

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6893885号
(P6893885)

(45) 発行日 令和3年6月23日(2021.6.23)

(24) 登録日 令和3年6月4日(2021.6.4)

(51) Int. Cl.	F I
A 2 3 L 33/135 (2016.01)	A 2 3 L 33/135
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
A 6 1 K 35/57 (2015.01)	A 6 1 K 35/57
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 K 35/741 (2015.01)	A 6 1 K 35/741

請求項の数 22 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-558357 (P2017-558357)	(73) 特許権者 516010799 インターナショナル ディハイドレーティ ッド フーズ, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ミズーリ 65806- 2523, スプリングフィールド, ピ ー. オー. ボックス 10347
(86) (22) 出願日 平成28年1月26日(2016.1.26)	
(65) 公表番号 特表2018-504928 (P2018-504928A)	(73) 特許権者 517260489 リンチ, ステファニー アメリカ合衆国 ミズーリ 65804, スプリングフィールド, イースト メ ドメア ストリート 1455
(43) 公表日 平成30年2月22日(2018.2.22)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/014825	
(87) 国際公開番号 W02016/123053	
(87) 国際公開日 平成28年8月4日(2016.8.4)	
審査請求日 平成31年1月28日(2019.1.28)	
(31) 優先権主張番号 62/108,008	
(32) 優先日 平成27年1月26日(2015.1.26)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロス組成物およびプロバイオティクスとしてのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

個体中の1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させるための組成物であって、前記組成物は、前記個体に、前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させるのに有効な量で投与されることを特徴とし、前記組成物が家禽の骨または軟骨から、前記家禽の骨または軟骨を、250°F超の温度で6時間超にわたって調理するステップを含むプロセスによって調製され、前記組成物が、前記家禽の骨または軟骨からの可溶性コラーゲン繊維を少なくとも20% (w/w 固体ベースで) 含む、組成物。

【請求項2】

前記組成物が、全固体の重量で少なくとも40%のタンパク質を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記組成物が、全固体の重量で10%未満の炭水化物を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記組成物が、少なくとも14日間にわたり毎日、前記有効な量で前記個体に投与されることを特徴とする、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

前記プロバイオティクスを増強させるのに有効な量が、前記個体に投与された場合、前記個体の消化器系内の前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を増加させ

10

20

る前記組成物の量である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記投与が、前記個体の消化器系内の微生物多様性を増大させる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記個体が、前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌の数を増大させることを必要とすると特定されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が前記個体に前記有効な量で少なくとも 14 日間にわたり毎日投与された後、前記個体の消化器系内の前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数が測定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌が乳酸産生細菌を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記組成物が、前記組成物を受けていない比較可能な個体と比較して、前記個体の消化器系内の前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を増大させ、前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌が、*Parasutterella*、*Morganelia*、*Oscillospira*、*Faecalibacterium* およびそれらの組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つのメンバーを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 11】

前記個体が、前記組成物の投与の前にプロバイオティック補充物を定期的に摂取し、ここで前記投与が、前記個体がプロバイオティック補充物を定期的に摂取する必要性を排除する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記投与が、前記個体の腸の上部セクションおよび/または中間部セクションの 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を増大させ、前記少なくとも 1 つのプロバイオティック細菌が、*Lactobacillus*、*Coprococcus*、*Oscillibacter*、*Odoribacter*、*Gastranaerophilales*、*Faecalibacterium*、*Allabaculum* およびそれらの組合せからなる群より選択される少なくとも 1 つのメンバーを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 13】

前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌が、*Lactobacillus* 細菌を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記 1 つまたは複数のプロバイオティック細菌が、*Lactobacillus rhamnosus* を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

前記組成物が、前記組成物の全アミノ酸のうちの重量で少なくとも 7% (w/w) のヒドロキシプロリンを含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 16】

前記組成物が、アミノ酸のグリシン、プロリンおよびヒドロキシプロリンを含み、グリシンが前記組成物の全アミノ酸の少なくとも 12% (w/w) を構成し、プロリンが少なくとも 8% (w/w) を構成し、ヒドロキシプロリンが少なくとも 7% (w/w) を構成する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

前記組成物が、検出可能な量のグルテンを含有しない、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 18】

前記プロセスが、

(a) 水の中でニワトリの小片を、70 ~ 150 の間の温度で約8分間~約24時間調理するステップであって、前記ニワトリの小片がニワトリ全体またはニワトリの部分から調製される、ステップと、

(b) ステップ(a)から不溶性物質(insoluble)を除去して液体形態の前記組成物を得るステップと

をさらに含む、請求項1~17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

プロバイオティック細菌を培養する方法であって、培地上で前記プロバイオティック細菌を成長させるステップを含み、前記培地が家禽の骨または軟骨から、前記家禽の骨または軟骨を、250°F超の温度で6時間超にわたって調理するステップを含むプロセスによって調製されたプレバイオティック組成物を含み、前記プレバイオティック組成物が家禽の骨または軟骨から調製された可溶性コラーゲン繊維を含む、方法。

10

【請求項 20】

前記プロセスが、

(a) 水の中でニワトリの小片を、70 ~ 150 の間の温度で約8分間~約24時間調理するステップであって、前記ニワトリの小片がニワトリ全体またはニワトリの部分から調製される、ステップと、

(b) ステップ(a)から不溶性物質を除去して液体形態の前記組成物を得るステップと

をさらに含む、請求項19に記載の方法。

20

【請求項 21】

プロバイオティック細菌を必要とする個体に投与するための組成物であって、可溶性コラーゲン繊維を含み、前記組成物が家禽の骨または軟骨から、前記家禽の骨または軟骨を、250°F超の温度で6時間超にわたって調理するステップを含むプロセスによって調製され、前記可溶性コラーゲン繊維が前記家禽の骨または軟骨から調製される、組成物。

【請求項 22】

前記プロセスが、

(a) 水の中でニワトリの小片を、70 ~ 150 の間の温度で約8分間~約24時間調理するステップであって、前記ニワトリの小片がニワトリ全体またはニワトリの部分から調製される、ステップと、

(b) ステップ(a)から不溶性物質を除去して液体形態の前記組成物を得るステップと

をさらに含む、請求項21に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、2015年1月26日に提出された米国特許出願第62/108,008号(この全体の内容は、この出願に参考として援用される)への優先権を主張する。

40

【0002】

1. 発明の分野

本開示は、栄養補充物および食事補充物の分野ならびに微生物学の一般分野に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

微生物が、哺乳動物の消化管でコロニー形成することは公知である。一部の微生物は、宿主のためにある特定の利益を有する。これらの有益な微生物は、「プロバイオティック微生物」または「プロバイオティクス」としても公知である。有益な細菌(または「良い

50

」細菌)は、「プロバイオティック細菌」とも称される。一部のプロバイオティック微生物は、宿主の腸管内に天然に存在し得る。他は、食事補充物によって宿主中に導入され得る。

【0004】

「プレバイオティック」という用語は、一般に、プロバイオティック微生物(例えば細菌または真菌)の成長(したがって、生菌数(live count)またはCFU)または活性を誘発する物質を指す。しかし、全部ではないが、大部分のプレバイオティクスは、炭水化物ベースであり、種々の植物供給源からのグルテンを含有する可能性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0005】

本開示は、個体のマイクロバイオームを増強させるプレバイオティクスとして使用され得る家禽から調製された組成物を提供することによって、当該技術分野を進歩させる。より具体的には、一実施形態では、本開示のプレバイオティック組成物は、グルテンを含まない。

【0006】

一実施形態では、組成物は、ニワトリ、シチメンチョウまたは他の鳥類などの家禽から調製することができる。別の実施形態では、本開示の組成物は、他の動物供給源からの部分を使用して調製することができる。別の実施形態では、本開示の組成物は、プロス、ストック(stock)、抽出物または粉末の形態であってよい。

20

【0007】

別の実施形態では、個体に、家禽の部分から調製された有効量の組成物を投与することによって、個体における1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させるための方法を開示する。一態様では、有効量は、個体の少なくとも1つのプロバイオティック細菌を増強させるのに有効な量である。別の態様では、プロバイオティック細菌を増強させることは、健康を増進させる、または個体の消化管(または腸管)内のプロバイオティック細菌の生菌数(すなわち、コロニー形成単位またはCFU)を増大させることを意味する。個体における細菌のCFUは、直接的または間接的に測定することができる。直接測定は、これらに限定されないが、個体からの糞便試料中の細菌のCFUを測定することを含み得る。一態様では、メタゲノム配列カウントの方法を、試料中の細菌のCFUを測定するために使用することができる。

30

【0008】

別の実施形態では、投与すべき有効量は、組成物を個体に投与した後、個体の腸管内の少なくとも1つのプロバイオティック細菌の生菌数を2~200倍、5~200倍、10~200倍、20~200倍または約200倍増大させるプロス組成物の量であってよい。別の態様では、有効量は、個体の腸管マイクロバイオーム中の少なくとも1つのプロバイオティック細菌の割合(またはパーセンテージ)を増大させる(すなわち、少なくとも1つの有益なプロバイオティック細菌の数を選択的に増大させる)プロス組成物の量であってよい。別の態様では、有効量は、個体における腸管マイクロバイオームの多様性を増大させるプロス組成物の量であってよい。

40

【0009】

一実施形態では、本開示のプロス組成物を、1日間、2、3、4、5、6、7日間もしくは14日間またはそれ超の日数にわたり毎日、有効量で個体に連続的に投与することができる。別の実施形態では、組成物を、例えば4、6、8、10、12、14日間またはそれ超の日数の期間にわたって1日おきに個体に非連続的に投与することができる。

【0010】

一実施形態では、本開示の方法にしたがって調製される組成物は、より高い濃度のある特定の有益成分を有することができる。一態様では、組成物は、可溶性コラーゲン繊維を含有することができる。本開示のために、「可溶性コラーゲン繊維」という用語は、プロス製造プロセスに供した後、プロス中で可溶性であるコラーゲタンパク質のフラグメン

50

トを指すために使用される。一態様では、フラグメントは、コラーゲンタンパク質の全長または部分長を表すことができる。別の態様では、フラグメントは、コラーゲン由来の小さいペプチドまたは単一のアミノ酸を含有することができる。別の態様では、可溶性コラーゲン繊維の少なくとも20%、30%、40%または少なくとも50%は、20またはそれ超のアミノ酸長のフラグメントまたはペプチドを含有する。別の態様では、可溶性コラーゲン繊維は、個体中のプロバイオティック細菌の増強または促進におけるプレバイオティクスとして働き得る。別の態様では、可溶性コラーゲン繊維は、主に家禽の軟骨由来である。別の態様では、可溶性コラーゲン繊維は、最終プロス組成物の少なくとも20% (w/w 固体ベースで) を構成する。別の態様では、可溶性コラーゲン繊維は、最終プロス組成物の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%もしくは少なくとも90% (w/w 固体ベースで) または100%もの高さを構成することができる。別の態様では、可溶性コラーゲン繊維は、I、IIまたはIII型コラーゲン由来であることができる。

10

【0011】

別の実施形態では、ある特定の有益な化合物は、現在市場で入手できる他のプロス製品と比べて、本開示の組成物中でより高い程度まで富化され得る。

【0012】

別の実施形態では、ニワトリプロスには通常は付随しないある特定の利益を達成するように、1つまたは複数の構成要素をプロス中に補うことができる。そうした補充物の例は、これらに限定されないが、生姜、コーヒー抽出物、ニンジン、緑茶、他の植物、例えばヤナギ樹皮またはボスウェリア、クルクミン/ウコン、オメガ3脂肪酸、魚油、オキアミ油、藻類油、フランスカイガンショウ樹皮抽出物であるピクノジェノール、ブドウ種子抽出物、亜麻仁抽出物、リボヌクレアーゼ、アンギオジェニン、ラクトフェリン、リボヌクレアーゼ富化ラクトフェリン、S-アデノシルメチオニン、コラーゲン、コラーゲンタンパク質 (例えばI、IIまたはIII型コラーゲン) またはコラーゲンペプチド、ゼラチン、アボカド/ダイズ不けん化物 (ASU)、ホップの球果の抽出物、卵殻膜、乳由来のポリペプチド、例えばカゼインまたは乳清、MSM (メチルスルホニルメタン)、ユッカ (Yucca)、デビルズクロー (Devils claw)、プロメライン、グルタミン酸、ココア、イラクサ、ビタミンE、ビタミンD3、クルミ抽出物等を含むことができる。一態様では、本開示のプロスは、相当量のコラーゲン、コラーゲンタンパク質および/またはコラーゲンペプチドを含有することができる。別の態様では、相当量のコラーゲン、コラーゲンタンパク質および/またはコラーゲンペプチドは、本開示のプロス中に天然に存在していてよい。別の態様では、相当量のコラーゲン、コラーゲンタンパク質および/またはコラーゲンペプチドを、補充物として本開示のプロス中に添加することができる。

20

30

【0013】

別の実施形態では、本開示の方法によれば、プロス組成物を個体に投与する前に、プロバイオティック細菌の数を増大させることを必要とする個体を最初に特定する。本開示のプロス組成物を必要とするそうした個体には、これらに限定されないが、そのGI系中に不均衡なマイクロバイオームを有する個体、および乳酸産生細菌などのある特定の望ましいプロバイオティック細菌の数 (CFU) の増大を必要とする個体が含まれ得る。そうした望ましい細菌の例には、これらに限定されないが、Lactobacillus、Parasutterella、Morganella、Oscillospira、Coprococcus、Oscillibacter、Odoribacter、Gastranaerophilales、AllabaculumまたはFaecalibacteriumが含まれ得る。別の実施形態では、望ましいプロバイオティック細菌の一例はLactobacillus rhamnosusであってよい。別の実施形態では、プロス組成物は、栄養素としてのタンパク質 (およびアミノ酸) だけでなく、個体の腸管マイクロバイオーム中のプロバイオティック細菌の数およびパーセンテージを増大させるのを助けるコラーゲン繊維の形態のタンパク質 (およびアミノ酸) も提供する。したがって

40

50

、本開示の一態様では、本開示のプロス組成物の投与は、そうでない場合、プロバイオティック補充物を定期的に摂取しなければならないことになる個体へのプロバイオティクスの連続的な補充の必要性を排除することができる。「定期的に」という用語は、少なくとも月に1回、週に1回または少なくとも日に1回を意味する。

【0014】

本開示の目的のために、「増強させる」という用語は、微生物の成長（したがって、生菌数またはCFU）または活性を増大させることを意味する。一実施形態では、本開示の組成物は、個体中に生来存在する1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させることができる。「生来の」という用語は、微生物が、個体の腸管内に天然に存在することを意味する。別の実施形態では、本開示の組成物は、個体中に生来のものではない1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させることができる。生来または非生来のプロバイオティック細菌の両方を、個体へ補うことができる。

10

【0015】

一態様では、本開示の組成物を、経口給餌によって個体に投与することができる。別の態様では、本開示の組成物を、1つまたは複数のプロバイオティック細菌と併せて投与することができる。別の態様では、本開示の組成物を1つまたは複数のプロバイオティック細菌と混合し、混合物として個体に投与することができる。

【0016】

別の態様では、プレバイオティック組成物を本明細書で開示されるプロセスにしたがって調製し、次いで、食事補充物として摂取されるように、液体または固体（例えば粉末）形態に調製することができる。

20

【0017】

一実施形態では、本開示の組成物によって増強される1つまたは複数のプロバイオティック細菌は少なくとも乳酸産生細菌を含むことができる。別の実施形態では、乳酸産生細菌は、例として、*Lactobacillus* 細菌を含むことができる。別の実施形態では、乳酸産生細菌は、*Lactobacillus rhamnosus* を含むことができる。

【0018】

家庭内で調理する場合、ニワトリまたはシチメンチョウプロスを、開放容器中、または加圧容器中、高温下で長時間調理することにより作製することができる。対照的に、本開示は、独特の組成物を有するプロス製品およびその調製方法を提供する。原材料、調理用原材料を選択し調製する方法、および得られたプロスを分離し精製する方法も本明細書で開示する。

30

【0019】

一実施形態では、種々の有益な化合物の抽出を最大化するために、家禽または他の動物供給源からの原材料を非常に細かく砕くことができる。一態様では、原材料を、約2cm未満、1cm、5mm、4mm、3mm、2mmまたは2mm未満のサイズまで小さくすることができる。調理する前での、小さなサイズの粒子へ家禽の部分の機械的処理は、ある特定の化合物の抽出を最大化する助けとなり得る。別の実施形態では、家禽の部分は、調理の前に、非常に小さなサイズの粒子へ機械的に処理されているので、処理された家禽の部分からプロスを得るために、より穏やかな調理条件（例えば60~100の温度）およびより短い調理時間（約8分間~300分間）を使用することができる。そうしたより穏やかでより短い調理は、従来の処理および調理法が使用される場合、そうでなければ不活性化されることになるある特定の化合物の不活性化を防止する助けとなり得る。そうした化合物の保存は、本開示のプロスを、ここで開示される方法によって調製されていない他のプロス製品に対して試験した場合に観察される、優れた利益を説明することができる。

40

【0020】

別の実施形態では、骨や軟骨を有する家禽の部分を、機械的に分離し、細かく砕いて、5mm（ミリメートル）、4mm、3mm、2mmまたは1mm未満のサイズの微細な小

50

片にすることができる。一態様では、骨から残留する肉を除去するためのステップはとらない。これらの細かい小片を、約70、100、110、120、または150 mmの高さで、少なくとも8分間、15分間、30分間、1時間、2時間、3時間もしくは6時間またはそれ超の時間調理して、ある特定のブrossの画分および/または化合物の抽出を最大化することができる。

【0021】

別の実施形態では、本開示の方法によって調製されたブrossは、SDS-PAGEで分析した場合、他の市販のブross製品から得られたものと異なるタンパク質プロファイルを示す。一態様では、本開示の組成物中の全タンパク質の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、70%または90%は、10kD(キロダルトン)~70kDの間の分子量を有する。別の態様では、本開示の組成物中のタンパク質の少なくとも95%は、100kD未満の分子量を有する。別の態様では、方法を、ブross中のタンパク質の分子量を10kD、5kD未満に、さらには3kDより低くさらに低下させて、被験体による同化を増強させるために使用することができる。例として、タンパク質を消化する1つまたは複数の酵素を使用して、ブrossのタンパク質の分子量を低下させることができる。

10

【0022】

別の実施形態では、本開示の組成物は、全固体の重量で少なくとも40%のタンパク質を含有することができる。例として、本開示の組成物は、組成物中の全固体の重量で50%、60%、70%もしくは80%またはそれ超のタンパク質を含有することができる。別の実施形態では、本開示の組成物は、組成物中の全固体の重量で10%未満の炭水化物を含有することができる。例として、本開示の組成物は、組成物中の全固体の重量で8%、5%、2%もしくは1%またはそれ未満の炭水化物を含有することができる。別の実施形態では、本開示の組成物は、動物供給源(例えば家禽)から調製され、植物供給源からのいかなるタンパク質も含有しない。別の実施形態では、本開示のプレバイオティック組成物は、検出可能な量のグルテンを含有しない。別の実施形態では、本開示のプレバイオティック組成物は、グルテンに対して感受性が高いまたはアレルギーがある個体において有害反応を引き起こす相当量のグルテンを含有しない。

20

【0023】

別の実施形態では、本開示の組成物は、アミノ酸のプロリンおよびヒスチジンを含有することができる。プロリンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも4:1である。一態様では、プロリンは、組成物中に、固体ベースで少なくとも8%(w/w)、10%またはそれ超存在する。別の態様では、プロリンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも6:1である。

30

【0024】

別の実施形態では、本開示の組成物はアミノ酸のグリシンおよびヒスチジンを含有することができる。グリシンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも6:1である。一態様では、グリシンは、本開示の組成物の全アミノ酸中に、固体ベースで少なくとも12%、14%またはそれ超(w/w)存在する。別の態様では、グリシンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも10:1である。

【0025】

別の実施形態では、本開示の組成物は、アミノ酸のヒドロキシプロリンおよびヒスチジンを含有することができる。ヒドロキシプロリンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも4:1である。一態様では、ヒドロキシプロリンは、組成物の全アミノ酸中に固体ベースで少なくとも7%、8%またはそれ超(w/w)存在する。別の態様では、ヒドロキシプロリンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも6:1である。

40

【0026】

別の実施形態では、本開示の組成物は、プロリン、グリシン、ヒドロキシプロリンおよびヒスチジンを含有することができる。一態様では、グリシンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも6:1である。別の態様では、グリシンは、組成物中に固体ベースで少なくとも12%(w/w)存在する。別の態様では、プロリンとヒスチジンとの比は重量で少

50

なくとも4：1である。別の態様では、ヒドロキシプロリンとヒスチジンとの比は重量で少なくとも6：1である。

【0027】

別の実施形態では、本開示の組成物は、プロリンおよび他のアミノ酸を含有することができ、プロリンの量は、組成物中の全アミノ酸の重量で少なくとも8%、10%またはそれ超である。別の実施形態では、本開示の組成物は、グリシンおよび他のアミノ酸を含有することができ、グリシンの量は、組成物中の全アミノ酸の少なくとも20重量%である。別の実施形態では、本開示の組成物は、ヒドロキシプロリンおよび他のアミノ酸を含有することができ、ヒドロキシプロリンの量は、組成物中の全アミノ酸の少なくとも8重量%である。

10

【0028】

別の実施形態では、本開示の組成物は、1つまたは複数の分枝鎖アミノ酸 (branched chain amino acid) (BCAA) (例えばバリン、ロイシンおよびイソロイシン) を含有することができ、組成物中のBCAAは、他のプロス製品中のBCAAのレベルより高いレベルで存在する。一態様では、バリン、ロイシンおよびイソロイシンを含む全BCAAの量は、組成物中の全アミノ酸の少なくとも5%、6%または7重量%である。

【0029】

別の実施形態では、本開示にしたがって調製されるプロス製品は、999：1～1：999の間または200：1～10：1の間の湿潤タンパク質比 (moisture protein ratio) (MPR) を有することができる。例として、200：1のMPRは、製品が、200部の水と1部の肉 (タンパク質) とを含有することを意味する。別の実施形態では、本開示にしたがって調製されるプロス製品は、150：1～40：1の間または135：1～67：1の間の湿潤タンパク質比 (MPR) を有することができる。

20

【0030】

コンドロイチン硫酸 (CS) は、軟骨中に豊富にあり、関節の健康に有益であることが報告されている。プロスが調製される原材料およびプロセスの選択は、本開示の組成物中での比較的高いレベルのコンドロイチン硫酸に寄与し得る。本開示の一実施形態では、プロス組成物は、酵素消化およびLC-UV検出アッセイを使用して測定して、組成物中の全乾燥固体の重量で少なくとも6%、7%、8%または10%のコンドロイチン硫酸を含有することができる。例えば、参照により本開示に組み込まれる、Jiら、Journal of AOAC International、90巻、3号、659～69頁 (2007年) を参照されたい。

30

【0031】

一態様では、組成物は、すぐに消費できる液体形態であってもよく、ストックなどの濃縮液体の形態であってもよい。別の態様では、組成物は、粉末またはペーストなどの固体形態であってもよい。

【0032】

一実施形態では、組成物は、ポリフェノールの濃度がFolin-Ciocalteuアッセイに基づいて少なくとも4,000 μg/ml GAE (没食子酸当量) である、1つまたは複数のポリフェノールを含有することができる。

40

【0033】

別の実施形態では、組成物は、アミノ酸のグリシン、プロリンおよびヒドロキシプロリンを含むことができ、グリシンは、組成物の全アミノ酸の少なくとも12% (w/w) を構成し、プロリンは少なくとも8% (w/w) を構成し、ヒドロキシプロリンは少なくとも7% (w/w) を構成する。

【0034】

プロバイオティック細菌は一般に培養培地で成長させた後、それらを収穫し、食事補食物として使用する。一実施形態では、本開示のプロバイオティック組成物を、プロバイオ

50

ティック細菌を培養するために使用することができる。プロバイオティック細菌は、とりわけ、家禽から調製された本開示のプレバイオティック組成物を含有する培地で成長させることができる。一態様では、本開示のプレバイオティック組成物は、家禽から調製された可溶性コラーゲン繊維を含有する。

【 0 0 3 5 】

本明細書で開示されるプロス組成物は、本明細書で説明するような独特の組成によって特徴付けることができる。プロス組成物は、それらが調製される方法によっても特徴付けることができる。さらに、本開示の組成物は、それらが被験体に提供し得る利益においても独特である。被験体を、一方の群が有効量の本開示のプロス製品を毎日摂取（または消費）し、他方の群が水または他のプロス製品を摂取する、2つの群に分けることができる。次いで、種々の指標を測定し、2つの群の間で比較することができる。

10

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

個体中の1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させるための方法であって、前記個体に、前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌を増強させるのに有効な量で組成物を投与するステップを含み、前記組成物が家禽から調製される、方法。

(項目2)

前記組成物が、家禽からの可溶性コラーゲン繊維を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記組成物が、全固体の重量で少なくとも40%のタンパク質を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目4)

前記組成物が、全固体の重量で10%未満の炭水化物を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

前記組成物が、少なくとも14日間にわたり毎日、前記有効な量で前記個体に投与される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目6)

前記プロバイオティクスを増強させるのに有効な量が、前記個体に投与された場合、前記個体の消化器系内の前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を増加させる前記組成物の量である、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目7)

前記組成物が、前記個体の消化器系内の微生物多様性を増大させる、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌の数を増大させることを必要とする個体を特定するステップをさらに含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記組成物を前記個体に前記有効な量で少なくとも14日間にわたり毎日投与した後、前記個体の消化器系内の前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を測定するステップをさらに含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目10)

前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌が乳酸産生細菌を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記組成物が、前記組成物を受けていない比較可能な個体と比較して、前記個体の消化器系内の前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を増大させ、前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌が、*Parasutterella*、*Morganelia*、*Oscillospira*、*Faecalibacterium*およびそれらの組合せからなる群より選択される少なくとも1つのメンバーを含む、前記項目のいずれか

50

一項に記載の方法。

(項目12)

前記個体が、前記組成物の投与の前にプロバイオティック補充物を定期的に摂取し、ここで前記投与が、前記個体がプロバイオティック補充物を定期的に摂取する必要性を排除する、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記組成物が、前記個体の腸の上部セクションおよび/または中間部セクションの1つまたは複数のプロバイオティック細菌の生菌数を増大させ、前記少なくとも1つのプロバイオティック細菌が、Lactobacillus、Coprococcus、Oscillibacter、Odoribacter、Gastranaerophilales、Faecalibacterium、Allabaculumおよびそれらの組合せからなる群より選択される少なくとも1つのメンバーを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目14)

前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌が、Lactobacillus細菌を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記1つまたは複数のプロバイオティック細菌が、Lactobacillus rhamnosusを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記組成物が、1つまたは複数のプロバイオティック細菌との混合物として前記個体に投与される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目17)

前記組成物が、アミノ酸のグリシン、プロリンおよびヒドロキシプロリンを含み、グリシンが前記組成物の全アミノ酸の少なくとも12% (w/w)を構成し、プロリンが少なくとも8% (w/w)を構成し、ヒドロキシプロリンが少なくとも7% (w/w)を構成する、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記組成物が、検出可能な量のグルテンを含有しない、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目19)

前記組成物が、
(a) 水の中でニワトリの小片を、70 ~ 150 の間の温度で約8分間~約24時間調理するステップであって、前記ニワトリの小片がニワトリ全体またはニワトリの部分から調製される、ステップと、
(b) ステップ(a)から不溶性物質(insoluble)を除去して液体形態の前記組成物を得るステップ
を含むプロセスによって、家禽の部分から調製される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

プロバイオティック細菌を培養する方法であって、培地上で前記プロバイオティック細菌を成長させるステップを含み、前記培地が家禽から調製されたプレバイオティック組成物を含み、前記プレバイオティック組成物が家禽から調製された可溶性コラーゲン繊維を含む、方法。

40

(項目21)

前記プレバイオティック組成物が、
(a) 水の中でニワトリの小片を、70 ~ 150 の間の温度で約8分間~約24時間調理するステップであって、前記ニワトリの小片がニワトリ全体またはニワトリの部分から調製される、ステップと、
(b) ステップ(a)から不溶性物質を除去して液体形態の前記組成物を得るステップ

50

と

を含むプロセスによって、家禽の部分から調製される、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

プロバイオティック細菌を必要とする個体に投与するための組成物であって、可溶性コラーゲン繊維およびプロバイオティック細菌を含む、組成物。

(項目 23)

(a) 水の中でニワトリの小片を、70 ~ 150 の間の温度で約 8 分間 ~ 約 24 時間調理するステップであって、前記ニワトリの小片がニワトリ全体またはニワトリの部分から調製される、ステップと、

(b) ステップ (a) から不溶性物質を除去して液体形態の前記組成物を得るステップ

10

と

を含むプロセスによって、家禽の部分から調製される、項目 22 に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】図 1 は、糞便試料からの U P G M A (算術平均での非加重結合法) 系統樹を示す図である。

【0037】

【図 2】図 2 は、盲腸試料からの U P G M A 系統樹を示す図である。

【0038】

【図 3】図 3 は、食事への A A C 1 の添加によって影響を受けた種を代表する D N A バンドの選択について生成した D G G E (変性濃度勾配ゲル電気泳動) プロファイルを示す図である。番号が付けられたバンドは、目的の潜在的領域を表している。レーンは以下の通りである：(1) 盲腸 - 水；(2) 盲腸 - A A C 1；(3) 盲腸 - 市販製品；(4) 盲腸 - ホームメイド；(5) 糞便 - 水；(6) 糞便 - A A C 1；(7) 糞便 - 市販製品。

20

【0039】

【図 4】図 4 は、異なるニワトリプロス製品が、B a c t e r o i d e t e s : F i r m i c u t e s 比を有意に変化させないことを示す図である。

【0040】

【図 5】図 5 は、A A C 1 が、下部 G I 管で P r o t e o b a c t e r i a を選択することを示す図である。

30

【0041】

【図 6】図 6 は、A A C 1 が、下部 G I 管で L a c t o b a c i l l u s を選択または維持することを示す図である。

【0042】

【図 7】図 7 は、A A C 1 が、盲腸内で L a c t o b a c i l l u s を選択または維持することを示す図である。

【0043】

【図 8】図 8 は、A A C 1 が、腸管内の微生物叢の多様性を増大させることを示す図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0044】

ニワトリスープおよびニワトリプロスは何世紀にもわたってヒトの消費のために利用可能であった。研究は、ニワトリスープまたはプロスの種々の利益を示している。従来の家庭内の方法によれば、ニワトリスープまたはプロスは、水を入れたポットの中でニワトリ全体かまたはニワトリの大きな部分を長時間煮沸することによって調製される。この家庭内の方法によって調製されるスープまたはプロスは、化合物の一部が調理の間または処理の間に失われており、他の化合物がニワトリの部分から抽出されていない可能性があるため、スープまたはプロスの健康促進効果が最大化されていない恐れがある。

【0045】

一実施形態では、本開示は、プレバイオティクスとしてニワトリプロスを使用する方法

50

を提供する。プレバイオティクスは、プレバイオティクスが生きた生物ではなく、プロバイオティクスを支援するまたは増強させることができる構成要素であるという点で、プロバイオティクス(すなわち、いわゆる「良い細菌」)とは異なっている。プレバイオティクスは一般に、上部消化器系を迂回し、摂取後損なわれず腸に達する。プレバイオティクスは上部GIセクションにおいて細菌に影響を及ぼし得、その結果、上部GIセクションのこれらの細菌が栄養素を発酵させ始め、次いでこれが腸管の下部セクションの「良い細菌」を選択的に支援する代謝産物を提供するようにすることも可能である。それらが腸に達したら、プレバイオティクスは、正常な腸管内細菌叢による発酵において重要な役割を果たすことができる。発酵プロセスは、Lactobacillusなどの「良い細菌」の増殖を刺激し促進することができる。

10

【0046】

本明細書で使用される、「プロバイオティクス(probiotic)」という用語は、個体の利益になる補充物として個体を取り得る多くの微生物を指すことができる。「プロバイオティクス」という用語は、宿主の体内で天然に生存し宿主に利益を提供する、多くの異なる微生物を指すこともできる。そうした望ましい細菌の例は、これらに限定されないが、Lactobacillus、Parasutterella、Morganella、Oscillospira、Coprococcus、Oscillibacter、Odoribacter、Gastranaerophilales、AllabaculumまたはFaecalibacteriumを含むことができる。例えば、多くのLactobacillus細菌は、ヒトに有益であることが示されている。Faecalibacterium細菌は、抗炎症性であることも示されている。「Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients」、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America、105巻(43号):16731~6頁(2008年)を参照されたい。

20

【0047】

本開示の方法は、有益な化合物の抽出を最大化させながら、それに付随して、過酷な処理条件に起因した活性の損失を最小化するために、調理の前にニワトリの部分処理することによって、ならびに処理温度および調理時間を制御することによって、ある特定の成分の保存を助けることができる。

30

【0048】

家禽から特に選択された原材料を本開示の方法にしたがって処理して、高いタンパク質含量を有するプロスを得ることができる。ある特定のアミノ酸は、ホームメイドのプロスまたは他の市販製品と比較して、比較的高い濃度で存在する。一態様では、本明細書で説明される種々の動物試験で示されるように、本開示のプロス組成物は、宿主のプロバイオティクスの健康を増強させるのに有効であることを示すことができる。別の態様では、本開示のプロス組成物は、宿主中のプロバイオティクスの生菌数を増大させることができる。別の態様では、本開示のプロス組成物は、ある特定の微生物を選択的に増強させることができるが、他は増強させることはできない。別の態様では、本開示のプロス組成物は、宿主の腸管内の微生物の多様性を増大させることができる。

40

【0049】

「プロス」および「スープ」という用語は、少なくとも1つの溶質を含有する液体組成物を指し、すぐ供給できる形態、濃縮物、液体または固体の形態のストックを指すのに使用することもできる。

【0050】

本開示の家禽プロスは、相当量の異なるアミノ酸を含有することができる。そうしたアミノ酸は、プロス中に、タンパク質の形態で、または遊離アミノ酸として存在し得る。全

50

アミノ酸は、タンパク質の形態で存在するアミノ酸と、遊離アミノ酸として存在するものとの両方を含む。本開示の目的のために、ブロス組成物中の異なるアミノ酸の比は、全アミノ酸間の比を指す。

【0051】

本明細書で使用されるような「乾燥固体」または「固体」という用語は、すべての自由液体 (free liquid) が液体組成物から除去された後に残留する液体組成物の成分を指す。水性ブロスの場合、自由液体は水である。

【0052】

「投与する」という用語は、経口摂取によるなどの、個体への材料の送達を意味する。

【0053】

「検出不能」という用語は、現在利用可能な分析機器で測定できないような少量で存在する可能性がある化学物質または構成要素を意味する。

【0054】

「被験体」または「個体」という用語は、ヒトを含む哺乳動物を指すのに使用される。

【0055】

「実質的に」という用語は、少なくとも10~20%を意味する。

【実施例】

【0056】

以下の実施例は、実施形態を例示するためだけに提供するものであり、限定しようとするものではない。原材料、試薬、化学物質および他の材料は、例示的な成分または試薬として提示されるものであり、本開示の範囲内で上記考察を考慮して、様々な改変を行うことができる。本開示において別段の指定のない限り、実施例において説明されるようなシステムおよびアッセイで使用される成分、試薬、プロトコールおよび他の方法は、例示の目的のためだけのものである。

【0057】

(実施例1 シチメンチョウの部分からのブロスの調製)

この実施例では、シチメンチョウの部分、ブロスを調製するために使用し、ブロスの全体的な品質および潜在的利益を決定した。簡単に述べると、生のシチメンチョウを機械的に分離し、抽出を最大化させるために、部分を2mm未満のサイズに細かく砕いた。シチメンチョウからの小さなサイズの部分を、スチーム中195°Fで、約15分間またはそれ未満で穏やかに調理した。次いで、ブロス、デカンテーションにより不溶性画分から分離した。ブロス中の放出された脂肪も、遠心分離機によりブロスから除去した。ブロス市販の蒸発器中で濃縮し、冷却し、販売用に包装した。

【0058】

(実施例2 ニワトリの部分からのブロスの調製)

この試験では、ニワトリの骨および軟骨を含有する刻んだニワトリの部分、水の中で、250°F超の温度で、6時間超調理して、ある特定のブロス画分および/または化合物の抽出を最大化させた。このプロセスで得られたブロスを、内部標準のために「AAC1」と指定した。より具体的には、主要な筋肉を除去した後に残るUSDA検査済みの刻んだ生のニワトリの骨を、大きな市販のステンレス鋼製調理タンク中、水の中で調理した。調理した後、液体ブロス部分を、デカンテーションによりニワトリ固形物から分離した。ブロス市販の蒸発器中で濃縮し、次いで、噴霧乾燥し、標識した容器に詰めた。

【0059】

(実施例3 異なるブロスのタンパク質およびアミノ酸プロファイルの比較)

タンパク質は、例えば、酵素として機能すること、細胞間の情報伝達を容易にすること、および細胞に構造的支持を提供することを含む、生体系において豊富な機能を行うアミノ酸の1つまたは複数の鎖で構成される大きな分子である。ヒトならびに他の動物は、それらが、そうしたアミノ酸を合成するのに必要な酵素を欠いているので、必須アミノ酸を、それらの食事の一部として消費されたタンパク質から得る。本試験の目的は、ホームメイドの製品と比較して、ニワトリブロスAAC1中のタンパク質の濃度およびサイズ範囲

10

20

30

40

50

を決定することであった。

【0060】

本開示にしたがって調製された1つの試料(AAC1)と、家庭内の調理法(ホームメイド)にしたがって調製された別の試料を比較した。AAC1についての固体パーセント(w/v)は8固体%であり、ホームメイドについてのパーセンテージ(w/v)は1.7固体%であった。

【0061】

Bradford法によってタンパク質の量を決定する前に、各試料を蒸留水に希釈して最終1w/v%の溶液にした。標準曲線を、ウシ血清アルブミン(0~3.5µg/µL)を使用して作製した。すべての試料を3連で分析した。全タンパク質の量は、プレートリーダーを使用して、595nmの波長で決定した。結果を表1に示す。

【表1】

表1 ブロス試料中の全タンパク質の量

試料	値	結果	平均結果	濃度	SD	CV
AAC1	0.446	1.558	1.691	1.691	0.132	7.8
	0.461	1.693				
	0.474	1.821				
ホームメイド	0.544	2.496	2.52	2.52	0.034	1.3
	0.549	2.544				

【0062】

AAC1(8%)およびホームメイド(1.7%)試料における固体パーセントの差を修正するために、AAC1およびホームメイドについての1%溶液に基づいてタンパク質値に、それらのそれぞれの出発固体%を乗じた。AAC1およびホームメイドについての全タンパク質の最終補正量を表2に示す。

【表2】

表2 AAC1およびホームメイドブロス中の補正全タンパク質濃度

試料	補正最終濃度	AAC1の%
AAC1	13.6 µg/ul	-
ホームメイド	4.3 µg/ul	31.6%

【0063】

各試料のタンパク質プロファイルを決定するために、等容積のAAC1およびホームメイド試料(15.6µl)を、それぞれ、Laemmliのサンプルバッファおよび還元剤と混合し、95で5分間加熱し、4~12%のビストリスゲル上で分離した。タンパク質の相対サイズ範囲を、市販のタンパク質標準品(4.5kDa~300kDaの範囲)との比較によって決定した。150Vの一定電圧をゲルに30分間印加し、各試料中のタンパク質を分離させた。SimplyBlue(商標)SafeStainを使用して、タンパク質をゲル中で可視化させた。

【0064】

結果を図1に示す。レーン1はホームメイドブロスについて、レーン2はAAC1ブロスについてのタンパク質プロファイルを示しており、レーン3は分子量標準品である。タンパク質プロファイルに基づいて、AAC1は、ホームメイド製品より約3倍多いタンパク質で構成される。ホームメイド製品中のタンパク質は、大きいタンパク質(最大で約300~500kD)と小さいタンパク質(約5~15kD)との両方を含有する、より広い範囲の分子量分布を示している。対照的に、AAC1中のタンパク質の大部分(すなわち、50%超)は70kDa~15kDaの間の分子量を有している。

【0065】

個々のアミノ酸含量も分析した。以下の表3は、家庭内の方法ならびに他の市販製品を使用して調製したものと比較した、本開示の方法にしたがって調製されたブロス組成物の

個々のアミノ酸含量を示している。

【表 3】

表 3 異なるブrossのアミノ酸組成

表 2:上記含量値は 100%固体ベースに対 して計算された:	3823	市販製品	ホーム メイド- 1	ホーム メイド -2	AAC1-1	AAC1-2	AAC1-3
	W/W%	%					
タウリン	2.50						
アスパラギン酸	3.63	2.44	3.63	3.47	7.04	5.34	5.38
トレオニン	1.44	0.76	1.52	1.42	1.75	2.13	1.79
セリン	1.56	1.34	1.96	1.89	2.08	1.88	2.40
グルタミン酸	10.25	6.98	9.44	9.26	10.52	9.50	10.14
プロリン	3.53	3.05	5.93	5.57	9.59	10.66	11.07
ヒドロキシプロリン	2.19	2.99	5.31	4.92	na	7.00	9.39
グリシン	5.97	7.38	8.79	9.47	18.02	15.41	17.68
ランチオニン	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
アラニン	3.91	3.37	4.60	4.58	8.06	7.53	7.53
シスチン	0.44	0.29	0.34	0.40	0.00	0.25	0.17
バリン	1.44	0.73	1.43	1.42	2.44	2.19	2.21
イソロイシン	1.13	0.47	1.18	1.02	1.54	1.59	1.59
ロイシン	2.72	1.51	2.48	2.32	3.38	3.47	3.43
メチオニン	0.81	0.52	0.93	0.77	1.01	1.06	1.10
チロシン	0.88	0.44	0.81	0.65	1.09	1.00	0.90
フェニルアラニン	1.00	0.73	9.53	7.03	2.30	2.16	1.98
ヒドロキシリシン	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ヒスチジン	2.03	2.56	2.70	1.73	1.32	1.16	1.00
オルニチン	2.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
リシン	3.75	2.67	3.07	3.00	3.96	3.66	3.05
アルギニン	3.06	2.79	4.01	3.75	8.24	6.69	6.61
トリプトファン (TRYPTOPHAN)	0.16	0.06	0.12	0.09		0.22	0.15
合計	54.84	41.08	67.80	62.79	82.35	82.88	87.55

【 0 0 6 6 】

(実施例 4 異なるブross中のコンドロイチン硫酸 (C S) のレベルの比較)

コンドロイチン硫酸 (C S) は、軟骨中に見られる重要な構造化合物であり、関節の健康に参与している。C S は、i N O S、P G E 2、C O X - 2 (G w e n d o l y n、S p i n e 2 0 1 1 年) および N F k B (V a l l i e r e s、O s t e o a r t h r i t i s C a r t i l a g e、2 0 1 0 年) などの多くの炎症性メディエータのレベルを低下させることが示されている。この試験の目的は、種々のニワトリブross試料中の C S の量を決定することであった。ニワトリブrossを、酵素消化および L C - U V 検出法 (J i、J o u r n a l o f A O A C I n t e r n a t i o n a l、2 0 0 7 年) を使用して全 C S について分析した。結果を、標準試料と比較した曲線上の面積とし、定量限界を 1 g 乾燥材料あたり 8 m g コンドロイチン硫酸として計算した (表 4)。試験したすべてのニワトリブrossの中で、A A C 1 は、最も大きな量の C S (8 . 7 9 7 w / w %) を有していた。

【表 4】

表 4 コンドロイチン硫酸(CS)の量

試料	平均(mg)	乾燥 mg/g	乾燥% w/w
粉末ニワトリブロス AAC1	17.480	87.971	8.797
粉末ニワトリブロス H814	15.443	67.553	6.755
冷凍濃縮物 TSN	10.886	52.059	5.206
冷凍濃縮物 IDF ニワトリ 823	8.627	42.104	4.210
背骨からの家庭内のブロス	5.866	28.258	2.826
冷凍濃縮物 シチ メンチョウ 824	5.243	26.227	2.623
粉末ニワトリブロス HML 34511	4.979	24.335	2.434
粉末ニワトリブロス A1004	3.817	18.305	1.830
粉末ニワトリブロス P1301	3.075	15.054	1.505
ニワトリの部分からの家庭内のブロス	2.185	10.99	1.09
ニワトリの首からの家庭内のブロス	1.937	9.361	0.936

10

20

【 0 0 6 7 】

(実施例 5 異なるニワトリブロス中のポリフェノール濃度の比較)

異なるニワトリブロス中のポリフェノール濃度を、修正 Folin-Ciocalteu 法 (Slinkard, American Journal of Enology and Viticulture, 1977年) を使用して決定した。ポリフェノールは、抗酸化および抗炎症特性を有することが知られている化合物の部類である。AAC1 と家庭内のブロスとはどちらもポリフェノールを含有していたが、AAC1 は $4828.8 \mu\text{g/mL}$ GAE のポリフェノールを含有しており、これは、同じ種類のニワトリの部分から作製されたホームメイドブロス ($687.7 \mu\text{g/mL}$ GAE) より、約 7 倍多い GAE のポリフェノールである。

30

【 0 0 6 8 】

(実施例 6 下部 GI におけるマイクロバイオーームに対するブロス給餌の効果)

種々のブロス組成物を齧歯動物に給餌し、糞便試料を 0 日目 (基礎) と 14 日目に収集した。変性濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を使用して、微生物プロファイルの変化を分析した。試験したブロス組成物には：本開示のブロス AAC1、水 (陰性対照として)、ホームメイド風ブロスおよび市販のブロス製品が含まれる。動物に異なるブロス組成物を給餌した後、0 日目と 14 日目に、マイクロバイオーームの DGGE プロファイルを比較した。

40

【 0 0 6 9 】

基礎試料のすべてが、比較的高度の類似性を示した。最大で、AAC1 の群と水の群との基礎試料の間に 9% の差があった。すべての基礎試料の間の平均差は 6.1% であった。種々のニワトリブロスの導入ならびに 2 週間の期間によって、試料間に追加的な変動もたらされた。最大で、AAC1 と市販のブロス製品は 15% 異なっていた。対照的に、ホームメイドブロスは、水および市販のブロスと 9% 異なった。すべての試料の間の平均差は 12% であった。

50

【0070】

試料のすべてが、基礎0日目と14日目との時間点の間で組成が変化した。例えば、水対照の0日目（基礎）と14日目との間の差は7%であった。この7%の変化は、2週間にわたる比較的安定した腸管マイクロバイームを実証しており、これは優れた対照としての役目を果たす。基礎から14日目までの時間点のすべての試料の間の平均分散は13.5%であった。

【0071】

異なるプロファイルを、D G G Eにおける染色類似性（すなわち、DNAバンドの存在/非存在）に基づいてグループ化し、分類した。A A C 1ニワトリプロスを受けた動物は、水または他の2つのプロスを受けた動物と比較した場合、それらの腸管マイクロバイームにおける明らかなシフトを経験している。階層的クラスタリングによって、A A C 1給餌動物において観察される相違がこの投与に独特であることが明らかにされているように、この結果は、図1において最も明確に実証されている。14日目にA A C 1を給餌された動物は、基礎の群または他の14日目の群のいずれともクラスター形成していない。これは、A A C 1プロスが、齧歯動物腸管マイクロバイームにおける独特のシフトを引き起こすことを表している。図1の低部のスケールは、クラスター間の類似性パーセントを表している。

10

【0072】

（実施例7 盲腸におけるマイクロバイームに対するプロス給餌の効果）

各給餌群についての盲腸試料も14日目に収集し、上記と同じプロトコールにしたがって分析した。糞便中に見られた多くの微生物が盲腸内にも見られるが、盲腸の内容物は、腸管マイクロバイーム、および臓器の異なる機能/状態に起因する動物内で起こる任意の付随する変化についてのさらなる検証（look into）を提供する。盲腸分析の欠点は、収集のために動物を犠牲にしなければならず、したがって、基礎試料を取れなかったという点である。盲腸材料によるD G G E分析は、水、ホームメイドおよび市販のプロス給餌動物の間の高度の類似性（3つのすべての試料間で平均4.6%の差）を明らかにしている。興味深いことに、A A C 1群は水、ホームメイドおよび市販のプロス群から14%超異なっていた。

20

【0073】

異なるプロファイルを、D G G Eにおける染色類似性（すなわち、バンドの存在/非存在）に基づいてグループ化し、分類した。図2の低部のスケールは、クラスター間の類似性パーセントを表している。

30

【0074】

盲腸材料の分析による結果は、糞便試料のものに酷似している。盲腸微生物叢の組成に関しては基本的情報が入手できないが、14日間のA A C 1プロスの摂取は独特の盲腸組成をもたらした（図2）。

【0075】

糞便材料と盲腸材料との間のシフトを比較する目的で、図3のゲルを作製した。このゲルを、すべての盲腸試料および選択した糞便試料の間で直接比較させた。この結果から、それぞれ独特の細菌種に対応する11の目的の領域を選択した。バンドからのDNAの直接配列決定は、A A C 1摂取の結果として変化したいくつかの種の特性を可能にした（表5）。腸管内細菌叢の著しい多様性に起因して、それらがこれまで全く特徴付けされていなかったもので、種のいくつかは特定することができなかった。

40

【表5】

表5 AAC1 給餌によって変更されたバンドの DNA 配列決定による結果

バンド	正体	AAC1 投与との関係	種のまとめ	門
1	<i>Acholeplasma sp.</i>	すべての糞便および盲腸試料において見られたが、AAC1 糞便では減少しているようである。	腐生性または病原性。腸管内での役目については殆ど知られていない	Firmicutes
2	無培養 Lachnospiraceae	AAC1 糞便および盲腸試料に特有。他の任意の処理群または対照では見られなかった。	<i>Clostridium</i> と密接に関係	Firmicutes
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	AAC1 盲腸に特有。他の任意の試料、糞便または盲腸では見られなかった。	一般的なプロバイオティクスである。ある特定の菌株はいくつかの有益な効果をもたらすことが示されている。	Firmicutes
4	無培養 Lachnospiraceae	AAC1 糞便および盲腸試料に特有。他の任意の処理群または対照では見られなかった。	<i>Clostridium</i> と密接に関係	Firmicutes
5	混合試料/公知の配列なし	検出されず(N/D)	非適用(N/A)	非適用
6	無培養 <i>Clostridium sp.</i>	AAC1 盲腸に特有。他の任意の試料、糞便または盲腸では見られなかった。	腸管内細菌叢の一般的な常在菌。代謝的に多様である。	Firmicutes
7	混合試料/公知の配列なし	検出されず	非適用	非適用
8	無培養 Clostridiales	すべての糞便および盲腸試料において見出されたが、AAC1 糞便では明らかに増加している。	腸管内細菌叢の一般的な常在菌。代謝的に多様である。	Firmicutes
9	混合試料/公知の配列なし	AAC1 糞便および盲腸試料に特有。他の任意の処理群または対照では見られなかった。	非適用	非適用
10	混合試料/公知の配列なし	AAC1 盲腸に特有。他の任意の試料、糞便または盲腸では見られなかった。	非適用	非適用
11	<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	すべての糞便試料中に存在するが、AAC1 処理盲腸においても見られる。他の任意の盲腸試料には見られない。	セルロースおよびキシランを含む広範囲の複合多糖を分解させることができる。	Firmicutes

【0076】

特に目的の配列は、*Lactobacillus rhamnosus* と特定されたバンド3である。この種は、AAC1プロスを受けた動物の盲腸内容物においてのみ見られた。*L. rhamnosus* は一般的な市販のプロバイオティクスであるが、腸管内細菌叢の生来の常在菌でもある。いくつかの試験から、多くの利益が、*L. rhamnosus* のある特定の菌株の摂取と関係していることが示されている。例えば、研究により、マウスによる *L. rhamnosus* の摂取はより低いレベルの不安およびストレスホルモ

10

20

30

40

50

ンをもたらし得ることが示されている。

【0077】

(実施例8 糞便試料中のプロバイオティック細菌を特定するための次世代配列決定法の使用)

健康なヒト成人において、特定されている糞便微生物叢の80%は、3つの支配的な門：Bacteroidetes、FirmicutesおよびActinobacteriaに分類することができる。FirmicutesとBacteroidetesとの比は、腸管内細菌叢組成およびバランスの良好な指標と見なされている。Leyら(2006年)を参照されたい。FirmicutesとBacteroidetesとの比を、異なるプロス製品を給餌された齧歯動物の群について測定した。図4に示すように、FirmicutesとBacteroidetesとの比は、異なる群の間で有意に変化しなかった。

10

【0078】

糞便微生物叢のプロファイルは、下部GI管における微生物叢の良好な指標としての役割を果たす。図5は、異なるプロス組成物を給餌された動物の下部GI管中のProteobacteriaの相対量を示した。AAC1は、動物の下部GI管内のProteobacteriaを選択した。異なるプロス組成物を給餌された動物の下部GI管中のLactobacillusの相対量も測定した。図6に示すように、AAC1は、動物の下部GI管でLactobacillusを選択した(または特異的に維持した)。さらに、1つの属、Faecalibacteriumが、AAC1を14日間給餌された群においてのみ見られたが、他の群または基礎測定においては見られなかった。3つの属、Parasutterella、MorganelleおよびOscillospiraは、基礎レベルと比較して、AAC1で14日後、有意に高いレベルで存在した。

20

【0079】

(実施例9 盲腸試料におけるプロバイオティック細菌を特定するための次世代配列決定法の使用)

異なるプロス製品を給餌された齧歯動物の群における盲腸微生物叢のプロファイルを測定した。図7に示すように、AAC1は、動物の盲腸内で、Lactobacillusを選択した(または特異的に維持した)。さらに、4つの属、Odoribacter、Gastranaerophilales、FaecalibacteriumおよびAllabaculumは、AAC1を14日間給餌された群においてのみ見られたが、他の群または基礎測定においては見られなかった。3つの属、Lactobacillus、CoprococcusおよびOscilibacterは、基礎レベルと比較して、AAC1で14日後、有意に高いレベルで存在した。1つの属、Intestimonasは、基礎レベルと比較して、AAC1で14日後、有意に低いレベルで存在した。

30

【0080】

(実施例10 本開示の組成物は腸管内での生物多様性を増強させる)

NGSデータ分析での別の重要な検討事項は生物多様性である。より多様性のある腸管内細菌叢が有益であるということは、文献において一般に同意されていることである。NGS分析において最も一般的に使用される生物多様性の測定法のうちの2つは、ChaoおよびShannon-Weiner指数である。各指数は、微生物叢がいかに多様であるかということを表す値をもたらす。図8は、ホームメイド、別の市販製品を給餌された群および水対照群における多様性と比較して、14日後での多様性の程度が、AAC1を給餌された動物においてはるかに高いことを実証している。

40

【0081】

本明細書で説明したすべての動物試験は、政府の規則および規制に従った承認されているプロトコールを使用して実施した。その範囲を逸脱することなく、上記方法およびシステムに変更を加えることができる。したがって、上記説明に含まれる、または添付の図面に示される事柄は、例示としてのものであり、限定する意味ではないものと解釈すべきであることに留意すべきである。以下の特許請求の範囲は、本明細書で説明する全体的およ

50

び特定の特徴、ならびに言語的にそこに含まれるといえる本発明の方法およびシステムの範囲の記述を包含するものである。

【 0 0 8 2 】

上記の実施形態のそれぞれを、特定のそれぞれの方向性を有する種々の成分で例示してきたが、本開示に記載されているシステムおよび方法は、様々な位置および相互の方向で配置されているが、それでも本開示の趣旨および範囲内に留まっている種々の成分を有する様々な特定の構成を取り入れることができることを理解すべきである。さらに、適切な均等物を、種々の成分の代わりにまたはそれに加えて使用することができ、そうした置換または追加の成分の機能および使用は、当業者によく知られているものと思われ、したがって、本開示の範囲内に包含されるものと見なされる。したがって、本発明の実施例は、例示としてのものであり、限定的なものではないものと見なされるべきであり、本開示は、本明細書で提示された詳細に限定されるべきではないが、添付の特許請求の範囲内で修正することができる。

10

【 0 0 8 3 】

特許、特許出願、学术论文および他の出版物を含む、本開示で引用したすべての文献を、参照により本出願に組み込む。

文献

本明細書で引用するか、以下に挙げたすべての文献は、本明細書で完全に再現したのと同等に本開示に組み込まれる。

【 化 1 】

20

Arumugam, M., et al. "Enterotypes of the human gut microbiota." *Nature* (2011).

Bravo, J. A., et al. "Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve." *Proceedings of the National Academy of Science* (2011); doi: 10.1073/pnas.1102999108.

Larsen, N., et al. "Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults." *PLOS One* (2010).

30

Ley, R. E., et al. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proceedings of the National Academy of Science* (2005): 11070-11075.

Mariat, D., et al. "The Firmicutes/Bacteroides ratio of the human microbiota changes with age." *BMC Microbiology* (2009).

40

Ley RE, Turnbaugh P, Klein S, Gordon JI: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006, 444:1022-1023.

【 図 1 】

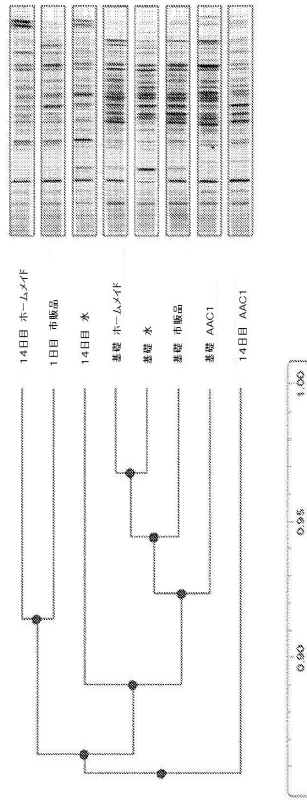


FIG. 1

【 図 2 】

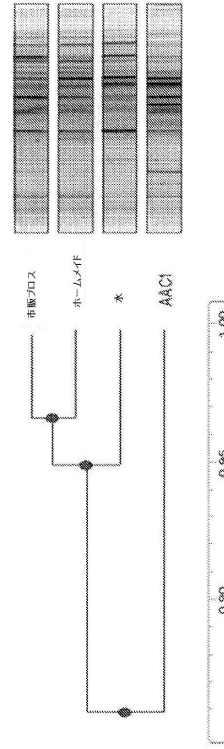


FIG. 2

【 図 3 】

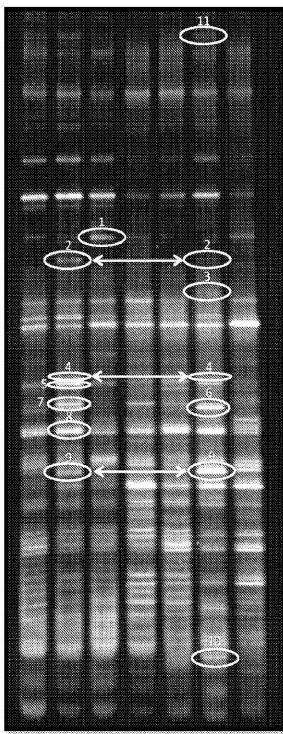


FIG. 3

【 図 4 】

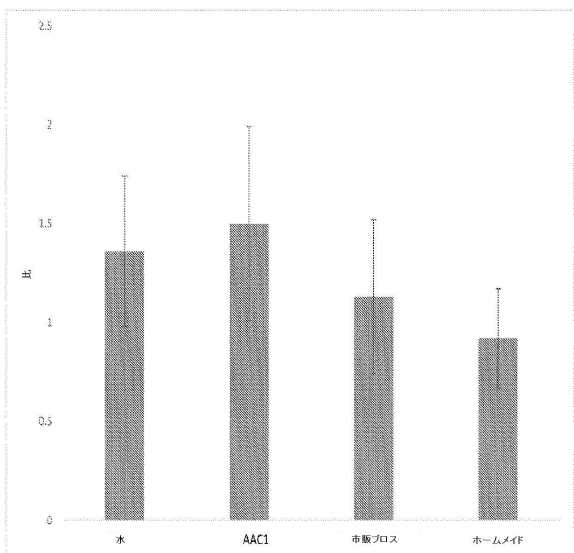


FIG. 4

【 図 5 】

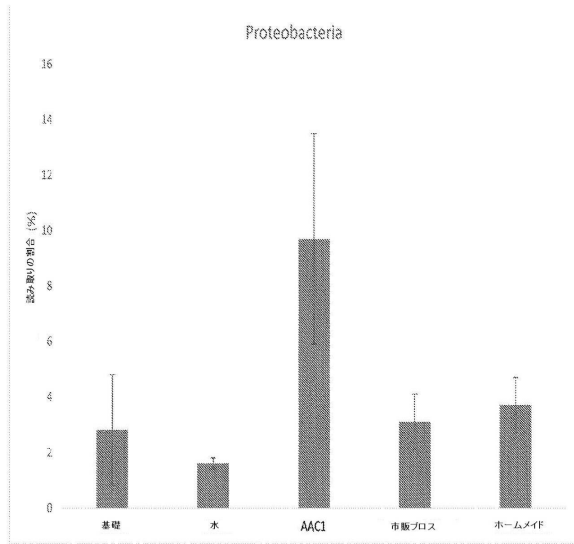


FIG. 5

【 図 6 】

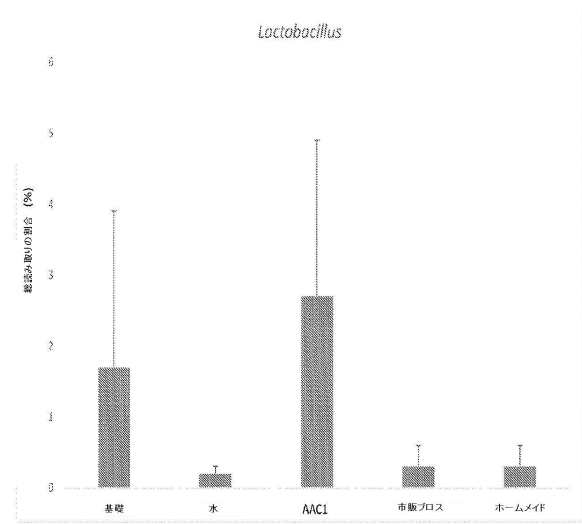


FIG. 6

【 図 7 】

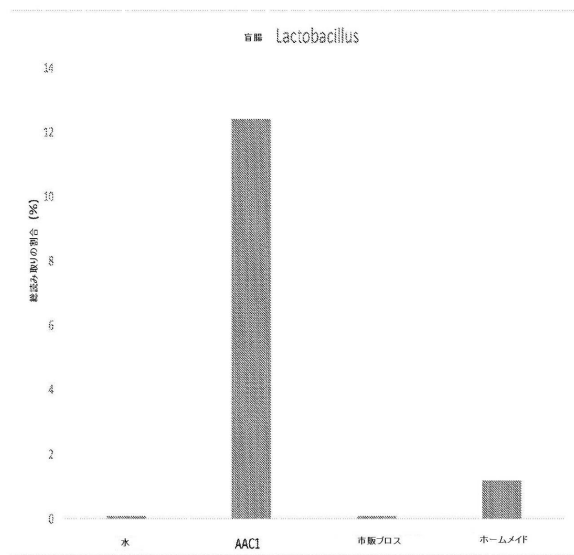


FIG. 7

【 図 8 】

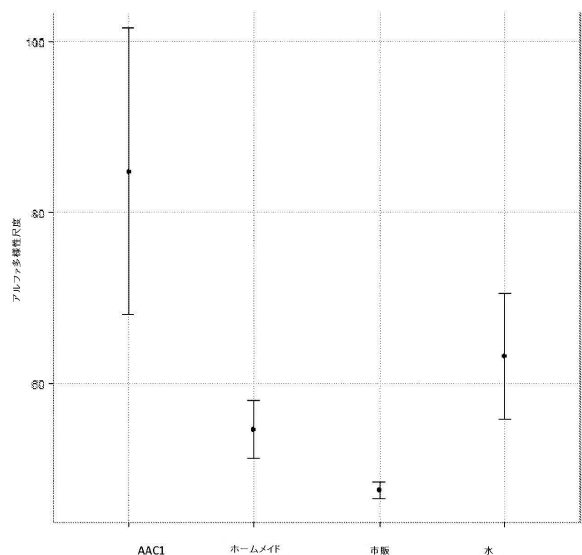


FIG. 8

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	35/747 (2015.01)	A 6 1 K	35/747
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 K	38/39 (2006.01)	A 6 1 K	38/39
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/00
A 6 1 K	31/70 (2006.01)	A 6 1 K	31/70
C 0 7 K	14/78 (2006.01)	C 0 7 K	14/78

(73)特許権者 517260490

ダーハム, ポール エル.

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 7 1 4, ニクサ, ウッドキャッスル ロード 1 3 1 7

(73)特許権者 517260504

ノートン, ライ

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 7 2 1, オザーク, イー. ハイビュー ドライブ 1 2 0 0

(73)特許権者 517260515

ホーキンス, ジョーダン エル.

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 8 0 2, スプリングフィールド, サウス カントン アベニュー 6 3 2

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リンチ, ステファニー

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 8 0 4, スプリングフィールド, イースト メドーマア ストリート 1 4 5 5

(72)発明者 デーク, ロジャー エル.

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 8 1 0, スプリングフィールド, ウェスト ロイヤル オークス ドライブ 2 0 7 3

(72)発明者 ダーハム, ポール エル.

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 7 1 4, ニクサ, ウッドキャッスル ロード 1 3 1 7

(72)発明者 ノートン, ライ

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 7 2 1, オザーク, イー. ハイビュー ドライブ 1 2 0 0

(72)発明者 ホーキンス, ジョーダン エル.

アメリカ合衆国 ミズーリ 6 5 8 0 2, スプリングフィールド, サウス カントン アベニュー 6 3 2

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特開2007-039423(JP,A)

米国特許出願公開第2013/0345139(US,A1)
米国特許出願公開第2004/0010122(US,A1)
米国特許出願公開第2015/0011500(US,A1)
中国特許出願公開第101099861(CN,A)
中国特許出願公開第102948621(CN,A)
中国特許出願公開第103564516(CN,A)
米国特許出願公開第2004/0005382(US,A1)
米国特許出願公開第2009/0041736(US,A1)
米国特許出願公開第2012/0263758(US,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A23L 33/135
C12N 1/20
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
FSTA(STN)