

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7181879号
(P7181879)

(45)発行日 令和4年12月1日(2022.12.1)

(24)登録日 令和4年11月22日(2022.11.22)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 35/66 (2015.01)	A 6 1 K 35/66	
A 6 1 K 35/747 (2015.01)	A 6 1 K 35/747	
A 6 1 K 35/745 (2015.01)	A 6 1 K 35/745	
A 6 1 K 36/06 (2006.01)	A 6 1 K 36/06	A
A 6 1 K 47/04 (2006.01)	A 6 1 K 47/04	
請求項の数 19 (全21頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2019-538674(P2019-538674)	(73)特許権者	397060588 デュボン ニュートリション バイオサイ エンシーズ エーピーエス デンマーク国 ディーケイ - 1 4 1 1 コ ベンハーゲン ランゲプロガード 1
(86)(22)出願日	平成30年1月12日(2018.1.12)	(74)代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(65)公表番号	特表2020-505361(P2020-505361 A)	(74)代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(43)公表日	令和2年2月20日(2020.2.20)	(72)発明者	クリストフ・ホラード アメリカ合衆国ウィスコンシン州5 3 7 1 6 . マディソン . アグリカルチャー・ ドライブ3 3 2 2 . ダニスコ・ユーエス エイ・インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/050761	(72)発明者	ジェフリー・パビン
(87)国際公開番号	WO2018/134135		
(87)国際公開日	平成30年7月26日(2018.7.26)		
審査請求日	令和3年1月7日(2021.1.7)		
(31)優先権主張番号	62/448,066		
(32)優先日	平成29年1月19日(2017.1.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	17159494.8		
(32)優先日	平成29年3月7日(2017.3.7)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 賦形剤を含む乾燥微生物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 乾燥微生物と (b) 粉末形態のリン酸塩とのブレンド物を含む組成物であって、前記リン酸塩が、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 $MgHPO_4$ 、 $Mg[H_2PO_4]_2$ 、及びこれらの混合物から選択され、前記リン酸塩が微生物及びリン酸塩の総重量を基準として少なくとも50重量%の量で存在する、上記組成物。

【請求項2】

前記リン酸塩が、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、及びこれらの混合物から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記リン酸塩が、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、及びこれらの混合物から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記リン酸塩が、 K_2HPO_4 、 Na_2HPO_4 、及び $MgHPO_4$ から選択される1つ又はそれ以上の塩と、 KH_2PO_4 、 NaH_2PO_4 、及び $Mg[H_2PO_4]_2$ から選択される1つ又はそれ以上の塩との混合物である、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記リン酸塩がpH6~9にpH調整される、請求項1~4のいずれか1項に記載の組

成物。

【請求項 6】

前記リン酸塩が 6 . 8 ~ 7 . 2 に pH 調整される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記リン酸塩が微生物及びリン酸塩の総重量を基準として少なくとも 6 0 重量 % の量で存在する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記リン酸塩が微生物及びリン酸塩の総重量を基準として少なくとも 8 0 重量 % の量で存在する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 9】

前記微生物が凍結乾燥されている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記微生物がプロバイオティクスである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記微生物が、乳酸杆菌 (lactobacilli)、ビフィズス菌 (bifidobacteria)、サッカロミケス (saccharomyces)、及びこれらの混合物から選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記微生物が、バシラス・コアギュランズ (Bacillus coagulans)、
 20
 、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)
 亜種インファンティス (infantis)、ラクトバシラス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus)、ラクトバシラス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei)、ラクトバシラス・ジョンソニイ (Lactobacillus johnsonii)、ラクトバシラス・プランタラム (Lactobacillus plantarum)、ラクトバシラス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri)、ラクトバシラス・ロイテリ・プロテクティス (Lactobacillus reuteri protectis)、ラクトバシラス・ロイテリ・プロデンティス (Lactobacillus reuteri prodentis)、
 30
 サッカロマイセス・ボウラルディ (Saccharomyces boulardii)、ラクトバシラス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus)、ラクトバシラス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ラクトバシラス・プランタラム (Lactobacillus plantarum)、ラクトバシラス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei)、及びこれらの混合物から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 13】

前記微生物がラクトバシラス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

単位微生物用量の請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物を含有する組成物。

40

【請求項 15】

請求項 14 に記載の組成物を含有するカプセル。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の組成物を含有する小袋。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の組成物を含有する錠剤。

【請求項 18】

請求項 14 に記載の組成物を含有する粉末栄養製剤。

【請求項 19】

(i) (a) 乾燥微生物、及び (b) 粉末形態のリン酸塩を準備する工程；並びに

50

(i i) 前記乾燥微生物と前記粉末形態のリン酸塩とを混合して組成物を得る工程；
を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物の調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乾燥微生物の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

例えば凍結乾燥又は噴霧乾燥によって、貯蔵のために微生物を乾燥することは一般的である。そのような乾燥微生物は、工業用途及び食品用途、例えばチーズ及びヨーグルトの製造において、並びにプロバイオティクスとしても使用されている。貯蔵中に乾燥生物の生存能力はある程度低下するため、時間とともに生細胞数は減少する。これは特に高湿環境では問題になる。

10

【0003】

プロバイオティクスは、適切な投与量で投与された場合にヒト又は動物の健康に有益な生きた微生物である。プロバイオティクスを投与する 1 つの方法は、賦形剤と混合され、カプセル又は小袋の中に包装された乾燥プロバイオティクスの摂取によるものである。残念なことに、乾燥したプロバイオティクスの細胞は貯蔵中にあまり安定ではないため、生細胞数は時間とともに減少し、治療効果が低下する。これは、プロバイオティクスが高い湿度含有率を有する賦形剤とブレンドされている場合、容器の壁が外部の大気中の水分に対して透過性である場合、及びプロバイオティクスが高い相対湿度環境で貯蔵される場合に特に当てはまる。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

第 1 の態様では、本発明は、(a) 乾燥微生物と (b) 粉末形態のリン酸塩とのブレンド物を含有する組成物を提供する。

【0005】

第 2 の態様では、本発明は、(a) 乾燥微生物と (b) 粉末形態のリン酸塩との混合物を含有する組成物を含有する単位微生物用量を提供する。

30

【0006】

第 3 の態様では、本発明は、

(i) (a) 乾燥微生物、及び (b) 粉末形態のリン酸塩を準備する工程；

(i i) 乾燥微生物と粉末形態のリン酸塩とを混合して組成物を得る工程；

を含む、組成物の調製方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図 1】従来の賦形剤 (「 M C C 」) 又は賦形剤なし (「凍結乾燥プロバイオティクス」) と比較した、本発明による賦形剤 (「 K 2 H P O 4 」) と混合した様々な菌株の 30 での湿潤条件 ($a_w = 0.4$) での 3 か月貯蔵後の % 生存率を示す。

40

【図 2】従来の賦形剤 (「 M C C 」) と比較した、本発明による賦形剤 (「 K 2 H P O 4 」) と混合した凍結乾燥ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の a_w ($a_w = 0.1$ 、 $a_w = 0.2$ 、及び $a_w = 0.3$) の関数としての 30 で 3 か月後の % 生存率を示す。

【図 3】30 で 6 か月後の、湿潤条件 ($a_w 0.4$) 下のブレンド物中の K 2 H P O 4 賦形剤の割合の関数としてのラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の % 生存率を示す。

【図 4】30 で 6 か月後の、湿潤条件 ($a_w 0.4$) 下の M C C とのブレンド物中の K 2 H P O 4 賦形剤の割合の関数としてのラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の % 生存率を示す。

50

【図5】1か月後及び3か月後の30%での乾燥条件下($a_w 0.1$)での凍結乾燥ラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)粉末の%生存率に対する賦形剤のpHの影響を示す。「KP」は表示pHまでpHが調整された K_2HPO_4 を示し、「 K_2HPO_4 」はpH調整なしの K_2HPO_4 を示し、「MCC」は微結晶セルロースを示す。

【図6】3か月後の30%での湿潤条件下($a_w 0.4$)での凍結乾燥ラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)粉末の%生存率に対する賦形剤のpHの影響を示す。「 K_2HPO_4 」は表示pHまでpHが調整された K_2HPO_4 を示し、「MCC」は微結晶セルロースを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本明細書で言及される全ての文献は参照により組み込まれる。

【0009】

本発明者らは、驚くべきことに、乾燥微生物の生存率が賦形剤としてのリン酸塩を使用することによって改善されることを見出した。その効果は、高い水分活性(a_w)環境で特に顕著である。高い水分活性は、 $a_w > 0.15$ であるとみなされる。

【0010】

典型的には、微生物乾燥粉末、特にプロバイオティクスは、微生物濃度を標準化するために賦形剤とブレンドされる。特に微生物がカプセル及び小袋に入れている場合に最も使用される賦形剤のうちの1つは、微結晶セルロース(MCC)である。本発明者らは、参照賦形剤としてMCCを使用した。本発明者らは、MCC賦形剤においてほぼ0%の生存率であるのと比較して、リン酸塩を使用すると、3か月以上60%を超える乾燥微生物の生存率が得られることを見出した。この効果は、高い水分活性の環境($a_w > 0.15$ 、特に $a_w > 0.2$ 、更には $a_w > 0.3$)において特に顕著である。

【0011】

水分活性は、好ましくは露点湿度計によって測定される。

【0012】

微生物の生存率は2つの異なる方法で表される。

A) 生存率

$\% \text{生存率} = (\text{貯蔵後のCFU} / \text{CFU}_{t_0}) \times 100\%$

B) Log 損失

$\text{Log 損失} = \text{Log}(\text{CFU}_{t_0}) - \text{Log}(\text{貯蔵後のCFU})$

【0013】

乾燥微生物

本発明の組成物は、乾燥微生物を含有する。微生物、特にプロバイオティクスは、任意の手段で乾燥させることができるものの、凍結乾燥及び噴霧乾燥が好ましく、凍結乾燥が特に好ましい。

【0014】

微生物という表現は、任意の細菌もしくは酵母、又はこれらの混合物、特にプロバイオティクスを包含することが意図されている。

【0015】

プロバイオティクスという用語には、宿主に健康上の利益を与えることを目的として宿主に投与される全ての生存微生物が含まれる。特に、これは酵母もしくは細菌、又はこれらの任意の混合物であってもよい。

【0016】

乾燥微生物、特にプロバイオティクスは、送達に適した任意の形態で提供することができる。例えば、乾燥微生物、特にプロバイオティクスは、顆粒又は粉末の形態で提供されてもよい。1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは粉末形態である。

【0017】

本発明の組成物は、1種の微生物(特にプロバイオティクス)、1種の微生物株(特に

10

20

30

40

50

プロバイオティクス)、微生物種の混合物(特にプロバイオティクス)、又は微生物株の混合物(特にプロバイオティクス)を含有していてもよい。1つの態様においては、本発明の組成物は、1種の微生物(特にプロバイオティクス)と、任意選択的な1種の微生物株(特にプロバイオティクス)とを含有する。1つの態様においては、本発明の組成物は、微生物の株の混合物(特にプロバイオティクス)を含有する。1つの態様においては、本発明の組成物は微生物種の混合物(特にプロバイオティクス)を含有する。

【0018】

好ましい実施形態では、微生物、特にプロバイオティクスは、乳酸杆菌(*Lactobacilli*)、ビフィズス菌(*bifidobacteria*)、サッカロミセス(*saccharomyces*)、及びこれらの混合物から選択される。

10

【0019】

更に好ましい実施形態では、微生物、特にプロバイオティクスは、バシラス・コアギュランズ(*Bacillus coagulans*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*) 亜種インファンティス(*infantis*)、ラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・パラカゼイ(*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバシラス・ジョンソニイ(*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバシラス・プラントラム(*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバシラス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバシラス・ロイテリ・プロテクティス(*Lactobacillus reuteri protectis*)、ラクトバシラス・ロイテリ・プロデンティス(*Lactobacillus reuteri prodentis*)、サッカロマイセス・ボウラルディ(*Saccharomyces boulardii*)、ラクトバシラス・ラムノサス(*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバシラス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバシラス・プラントラム(*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバシラス・パラカゼイ(*Lactobacillus paracasei*)、及びこれらの混合物から選択される種から選択される。

20

【0020】

更に好ましい実施形態では、微生物、特にプロバイオティクスは、ラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシラス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ビフィドバクテリウム・ラクテイス(*Bifidobacterium lactis*)、及びこれらの混合物から選択される種から選択される。

30

【0021】

1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは、バシラス・コアギュランズ(*Bacillus coagulans*) GBI-30、6086、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*) 亜種インファンティス(*infantis*) 35624、ラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*) NCFM、ラクトバシラス・パラカゼイ(*Lactobacillus paracasei*) St11(又はNCC2461)、ラクトバシラス・ジョンソニイ(*Lactobacillus johnsonii*) La1(=ラクトバシラス(*Lactobacillus*) LC1、ラクトバシラス・ジョンソニイ(*Lactobacillus johnsonii*) NCC533)、ラクトバシラス・プラントラム(*Lactobacillus plantarum*) 299v、ラクトバシラス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*) ATCC55730(ラクトバシラス・ロイテリ(*Lactobacillus reuteri*) SD2112)、ラクトバシラス・ロイテリ・プロテクティス(*Lactobacillus reuteri protectis*)(DSM17938、ATCC55730の娘株)、ラクトバシラス・ロイテリ・プロデンティス(*Lactobacillus re*

40

50

uteri prodentis) (DSM17938 / ATCC55730とATCC PTA5289との組み合わせ)、サッカロマイセス・ボウラルディ (Saccharomyces boulardii)、ラクトバシラス・ラムノサス (Lactobacillus rhamnosus) GR-1、ラクトバシラス・ロイテリ (Lactobacillus reuteri) RC-14、ラクトバシラス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) CL1285、ラクトバシラス・カゼイ (Lactobacillus casei) LBC80R、ラクトバシラス・プランタラム (Lactobacillus plantarum) HEAL 9、ラクトバシラス・パラカゼイ (Lactobacillus paracasei) 8700:2、及びこれらの混合物の微生物から選択される。

10

【0022】

1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは、ラクトバシラス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) (NCFM株)、ラクトバシラス・カゼイ (Lactobacillus Casei) (LPC37株)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (Bifidobacterium Lactis) (HN0019)、及びこれらの混合物の株のプロバイオティクスから選択される。

【0023】

微生物、特にプロバイオティクスは、必要量の微生物、特にプロバイオティクスを送達するために任意の適切な量で存在していてもよい。微生物の「濃度」、特に組成物1グラム当たりの微生物のコロニー形成単位 (CFU) でのプロバイオティクスも、当業者が選択することができる。1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは、組成物1グラム当たり少なくとも 1×10^8 CFU の量で存在する。1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは、組成物1グラム当たり少なくとも 1×10^9 CFU の量で存在する。1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは、組成物1グラム当たり少なくとも 1×10^{10} CFU の量で存在する。1つの態様においては、微生物、特にプロバイオティクスは、組成物1グラム当たり $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ CFU の量で存在する。

20

【0024】

単位プロバイオティクス用量として処方される場合、その用量は任意の望まれる量のプロバイオティクスを含む。典型的な単位用量は、1用量当たり $10^8 \sim 10^{14}$ CFU、より好ましくは1用量当たり $10^9 \sim 10^{12}$ CFU、特に好ましくは $10^9 \sim 10^{11}$ CFU を含むであろう。

30

【0025】

微生物、特にプロバイオティクスは、乾燥形態であり、好ましくは噴霧乾燥又は凍結乾燥形態、特に凍結乾燥形態である。好ましくは、乾燥微生物、特にプロバイオティクスは、0.4以下、より好ましくは0.3以下、特に好ましくは0.2以下の水分活性を有する。より特に好ましくは、乾燥微生物、特にプロバイオティクスは、0.1以下の水分活性を有する。

【0026】

リン酸塩

40

本発明の組成物はリン酸塩を含有する。リン酸塩は、リン酸 (H_3PO_4) の任意の塩であり、リン酸二水素塩 ($H_2PO_4^-$)、リン酸水素塩 (HPO_4^{2-})、及びリン酸塩 (PO_4^{3-}) に基づいた塩を含む。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、リン酸水素塩 (HPO_4^{2-})、又はリン酸水素塩 (HPO_4^{2-}) とリン酸二水素塩 ($H_2PO_4^-$) との混合物を含有する。

【0027】

水和と無水の両方のリン酸塩を使用することができる。

【0028】

リン酸塩のカチオンは特に限定されない。好ましい実施形態では、リン酸塩のカチオンは、ナトリウム、カリウム、カルシウム、及びマグネシウムから選択される。好適なリン

50

酸塩の例としては、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 $MgHPO_4$ 、 $Mg[H_2PO_4]_2$ 、 $CaHPO_4$ 、 $Ca[H_2PO_4]_2$ が挙げられる。特に好ましい実施形態では、リン酸塩はリン酸カリウム塩である。

【0029】

好ましくは、リン酸塩は、リン酸二カリウム (K_2HPO_4)、又はリン酸二カリウム (K_2HPO_4) とリン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) との混合物である。

【0030】

好ましい実施形態では、リン酸塩は pH 6 ~ pH 9、好ましくは pH 6.5 ~ 8、より特に好ましくは pH 6.8 ~ 7.2 に pH 調整される。「塩の pH」という表現は、塩が水に溶解している際の溶液の pH を意味する。pH は、リン酸二水素塩、リン酸水素塩、及びリン酸塩のブレンド物を使用することによって調整することができる。好ましい実施形態では、 HPO_4^{2-} と $H_2PO_4^-$ の塩のブレンド物が使用される。望まれる pH を得るためのこれらの塩の相対的な量は周知である。例えば、61.5 / 38.5 の HPO_4^{2-} / $H_2PO_4^-$ モル比は 7 の pH を与える。あるいは、pH 調整された塩は、 PO_4^{3-} 及び / 又は HPO_4^{2-} の塩の溶液を、酸又は塩で望みの pH まで滴定し、その後得られた溶液を例えば噴霧乾燥などにより乾燥させることによって調製することができる。

【0031】

リン酸塩は、乾燥微生物、特にプロバイオティクスの望まれる安定化を与えるために、任意の適切な量で本発明の組成物中に存在していてもよい。本発明との関係においては、重量%は、微生物（特にプロバイオティクス）及びリン酸塩の総重量に対して与えられる。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 10 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 20 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 30 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 40 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 50 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 60 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 70 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の少なくとも 80 重量%の量で存在する。

【0032】

1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 10 ~ 90 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 20 ~ 90 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 30 ~ 90 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 40 ~ 90 重量%、より好ましくは 50 ~ 80 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 50 ~ 90 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 60 ~ 90 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 70 ~ 90 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は組成物の 80 ~ 90 重量%の量で存在する。本発明との関係においては、重量%は、微生物（特にプロバイオティクス）及びリン酸塩の総重量に対して与えられる。

【0033】

微生物（特にプロバイオティクス）及びリン酸塩以外の成分が組成物中に存在する場合、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 10 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 20 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 30 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 40 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 50 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 59 重量%又は 60 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 70 重量%の量で存在する。1つの態様においては、リン酸塩は、全組成物の少なくとも 80 重量%の量で存在する。

【0034】

好適な混合物は、80 重量%のリン酸塩と、20 重量%の微生物、特にプロバイオティ

クスである。

【0035】

リン酸塩は、好ましくは粉末形態である。好ましくは、粒径分布は、5 ~ 120（より好ましくは5 ~ 90）のミクロン単位のD10値、70 ~ 180（より好ましくは80 ~ 140）のミクロン単位のD50値、及び160 ~ 400（より好ましくは180 ~ 350）のミクロン単位のD90値を有する。

【0036】

微生物、特にプロバイオティクスの生存率は、高い水分活性（ $a_w > 0.15$ 、好ましくは $a_w > 0.2$ 、より好ましくは $a_w > 0.3$ ）条件下で特に増加する。

【0037】

本発明の組成物は、好ましくは、微生物単独と比較して、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、特に好ましくは60%超、微生物（特にプロバイオティクス）の生存率を増加させる。

【0038】

本発明の組成物は、好ましくは、湿潤条件下（ $a_w > 0.15$ 、好ましくは > 0.2 、より好ましくは > 0.3 ）、微生物単独と比較して、少なくとも1% ~ 30%、より好ましくは少なくとも20%、特に好ましくは30%超、微生物（特にプロバイオティクス）の生存率を増加させる。

【0039】

本発明の組成物は、好ましくは、賦形剤としてMCCを用いたプロバイオティクスと比較して、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、特に好ましくは60%超、プロバイオティクスの生存率を増加させる。

【0040】

本発明の組成物は、好ましくは、湿潤条件下（ $a_w > 0.15$ 、好ましくは > 0.2 、より好ましくは > 0.3 ）、賦形剤としてMCCを用いたプロバイオティクスと比較して、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、特に好ましくは60%超のプロバイオティクスの生存率を増加させる。

【0041】

追加の成分

本発明の組成物は、プロバイオティクス及びリン酸塩のみを含有してもよく、あるいはこれは1種以上の追加の成分を含有してもよい。

【0042】

一実施形態では、組成物は、追加の賦形剤（マルトデキストリン、微結晶セルロース（MCC）等）、プロバイオティクス（イヌリン、フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、ポリデキストロース等）、流動助剤（シリカ、ステアリン酸マグネシウム等）を更に含有する。

【0043】

追加の成分が存在する場合、好ましくはそれらは全組成物の20重量%未満、より好ましくは10重量%未満を占める。

【0044】

使用

本発明の組成物は、プロバイオティクスとしてヒト又は動物に投与するために使用することができ、あるいは工業用途又は食品用途のために使用することができる。典型的な食品用途としては、チーズ、ヨーグルト、発酵大豆製品（味噌、納豆など）、ザワークラウト、食用アルコール製品などの製造が挙げられる。典型的な工業用途としては、工業用アルコールの製造などの発酵による原料又は完成材料の製造が挙げられる。

【0045】

形態

本発明の組成物は、例えば食品もしくは工業用途の前、又はヒトもしくは動物への投与前、及び/又は適切な剤形への分割前の、貯蔵又は輸送のためのバルク粉末ミックスの形

10

20

30

40

50

態であってもよい。

【0046】

更なる態様においては、本発明は、ヒト又は動物に投与するための単位微生物用量を提供する。単位微生物用量は、適切な量の本発明の組成物を含み、これは、例えば小袋、カプセル、又は錠剤の中に包装されていてもよい。典型的な単位用量は、1用量当たり $10^8 \sim 10^{14}$ CFU、より好ましくは1用量当たり $10^{10} \sim 10^{12}$ CFUを含むであろう。

【0047】

方法

更なる態様においては、本発明は、(i)(a)乾燥微生物及び(b)粉末形態のリン酸塩を準備すること；(ii)乾燥微生物と粉末形態のリン酸塩とを混合して組成物を得ること；を含む、本発明の組成物の調製方法を提供する。本方法の好ましい実施形態においては、微生物は凍結乾燥されている。

10

【0048】

混合は、微生物にダメージを与えない任意の方法によって行うことができる。例えば、適切な容器内での回転又は振とう、及び/又はパドルなどの混合器具による混合である。

【実施例】

【0049】

材料

以下の凍結乾燥プロバイオティクスを用いて実験を行った：ラクトバシラス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)(NCFM株)株、ラクトバシラス・カゼイ(Lactobacillus casei)(LPC37株)、ビフィドバクテリウム・ラクティス(Bifidobacterium lactis)(HN0019)。

20

【0050】

微結晶セルロースはMingtai Chemical社から供給され、リン酸二カリウムはBKGlulhi GmbH社から得た。

【0051】

使用したカプセルは、Capsugel CieからのVcaps、サイズ0、CS、ヒプロメロースであった。

30

【0052】

シリカは、Evonik Industries AGから入手したSipernat 50sであった。

【0053】

ステアリン酸マグネシウムはAcetocorporationから入手した。

【0054】

マルトデキストリン(IT6)はRoquetteから入手した。

【0055】

分析方法

水分活性測定(a_w)

水分活性測定のために、Aqualab 3TE, Decagonを使用した。鏡、光学センサー、内部ファン、及び赤外線温度センサーを含む密閉チャンバーのヘッドスペース内で、試料(約1g)を平衡化する。

40

【0056】

細胞計数方法

使用される細胞計数方法は、株に応じた品質管理研究所からの方法である。結果は、製品1g当たりのコロニー形成単位(CFU/g)で示した。

【0057】

方法は、以下のことから構成された：

(i) 1gの試料を瓶の中に秤り入れた。滅菌ペプトン水を100gまで入れ、混合物

50

をベンチトップシェーカーを用いて400rpmで5分間混合した。混合物を室温で20分間放置し、その後5分間再び混合して均質な溶液を得た。元の試料から10-2希釈液を得た。

(ii) その後の希釈を1:10の段階で行い、1mlの溶液を9mlのペプトン水に添加することによって行った。溶液を最大速度でVortexシステムを使用して20秒間各工程で均質化した。

(iii) MRS寒天及び1%のシステインを用いて細胞を平板培養した。

(iv) 各決定のために、4つのプレート数を数えた: 2つの異なる体積の細胞懸濁液を平板培養し、各体積を二度繰り返した。次いで、プレート上で得られたコロニーの数を加え、これらのプレートのために使用した細胞懸濁液の体積の総和で割った。

(vi) プレートを、37°Cで72時間インキュベートした。

【0058】

実施例1

試料の調製

様々なプロバイオティクス種をMCCと混合して、 $1.5 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{10}$ CFU/gのCFUを得た。ブレンド物をプラスチック瓶中で20分間回転(約60rpm)させることにより混合した。その後、カプセルにブレンド物を詰めた。試料の調製は、40%RH、25°Cのクリーンルームで行った。

【0059】

高湿度暴露試験

マルトデキストリンを、平衡に到達するまで40%RHの雰囲気暴露した。その結果、マルトデキストリンの a_w はほぼ0.4であった。同じ方法を使用して、0.3及び0.1の a_w で平衡化されたマルトデキストリンを得た。

【0060】

カプセルを作製し、次のものを充填した:

1. プロバイオティクス粉末のみ、
2. プロバイオティクス(20重量%) - MCC(80重量%)ブレンド物、及び
3. プロバイオティクス(20重量%) - K_2HPO_4 (80重量%)のブレンド物。

【0061】

これらのカプセルをガラス瓶の中に入れた。その後、約0.4の a_w でマルトデキストリンを上添加し、瓶を必要とされる時間振とうした。

【0062】

カプセルを30°Cの環境室の中で6か月間貯蔵した。安定性の性能に対する賦形剤の種類の影響を評価するために、0か月、1か月、及び3か月の時点でCFU及び a_w を測定した。

【0063】

生存率の計算

プロバイオティクスの生存率は2つの異なる方法で表した。

A) 生存率

$$\% \text{生存率} = (\text{貯蔵後のCFU} / \text{CFU}_{t_0}) \times 100\%$$

B) Log損失

$$\text{Log損失} = \text{Log}(\text{CFU}_{t_0}) - \text{Log}(\text{貯蔵後のCFU})$$

【0064】

結果

使用した賦形剤による3か月後の湿潤条件下(a_w 0.4)での様々な菌株の生存率を表1に示す。MCCはプロバイオティクスをMCCと混合した場合を表し、 K_2HPO_4 はプロバイオティクスを K_2HPO_4 と混合した場合を表し、「凍結乾燥プロバイオティクス」は、プロバイオティクス粉末のみを用いた場合を表す。

【0065】

10

20

30

40

50

【表 1】

	ラクトバシラス・アシドフィルス(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	ラクトバシラス・カゼイ(<i>Lactobacillus casei</i>)	ビフィドバクテリウム・ラクティス(<i>Bifidobacterium lactis</i>)(BBL)	ビフィドバクテリウム・ラクティス(<i>Bifidobacterium lactis</i>)(BBL)	ビフィドバクテリウム・ラクティス(<i>Bifidobacterium lactis</i>)(HN019)
MCC	0%	0%	0%	1%	2%
K ₂ HPO ₄	35%	1%	5%	26%	20%
凍結乾燥プロバイオティクス	0%	0%	0%	0%	0%

10

【0066】

図 1 は、同じ結果をグラフ形式で示している。MCC はプロバイオティクスを MCC と混合した場合を表し、K₂HPO₄ はプロバイオティクスを K₂HPO₄ と混合した場合を表し、「凍結乾燥プロバイオティクス」は、プロバイオティクス粉末のみを用いた場合を表す。

20

【0067】

表 1 及び図 1 は、安定性に対する K₂HPO₄ の影響が菌株に応じて変化することを示している。生存率は、MCC 又はプロバイオティクスのみを用いるよりも賦形剤としての K₂HPO₄ を用いる方が常に高い。賦形剤としての K₂HPO₄ の使用が、特に湿潤条件下で、菌株の安定性(生存率)を改善することは明らかである。

【0068】

異なる湿度条件下でのラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)の生存率

30 で3か月後のラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)の、 a_w 及び賦形剤の関数としての生存率を表 2 に示す。MCC はプロバイオティクスを MCC と混合した場合を表し、K₂HPO₄ はプロバイオティクスを K₂HPO₄ と混合した場合を表す。

30

【0069】

【表 2】

a_w	0.1	0.3	0.4
MCC	78%	6%	0%
K ₂ HPO ₄	66%	39%	60%

40

【0070】

図 2 は、同じ結果をグラフ形式で示している。MCC はプロバイオティクスを MCC と混合した場合を表し、K₂HPO₄ はプロバイオティクスを K₂HPO₄ と混合した場合を表す。

【0071】

表 2 及び図 2 は、高湿度条件($a_w > 0.1$)では、K₂HPO₄ を用いた生存率が MCC

50

Cを用いた生存率よりも常に高いことを示している。低湿度条件 ($a_w = 0.1$) では、 K_2HPO_4 を用いた安定性とMCCを用いた安定性とは同様である。

【0072】

これらの結果から、 K_2HPO_4 を添加すると湿潤条件下での菌株の安定性が改善されることが分かる。

【0073】

実施例 2

この実施例では、湿潤環境における K_2HPO_4 濃度の関数としてのプロバイオティクスの安定性を調べる。Sipernat 50s及びステアリン酸マグネシウムを流動助剤として添加して、市販のブレンド組成物と同様の試料組成物を得た。この実施例のために、凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 粉末を使用した。実施例は2段階で調製した。パート1では、プロバイオティクスは K_2HPO_4 のみと混合した。パート2では、プロバイオティクスを K_2HPO_4 及びMCCと混合した。

10

【0074】

試料の調製

パート1： K_2HPO_4 と混合されたプロバイオティクス

凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 粉末、 K_2HPO_4 、Sipernat 50s、及びステアリン酸マグネシウムからなるブレンド物を調製した。Sipernat 50s及びステアリン酸マグネシウムの濃度を一定に保ちながら、凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の濃度を徐々に増加させ、 K_2HPO_4 の濃度を徐々に減少させた10個の試料を作製した。下の表は、パート1の様々な試料の説明を示している。

20

【0075】

30

40

50

【表 3】

表 3: 実施例 2, パート 1 に関する様々な試料の説明

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7	試料 8	試料 9	試料 10
ラクトバシラス・アシドフィルス (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) (g)	5	10	15	20	25	30	35	40	45	49.5
K ₂ HPO ₄ (g)	44.5	39.5	34.5	29.5	24.5	19.5	14.5	9.5	4.5	0
Sipernat 50s (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
ステアリン酸マグネシウム (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
合計質量 (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
ブレンド物の細胞数 (CFU/g)	3.5E10	7E10	1.05E11	1.4E11	1.75E11	2.1E11	2.45E11	2.8E11	3.15E11	3.47E11
% K ₂ HPO ₄ (W/W)	89%	79%	69%	59%	49%	39%	29%	19%	9%	0%

【 0 0 7 6 】

パート 2 : K₂HPO₄ 及び MCC と混合されたプロバイオティクス

凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 粉末、K₂HPO₄、MCC、Sipernat 50s、及びステアリン酸マグネシウムからなるブレンド物を調製した。ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 粉末、Sipernat 50s、及びステアリン酸マグネシウムの濃度を一定に保ちながら、K₂HPO₄ の濃度を徐々に増加させ、MCC の濃度を徐々に減少させた 9 個の試料を作製した。下の表は、パート 2 の様々な試料の説明を示している。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

【 表 4 】

表 4: 実施例 2, パート 2 に関する様々な試料の説明

	試料 11	試料 12	試料 13	試料 14	試料 15	試料 16	試料 17	試料 18	試料 19
ラクトバシラス・アシドフィルス (<i>Lactobacillus Acidophilus</i>) (g)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
MCC (g)	42	37	32	27	22	17	12	7	0
K ₂ HPO ₄ (g)	0	5	10	15	20	25	30	35	42
Sipernat 50s (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
ステアリン酸マグネシウム (g)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
合計質量 (g)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
ブレンド物の細胞数 (CFU/g)	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0	5.25E1 0
% K ₂ HPO ₄ (W/W)	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	84%

10

20

30

40

【 0 0 7 8 】

結果

パート 1 の結果

湿潤条件下 ($a_w 0.4$) での K₂HPO₄ 賦形剤の重量パーセントの関数としての、ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の 30 で 6 か月後の生存率を表 5 に示す。

【 0 0 7 9 】

50

【表 5】

表 5. 湿潤条件(a_w 0.4)下での K_2HPO_4 賦形剤の割合の関数としての、ラクトバシラス・アシドフィルス (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)の 30°C で 6 か月後の生存率	
ブレンド物中の重量% K_2HPO_4	% 生存率
0%	0%
9%	0%
19%	0%
29%	0%
39%	0%
49%	0%
59%	2%
69%	9%
79%	17%
89%	12%

10

20

【0080】

図 3 は、同じ結果をグラフ形式で示している。

【0081】

表 5 及び図 3 は、生存率が K_2HPO_4 の量の関数として変化することを示している。結果は、 K_2HPO_4 が 50 重量%を超えると生存率が有意に増加することを示している。 K_2HPO_4 が 80 重量%を超えても、80 重量%よりは劣るものの K_2HPO_4 なしよりも依然として有意に優れている。

【0082】

パート 2 の結果

湿潤条件下 (a_w 0.4) での MCC とのブレンド物における K_2HPO_4 賦形剤の割合の関数としての、ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の 30°C で 6 か月後の生存率を表 6 に示す。

30

【0083】

40

50

【表 6】

表 6. 湿潤条件(a_w 0.4)下での MCC とのブレンド物における K_2HPO_4 賦形剤の割合の関数としての、ラクトバシラス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)の 30°C で 6 か月後の生存率

ブレンド物中の % K_2HPO_4	% 生存率
0%	0.0%
0%	0.0%
10%	0.0%
20%	0.0%
30%	0.0%
40%	0.2%
50%	0.8%
60%	3.2%
70%	15.3%
84%	20.4%

10

20

【0084】

図 4 は、同じ結果をグラフ形式で示している。

【0085】

表 6 及び図 4 は、生存率が K_2HPO_4 の割合の関数として変化し、 K_2HPO_4 が 40 重量%を超えると、 K_2HPO_4 なしよりも有意に優れていることを示している。

【0086】

実施例 3

ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*Bifidobacterium lactis*)、ラクトバシラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) に対する K_2HPO_4 賦形剤の pH の影響を評価した。

30

【0087】

様々な pH 値の K_2HPO_4 を含む様々な賦形剤 (pH 6.5 ; pH 6.9 ; pH 7.1 ; pH 7.6 ; pH 8.1 ; pH 9) を製造した。様々な pH の賦形剤は、下の 2 つの方法のいずれかによって調製した :

1 . K_2HPO_4 溶液を調製し、リン酸を添加して溶液の pH を望みの値にし、次いで溶液を噴霧乾燥して粉末を得た ; 又は

2 . K_2HPO_4 を、望みの pH を得るために計算された様々な量の KH_2PO_4 と乾燥形態でブレンドした。

40

【0088】

試料の調製

パート 1 : 乾燥条件下での生存に対する賦形剤の pH の影響 :

凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 粉末を様々な pH で様々な賦形剤とブレンドした。各ブレンド物の組成は、80%の賦形剤 K_2HPO_4 粉末及び 20%の凍結乾燥プロバイオティクス粉末であった。ブレンド物をプラスチック瓶中で 20 分間回転 (約 60 tr / 分) させることにより混合した。小袋にブレンド物を詰めた。試料の調製は、40% RH、25 のクリーンルーム内で行った。試験中、小袋を乾燥湿度 (a_w 0.1) で 30 で 3 か月間貯蔵

50

した。

【 0 0 8 9 】

パート 2 : 湿潤条件下での生存率に対する賦形剤の pH の影響 :

凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) 粉末を、様々な pH 及び MCC で様々な K_2HPO_4 粉末とブレンドした。各ブレンド物の組成は、80% の賦形剤及び 20% の凍結乾燥プロバイオティクス粉末であった。ブレンド物をプラスチック瓶中で 20 分間回転 (約 60 tr / 分) させることにより混合した。試料の調製は、40% RH、25 のクリーンルームで行った。カプセルにブレンド物を詰め、カプセルをガラス瓶の中に入れた。その後、約 0.4 の a_w でマルトデキストリンを上に加し、瓶を振とうした。瓶を 30 で 3 か月間貯蔵した。

10

【 0 0 9 0 】

80% の乾燥 MCC 及び 20% の凍結乾燥プロバイオティクス粉末を含む対照を調製し、同じ方法で試験した。

【 0 0 9 1 】

結果

パート 1 の結果

乾燥条件 (a_w 0.1) 下、30 で 1 か月間及び 3 か月間貯蔵した後の、 K_2HPO_4 賦形剤の pH の関数としての、凍結乾燥したラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の生存率を表 7 に示す。

20

【 0 0 9 2 】

【 表 7 】

表 7. 乾燥条件($a_w \leq 0.1$)下で 30°C で 1 か月又は 3 か月貯蔵した後の、 K_2HPO_4 賦形剤の pH の関数としての、凍結乾燥ラクトバシラス・アシドフィルス(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)の生存率		
賦形剤	1 か月後の %生存率	3 か月後の %生存率
K_2HPO_4 pH 6.5	63%	59%
K_2HPO_4 pH 6.9	87%	88%
K_2HPO_4 pH 7.1	73%	63%
K_2HPO_4 pH 7.6	68%	49%
K_2HPO_4 pH 8.1	71%	68%
K_2HPO_4 (pH 未調整)	58%	59%
MCC	50%	12%

30

【 0 0 9 3 】

図 5 は、同じ結果をグラフ形式で示している。

【 0 0 9 4 】

表 7 及び図 5 は、乾燥条件下での生存率 / 安定性は pH の関数として変化するが、全ての場合において、唯一の賦形剤としての MCC を用いた生存率よりも優れていることを示している。安定性は賦形剤の pH の影響を受けた。乾燥条件下での安定性のためには、 K_2HPO_4 の最適 pH は 6.9 ~ 7.1 である。評価された他の種には、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*Bifidobacterium lactis*) 及びラクトバシラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) が含まれていた。

40

【 0 0 9 5 】

50

パート 2 の結果

湿潤条件下 ($a_w = 0.4$) で 30 で 3 か月間貯蔵した後の、 K_2HPO_4 賦形剤の pH の関数としての、凍結乾燥ラクトバシラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*) の生存率を表 8 に示す。

【 0 0 9 6 】

【 表 8 】

表 8. 湿潤条件($a_w = 0.4$)下で 30°C で 3 か月貯蔵した後の、 K_2HPO_4 賦形剤の pH の関数としての、凍結乾燥ラクトバシラス・アシドフィルス(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)の生存率	
賦形剤	% 生存率
K_2HPO_4 pH 6.5	37%
K_2HPO_4 pH 6.9	50%
K_2HPO_4 pH 7.1	13%
K_2HPO_4 pH 7.6	14%
K_2HPO_4 pH 8.1	26%
K_2HPO_4 pH 9	41%
MCC	1%

10

20

【 0 0 9 7 】

図 6 は、同じ結果をグラフ形式で示している。

【 0 0 9 8 】

表 8 及び図 6 は、安定性が pH 値の関数として変化することを示している。pH 調整された全ての賦形剤は、湿潤条件下で MCC 粉末よりも優れた安定性を有する。湿潤条件下で最も優れた安定性を得るためには、最適な pH は 6.9 である。

30

40

50

【 5 】

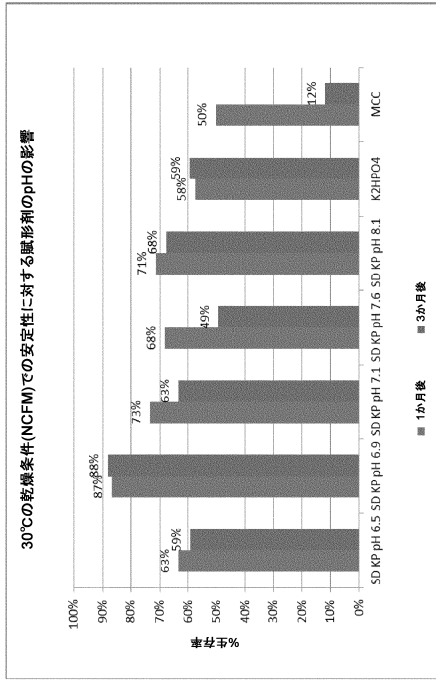


Fig. 5.

【 6 】

30°Cで3か月後の湿潤条件(Aw0.4)での凍結乾燥クロトバリス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)粉末の安定性に対する賦形剤のpHの影響

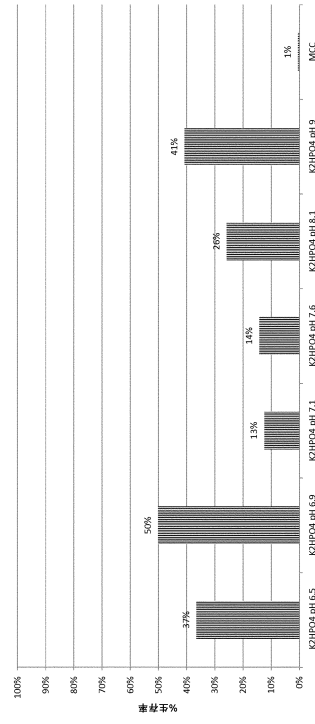


Fig. 6.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
A 6 1 K	9/48 (2006.01)	A 6 1 K	9/48
A 6 1 K	9/20 (2006.01)	A 6 1 K	9/20
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14
A 6 1 P	3/02 (2006.01)	A 6 1 P	3/02
A 6 1 K	9/19 (2006.01)	A 6 1 K	9/19

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

フランス国75017パリ・リュ・ブリュネル20・ダニスコ・フランス・エスアーエス

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献

国際公開第2011/018509(WO, A1)

特開2002-306125(JP, A)

国際公開第2011/018547(WO, A1)

特表2011-502505(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 35/00 - 35/768

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)