

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2012 年 10 月 4 日(04.10.2012)



(10) 国際公開番号  
**WO 2012/132913 A1**

- (51) 国際特許分類:  
A61K 35/74 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)  
A61K 31/19 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)  
A61K 31/192 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/056628
- (22) 国際出願日: 2012 年 3 月 15 日(15.03.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2011-072462 2011 年 3 月 29 日(29.03.2011) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社明治(MEIJI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1368908 東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 10 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 利光 孝之 (TOSHIMITSU, Takayuki) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 株式会社明治 研究本部内 Kanagawa (JP). 池上 秀二(IKEGAMI, Shuji) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 株式会社明治 研究本部内 Kanagawa (JP). 伊藤裕之(ITU, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 株式会社明治 研究本部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: CLOSTRIDIUM DIFFICILE GROWTH INHIBITOR

(54) 発明の名称: クロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤

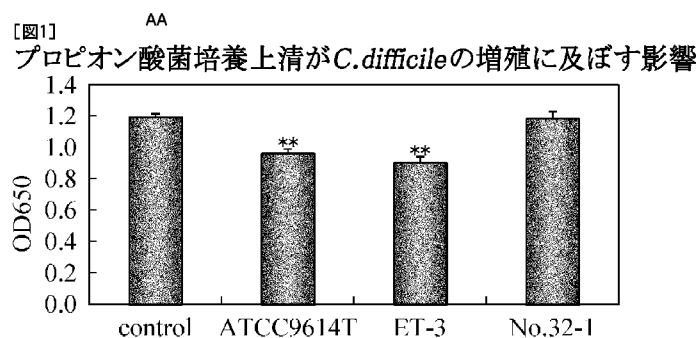


FIG. 1:  
AA Effect of propionic acid bacterium culture supernatant on the growth of *C. difficile*

(57) Abstract: Provided are: a *Clostridium difficile* growth inhibitor which comprises, as the active ingredient, a propionic acid bacterium and/or a fermentation product thereof; and a prebiotics composition which has an effect of inhibiting the growth of *Clostridium difficile*. Also provided are: a *Clostridium difficile* growth inhibitor which comprises, as the active ingredient, 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) and/or an organic acid; a prebiotics composition which has an effect of inhibiting the growth of *Clostridium difficile*; and a food composition comprising the same. Also provided is a method for inhibiting the growth of *Clostridium difficile*, said method comprising taking or administering the aforesaid substances.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2012/132913 A1



規則 4.17 に規定する申立て:

添付公開書類:

- 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii)) — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

プロピオン酸菌及び／又はその発酵物を有効成分とするクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤、およびクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物を提供する。また、1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を有効成分とするクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤、およびクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物、さらにこれらを含む食品組成物を提供する。また、これらを摂取又は投与するクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害方法を提供する。

## 明 細 書

発明の名称：クロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤

### 技術分野

[0001] 本発明は、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤、並びに、クロストリジウム・ディフィシル増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物及びこれを含んでなる飲食品組成物並びにクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害方法に関する。

### 背景技術

[0002] クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) は抗菌薬が誘因となる下痢症あるいは腸炎の主要な原因菌であり、偽膜性大腸炎の原因菌としてよく知られている。クロストリジウム・ディフィシル感染症の症状は、軽度の下痢症状から、腸閉塞等死に至るような重篤な病態まで幅が広いことを特徴とする。さらに、本感染症は再発することが多く治療が困難で、院内感染の原因菌としても重要で、病院入院症例や老人ホームの入居者における院内集団発生が頻繁に報告されている。こうした場合の臨床現場においては薬剤による治療が困難であるため、特に簡便に用いることができる飲食品やプレバイオティクスによる症状緩和、感染症抑制やその予防が強く求められている。

[0003] これまでも、様々なクロストリジウム・ディフィシル感染症に対する対応策が検討されている。例えば、特許文献1にはフラクトオリゴ糖からなる未消化性オリゴ糖の治療有効量を投与することでクロストリジウム・ディフィシルによる哺乳動物の感染症を抑制する方法が開示されている。また特許文献2にはホップ抽出物等を飲食品もしくは飲料に添加して又は投与してクロストリジウム・ディフィシルの増殖を抑制し、さらにはこれにより誘起される疾病の治療又は予防を行う事を開示している。さらに、特許文献3は、クロストリジウム・ディフィシル等による院内感染性の感染症の増加にともない、これらの疾患に対する新規抗菌化合物として、クロストリジウム・ディ

フィシル増殖阻害効果を有するツリシンCDというバクテリオシンについて開示している。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許第5688777号明細書

特許文献2：特開平11-221064号公報

特許文献3：特表2011-505126号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0005] しかし、上記特許文献に開示の技術においては、有用なビフィズス菌の増殖を促進しつつ、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) の増殖を阻害するようなプレバイオティクス及びプレバイオティクス由来成分については開示されておらず、またこれについて報告した例はこれまで知られていなかった。

[0006] したがって、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) の増殖を抑制し、またこれによる症状緩和、さらにはこれによる感染症抑制やその予防が、より簡便な方法でかつ高い効果で達成しうる技術の開発が引き続き望まれていた。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記従来の問題点に鑑み鋭意研究を進めたところ、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*)、特にET-3株やATCC9614T株等の培養上清がクロストリジウム・ディフィシルの増殖を抑制しうることを見出した。また、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒET-3株やATCC9614T株等が高産生する1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸がクロストリジウム・ディフィシルの増殖を顕著に阻害することを見出した。

[0008] したがって、本発明はビフィズス菌、乳酸菌等の有用細菌に対して影響を及ぼすことなくクロストリジウム・ディフィシルの増殖を顕著に抑制するプレバイオティクス組成物及びこれを含んでなる飲食品組成物、並びにクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法を提供する。

[0009] 本発明の好ましい態様は、プロピオン酸菌及び／又はその発酵物を有効成分として含む、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤である。

また、本発明の一態様は、プロピオン酸菌及び／又はその発酵物を含んでなるクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物である。

[0010] 上記増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物における前記プロピオン酸菌としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T) であることが好ましい。

[0011] 本発明の好ましい態様は、1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を有効成分として含む、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤である。

また本発明の別の態様は、1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を含んでなるクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物である。

[0012] 上記増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物における前記1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium*

f r e u d e n r e i c h i i E T - 3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (P r o p i o n i b a c t e r i u m f r e u d e n r e i c h i i A T C C 9 6 1 4 T) の発酵物より得られるもの、あるいは、合成DHNAであることが好ましい。DHNAは、当業者であれば公知の手法によって適宜合成することが可能である。そして前記の有機酸は、酢酸、蟻酸、プロピオン酸などが挙げられ、特に好ましくはプロピオン酸である。

[0013] 本発明のさらに別の態様は、有効量のプロピオン酸菌及び／又はその発酵物を含んでなるクロストリジウム・ディフィシル (C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e) 増殖阻害作用を有する飲食品組成物である。

[0014] 上記飲食品組成物における前記プロピオン酸菌としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ E T - 3 (P r o p i o n i b a c t e r i u m f r e u d e n r e i c h i i E T - 3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (P r o p i o n i b a c t e r i u m f r e u d e n r e i c h i i A T C C 9 6 1 4 T) であることが好ましい。

[0015] また本発明のさらに別の態様は、有効量の1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を含んでなるクロストリジウム・ディフィシル (C l o s t r i d i u m d i f f i c i l e) 増殖阻害作用を有する飲食品組成物である。

[0016] 上記飲食品組成物における前記1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ E T - 3 (P r o p i o n i b a c t e r i u m f r e u d e n r e i c h i i E T - 3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (P r o p i o n i b a c t e r i u m f r e u d e n r e i c h i i A T C C 9 6 1 4 T) の発酵物より得られるものであることが好ましい。

[0017] 本発明のさらに別の態様は、有効量のプロピオン酸菌及び／又はその発酵

物を含んでなるプレバイオティクス組成物を摂取又は投与することを特徴とするクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法である。

[0018] 上記クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法における前記プロピオン酸菌としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T) であることが好ましい。

[0019] また本発明のさらに別の態様は、有効量の 1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を含んでなるプレバイオティクス組成物を摂取又は投与することを特徴とするクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法である。投与対象としては、例えば、ヒトあるいは非ヒト哺乳動物等が挙げられる。また本発明の上記増殖阻害方法には、例えば、インビボ、インビトロ、エクスビボの方法が含まれる。

[0020] 上記クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法における前記 1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T) の発酵物より得られるものであることが好ましい。

[0021] また、本発明のクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤は、後述のように、ビフィズス菌、乳酸菌等の有用細菌に対して影響を及ぼすことなくクロストリジウム・ディフィシルの増殖を顕著に抑制する効果を有する。した

がって、本発明の増殖阻害剤の利用態様としては、例えば、ビフィズス菌、乳酸菌等の有用細菌の増殖に影響を及ぼす作用を有する抗生物質や抗菌薬と併用して用いる態様が挙げられる。即ち、本発明の増殖阻害剤は、抗生物質や抗菌薬との併用剤として有用である。

[0022] 本発明の増殖阻害剤と併用される抗生物質としては、例えば、リンコマイシン系抗生物質、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、クロラムフェニコール系抗生物質、ペプチド系抗生物質、ホスホマイシンなどが挙げられ、本発明の抗菌薬としては、例えば、サルファ剤、抗結核薬、キノロン系抗菌薬、ニューキノロン系抗菌薬、抗ウィルス薬、抗真菌薬などが挙げられる。これらの抗生物質や抗菌薬は、クロストリジウム・ディフィシルの増殖を引き起こす恐れがあるため、クロストリジウム・ディフィシルの増殖を抑制する目的で併用する。また、メトロニダゾール (metronidazole) やバンコマイシン (vancomycin)、フィダキソマイシン (Fidaxomicin) といったクロストリジウム・ディフィシルに有効な抗生物質の作用を補完する形で本発明のクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤を併用することも本発明の範囲に含まれる。

[0023] また本発明は、プロピオン酸菌及び／又はその発酵物の、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤の製造のための使用に関する。

さらに本発明は、1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) 及び／又は有機酸の、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤の製造のための使用に関する。

[0024] また本発明は、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害に用いるためのプロピオン酸菌及び／又はその発酵物に関する。

さらに本発明は、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害に用いるための1, 4-ジヒドロキシ



－２－ナフトエ酸（DHNA）に関する。

## 発明の効果

[0025] 本発明のプレバイオティクス組成物は腸内の有用な細菌であるビフィズス菌の増殖を促進し、また乳酸菌の増殖には影響を及ぼさない。そのため、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒET-3株及びATCC9614T株並びにDHNA等を含む本発明のプレバイオティクス組成物はビフィズス菌等の増殖を促進する一方、極めて有害な細菌であるクロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）の増殖を抑制することができる。したがって本発明は、非常に有用なクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物及びこれを含んでなる飲食品組成物並びにクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害方法を提供することが可能である。

## 図面の簡単な説明

[0026] [図1]本発明のプレバイオティクス組成物のクロストリジウム・ディフィシルの増殖阻害活性を示すグラフ図である。

[図2]本発明のプレバイオティクス組成物のクロストリジウム・ディフィシルの増殖阻害活性を示すグラフ図である。

[図3]本発明のプレバイオティクス組成物がビフィズス菌（*Bifidobacterium longum* OLB6001株）の増殖に及ぼす影響を示すグラフ図である。

[図4]本発明のプレバイオティクス組成物が乳酸菌（*L. bulgaricus*）の増殖に及ぼす影響を示すグラフ図である。

[図5]本発明のプレバイオティクス組成物が乳酸菌（*S. thermophilus* OLS3059株）の増殖に及ぼす影響を示すグラフ図である。

[図6]本発明のプロピオン酸がクロストリジウム・ディフィシルの増殖に及ぼす影響を示すグラフ図である。

[図7]受託番号FERM BP-8115（プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒET-3株）の受託証の写しである。

[図8]受託番号FERM BP-8115（プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒET-3株）の生存に関する証明書の写しである。

### 発明を実施するための形態

[0027] 以下、本発明を詳細に説明するが、本発明は以下に述べる個々の形態には限定されない。

[0028] プロピオン酸菌は、古くからエメンタールチーズ等のスターターとして利用されており、その安全性は確認されている。本発明によるクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物に含まれるプロピオン酸菌の例としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒET-3（*Propionibacterium freudenreichii* ET-3）、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T（*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T）、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ IFO 12424（*Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424）、*Propionibacterium jensenii*、*Propionibacterium acidipropionici*等プロピオニバクテリウム属に属する微生物が挙げられる。この中でも特に、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3株、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T株が好ましい。

これらの菌体については単独または複数のものを組み合わせて使用しても良い。

[0029] 本発明によるクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物で用いられるプロピオン酸菌及び／またはその発酵物としては、前記プロピオニバクテリウム属微生物を常法に従って培養することによって得られる。得られた発酵物それ自体、及び／又はその処理物を、本発明に係る増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物として使用できる。処理物は例えば、菌体を含む発酵物、発酵物を濾過あるいは除菌して得た濾液

、所定の溶媒により抽出した抽出物、エバポレーター等により発酵物・その濾液・抽出物・上清液を濃縮した濃縮物、これらの乾燥物（凍結乾燥、他）等の処理工程を経たものを用いることができる。

[0030] 好ましいプロピオン酸菌及び／またはその発酵物の添加量としては、発酵物の濃縮度等によって異なる。例えば、国際公開パンフレット第WO 2005 / 033323号明細書の実施例1に記載の方法で製造したプロピオン酸菌の発酵物をDHNA濃度100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるまで濃縮したものの場合、本発明の増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物に対して0.1～10重量%、好ましくは0.3～5重量%である。

[0031] 本発明によるクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物に含まれる1,4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸（DHNA）としては、化学合成または生合成によるもののいずれでも用いることができるが、好ましくは生合成によるものである。本発明においては特に、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ（*Propionibacterium freudenreichii*）ET-3株やプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T（*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T）、が高産生するDHNAを用いることが好ましい。たとえば、プロピオニバクテリウム属微生物を常法に従って培養することによって得られる発酵物それ自体、及び／又はその処理物をDHNAとして使用できる。処理物は例えば、菌体を含む発酵物、発酵物を濾過あるいは除菌して得た濾液、所定の溶媒により抽出した抽出物等の粗製物、またそれらの精製物、エバポレーター等による発酵物・その濾液・抽出物・上清液を濃縮した濃縮物、これらの乾燥物（凍結乾燥、他）等の処理工程を経たものを用いることができる。DHNAの濃度としては、用途等に応じて適宜調整することができるが、1～250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは1～5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である。

[0032] 本発明はプレバイオティクス組成物を含有する飲食品組成物も提供する。

[0033] 本発明のプレバイオティクス組成物を含有する飲食品組成物は、具体的に

は、飲食品組成物、例えば、牛乳、清涼飲料、発酵乳（ヨーグルト、ヨーグルト飲料）、チーズ、パン、ビスケット、クラッカー、ピッツァクラスト、調製粉乳、流動食、病者用食品、幼児用粉乳等食品、授乳婦用粉乳等食品、栄養食品等に本発明のプレバイオティクス組成物を添加し、これを摂取してもよい。また、その性状についても、通常用いられる飲食品の状態、例えば、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状、流動食状、ゼリー状、タブレット状、顆粒状、カプセル状等、通常流通し得るあらゆる飲食品形状をとることができる。この中でも、簡便に摂取しうる点、吸収性の点等から、本発明の飲食品組成物は飲料の形態で提供することが好ましい。

[0034] その他の成分についても特に限定されないが、本発明のプレバイオティクス組成物を飲食品組成物に含ませて用いる場合には、水、タンパク質、糖質、脂質、ビタミン類、ミネラル類、有機酸、有機塩基、果汁、フレーバー類等を主成分として使用することができる。タンパク質としては、例えば全脂粉乳、脱脂粉乳、部分脱脂粉乳、カゼイン、ホエイ粉、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質濃縮物、ホエイタンパク質分離物、 $\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼイン、 $\kappa$ -カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、ラクトフェリン、大豆タンパク質、鶏卵タンパク質、肉タンパク質等の動植物性タンパク質、これら加水分解物；バター、乳清ミネラル、クリーム、ホエイ、非タンパク態窒素、シアル酸、リン脂質、乳糖等の各種乳由来成分等が挙げられる。糖質としては一般の糖類、加工澱粉（デキストリンのほか、可溶性澱粉、ブリティッシュスターチ、酸化澱粉、澱粉エステル、澱粉エーテル等）、食物繊維等が挙げられる。脂質としては、例えば、ラード、魚油等、これらの分別油、水素添加油、エステル交換油等の動物性油脂；パーム油、サフラワー油、コーン油、ナタネ油、ヤシ油、これらの分別油、水素添加油、エステル交換油等の植物性油脂等が挙げられる。ビタミン類としては、例えば、ビタミンA、カロチン類、ビタミンB群、ビタミンC、ビタミンD群、ビタミンE、ビタミンK群、ビタミンP、ビタミンQ、ナイアシン、ニ

コチン酸、パントテン酸、ビオチン、イノシトール、コリン、葉酸等が挙げられ、ミネラル類としては、例えば、カルシウム、リン、カリウム、マグネシウム、塩素、ナトリウム、銅、鉄、マンガン、亜鉛、セレン、クロム、モリブデン、バナジウム、乳清ミネラル等が挙げられる。有機酸としては、例えば、リンゴ酸、クエン酸、乳酸、酒石酸等が挙げられる。これらの成分は、単独でも2種以上を組み合わせても使用することができ、合成品及び／またはこれらを多く含む飲食品を用いてもよい。

[0035] 上記飲食品組成物は、本発明のプレバイオティクス組成物と上記必要成分の適宜量とを混合し、常法に従って製造することができる。

[0036] 本発明の飲食品組成物におけるプレバイオティクス組成物の含有量は、その目的、用途等に応じて任意に定めることができる。本発明はこれに限定されないがその含有量としては、全量に対して通常、5重量%以上、より好ましくは10重量%以上である。これを摂取または投与することで簡便にクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害を行うことができ、ひいては症状緩和、感染症抑制やその予防ができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0037] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより限定されるものではない。なお、実施例において「%」表示は特に明記する場合を除き重量%を示すものとする。

[0038] [実施例1]

・本発明のプレバイオティクス組成物であるプロピオン酸菌培養上清の調製  
プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3株(平成13年8月9日付で、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番地1中央第6(郵便番号305-8566))にFERM BP-8115として寄託されている)、プロピオニバクテリウ

ム・フロイデンライヒ ATCC 9614 T株（プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ基準株、American Type Culture Collection (ATCC) より購入）、市販のエメンタールチーズより分離したプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ株（No. 32-1）を30℃嫌気条件下で48時間賦活及び前培養した後、さらに30℃嫌気条件下で72時間培養した。培養物を遠心分離し（遠心分離条件：8000 rpm、4℃、10分）、培養上清を回収し、フィルター滅菌し、得られた培養上清を本発明のプレバイオティクス組成物として-80℃で保存した。

[0039] ・クロストリジウム・ディフィシルの培養

クロストリジウム・ディフィシル JCM 1296 T株（クロストリジウム・ディフィシル基準株）は理研バイオリソースセンターより購入し、添付のマニュアルに従って復元した。

[0040] ・阻害試験

上記において調整したクロストリジウム・ディフィシルを予め嫌気状態に保ったBHI培地に1%接種した。これに本発明のプレバイオティクス組成物又はDHNAを添加し、37℃嫌気条件下で24時間培養した。培養液をよく攪拌した後、OD<sub>650</sub>を測定した（島津分光光度計BioSpec 1600、（株）島津製作所製）。結果をグラフ図として図1に示す。なお得られたデータについては、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行い、各群n=3、\*p<0.05、\*\*p<0.01とした。なお、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC 9614 T及びプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3についてはcontrol群に対してp<0.01とした。

[0041] [結果]

本発明のプレバイオティクス組成物を5%添加した系において、24時間培養後のOD<sub>650</sub>が有意に低下したことから、本発明のプレバイオティクス組成物が効果的にクロストリジウム・ディフィシルの増殖阻害をすることがわか

った。

[0042] [実施例2]

・本発明のプレバイオティクス組成物に含むDHNAの調製

DHNA (Sigma-Aldrich製) 100mgを0.5mlのDMSOに溶解し、1MのDMSO溶液を作成した。BHI培地で10倍希釈し100mMとした後、フィルター滅菌した。同時にDMSOをBHI培地で10倍希釈した溶液も作成し、フィルター滅菌した。その後の希釈は全て10倍希釈DMSO溶液で行い、全濃度のDHNA溶液にDMSOが10%含まれるようにした。これらのDHNA溶液を本発明のプレバイオティクス組成物として菌培養液に0.1%添加するため、DMSOの最終濃度はいずれも0.01%とした。

[0043] ・阻害試験

実施例1において用いたクロストリジウム・ディフィシルに対する本発明のプレバイオティクス組成物の増殖阻害効果について実施例1と同様の阻害試験を行った。具体的には各試料に対してDHNA含有の本発明のプレバイオティクス組成物をそれぞれの濃度で添加した(1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、20 $\mu$ M、50 $\mu$ M)。得られた結果を図2のグラフに示す。なお、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行い、各群n=3、\*p<0.05とした。なお、10 $\mu$ M~50 $\mu$ MについてはDMSO群に対して\*\*p<0.01とした。

[0044] 図2に示すように10 $\mu$ M以上のDHNAの添加により、クロストリジウム・ディフィシルの増殖が顕著に阻害されることが示された。

[0045] [実施例3]

・ビフィズス菌及び乳酸菌培養上清の調整

B. longum OLB6001株(FERM P-13610)及び「明治ブルガリアヨーグルト」(商品名:明治乳業社製)より分離したL. bulgaricusは37℃嫌気条件下で18時間培養した。S. thermophilus OLS3059株(FERM P-15487)は3

0℃嫌気条件下で30時間培養した。培養物を遠心分離し（遠心分離条件：8000rpm、4℃、10分）、培養上清を回収し、フィルター滅菌して、得られた培養上清を比較組成物として-80℃で保存した（乳酸菌は実施例4において使用）。

[0046] ・本発明のプレバイオティクス組成物がビフィズス菌の増殖に及ぼす影響

*Bifidobacterium longum* OLB6001株を実施例2において用いたDHNAもしくは0.01%DMSOを（対照）添加し、37℃嫌気条件下で12時間培養した。培養液をよく攪拌した後、OD<sub>650</sub>を測定した（島津分光光度計BioSpec1600、（株）島津製作所製）。結果をグラフ図として図3に示す。なお、Tukey-Kramer法による多重比較検定を行い、各群n=3、\*p<0.05とした。なお、10μM~50μMについてはDMSO群に対して\*\*p<0.01とした。

[0047] [結果]

本発明のDHNAを含有するプレバイオティクス組成物の添加によりOLB6001株の増殖が有意に促進されることがわかった。即ち、本発明のプレバイオティクス組成物は有用細菌に対して影響を及ぼさずむしろ増殖促進効果があることが示された。したがって、クロストリジウム・ディフィシルの増殖阻害を行う際には有用細菌についてその増殖に影響を及ぼさない（むしろ増殖促進効果がある）ことがわかった。

[0048] [実施例4]

・本発明のプレバイオティクス組成物が乳酸菌の増殖に及ぼす影響

本発明のDHNAを含有するプレバイオティクス組成物（DHNA濃度：1μM~50μM）の、実施例3で用いた*L. bulgaricus*及び*S. thermophilus* OLS3059株に対する影響を調べるため、実施例3と同様の試験を行い、結果を図4及び図5に示す。実施例3と同様に、本発明のDHNAを含有するプレバイオティクス組成物の添加により*L. bulgaricus*及び*S. thermophilus* OLS3059株の増殖に対して影響を及ぼさないことがわかった。したがって、クロ



クロストリジウム・ディフィシルの増殖阻害する際には有用細菌についてその増殖に影響を及ぼさないことがわかった。

[実施例 5]

・本発明のプロピオン酸がクロストリジウム・ディフィシルの増殖に及ぼす影響

24 時間培養して  $OD_{650}$  が 1.2 まで増殖したクロストリジウム・ディフィシル (*C. difficile* JCM1296 株) 培養液を培地に 1% 添加すると同時に、各種有機酸を終濃度  $100 \mu M$  となるように添加し、24 時間後の  $OD_{650}$  値を測定した。結果をグラフ図として図 6 に示す。

図 6 に示すようにプロピオン酸の添加により、クロストリジウム・ディフィシルの増殖が阻害されることが示された。

### 産業上の利用可能性

[0049] 本発明によるクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害剤またはプレバイオティクス組成物は腸内の有用細菌であるビフィズス菌や乳酸菌の増殖には影響を及ぼさないあるいは増殖に対して有効である一方、極めて有害な細菌であるクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) の増殖を抑制することができる。そのため、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 株及び ATCC 9614 T 株並びに DHNA 等を含む本発明のプレバイオティクス組成物に基づき、非常に有用なクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害作用を有するプレバイオティクス組成物及びこれを含んでなる飲食品組成物並びにクロストリジウム・ディフィシル増殖阻害方法を提供することが可能であり、産業上の利用可能性は非常に高い。

## 請求の範囲

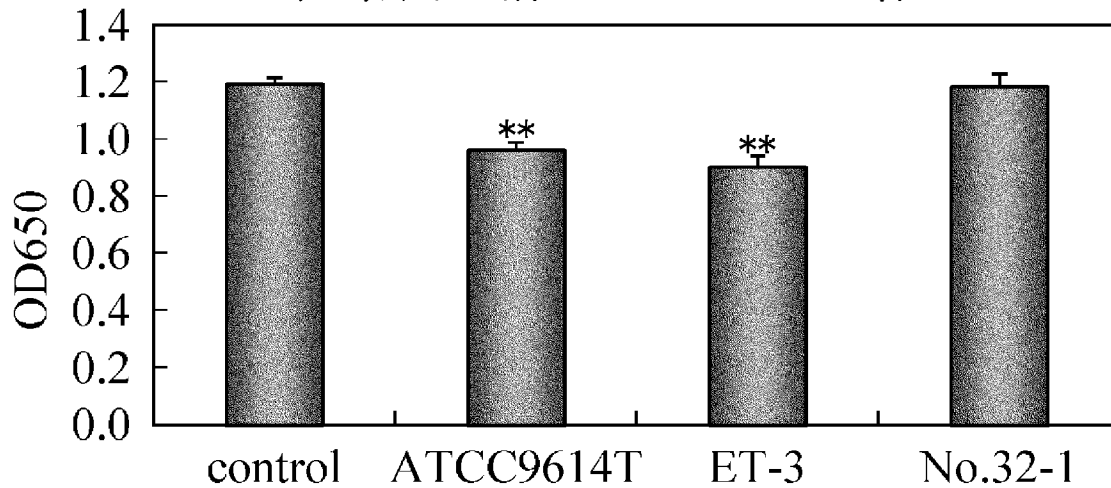
- [請求項1] プロピオン酸菌及び／又はその発酵物を有効成分として含む、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤。
- [請求項2] 前記プロピオン酸菌が、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T) である、請求項1に記載の薬剤。
- [請求項3] 1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を有効成分として含む、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害剤。
- [請求項4] 前記1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) がプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T) の発酵物より得られるものである、請求項3に記載の薬剤。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれかに記載の薬剤を含んでなる、抗生物質もしくは抗菌薬との併用剤。
- [請求項6] 有効量のプロピオン酸菌及び／又はその発酵物を含んでなるプレバイオティクス組成物を摂取又は投与することを特徴とするクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法。
- [請求項7] 前記プロピオン酸菌が、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freude*

nreichii ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T)であることを特徴とする請求項6に記載のクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法。

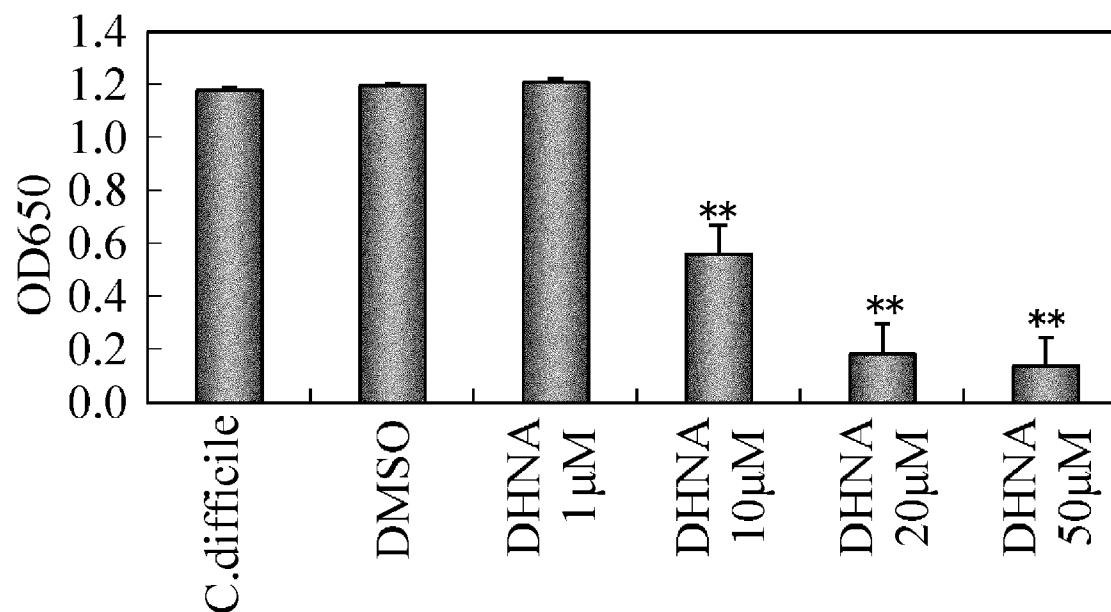
[請求項8] 有効量の1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) および／または有機酸を含んでなるプレバイオティクス組成物を摂取又は投与することを特徴とするクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法。

[請求項9] 前記1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (DHNA) がプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ET-3 (*Propionibacterium freudenreichii* ET-3) またはプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ ATCC9614T (*Propionibacterium freudenreichii* ATCC9614T) の発酵物より得られるものであることを特徴とする請求項8に記載のクロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) 増殖阻害方法。

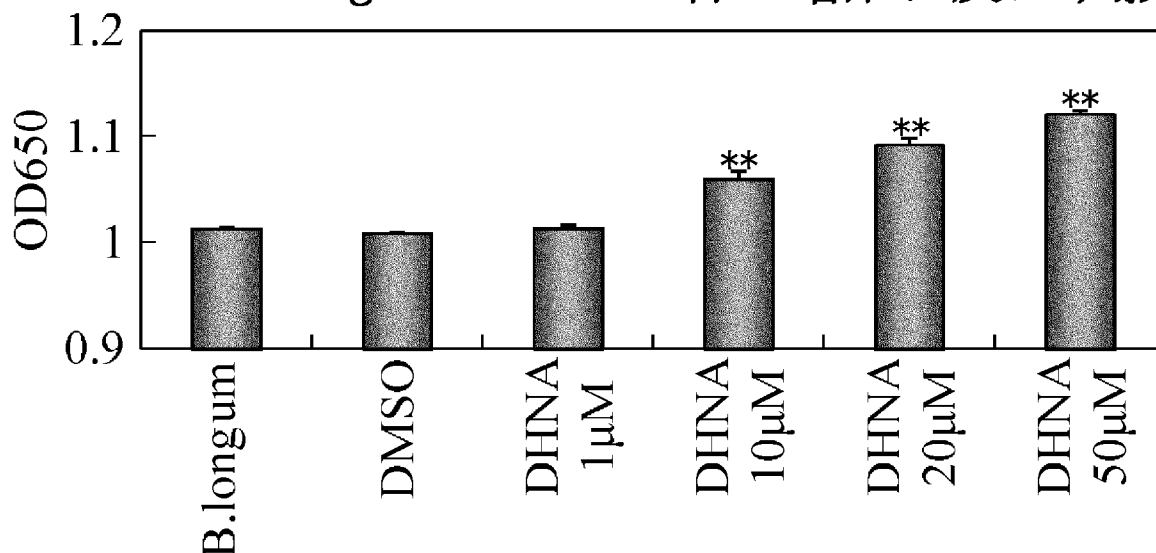
[図1]

プロピオン酸菌培養上清が*C.difficile*の増殖に及ぼす影響

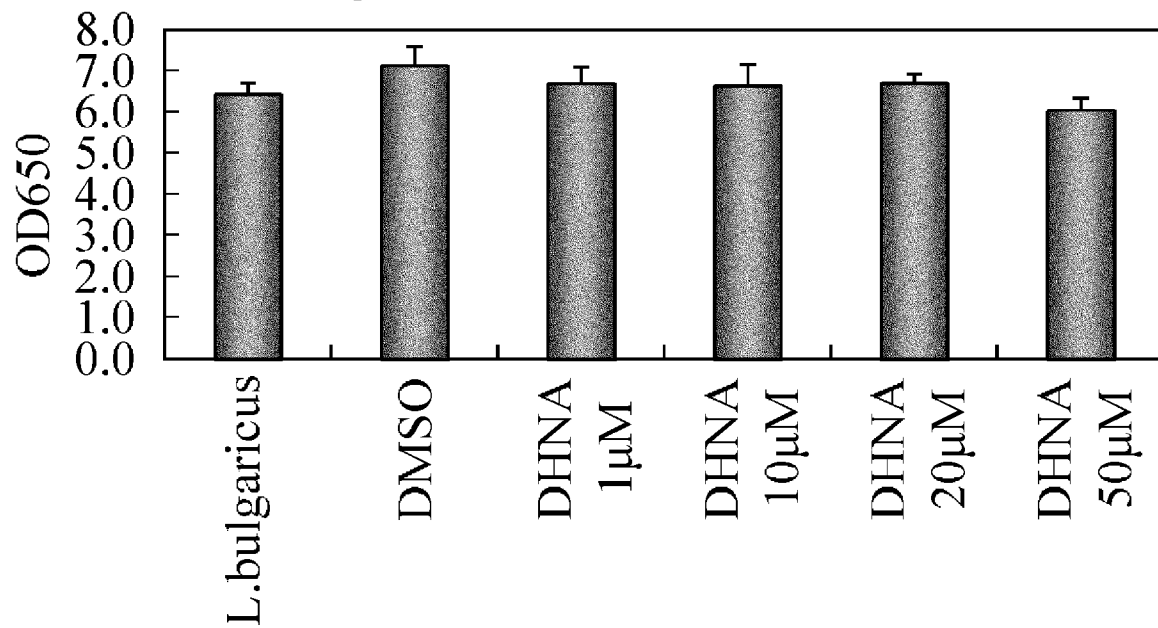
[図2]

DHNAが*C.difficile*JCM1296株の増殖に及ぼす影響

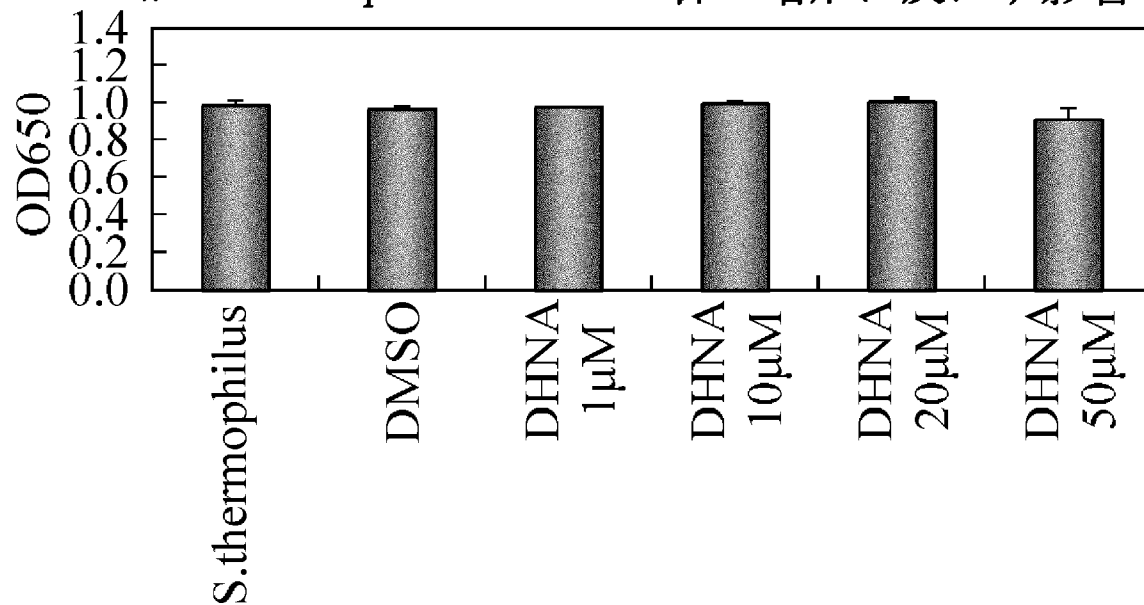
[図3]

DHNAが*B.longum* OLB6001株の増殖に及ぼす影響

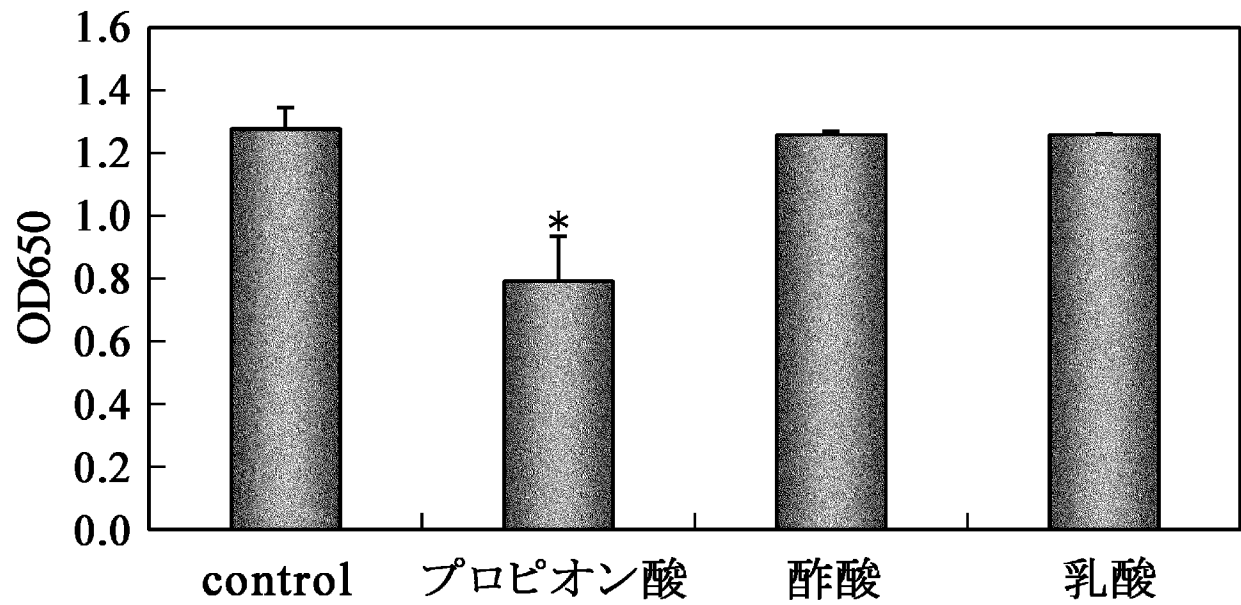
[図4]

DHNAが*L.bulgaricus* の増殖に及ぼす影響

[図5]

DHNAが*S.thermophilus* OLS3059株の増殖に及ぼす影響

[図6]

プロピオン酸が*C. difficile*JCM1296株の増殖に及ぼす影響

## [図7]

国際様式

INTERNATIONAL FORM

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 原寄託についての受託証

氏名(名称) 明治乳業株式会社  
代表取締役 中山 悠 殿  
寄託者 あて名 〒 東京都江東区新砂 1-2-10

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 微生物の表示                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |
| (寄託者が付した識別のための表示)<br>ET-3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | (受託番号)<br>FERM BP- 8115 |
| 2. 科学的性質及び分類学上の位置                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |
| 1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。<br><br><input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質<br><input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |
| 3. 受領及び受託                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |
| 本国際寄託当局は、平成 13 年 8 月 9 日(原寄託日)に受領した 1 欄の微生物を受託する。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |
| 4. 移管請求の受領                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                         |
| 本国際寄託当局は、平成 13 年 8 月 9 日(原寄託日)に 1 欄の微生物を受領した。<br>そして、平成 14 年 7 月 11 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。<br>(平成 13 年 8 月 9 日に寄託された FERM P- 18454 号より移管)                                                                                                                                                                                                                                                   |                         |
| 5. 国際寄託当局                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |
| <p>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</p> <p>International Patent Organism Depository</p> <p>名 称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology</p> <p>センター長 岡 修一</p> <p>Dr. Syuichi Oka, Director</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)<br/>AIST Tsukuba Central 6-1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,<br/>Ibaraki-ken 305-8566 Japan</p> <p>平成 14 年(2002) 7 月 11 日</p> |                         |

## [図8]

国際様式

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブタペスト条約

下記国際寄託当局によって規則10.2に従い  
発行される。

VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

## 生存に関する証明書

氏名(名称) 明治乳業株式会社  
代表取締役 中山 悠  
申請者 殿  
あて名 〒  
東京都江東区新砂1-2-10

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1. 寄託者                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 2. 微生物の表示                                                  |
| 氏名(名称) 明治乳業株式会社<br>代表取締役 中山 悠<br>あて名 〒<br>東京都江東区新砂1-2-10                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 受託番号:<br><br>FERM BP- 8115<br><br>受託の日:<br><br>平成13年 8月 9日 |
| 3. 生存試験の結果                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                            |
| 2欄の微生物の生存について 平成14年 7月24日に試験を実施した結果、当該微生物は、<br><input checked="" type="checkbox"/> 生存していた。<br><input type="checkbox"/> 生存していなかった。                                                                                                                                                                                                                       |                                                            |
| 4. 生存試験に際して使用した条件(結果が否定的である場合のみ)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                            |
| <input type="checkbox"/> 微生物条件記録書の写し 1通                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                            |
| 5. 国際寄託当局                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                            |
| 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<br>International Patent Organism Depository<br>名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology<br>センター長 岡 修<br>Dr. Syuichi Oka, Director<br>あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6ビル(郵便番号305-8566)<br>AIST Tsukuba Central 6.1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi,<br>Ibaraki-ken 305-8566 Japan<br>平成14年(2002) 7月26日 |                                                            |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/056628

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/74(2006.01)i, A61K31/19(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)n

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/74, A61K31/19, A61K31/192, A61P31/04, A23L1/30

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

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2012 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2012 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2012 |

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

CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | US 2004/0170617 A1 (Sydney M. Finegold),<br>02 September 2004 (02.09.2004),<br>entire text; particularly, paragraphs [0019],<br>[0050], [0051]<br>& WO 2001/093904 A1                                | 1, 3-5<br>1-5         |
| Y         | WO 2006/098447 A1 (Meiji Feed Co., Ltd.),<br>21 September 2006 (21.09.2006),<br>entire text; particularly, paragraph [0003];<br>claims<br>& JP 2006-254841 A & US 2009/0214695 A1<br>& EP 1867238 A1 | 1-5                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 April, 2012 (23.04.12)

Date of mailing of the international search report  
01 May, 2012 (01.05.12)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/056628

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                         | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X<br>Y    | JP 2010-280582 A (Miyarisan Pharmaceutical Co., Ltd.),<br>16 December 2010 (16.12.2010),<br>paragraph [0022]; table 2<br>(Family: none)    | 1-5<br>1-5            |
| X         | WO 2005/094850 A1 (Meiji Milk Products Co., Ltd.),<br>13 October 2005 (13.10.2005),<br>entire text<br>& US 2007/0172547 A1 & EP 1743647 A1 | 3-5                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2012/056628

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-9  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 6 to 9 involve "methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy".
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/74(2006.01)i, A61K31/19(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)n

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/74, A61K31/19, A61K31/192, A61P31/04, A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 日本国実用新案公報   | 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1 9 7 1 - 2 0 1 2 年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1 9 9 6 - 2 0 1 2 年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1 9 9 4 - 2 0 1 2 年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                   | 関連する<br>請求項の番号 |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| X<br>Y          | US 2004/0170617 A1 (Sydney M. Finegold) 2004.09.02, 全文、特に【0019】、【0050】、【0051】<br>& WO 2001/093904 A1                | 1, 3-5<br>1-5  |
| Y               | WO 2006/098447 A1 (明治飼糧株式会社) 2006.09.21, 全文、特に【0003】、請求項<br>& JP 2006-254841 A & US 2009/0214695 A1 & EP 1867238 A1 | 1-5            |

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 3 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 1 . 0 5 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 直寛

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

4 0 4 1

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                     |                |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                   | 関連する<br>請求項の番号 |
| X<br>Y                | JP 2010-280582 A (ミヤリサン製薬株式会社) 2010.12.16, 【0022】、【表2】<br>(ファミリーなし)                 | 1-5<br>1-5     |
| X                     | WO 2005/094850 A1 (明治乳業株式会社) 2005.10.13, 全文<br>& US 2007/0172547 A1 & EP 1743647 A1 | 3-5            |

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 6-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲6-9は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。
2. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。