

# 機能性関与成分ガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)定量試験方法

以下の試験法は、雪印メグミルク試験検査法に準拠している。

## 1. 培地および試薬

### (1) 希釈液の調製

試料の希釈には改変 A 希釈液を使用する。調製方法は以下の通り

表1. 改変 A 希釈液組成

希釈液成分	/1,000ml
リン酸二水素カリウム(和光純薬(株)製 特級)	4.5g
リン酸水素ナトリウム(和光純薬(株)製 特級)	6.0g
L-システイン塩酸塩(和光純薬(株)製 特級)	0.5g
Tween80(関東化学(株)製 特級)	0.5g
Bacto Agar(Difco 社製)	0.5g

- ① イオン交換水に 1,000ml に Tween80 を溶解する。完全溶解後にリン酸二水素カリウム、リン酸水素ナトリウム、L-システイン塩酸塩を完全溶解する。
- ② Bacto Agar を加え攪拌する(加熱していないので分散するのみ)。この時点で水溶液の pH が 6.8~7.0 であることを確認する。
- ③ オートクレーブ等で 105°C、30 分間処理し、寒天を溶解させる。寒天が溶解しているうちに、試験管に 9.0ml ずつ分注、オートクレーブ等で 121°C、15 分間滅菌処理する。

### (2) ガセリ菌用選択培地の調製

ガセリ菌を選択的に計数するには MRS/CL/CIP 寒天培地を使用する。同培地は MRS 寒天培地にクリンダマイシンおよびシプロフロキサシン(いずれも抗生物質)を添加したものであり、ISO20128(IDF192)において *Lactobacillus acidophilus* 計数用の培地として認定されている。適宜希釈した試料を MRS/CL/CIP 寒天培地に平板塗布し培養する。MRS/CL/CIP 寒天培地の調製方法は以下の通り。

表2. MRS/CL/CIP 培地組成

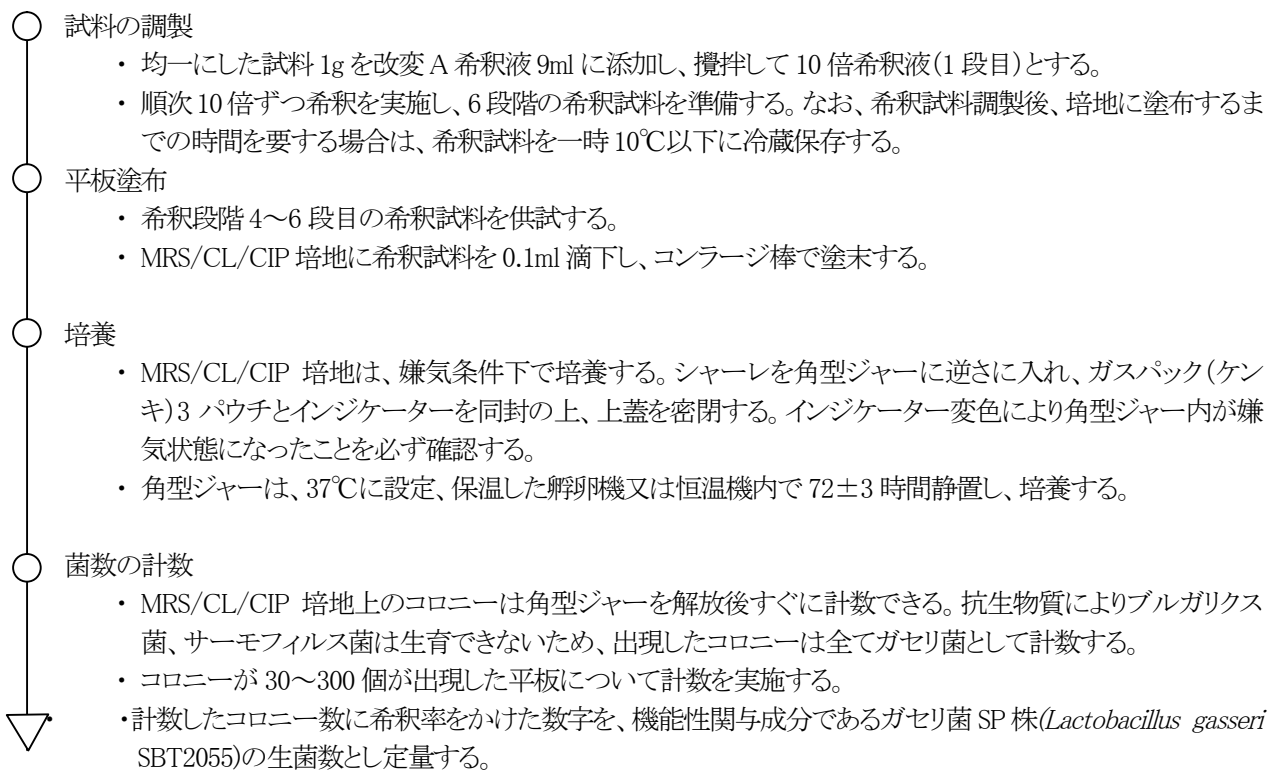
培地成分	/1,000ml
MRS 寒天培地(Difco 社製)	70.0g

- ① イオン交換水に MRS 寒天培地を溶解する(加熱していないので寒天は分散するのみ)。
- ② オートクレーブ等で 121°C、15 分間滅菌処理する。
- ③ 44~48°C に冷却後、クリンダマイシン溶液(0.2 mg/ml) 0.5ml、シプロフロキサシン溶液(2 mg/ml) 5ml を添加、混合後すぐに 15~20ml ずつ滅菌シャーレに分注して平板とする。

## 2. 器具および装置

- ・ 滅菌シャーレ
- ・ 滅菌ピペット :2ml、10ml。
- ・ 滅菌コンラージ棒
- ・ 角型ジャー :気密性が確保されるストッパー付きプラスチック容器、容量約 5L。
- ・ ガスパック(ケンキ) :三菱ガス化学(株)製「アネロパックケンキ」。使用方法は説明書に従う。
- ・ インジケーター :BBL 社製「Dry Anaerobic Indicator Strips」
- ・ 孵卵機、又は恒温機 :37°C で使用できるもの。

### 3. 培養方法



以上

## 【補足資料】

### 1. 当該商品の届出添付資料に於いて、ガセリ菌の特異的な測定が可能とする理由

本届出の「機能性関与成分ガセリ菌 SP 株 (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) 定量試験方法」は、アシドフィルス類縁菌 (アシドフィルス菌、ガセリ菌、ジョンソニイ菌、クリスパタス菌) を選択的に測定できる国際標準試験法 ISO20128/IDF192 に準じている。

本試験法では、アシドフィルス菌は、ガセリ菌、ジョンソニイ菌、クリスパタス菌と非常に近縁であり本方法では区別できないため、仮定としてアシドフィルス菌についてのみ述べられている旨が記載されている。したがって、本試験法ではアシドフィルス類縁菌 (アシドフィルス菌、ガセリ菌、ジョンソニイ菌、クリスパタス菌) を選択的に測定できることになる。

一方、当該届出商品は殺菌した脱脂乳等の混合液に [REDACTED] を添加し製造しているが、上記によると、本試験法で測定できる菌種はガセリ菌のみである。したがって、本試験法を用いて当該届出食品を測定した場合は、ガセリ菌のみが生育し特異的に測定される。

なお、当社が把握する限りでは、ガセリ菌のみを選択的に測定できる培地は見当たらない。以上のことから、当該届出食品におけるガセリ菌 SP 株の定量に本試験法を使用することは妥当と考える。

また、本試験法を用いてガセリ菌を定量している査読付きの学術論文<sup>1)</sup>が認められることから、本試験法をガセリ菌の定量に用いることは妥当であると考ええる。

- 1) Kalinka Baltova et., al, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28, No.6, 1084-1088(2014)

### 2. 当該商品の届出添付資料における測定方法にて生育したコロニーがガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)であることが確認できる理由

ガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)、サーモフィルス菌、ブルガリクス菌を加え発酵させた発酵乳を用いて、本測定方法にて生育したコロニーがガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)であることを、コロニー形態と遺伝学的な観点から下記のように確認した。

#### <コロニー形態による定性確認>

ガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)のコロニーは、当該培地にて選択的に生育する他の菌とは異なり、白色かつ円形で、周縁部は波状を示す。また、大きさは直径 2~3mm で表面は円滑である。当該特徴と形状見本 (添付資料 1) に基づきガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)であることを判定した。

#### <PCR 法を用いた遺伝学的試験>

生育したコロニーがガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)であることを、特開 2013-226077 (添付資料 3) に記載のガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)特異的プライマーを用いて、遺伝学的に確認した。以下に詳細を記載する。

PCR 反応液には、Go Taq Hot Start Green Master Mix(Promega)を用いた。そこに各プライマー $0.5 \mu\text{M}$ と菌株から抽出した鋳型 DNA  $1 \mu\text{l}$ を入れ、滅菌水で全量を  $20 \mu\text{l}$ とした。PCR 条件は、 $94^{\circ}\text{C}$ (5 分間)変性後、 $94^{\circ}\text{C}$ (20 秒間)、 $60^{\circ}\text{C}$ (20 秒間)、 $72^{\circ}\text{C}$ (50 秒間)で 30 サイクル、最後に  $72^{\circ}\text{C}$ (7 分間)である。

PCR 後、得られた DNA 断片を、2%アガロースゲルを用いた電気泳動に供してバンドパターンを確認した。その結果、生育したコロニーがガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)であることを示す、単一のバンドが見られた (添付資料 2)。このことから、形成されたコロニーはガセリ菌 SP 株であることが確認できた。

ガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)特異的プライマーの配列

配列表配列番号①

GCCTTATTGCTATTCCATGC (フォワードプライマー)

配列表配列番号⑥

AAGTTAAATGCGGAAGCTGG (リバースプライマー)

#### <出願済み特許(特開 2013-226077) 概要>

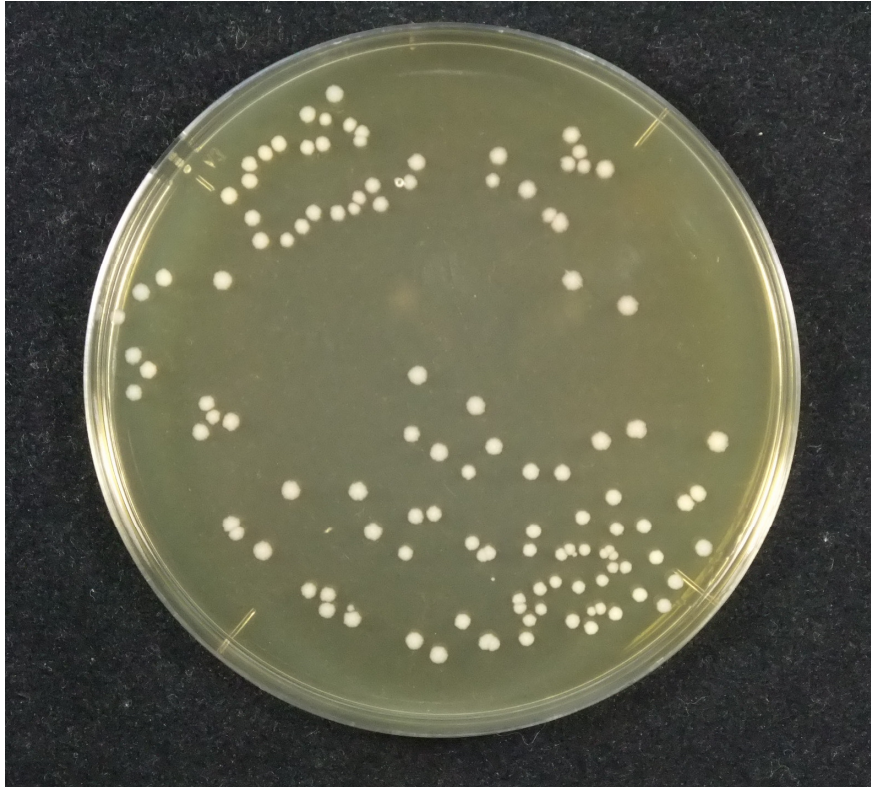
ガセリ菌 SP 株 (ラクトバチルス・ガセリ SBT2055) に特異的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法を行うことで、ガセリ菌 SP 株を迅速かつ簡便に確認できる。

#### <添付資料>

- 1) ガセリ菌 SP 株(*Lactobacillus gasseri* SBT2055)コロニー見本
- 2) ガセリ菌 SP 株 (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) の菌株特異的プライマーを用いた PCR 法 (特開 2013-226077) で得られた DNA 断片の電気泳動結果
- 3) 出願済み特許(特開 2013-226077)

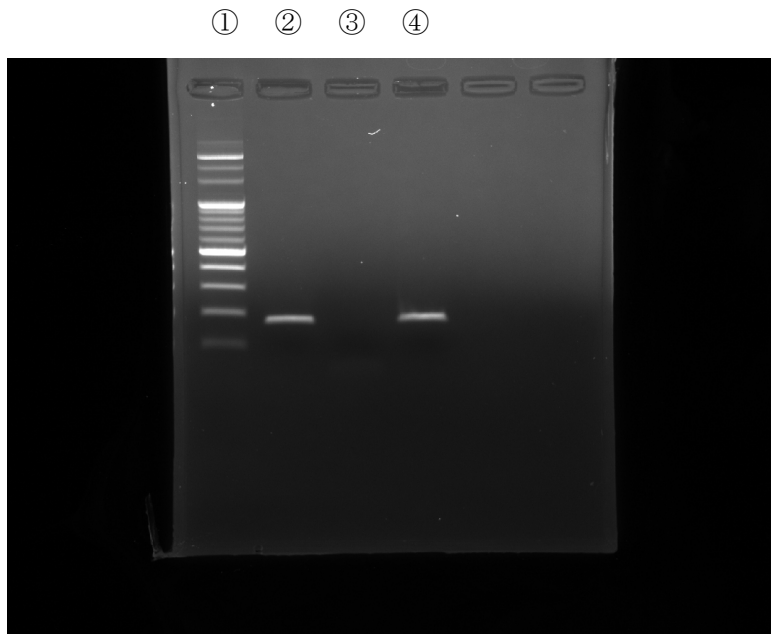
添付資料. 1

ガセリ菌 SP 株 (*Lactobacillus gasser* SBT2055) コロニー見本



添付資料. 2

ガセリ菌 SP 株 (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) の菌株特異的プライマーを用いた PCR 法 (特開 2013-226077) で得られた DNA 断片の電気泳動結果



レーン①：マーカー

レーン②：ガセリ菌 SP 株 (*Lactobacillus gasseri* SBT2055)

レーン③：JCM1131 株 (*Lactobacillus gasseri* 基準株)

レーン④：サーモフィルス菌、ガセリ菌 SP 株、ブルガリクス菌を加え発酵させた発酵乳を、届出資料「機能性関与成分ガセリ菌 SP 株 (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) 定量試験方法」に準じて培養し、生育した単一コロニー

添付資料. 3

出願済み特許(特開 2013-226077)

次頁以降に記載。

以上

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2013-226077**

**(P2013-226077A)**

(43) 公開日 **平成25年11月7日(2013.11.7)**

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 19 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2012-100848 (P2012-100848)</p> <p>(22) 出願日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)</p>	<p>(71) 出願人 711002926 雪印メグミルク株式会社 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号</p> <p>(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所</p> <p>(72) 発明者 藤原 ひとみ 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内</p> <p>(72) 発明者 上西 寛司 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内</p> <p>Fターム(参考) 4B024 AA05 AA11 CA01 HA14 4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ42 QR32 QR39 QR55 QR62 QR75 QS25 QS34 QX02</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 ラクトバチルス・ガセリの検出および／または定量用オリゴヌクレオチド

(57) 【要約】

【課題】ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) を、迅速かつ簡便に検出できる、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含むプライマーセットの提供、ならびに、これらを利用するラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の検出方法、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の定量方法を提供する。

【解決手段】ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) に特異的な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを設計した。これらを用い、P C R 法、定量的 P C R 法などを行うことにより、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) を特異的に検出し、また、定量する方法を提供した。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列表配列番号1～10のいずれかに示される塩基配列を含む、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチド。

## 【請求項2】

請求項1記載のいずれかのオリゴヌクレオチドを含む、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用キット。

## 【請求項3】

配列表配列番号1～5のいずれかに示される塩基配列を含むラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドと、配列表配列番号6～10のいずれかに示される塩基配列を含むラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドをプライマーとして、これらを組み合わせて得られるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用プライマーセット。

10

## 【請求項4】

請求項3に記載のプライマーセットを含む、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用キット。

## 【請求項5】

請求項1に記載のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチド、または、請求項3に記載のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用プライマーセットを用いることにより、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を検出するラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法。

20

## 【請求項6】

PCR法によりラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を検出する、請求項5に記載のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法。

30

## 【請求項7】

請求項1に記載のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチド、または請求項3に記載のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用プライマーセットを用いることにより、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を定量するラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の定量方法。

## 【請求項8】

定量的PCR法によりラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を定量する、請求項7に記載のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の定量方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、プロバイオティクスとして整腸作用や内臓脂肪蓄積抑制作用など様々な効果を有するラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を検出するためのラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含むプライマーセットに関するものである。また、これらを用いたラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法、定量方法に関するものである。

50



## 【背景技術】

## 【0002】

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) は、ヒト腸管細胞に高い親和性を有し、経口で投与した時、生存して腸管内に到達し、長期間腸管内に常在することが可能である。また、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) は、腸管に長く留まって腸内環境を整え、便通を改善することが知られている。さらに、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) は血中コレステロール低下作用や、内臓脂肪蓄積抑制作用など、様々な健康効果を有するプロバイオティクス乳酸菌である。

## 【0003】

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を含む発酵乳やチーズなどの食品において、プロバイオティクスとしてこれら菌株の菌数を確保することが重要である。また、ヒトやマウスなどの実験動物の腸内において、摂取したラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を正確に識別し、菌数を把握することも、菌の有効性を評価する上で重要である。したがってラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を迅速かつ簡便に測定することが求められる。

## 【0004】

特にヒトの腸内には、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) と同属同種の乳酸菌ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) が高頻度で検出されることが報告されており、これらの菌株と摂取したラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) とを区別して検出、定量することが求められる。

## 【0005】

従来、生物試料中や環境中の菌の同定には、菌を培養し、菌形やグラム染色などの形態観察、糖の発酵性や酵素活性などの生化学検査などにより行われてきた。しかし、これらの手法では、培養に時間がかかることや熟練の技術が要求されるなど、多くの問題があった。また近年、検出対象とする菌によって様々な選択培地が開発・販売されているが、同属同種の似た性質をもつ菌が混在する試料中で特定の菌株だけを特異的に検出できる培地を作ることは困難であった。

## 【0006】

一方で、近年、ポリマーゼ連鎖反応 (PCR) 法によって特定の微生物を検出する方法が報告されている。これまでに実施されている PCR 法による菌の識別法は、16S リボソーム RNA 遺伝子や 23S リボソーム RNA 遺伝子などに由来する特定遺伝子領域を用いるものが多い。特に 16S リボソーム RNA 遺伝子は原核生物に普遍的に存在し、属および菌種間に共通な塩基配列があるため、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列を基準株と比較して種を決定することができるなど、菌種の同定には有効である。しかしながら、この識別法についても同属同種の異株間の識別は困難であった。

## 【0007】

近年、定量的 PCR 法によって、ある特定の菌を簡便に定量する方法も報告されている (特許文献 1、2)。

## 【0008】

また、菌株の識別方法として、制限酵素によって切断した染色体 DNA の電気泳動パターンの違いを識別する Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 法 (非特許文献 1) や、ランダムに設定した 10 塩基程度のオリゴヌクレオチドを用いて PCR 法を行い、増幅された PCR 産物の電気泳動パターンを比較する Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法 (非特許文献 2) などが報告されている。

## 【0009】

なお、RAPD 法によって得られた、ある特定の菌株に特異的なバンドの塩基配列を用

10

20

30

40

50

いて該菌株を特異的に検出するプライマー（非特許文献3、4）や、ある菌株に多く含まれるIS配列を利用した特異的検出プライマー（特許文献3）などが報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2006-149400号公報

【特許文献2】特開2007-20423号公報

【特許文献3】特開2008-86285号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】腸内細菌学雑誌、19、193-198

【非特許文献2】Letters in Applied Microbiology, 35, 370-374

【非特許文献3】International Journal of Food Microbiology, 126, 210-215

【非特許文献4】Journal of Applied Microbiology, 110, 209-217

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

特許文献1、2には、定量的PCR法によって、ある特定の菌を簡便に定量する方法が開示されているが、これらの方法も属や種レベルで菌数を定量するものであり、菌株レベルで菌数を定量する簡便な方法は開示されていない。

また、非特許文献1、2に開示されているRFLP法やRAPD法は、いずれも定量性がなく、RFLP法は、精度は高いが工程が複雑で時間がかかること、RAPD法は迅速な検出が可能であるが、使用する機器によって結果が異なることや再現性が劣るなどの問題がある。

さらに、非特許文献3、4および特許文献3の方法は、対象とする各菌株を特異的に検出するものであるが、ラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）に関する方法は開示されていない。

本発明は、ラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）を特異的に迅速かつ簡便に検出できるラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）検出および／または定量用オリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含むプライマーセットを提供することを目的とするものである。さらに、本発明は、これらを利用したラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）の検出方法、ラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）の定量方法を提供することを目的とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

上記目的を達成するため、本発明者らは鋭意検討した結果、ラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）に特異的な塩基配列を見出し、これを含むオリゴヌクレオチドを設計した。そして、このオリゴヌクレオチドまたはこれらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして組合せたプライマーセットを用いることでラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）を特異的に検出でき、また、定量できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】

すなわち本発明は、以下の(1)～(8)に示される、ラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）検出および／または定量用オリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドを含むプライマーセット、ラクトバチルス・ガセリSBT2055（FERM BP-10953）の検出方法、または定量方法に関する。

10

20

30

40

50

(1) 配列表配列番号1～10のいずれかに示される塩基配列を含む、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチド。

(2) 上記(1)に記載のいずれかのオリゴヌクレオチドを含む、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用キット。

(3) 配列表配列番号1～5のいずれかに示される塩基配列を含むラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドと、配列表配列番号6～10のいずれかに示される塩基配列を含むラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドをプライマーとして、これらを組み合わせて得られるラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用プライマーセット。

10

(4) 上記(3)に記載のプライマーセットを含む、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用キット。

(5) 上記(1)に記載のラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチド、または、上記(3)に記載のラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用プライマーセットを用いることにより、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) を検出するラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法。

20

(6) PCR法によりラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) を検出する、上記(5)に記載のラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法。

(7) 上記(1)に記載のラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチド、または上記(3)に記載のラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用プライマーセットを用いることにより、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を定量するラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の定量方法。

(8) 定量的PCR法によりラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を定量する、上記(7)に記載のラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の定量方法。

30

【発明の効果】

【0015】

本発明により、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) を迅速かつ簡便に検出することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の特異的検出における、PCR法による増幅産物の確認結果を示した図である(実施例2)。

40

【図2】ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用プライマーセットの検討における、PCR法による増幅産物の確認結果を示した図である(実施例3)。

【図3】ヒトの腸内におけるラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の特異的検出における、PCR法による増幅産物の確認結果を示した図である(実施例4)。

【図4】ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の定量(定量的PCR法)における、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の増幅曲線を示した図である(実施例6)。

【図5】ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953) の定量

50

(定量的PCR法)における、検量線を示した図である(実施例6)。

【図6】ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)の定量(定量的PCR法)における、増幅産物の解離曲線を示した図である(実施例6)

【図7】ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)の定量(定量的PCR法)により測定したマウス腸内のラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)の菌数を示した図である(実施例6)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明のラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)検出および/または定量用オリゴヌクレオチドは、これらのラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)に近縁の菌株を認識することなく、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)を特異的に認識し、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)を特異的に検出し、定量できるオリゴヌクレオチドとなる。

10

【0018】

上記のオリゴヌクレオチドは、以下の方法で設計した。

まずラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)とガセリ菌の基準株の全ゲノム配列(ACCESION No. CP000413)を比較し、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)の有するDNAのうちガセリ菌の基準株にはない配列部分を抽出した。これらの配列と、これらの配列に隣接するガセリ菌の基準株に存在する配列部分との間でいくつかオリゴヌクレオチドを作成した。通常のPCR条件で増幅可能であること、他の領域では増幅断片が生じない配列であることに加え、定量的PCRにも適用可能な100~300bpの長さの増幅領域でかつTm値が55~65℃の範囲内になるよう設計を行った。

20

【0019】

得られた配列をDDBJ(DNA Data Bank of Japan)でBLAST検索し、リバーズ側がガセリ菌の他の株と相同性の高い配列であるオリゴヌクレオチドは除いた。また同属同種の近縁株10株を用いてPCRを行い、これらのオリゴヌクレオチドからなるプライマーの組合せがラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)でのみ特異的に検出されることを確認した。なお、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)に近縁のラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasserii)菌として、ラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasserii)に属する乳酸菌のうち、独立行政法人理化学研究所の公開菌株であるラクトバチルス・ガセリ(Lactobacillus gasserii)JCM1131、JCM1025、JCM1031、JCM1130、JCM5344、JCM5813、JCM8787、JCM8788、JCM8789、JCM8790などをあげることができる。

30

【0020】

本発明のラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)検出および/または定量用オリゴヌクレオチドは、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)のDNAに特異的な塩基配列を含み、試料などに含まれるラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)を特異的に検出および/または定量できるオリゴヌクレオチドのことをいう。

40

ここでラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)のDNAに特異的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとは、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)のDNAを特異的に認識し得る塩基配列からなるオリゴヌクレオチドのことをいう。

ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-10953)のDNAを特異的に認識し得る塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであれば良く、このようなオリゴヌクレオチドとして、ラクトバチルス・ガセリSBT2055(FERM BP-109

50

53) の DNA に特異的に含まれる塩基配列からなるオリゴヌクレオチドがあげられるが、このようなラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の DNA に特異的に含まれる塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと実質的に相同な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであってもよい。

#### 【0021】

例えば、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の DNA に含まれる特異的な塩基配列と 80% 以上の同一性を有する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、85% 以上の同一性を有する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、90% 以上の同一性を有する塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、95% 以上の同一性を有する塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであって、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の DNA を特異的に認識し得る塩基配列からなるオリゴヌクレオチドなどがあげられる。

10

これらのオリゴヌクレオチドが、試料中のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を特異的に認識し得る程度の相同性を有していればよく、共存する菌株によっては、オリゴヌクレオチドの配列が数塩基程度異なっても PCR 条件などを変えることによって特異性を示せれば、本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドとして構わない。

#### 【0022】

このような、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の DNA に特異的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとして、配列表配列番号 1~10 のいずれかに示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドがあげられる。また、これらの塩基配列に相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドなども含まれる。

20

本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドは、このような配列表配列番号 1~10 のいずれかに示される塩基配列を一つ以上含むオリゴヌクレオチドであればよく、これらの塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを 2 つ以上の複数含むものであってもよい。

本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドは、独自に設計し合成したものであってもよく、DNA 合成業者に合成を委託したものであってもよい。

30

#### 【0023】

本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドは、試料などに含まれるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出、定量のためのいずれの方法にも使用できるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

例えば、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 由来の DNA を鋳型とした PCR 法や、定量的 PCR 法に使用することができ、また、FISH 法やサザンハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーションにおいてプローブなどとして使用できるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。

#### 【0024】

40

ここで、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出、定量に用いる試料としては、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) が存在し得る試料であればいずれのものであってもよく、例えば乳酸菌の混合培養物やヨーグルトやチーズなどの微生物を含む食品、マウスやラットなどの実験動物やヒトの糞便などを試料とすることができる。

#### 【0025】

これらの試料から核酸を抽出する方法は、例えば、Lysozyme などの酵素やビーズなどで物理的に細胞を破壊して抽出する方法、また極東製薬工業株式会社の MORAE XTRACT などの市販の抽出キットを使用することもでき、特に限定されるものではない。

50

## 【0026】

本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用キットとは、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを1つ以上含み、試料などに含まれるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を検出するためのキット、定量するためのキット、または検出および定量するためのキットのことをいう。

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチド以外に、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出、定量に必要な試薬などを含んでいても良い。

10

## 【0027】

本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用プライマーセットとは、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドをプライマーとして2つ以上組合せた、試料などに含まれるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を検出するためのプライマーセット、定量するためのプライマーセット、または検出および定量するためのプライマーセットのことをいう。

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドをプライマーとして、2つ以上組合せたプライマーセットであればよいが、例えば、配列表配列番号1～5のいずれかに示される塩基配列を含むラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドから1つ以上をフォワードプライマーとして選択し、配列表配列番号6～10のいずれかに示される塩基配列を含むラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 用オリゴヌクレオチドから1つ以上をリバースプライマーとして選択し、これらを組合せてプライマーセットとしたものなどが好ましい。

20

## 【0028】

本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法は、本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを用いて行う検出方法、またはラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用プライマーセットを用いて行う検出方法であれば、従来知られるいずれの検出方法を用いても良い。

30

このような検出方法として、PCR法、FISH法、サザンハイブリダイゼーションやドットハイブリダイゼーションなどをあげることができる。

このうち、PCR法によるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出方法では、本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを用いる以外は、通常用いられるいずれのPCR試薬および機器を使用することも可能であり、特に限定されるものではない。

40

PCR反応条件については、使用する試薬や装置などに応じて、適宜設定すればよいが、例えば、94℃5分変性後、94℃20秒、55℃または60℃20秒、72℃50秒で30サイクル、最後に72℃7分反応させるなどがあげられる。このPCR反応条件は、PCR法に関する基本的な知識を有していれば、試料などに応じて調整することは容易に行えるため、特に限定されるものではない。

## 【0029】

また、PCR法によって得られた増幅産物は、通常用いられるPCR産物の確認方法で確認することができる。例えば、アガロースゲルなどにPCR反応サンプルおよび所定のサイズマーカーをアプライして一定時間ゲル電気泳動を行い、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドなどの染色液で染色した後、UV照射などでPCR法での増幅産物の有無

50

および断片サイズを確認することができる。

【0030】

本発明のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の定量方法は、本発明のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを用いて行う定量方法、またはラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用プライマーセットを用いて行う定量方法であれば、従来知られるいずれの方法を用いても良い。

このような定量方法として、定量的 P C R 法などをあげることができる。

定量的 P C R 法によるラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の定量方法では、本発明のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを用いる以外は、通常用いられる定量的 P C R 用の試薬および機器を使用することも可能であり、特に限定されるものではない。

例えば、A p p l i e d b i o s y s t e m s 社の P o w e r S Y B R (登録商標) G r e e n P C R M a s t e r M i x など市販の試薬を用いることができる。またあらかじめ菌数を測定してから抽出を行ったラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の D N A を段階希釈して検量線を作成することにより、サンプル中の未知のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の菌数を求めることもできる。

【0031】

本発明のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用プライマーにより、例えば、P C R 法によって増幅産物が確認された場合、単一の菌のみであればその菌株がラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) であることが同定できる。またヨーグルトやチーズなどの食品や糞便など、複数の菌株が共存する試料中であれば、試料中にラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) が存在していることが判別できる。さらに定量的 P C R 法を行うことにより、試料中のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の菌数も定量可能である。

【0032】

したがって本発明のラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを用いることにより、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) を容易に判別することができる。また、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の菌体または同菌体を含む飲食品などを工業的に製造するに際し、菌数の測定や発酵状態の管理を容易に行うことができる。さらに、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることにより、実験動物やヒトの腸内における当該菌数を把握することができる。

本発明は、通常の P C R 法によって、検出、定量が可能であるため、特殊な技術を必要とせず、精度および再現性がよい。また、ある特定の塩基配列をターゲットして検出を行うため、生菌だけでなく、死菌も含めたラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) の検出、定量が可能となる。

【0033】

以下に、本発明の実施例などをあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0034】

[実施例 1]

1. ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9 5 3 ) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドの設計

以下の方法により、ラクトバチルス・ガセリ S B T 2 0 5 5 ( F E R M B P - 1 0 9

10

20

30

40

50

53) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドを設計した。

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) のゲノム配列とラクトバチルス・ガセリの基準株 (ACCESION No. CP000413) のゲノム配列を比較し、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の有するゲノム配列のうちラクトバチルス・ガセリの基準株にはないゲノム配列部分の塩基配列を抽出した。これらの塩基配列と、これらの塩基配列に隣接するラクトバチルス・ガセリの基準株に存在する部分の塩基配列との間でいくつかオリゴヌクレオチドを設計した。

これらのオリゴヌクレオチドは、通常の PCR 条件で増幅可能であること、他のゲノム配列の領域では増幅断片が生じない塩基配列であることに加え、定量的 PCR 法にも適用可能な 100～300 bp の長さの領域を増幅でき、かつ、Tm 値が 55～65℃ の範囲内になるように設計した。

設計した各オリゴヌクレオチドの塩基配列を DDBJ (DNA Data Bank of Japan) で BLAST 検索し、ラクトバチルス・ガセリの基準株にはないゲノム配列の塩基配列に設計したオリゴヌクレオチドのうち、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 以外の菌株と相同性の高い塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを除いた。

#### 【0035】

また、これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとして組み合わせ、同属同種の近縁株 10 株を用いて PCR 法を行い、これらのオリゴヌクレオチドが、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) が有する塩基配列のみを特異的に増幅することを、次の実施例 2～実施例 5 により確認した。

このように設計された本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドは、表 1 に示される、配列表配列番号 1～10 のいずれか一種以上の塩基配列を含むオリゴヌクレオチドであった。また、これらの塩基配列と実質的に相同な塩基配列を含むオリゴヌクレオチドも、本発明のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および／または定量用オリゴヌクレオチドとなる。

#### 【0036】

##### 【表 1】

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出  
および／または定量用オリゴヌクレオチド

配列番号	塩基配列 (5' - 3')
1	GCCTTATTGCTATTCCATGC
2	TTATTGCTATTCCATGCAG
3	AACTTGATAAGGCTTATTGC
4	GGCTTATTGCTATTCCATG
5	AAGGCTTATTGCTATTCCATG
6	AAGTTAAATGCGGAAGCTGG
7	AGTTAAATGCGGAAGCTG
8	ATACCCACTTAGTCCATTTGAG
9	GATACCCACTTAGTCCATTTGAG
10	AGATACCCACTTAGTCCATTTGAG

#### 【0037】

##### [実施例 2]

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出



## 1. 供試菌株および培養条件

### 1) ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953)

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を MRS 液体培地で 37℃、16 時間培養し、培養菌体を得た。

### 2) 近縁株

ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*) に属するラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の近縁株である、次の (1) ~ (10) の 10 菌株について、それぞれ MRS 液体培地で 37℃、16 時間培養し、培養菌体を得た。

これらの菌株は、菌株の分譲機関である独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より入手した。菌株名の最後に「T」とつくものは、Type Strain (基準株) であることを示している。

(1) JCM1131T、(2) JCM1025、(3) JCM1031、(4) JCM1130、(5) JCM5344、(6) JCM5813、(7) JCM8787、(8) JCM8788、(9) JCM8789、(10) JCM8790

### 【0038】

## 2. DNA 抽出および PCR 法による検出

上記 1. の各菌株の培養菌体から Lysoszyme-SDS 法により DNA を抽出し、それぞれ鋳型 DNA とした。配列表配列番号 1 に記載のオリゴヌクレオチドをフォワードプライマー、配列番号 6 に記載のオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして PCR 法を行った。

PCR 反応液は、0.5 μM プライマー (フォワードプライマー/リバースプライマー)、鋳型 DNA 1 μl と、Tris-HCl buffer (pH 8.5)、Taq DNA polymerase、400 μM dNTP、4 mM MgCl<sub>2</sub>、を入れ、滅菌水で全量を 20 μl にした。

PCR 反応は、94℃ 5 分変性後、94℃ 20 秒、55℃ または 60℃ 20 秒、72℃ 50 秒で 30 サイクル、最後に 72℃ 7 分反応を行った。PCR 反応後、2% のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色により PCR 法で増幅した特異的なバンドを検出した。

### 【0039】

PCR 法による増幅産物の確認結果を図 1 に示した。その結果、図 1 の、1 に示したラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 由来の試料についてのみバンドが検出され、図 1 の 2 ~ 11 に示したラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 以外のラクトバチルス・ガセリ 10 株についてはバンドが検出されないことが確認できた。

したがって、この結果から、本発明の配列表配列番号 1 に記載のオリゴヌクレオチドおよび、配列番号 6 に記載のオリゴヌクレオチドを用いることにより、同属同種のラクトバチルス・ガセリに対し、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) のみを特異的に検出できることが示された。

### 【0040】

#### [実施例 3]

マウスの腸内におけるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の検出

8 週齢雄性 C57BL/6J マウス 10 匹に、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を含む AIN-76 組成に準じた飼料を 2 週間自由摂取させた後、それぞれのマウスの盲腸内容物より DNA を抽出した (C1-C10)。また、比較として、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を含まない飼料を 2 週間自由摂取させたマウス (10 匹) の盲腸内容物より DNA を抽出した (B1-B10)。

これらを鋳型 DNA として、配列表配列番号 1 に記載のオリゴヌクレオチドをフォー

10

20

30

40

50

ドプライマー、配列番号6に記載のオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして、実施例2と同様にPCR法を行った。

#### 【0041】

PCR法による増幅産物の確認結果を図2に示した。

その結果、図2に示されるように、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を投与した各マウス(C1-C10)においてはバンドが検出され、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を投与していない各マウス(B1-B10)においてはバンドが検出されなかった。

したがって、マウスにラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含む試料を投与することにより、マウスの腸内にラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を到達させることができ、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることにより、マウスの腸内に存在するラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を特異的に検出できることが確認できた。

10

#### 【0042】

##### [実施例4]

ヒトの腸内におけるラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)の検出

健康な成人(被験者A、被験者B)にラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)含有ヨーグルト100gを3日間摂取させた。その摂取前後の糞便からDNAをそれぞれ抽出し、鋳型DNAとした。なお、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含むヨーグルトを摂取前に、少なくとも3週間以上ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含む食品を摂取していない人を被験者とした。また、配列表配列番号1に記載のオリゴヌクレオチドをフォワードプライマー、配列番号6に記載のオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして、実施例2と同様にPCR法を行った。

20

#### 【0043】

PCR法による増幅産物の確認結果を図3に示した。

その結果、図3に示されるように、いずれの被験者においても、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含むヨーグルトを摂取した後でのみバンドが検出され、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含むヨーグルトを摂取する前ではバンドが検出されなかった。

30

したがって、この結果より、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含む飲食品を摂取することにより、ヒトの腸内にラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を到達させることができ、本発明のオリゴヌクレオチドを用いることにより、ヒトの腸内に存在するラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を特異的に検出できることが確認できた。

#### 【0044】

##### [実施例5]

ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)株検出および/または定量用オリゴヌクレオチドを含むプライマーセットの検討

40

実施例1にて設計したラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)検出および/または定量用オリゴヌクレオチドをプライマーとして、それぞれ表2に示した組み合わせでプライマーセットA~Hとし、以下の1)~6)のDNAを鋳型として、実施例2と同様の方法により、PCR法を行った。その結果を表3に示した。

#### 【0045】

鋳型DNA

1) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)

実施例2と同様の方法により、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)から抽出したDNAを鋳型DNAとした。

2) ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*) に属する

50

### 乳酸菌のDNA混合物

実施例2と同様の方法により、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)の近縁株(10菌株)からそれぞれ抽出したDNAを混合して鋳型DNAとした。

#### 【0046】

3) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)非投与群のマウスの盲腸内容物のDNA混合物

実施例3と同様の方法により、8週齢雄性C57BL/6Jマウス10匹に、AIN-76組成に準じた飼料を2週間自由摂取させた後、それぞれのマウスの盲腸内容物よりDNAを抽出し、これらを混合して鋳型DNAとした。

10

4) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)投与群マウスの盲腸内容物のDNA混合物

実施例3と同様の方法により、8週齢雄性C57BL/6Jマウス10匹に、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)を含むAIN-76組成に準じた飼料を2週間自由摂取させた後、それぞれのマウスの盲腸内容物よりDNAを抽出し、これらを混合して鋳型DNAとした。

#### 【0047】

5) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)含有ヨーグルト摂取前のヒト由来のDNA混合物

実施例4と同様の方法により、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)含有ヨーグルト100gを3日間摂取する前のヒト(n=2)の糞便から抽出したDNAを混合し、鋳型DNAとした。

20

6) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)含有ヨーグルト摂取後のヒト由来のDNA混合物

実施例4と同様の方法により、上記5)にて糞便を採取した後、ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)含有ヨーグルト100gを3日間摂取したヒト(n=2)から糞便を採取し、これから抽出したDNAを混合し、鋳型DNAとした。

#### 【0048】

##### 【表2】

30

組合せ	フォワードプライマー	リバースプライマー
A	配列番号1	配列番号6
B	配列番号1	配列番号8
C	配列番号1	配列番号9
D	配列番号1	配列番号10
E	配列番号2	配列番号7
F	配列番号3	配列番号7
G	配列番号4	配列番号8
H	配列番号5	配列番号8

40

#### 【0049】

その結果、表3に示したように、1) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)、4) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)投与群マウスのDNA混合物、6) ラクトバチルス・ガセリSBT2055 (FERM BP-10953)含有ヨーグルト摂取後のヒト由来のDNA混合物、を鋳型DNAとしてPCR法を行ったサンプルのみ、バンドが検出された。

したがって、この結果および、上記実施例1などの結果より、表1に示した配列表配列番号1~5のいずれか1つの塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをフォワードプライマー

50

とし、配列表配列番号6～10のいずれか1つの塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとして組合せたプライマーセットであれば、どのような組合せであってもラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を特異的に検出できることが確認できた。

【0050】

【表3】

組合せ	鋳型DNA					
	1)	2)	3)	4)	5)	6)
A	+	-	-	+	-	+
B	+	-	-	+	-	+
C	+	-	-	+	-	+
D	+	-	-	+	-	+
E	+	-	-	+	-	+
F	+	-	-	+	-	+
G	+	-	-	+	-	+
H	+	-	-	+	-	+

10

20

【0051】

[実施例6]

ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の定量 (定量的PCR法)

実施例4と同様の方法により、マウスにラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を投与した後、マウスの盲腸内容物より抽出したDNAを鋳型として定量的PCR法により、マウス腸内のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を定量した。配列表配列番号1に記載のオリゴヌクレオチドをフォワードプライマー、配列番号6に記載のオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとした。

30

【0052】

定量的PCR法は、Applied biosystems ViiA™7 Real-Time PCR System (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) を用いた。PCR反応液は、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems) を用い、プライマー (フォワードプライマー/リバースプライマー) 各0.25 μl、鋳型DNA 1 μlを入れ、滅菌水で全量を20 μlにした。

PCR反応は、94℃5分で変性後、94℃20秒、60℃20秒、72℃50秒で40サイクル行った。

検量線は、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) のDNAをPCR反応液あたり10<sup>1</sup>~10<sup>6</sup>個の菌数になるよう段階希釈したものを用いて作成した。またPCR反応後、0.2℃/sの温度勾配で60℃~95℃まで解離曲線解析を行い、反応の特異性を確認した。

40

【0053】

定量的PCR法により得られたラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の増幅曲線、検量線、増幅産物の解離曲線を図4、図5、図6に示した。図4より、PCR反応液あたりラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数が10<sup>1</sup>~10<sup>6</sup>個の範囲で増幅曲線が得られた。図5より、検量線もR<sup>2</sup>=0.998で直線性が得られた。図6より、増幅産物の解離曲線も76℃付近に単一のピークが得られ、非特異的な増幅産物はみられなかった。したがって、これらの

50

結果より、本発明のオリゴヌクレオチドからなるプライマーセットを用いることによって、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数が定量可能であることが確認できた。

#### 【0054】

定量的 PCR 法により測定したマウス腸内のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の菌数を図7に示す。図7において、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を投与しなかったマウスの腸内 (図7、ガセリ菌 SBT2055 非投与群) には、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) が存在していなかったが、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を投与したマウスの腸内 (図7、ガセリ菌 SBT2055 投与群) には、盲腸内容物 1g あたり  $1.2 \pm 0.2 \times 10^{10}$  個程度のラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) が存在することが確認できた。

10

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0055】

本発明の、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) 検出および/または定量用オリゴヌクレオチドを用いることにより、プロバイオティクス飲食品などに含まれるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) を迅速かつ簡便に検出し、定量することが可能となる。

また、この飲食品を摂取したヒトなどの体内におけるラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) の有無や菌体数を調べることにより、ラクトバチルス・ガセリ SBT2055 (FERM BP-10953) による効果を予測することが可能となる。

20

#### 【符号の説明】

#### 【0056】

[図1] 1: 鋳型 DNA が SBT2055 由来、2: 鋳型 DNA が JCM1131T 由来、3: 鋳型 DNA が JCM1025 由来、4: 鋳型 DNA が JCM1031 由来、5: 鋳型 DNA が JCM1130 由来、6: 鋳型 DNA が JCM5344 由来、7: 鋳型 DNA が JCM5813 由来、8: 鋳型 DNA が JCM8787 由来、9: 鋳型 DNA が JCM8788 由来、10: 鋳型 DNA が JCM8789 由来、11: 鋳型 DNA が JCM8790 由来、12: NC (ネガティブコントロール)、M: マーカー (100bp ladder)

30

[図3] 1: ガセリ菌 SBT2055 を含むヨーグルト摂取前 (被験者 A)、2: ガセリ菌 SBT2055 を含むヨーグルト摂取前 (被験者 B)、3: ガセリ菌 SBT2055 を含むヨーグルト摂取後 (被験者 A)、4: ガセリ菌 SBT2055 を含むヨーグルト摂取後 (被験者 B)、M: マーカー (100bp ladder)

#### 【受託番号】

#### 【0057】

[寄託生物材料への言及]

(1) *Lactobacillus gasseri* SBT2055

40

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

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

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1中央第6 (郵便番号305-8566)

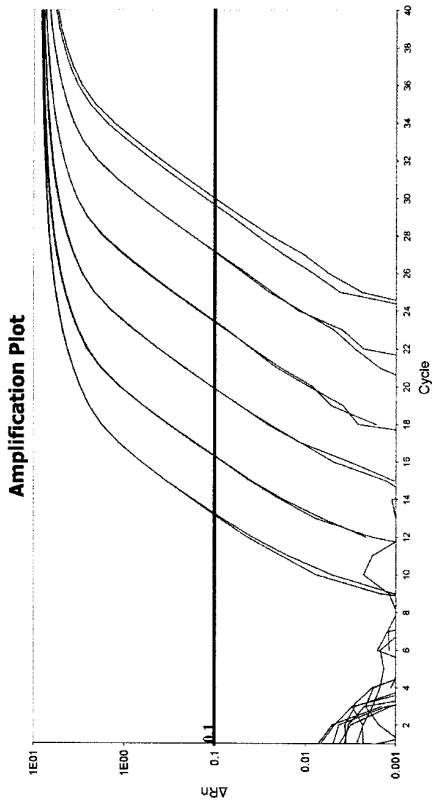
ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成8年3月27日

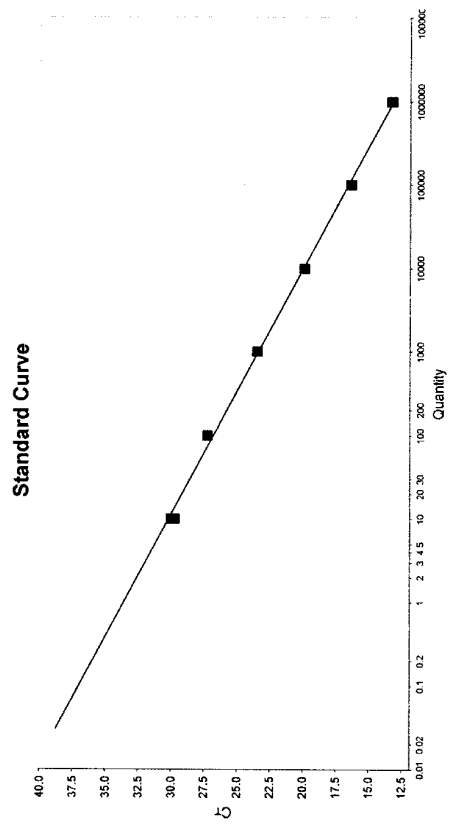
ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

FERM BP-10953

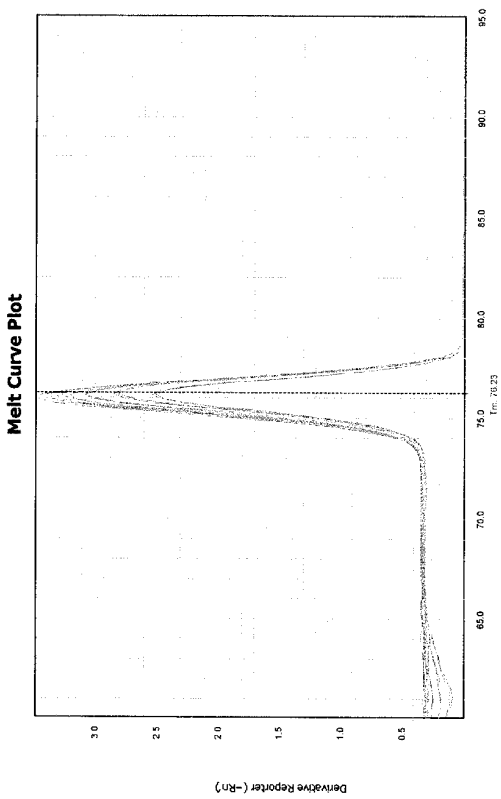
【 4 】



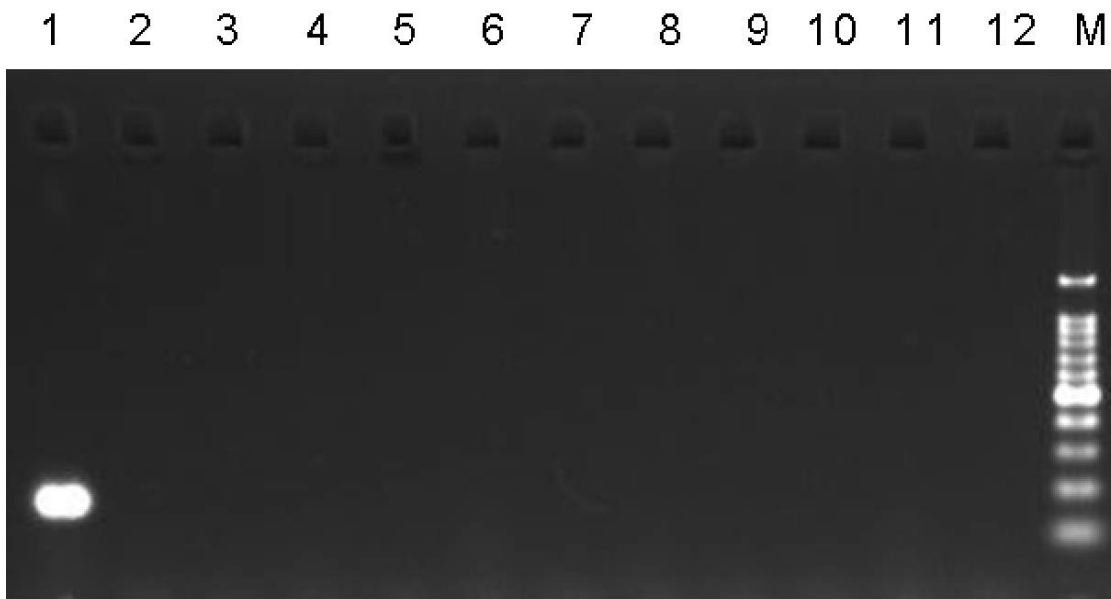
【 5 】



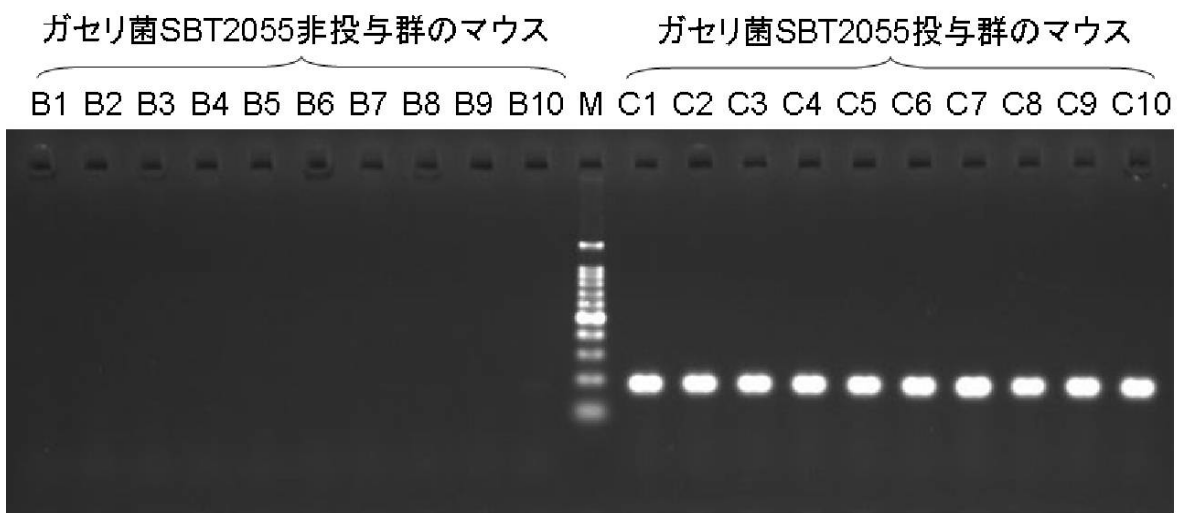
【 6 】



【図1】



【図2】

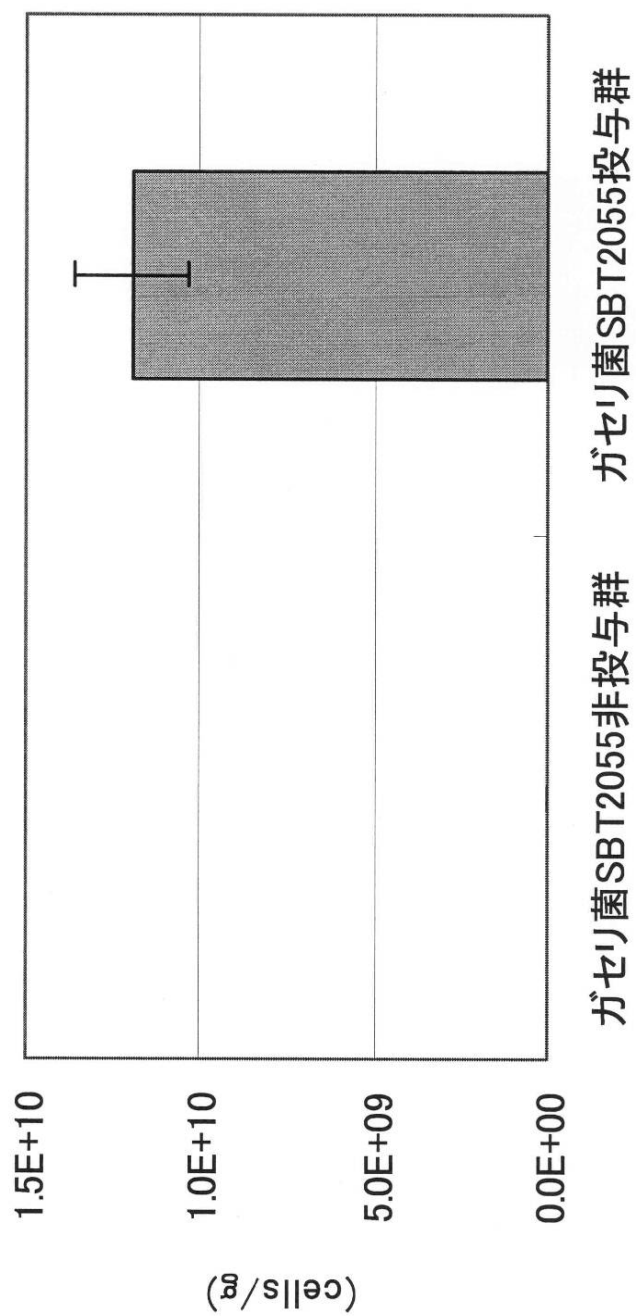


【図3】





【図7】



【配列表】

[2013226077000001.app](#)