

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7601332号
(P7601332)

(45)発行日 令和6年12月17日(2024.12.17)

(24)登録日 令和6年12月9日(2024.12.9)

(51)国際特許分類	F I
A 2 3 L 33/21 (2016.01)	A 2 3 L 33/21
A 6 1 P 1/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/10
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715

請求項の数 8 (全21頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-75009(P2021-75009)	(73)特許権者	304040441 江南化工株式会社 三重県四日市市楠町北五味塚 1 5 1 5
(22)出願日	令和3年4月27日(2021.4.27)	(73)特許権者	304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7
(65)公開番号	特開2021-191257(P2021-191257 A)	(74)代理人	100108280 弁理士 小林 洋平
(43)公開日	令和3年12月16日(2021.12.16)	(72)発明者	大谷 浄治 三重県四日市市楠町北五味塚 1 5 1 5 江南化工株式会社内
審査請求日	令和5年6月28日(2023.6.28)	(72)発明者	寺澤 匡博 三重県四日市市楠町北五味塚 1 5 1 5 江南化工株式会社内
(31)優先権主張番号	特願2020-98041(P2020-98041)	(72)発明者	松田 孝一
(32)優先日	令和2年6月4日(2020.6.4)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 便秘解消組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトエグサ由来のラムナン硫酸を含有することを特徴とする便秘解消組成物。

【請求項 2】

肥満者用または高脂肪食摂取者用のものである請求項 1 に記載の便秘解消組成物。

【請求項 3】

血糖値低下作用を備えた請求項 1 または 2 に記載の便秘解消組成物。

【請求項 4】

腸内環境改善効果が、腸内細菌のフィルミクテス (Firmicutes) とバクテロイデス (Bacteroidetes) との比である F / B 比を減少させることである請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の便秘解消組成物。

【請求項 5】

腸内環境改善効果が、腸内細菌のラクトバチルス (Lactobacillus) 属を増加させることである請求項 1 ~ 4 のいずれか一つに記載の便秘解消組成物。

【請求項 6】

高脂肪食に併せて摂取するものである請求項 1 ~ 5 のいずれか一つに記載の便秘解消組成物。

【請求項 7】

経口投与用の健康食品である請求項 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の便秘解消組成物。

【請求項 8】

ヒトエグサ由来のラムナン硫酸を含有することを特徴とする乳酸菌増殖促進剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、便秘解消組成物、特に肥満者または高脂肪食の腸内環境改善効果を備える便秘解消組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

日本国内では、メタボリック症候群やその予備群の数は1000万人以上にも至ると言われており、該当者は5年連続で増加するなど歯止めが効かない状態となっている。厚生労働省は、健康増進法に基づき、「健康日本21」の施策を講じているものの、改善の兆しは認められていない。メタボリック症候群の増加と共に医療費も増大しており、国民医療費の疾病分類別データでは、メタボリック症候群を要因とする「循環器系の疾患」が6兆円を超える規模となっており、深刻な課題となっている。

10

一般に便秘とは、3～5日以上にわたって排便がない状態を言うが、便通には個人差があり、2～3日排便がなくても不快感がない場合には便秘とは言わず、毎日排便があっても不快感や残便感がある場合には便秘と言う。便秘の場合には、排便時に努力と苦痛を要し、お腹が張る、腹痛などの症状があり、日常生活に支障をきたすことが多い。特に若い女性には、便秘を持つ者が多いと言われており、これを解消する便秘薬も多く販売されている。しかしながら、便秘薬を使いすぎると、体が慣れてしまい、効果が薄れたり、用量が増加してしまうことがあるため、長期に渡って安定して使用できるものが望まれていた。

20

ところで、日本近海に生育するアオサから抽出されるラムナン硫酸は、ラムノースを構成単糖の主成分とする硫酸化多糖類であり、数十万～数百万程度の分子量で天然に広く分布している。ラムナン硫酸には、血糖値上昇抑制効果、抗ウイルス効果などが知られている（特許文献1, 2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特開2008-184390号公報

【文献】特開2019-137644号公報

30

【非特許文献】

【0004】

【文献】Marta Olivares et al. (2018) The DPP-4 inhibitor vildagliptin impacts the gut microbiota and prevents disruption of intestinal homeostasis induced by a Western diet in mice, *Diabetologia* 61:1838-1848

【文献】Qian Zhang et al. (2017) Vildagliptin increases butyrate-producing bacteria in the gut of diabetic rats. *PLoS ONE* 12(10): e0184735

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、ラムナン硫酸の生体に対する効果については、十分に知られていなかった。

40

本発明は、上記した事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、ラムナン硫酸を含有する便秘解消組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、鋭意検討の結果、硫酸化多糖類（特に、ラムナン硫酸）には、腸内環境改善効果があることを見出し、基本的には本発明を完成するに至った。

こうして、本発明に係る便秘解消組成物は、硫酸化多糖類（特に、ラムナン硫酸）を含有することを特徴とする。ラムナン硫酸を摂取すると、腸内の乳酸菌（ラクトバチルス（

50

Lactobacillus) 属、有孢子性乳酸菌 (Bacillus coagulans) など) を増加させて腸内環境を改善し、便秘を解消する効果があることが分かった。

このとき、便秘解消組成物は、肥満者用または高脂肪食摂取者用のものであることが好ましい。

肥満者とは、BMI (=体重(kg) / (身長(m) × 身長(m))) が25以上の者を意味する。

高脂肪食とは、食事から摂取する全エネルギーのうち、脂肪のエネルギー比率が50%以上となるものを意味する。一般の食事では、脂肪のエネルギー比率は30%程度であるが、これに比較して相当に高いものを摂取すると、肥満やメタボリック症候群になりやすい。

【0007】

また、このとき血糖値低下作用を備えたものであることが好ましい。肥満・メタボリック
クシンドロームの症状の増悪因子の1つとして、腸内細菌のオシリバクター属細菌 (Oscil- 10
libacter valericigenes) がある。この細菌は、肥満者や高脂肪食摂取者にて増加すること
で、血糖値を増加させると言われている。これに対し、本発明の便秘解消組成物は、オ
シリバクター属細菌を減少させることで、高脂肪食摂取者の血糖値を減少させる効果を合
わせ持つ。

上記発明において、前記腸内環境改善効果が、腸内細菌のフィルミクテス (Firmicutes
) とバクテロイデス (Bacteroidetes) との比である F / B 比を減少させることであるこ
とが好ましい。

また、前記腸内環境改善効果が、腸内細菌の乳酸菌類 (例えば、ラクトバチルス (Lact- 20
obacillus) 属、バチルス・コアグランス (Bacillus coagulans) など) を増加させるこ
とであることが好ましい。

肥満者の腸内細菌を移植されたマウスと、痩身者の腸内細菌を移植されたマウスとを比
べると、前者は有意に体重が増加することが知られている。前者では、フィルミクテス門
に属する細菌割合が多く、後者では、バクテロイデス門に属する細菌割合が多いことが判
明した。このことから、腸内細菌叢が脂質の吸収率を制御していることが分かった。また
、フィルミクテス門に属する腸内細菌は、脂肪吸収効率を増加させ、肥満を促進すること
が知られている。こうして、個体の腸内細菌叢について、ファーミキューテス門 / バクテ
ロイデーテス門比 (F / B 比) を調べることにより、肥満の程度が一定程度まで理解でき
ることとなり、F / B 比は肥満指数と称されている。本発明によれば、F / B 比を減少させ
ることで、腸内環境改善効果を示し、便秘を解消させられる。 30

【0008】

また、本発明は、高脂肪食に併せて摂取することが好ましい。本発明によれば、便秘解
消組成物は、F / B 比を減少させるので、特に高脂肪食を摂取したときに、便秘解消と抗
肥満効果を発揮しやすい。

また、本発明は、経口投与用の健康食品であることが好ましい。ラムナン硫酸を経口摂
取したときの毒性は極めて低い。但し、余りにも沢山の量を一度に摂取するのは困難が伴
う。このため、ラムナン硫酸の投与量としては、特に限定されるものではないが、ヒト成
人一日当たり50mg ~ 400mg、好ましくは50mg ~ 200mg、更に好ましくは100 mg ~
200 mg である。

このときの剤型としては、適当に設定できるが、例えば錠剤、顆粒剤、カプセル剤、粉
末剤、散剤などの固形製剤、液剤、懸濁剤などの液状製剤などが例示される。 40

【0009】

食品分野では、腸内環境改善効果を発揮できる有効量のラムナン硫酸を食品素材として
各種食品に配合することにより、食品組成物を提供できる。食品組成物としては、一般の
食品に加え、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品、病院患者用食品、サプ
リメント等が例示される。加えて、食品添加物として用いられる。

食品組成物としては、例えば畜肉加工品、農産加工品、飲料 (清涼飲料、アルコール飲
料、炭酸飲料、乳飲料、果汁飲料、茶、コーヒー、栄養ドリンク、濃縮飲料など)、粉末
飲料 (粉末ジュース、粉末スープなど)、菓子 (キャンディ (のど飴)、クッキー、ビス
ケット、ガム、グミ、チョコレート等)、パン、シリアル、調味料などが例示される。 50

【 0 0 1 0 】

健康食品の場合には、カプセル、トローチ、シロップ、顆粒、粉末などの形状として提供できる。

なお、本発明は、特定保健用食品・栄養機能食品・機能性表示食品などとしても提供できる。特定保健用食品とは、生理学的機能等に影響を与える保健機能成分を含む食品であって、消費者庁長官の許可を得て特定の保健の用途に適する旨を表示可能なものである。本発明では、抗肥満用途と表示して販売される食品となる。栄養機能食品とは、栄養成分（ビタミン、ミネラル）の補給のために利用される食品であって、栄養成分の機能を表示するものである。栄養機能食品として販売するためには、一日当たりの摂取目安量に含まれる栄養成分量が定められた上限値、下限値の範囲内にある必要があり、栄養機能表示だけでなく注意喚起表示等もする必要がある。

10

【 0 0 1 1 】

機能性表示食品とは、事業者の責任において、科学的根拠に基づいた機能性を表示した食品である。販売前に安全性及び機能性の根拠に関する情報などが消費者庁長官へ届け出られたものである。

本発明は、ラムナン硫酸を有効成分として含み、腸内環境改善効果を奏する抗便秘用特定保健用食品、抗便秘用栄養機能食品、抗便秘用機能性表示食品として用いられる。このとき、抗便秘用を抗便秘・抗肥満用とすることもできる。

本発明は、ラムナン硫酸を有効成分として含み、特に肥満者または高脂肪食摂取者の腸内環境改善効果と便秘解消効果を示す特定保健用食品・栄養機能食品・機能性表示食品などの健康食品に用いられる。

20

また、別の発明に係る乳酸菌増殖促進剤は、硫酸化多糖類を含有することを特徴とする。このとき、硫酸化多糖類がラムナン硫酸であることが好ましい。この乳酸菌増殖促進剤は、例えばインピトロ系で乳酸菌を培養する際に、本発明品を添加することで、増殖時間を早めたり、増殖率を向上させることができる。培地への添加量はラムナン硫酸として0.03mg/ml～100mg/ml、好ましくは0.1mg/ml～30mg/ml、更に好ましくは0.3mg/ml～10 mg/mlである。

【発明の効果】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、便秘解消組成物、特に肥満者または高脂肪食摂取者の腸内環境改善効果を備える便秘解消組成物を提供できる。また、インピトロ系で乳酸菌を培養する際に、本発明品を添加することで、増殖時間を早めたり、増殖率を向上させることができる。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図1】マウス試験において、各群の体重変化を示した折線グラフである。

【図2】各群の血液成分を示す棒グラフである。（A）血糖値、（B）中性脂肪、（C）総コレステロールの結果を示す。

【図3】各群の（A）糞便重量と（B）糞便カロリーを示す棒グラフである。

【図4】糞便中の細菌の相対的存在量を門レベルで調べた結果を示すグラフである。NFは通常食を、HFは高カロリー食を、RSはラムナン硫酸を、1wはラムナン硫酸投与開始から1週目を、4wはラムナン硫酸投与開始から4週目をそれぞれ意味する。

40

【図5】ラムナン硫酸投与開始から1週目または4週目において、（A）糞便中の通常食（NF）または高カロリー食（HF）を投与した群におけるバクテロイデス門（Bacteroidetes）の相対的存在量、（B）F/B比（Firmicutes/Bacteroidetes）を示す棒グラフである。

【図6】糞便中の4種類の細菌について、通常食群に対する相対比を示す棒グラフである。それぞれ、（A）Lactobacillus johnsonii、（B）Lactobacillus reuteri、（C）Lactobacillus intestinalis、（D）Oscillibacter valericigenesを示す。

【図7】ラムナン硫酸がJCM8130(Lactobacillus paracasei)の増殖に与える影響を確認した結果を示す棒グラフである。（A）ラムノックス100、10mg/mlの有無による結果

50

、(B)ラムノックス100、0、0.625、1.25、2.5、5及び10mg/mlの結果を示した。

【図8】ラムナン硫酸がJCM2257(*Bacillus coagulans*)の増殖に与える影響を確認した結果を示すグラフである。(A)ラムノックス100、10mg/mlの有無による結果、(B)ラムノックス100、0、0.625、1.25、2.5、5及び10mg/mlの結果を示した。

【図9】ラムナン硫酸がJCM11046(*Lactobacillus gasseri*)の増殖に与える影響を確認した結果を示すグラフである。(A)ラムノックス100、10mg/mlの有無による結果、(B)ラムノックス100、0、0.625、1.25、2.5、5及び10mg/mlの結果を示した。

【図10】<ヒト試験2>において、試験対象者の内訳を示す図である。

【図11】0W時、1W時及び2W時の排便状況の算出値を被験食品群(白抜き)と対照食品群(灰色)で比べた棒グラフである(データは、「平均値+標準偏差」で示した。)(A)排便回数の結果を、(B)排便日数の結果を、それぞれ示した。

10

【図12】0W時、1W時及び2W時の排便状況の変化量を被験食品群(白抜き)と対照食品群(灰色)で比べた棒グラフである(データは、「平均値+標準偏差」で示した。)(A)排便回数の結果を、(B)排便日数の結果を、それぞれ示した。

【図13】腸内細菌種数が平均値以上の者について層別解析したときの0W時、1W時及び2W時の排便状況の算出値を被験食品群(白抜き)と対照食品群(灰色)で比べた棒グラフである(データは、「平均値+標準偏差」で示した。)(A)排便回数の結果を、(B)排便日数の結果を、それぞれ示した。

【図14】腸内細菌種数が平均値以上の者について層別解析したときの0W時、1W時及び2W時の排便状況の変化量を被験食品群(白抜き)と対照食品群(灰色)で比べた棒グラフである(データは、「平均値+標準偏差」で示した。)(A)排便回数の結果を、(B)排便日数の結果を、それぞれ示した。

20

【図15】糞便中細菌叢をアンプリコンシーケンス解析し、綱レベルでのClostridiaの占有率を調べた結果を示す棒グラフである。データは、「平均値±標準偏差」で示し、被験食品群を白抜きで、対照食品群を灰色で示した。

【図16】糞便中細菌叢をアンプリコンシーケンス解析し、綱レベルでのNegativecutesの占有率を調べた結果を示す棒グラフである。データは、「平均値±標準偏差」で示し、被験食品群を白抜きで、対照食品群を灰色で示した。

【図17】糞便中細菌叢をアンプリコンシーケンス解析し、目レベルでのAcidaminococlesの占有率を調べた結果を示す棒グラフである。データは、「平均値±標準偏差」で示し、被験食品群を白抜きで、対照食品群を灰色で示した。

30

【発明を実施するための形態】

【0014】

次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施することができる。

<分子量の異なるラムナン硫酸の調製>

ラムナン硫酸としては、天然由来のどのような物でも用いることができる。本実施形態では、ヒトエグサから熱水抽出して得たものを用いた。簡単に説明すると次の通りである。乾燥した海藻を水で洗浄し、熱水(95~100)で6時間抽出した。得られた熱水抽出液を純水に対して透析し、凍結乾燥した。この凍結乾燥物を水に溶解した後、陰イオン交換クロマトグラフィーにアプライし、連続的に溶出させ、ラムナン硫酸を精製した。これを発明の試料として用いた。

40

なお、本発明に使用可能な硫酸化多糖類(例えば、ラムナン硫酸)は、上記方法以外にも各種方法によって調製できる。また、原料としては、ヒトエグサに限られず、アナアオサ、リボンアオサなどを用いることができる。

【0015】

次に、上記で得られたラムナン硫酸を用いて、マウスにおける腸内細菌改善効果及び抗肥満効果を以下の方法で評価した。

<マウス試験>

50

自然発症2型糖尿病マウス(NYS/Hos Male, 9週齢)を用いて、経口投与試験を行った。以下の試験群1~4の各成分が添加された餌を4週間摂取させ、1週間後と4週間後の腸内細菌叢を解析した。

試験群1: 通常食

試験群2: 通常食 + ラムナン硫酸0.25mg/g添加

試験群3: 高脂肪食

試験群4: 高脂肪食 + ラムナン硫酸0.25mg/g添加

試験の繰り返し回数は5とした。試験期間中、毎週1回、摂食量計測・体重測定および糞便の回収を行い、試験終了時には血液生化学試験を行った。

【0016】

図1には、各実験群の体重変化を示した。高脂肪食のみを与えた試験群3では、通常食群に対して有意に($p < 0.01$)体重が増加した。試験群3に対し、高脂肪食にラムナン硫酸を添加した試験群4では、体重増加を抑制する傾向が認められた。なお、摂食量に関しては、試験群1と2、試験群3と4の間では有意な違いは認められなかった。

図2には、試験終了時に採取した血液成分の解析結果を示した。本試験に用いた系統のマウスは、若齢でも高脂肪食負荷により血糖値が上昇することが知られている。本試験においても、高脂肪食群(試験群3)は有意に($p < 0.05$)血糖値が上昇した。これに対し、高脂肪食にラムナン硫酸を添加した群(試験群4)では試験群3で上昇した血糖値が減少する傾向を示した。このことから、ラムナン硫酸は、特に高脂肪食を摂取する者に対して、血糖値低減効果があることが分かった。

また、血漿中の中性脂肪は通常食群・高脂肪食群ともにラムナン硫酸の添加(試験群2および4)により有意に($p < 0.05$)減少した。血漿中の総コレステロールも高脂肪食群の試験群3において有意に増加していたが、ラムナン硫酸添加(試験群4)により有意に($p < 0.05$)減少した。このように、ラムナン硫酸は、高値となった血中脂肪を低下させ、メタボリックシンドロームの改善に資することが分かった。

【0017】

図3には、1日当たりの糞便の重量およびカロリーを示した。通常食群(試験群1と2)の間では差異は認めなかったが、高脂肪食群(試験群3と4)の間では、ラムナン硫酸添加により(試験群4)有意に($p < 0.05$)糞便重量およびカロリーが増加していた。このことから、通常の糞便量が増加し、便秘を解消でき得ることが分かった。また、糞便中カロリーも有意に増加していることから、抗肥満効果を資することが分かった。

次に、回収した糞便に含まれる細菌由来の16s rRNAの配列をNanopore 16S Barcoding Kit(Oxford Nanopore社)を用いて解析した。図4には、門レベル(phylum level)における細菌の相対的存在量を示した。NSY/HOS 2型糖尿病マウスでは、殆どをFirmicutesが占めており、次いでBacteroidetes, Actinobacteria(1%前後), Deferribacteres(1%以下)が存在した。図5には、1週目または4週目において、(A)通常食または高カロリー食を投与した群におけるバクテロイデス門(Bacteroidetes)の相対的存在量及び(B)F/B比(Firmicutes/Bacteroidetes)を示した。高カロリー食を与えた群では、ラムナン硫酸の投与により、コントロールに比べるとBacteroidetesが増加しており、F/B比が低下することが分かった。一般的に肥満の人はFirmicutesが多く、Bacteroidetesが少なくなることが知られており、F/B比は肥満指数として使用されている。すなわち、F/B比が小さくなると、肥満が解消する方向に移行したと考えられる。

【0018】

図6には、ラムナン硫酸の投与によって、有意に増加または減少した細菌類のグラフを示した。図に示すように、高脂肪食及び通常食投与群のいずれの群においても、ラムナン硫酸の投与によって、乳酸菌類(Lactobacillus reuteri, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus intestinalisなど)の増加が認められた。また、肥満・メタボリックシンドロームの症状の増悪因子の1つであるオシリバクター属細菌(Oscillibacter valericigenes)は高脂肪食群(試験群3)にて増加していたが、ラムナン硫酸によってそれが減少していた(試験群4)。以上のことより、ラムナン硫酸の経口摂取は腸内細菌叢の構成を

10

20

30

40

50

変化させることが分かった。特に、高脂肪食を投与された群（特に肥満者に多いと考えられる）では、肥満の諸症状を改善することが分かった。オシリバクター属細菌は、空腹時血糖値や経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）のAUCと正の相関があり、血糖値を下げるDPP-4 inhibitorによって減少する報告がある（非特許文献1, 2）。すなわち、オシリバクター属細菌を減少させることにより、血糖値を減少させることができ得る。図2（A）の結果より、ラムナン硫酸は、高脂肪食群において増加した血糖値を有意に低下させる。この作用は、ラムナン硫酸がオシリバクターを減少させることによって得られると考えられた。

【0019】

<ラムナン硫酸が微生物の増殖に与える影響の確認試験>

10

上記<マウス試験>の結果により、ラムナン硫酸が乳酸菌の増殖に対して、良好な影響を与えることが分かった。そこで、インビトロ試験系において、ラムナン硫酸が微生物（特に乳酸菌）の増殖に与える影響を確認した。

1. 試験方法

(1)微生物の培養

MRS粉末培地（Difco Lactobacilli MRS Broth）55gを秤量し、精製水で1000mLにメスアップした。これを攪拌し、溶解後にオートクレーブにて2気圧、121℃、15分の条件で滅菌を行った。これをMRS培地として使用した。

ラムナン硫酸添加培地はオートクレーブ済みMRS培地にラムノックス100（Rhamnox100（江南化工株式会社製、ヒトエグサ抽出物100%、ラムナン硫酸含有量60%以上の製品））。以下も同じ。）の濃度を10mg/ml（または0.625, 1.25, 2.5, 5及び10mg/ml）となるように添加した。ラムナン硫酸は溶解し難いためオートクレーブで105℃、1分の条件で溶解させた培地をラムナン硫酸添加MRS培地とした。

20

MRS培地及びラムナン硫酸添加MRS培地を室温まで冷却後、それぞれ100mLずつ蓋付き三角フラスコへ分注した。そこへ、MRS培地に溶解させた検討用微生物を100μLずつ添加し、37℃で培養を行った。

微生物増殖の程度は660nmの吸光度（O.D.660）を測定することで検討した。O.D.660の測定は微生物が対数増殖期になる時間より開始し、測定時間間隔は1時間とした。

また、乳酸菌として、JCM8130(Lactobacillus paracasei)、JCM2257(Bacillus coagulans)及びJCM11046(Lactobacillus gasseri)を理研バイオリソース研究センターより入手して用いた。

30

【0020】

(2)微生物のカウント

BCP加プレート寒天培地（栄研化学 乳酸菌数測定用）24.6gを秤量し、精製水で1000mLにメスアップした。これを攪拌し、溶解後にオートクレーブにて2気圧、121℃、15分の条件で滅菌を行った。これをBCP加プレート寒天培地として使用した。

培養が終了した微生物液体培地を1mL取り、滅菌済み生理食塩水を加えて10倍希釈試料を作成した。この作業を繰り返し、10億倍希釈まで作成した。

希釈倍率1000倍～10億倍までの乳酸菌希釈液をそれぞれ1mL分取し培養用シャーレに添加した。この試料入りシャーレに44℃に保温したBCP加プレート寒天培地を約20mL添加しよく混合させた。この培地が凝固後、倒置し37℃、72時間±3時間培養した。コントロールとして、希釈に用いた滅菌済み生理食塩水を用いて上記と同様の方法で培養を行った。培養後、培地が黄色に変色しているコロニーを乳酸菌としてカウントした。カウント数に希釈倍率を乗じて乳酸菌数とした。

40

【0021】

2. 試験結果

図7（A）、図8（A）及び図9（A）に示すように、3種類の乳酸菌は何れもラムノックス100を10mg/ml（ラムナン硫酸として6mg/ml以上）の濃度で培地に添加することにより増殖を促進した。CFU（colony forming unit。コロニー形成単位）を測定したところ、表1に示すように、何れもラムナン硫酸添加で上昇し、濁度と相関して菌数が増加

50

していることがわかった。

【 0 0 2 2 】

【表 1】

JCM	学 名	CFU (CFU/uL)	
		control	Rhamnox100 10mg/mL
8130	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.2.E+07	5.1.E+08
2257	<i>Bacillus coagulans</i>	2.2.E+07	6.0.E+07
11046	<i>Lactobacillus gasseri</i>	3.4.E+09	3.5.E+09

10

【 0 0 2 3 】

さらにラムナン硫酸の濃度依存的に増殖を促進するかどうかを確かめるために培地に0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mlの濃度でラムノックス100を加え、増殖促進効果を比較したところ、図7(B)、図8(B)及び図9(B)に示すように、JCM8130(*Lactobacillus paracasei*)、JCM2257(*Bacillus coagulans*)において0.625 mg/ml(ラムナン硫酸として0.375 mg/ml)以上の濃度で、JCM11046(*Lactobacillus gasseri*)で1.25 mg/ml(ラムナン硫酸として0.75 mg/ml)以上の濃度で濃度依存的に増殖を促進した。

20

このようにラムナン硫酸は、インピトロ系で乳酸菌を増殖させる効果を持つことが分かった。

【 0 0 2 4 】

< ヒト試験 1 >

次に、江南化工株式会社内の数名のヒトボランティアによって、ラムナン硫酸の効果を調べた。3名の健康人ボランティアにラムノックス(1日あたり100mg)を経口投与した。ラムノックス(江南化工株式会社製)はヒトエグサを95 ~ 100 で6時間熱水抽出し製造した。珪藻土を加えて遠心分離、上澄み液を減圧濾過処理し、ろ液を限外濾過膜(分画分子量1万)でろ過した。濃縮液をスプレードライして粉体を得た(ラムナン硫酸含有量87%)。

30

その結果、排便回数と排便量が増加しているとの感想を得た。同時に、お腹が張るなどの不快な症状があった者は、解消された。なお、下痢や嘔吐などの副作用症状は認められなかった。

一般の便秘では、3~5日以上に渡って排便がない状態を言う。また、便秘になると、排便時に努力と苦痛を要し、お腹が張る、腹痛などの症状がある。本実施形態の便秘解消組成物によれば、継続的な摂取を行うことにより、排便回数が増加し、排便量も増加するらしいことが分かった。このように、ヒトにおいても有意に便秘を解消させることが分かった。

40

【 0 0 2 5 】

本実施形態のデータによれば、ヒトにおいても、ラムナン硫酸の投与によって便秘症状が解消されることが分かった。また、前記<マウス試験>の結果を兼ね併せると、この便秘解消効果は、腸内細菌叢の構成の変化によるものであると考えられた。このように、特に高カロリー食を摂取する場合に、ラムナン硫酸の投与によって腸内細菌叢の構成をより良い方向に変化させ、便秘を解消させると共に、肥満を改善できることが分かった。

【 0 0 2 6 】

50

< ヒト試験 2 >

1. 試験方法

(1) 被験者

プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験を採用した。被験者の選択基準として、(a)同意取得時の年齢が20歳以上65歳未満の健康な男女、(b)便秘傾向者（排便回数が週3～5回）の2つの条件を満足する者とした。

(2) 検査項目

検査項目として、0W時に便検査（来院5日前から原則として来院前日までに採便させたもの）において腸内細菌検査（アンプリコンシーケンス解析）を、2W時に便検査（来院5日前から原則として来院前日までに採便させたもの）において腸内細菌検査（アンプリコンシーケンス解析）を行った。また、WEB日誌（生活日誌・便通日誌）として、食事調査表・便通日誌（前観察期間開始日より本試験2W終了時の前日までの記録）を施行した。このとき、入力項目として、便通状況（排便回数・採便日、便採取日は何回目かの排便での採取か確認、 Bristolスケール（便性状）、排便量を記録した。

10

(3) 試験食品

試験食品として、被験食品としてラムノックス（江南化工株式会社製、ラムナン硫酸含有量87%）、100mgを含むカプセルを、対照食品としてラムノックスを含まないカプセルを用いた。

上記試験食品について、1日1カプセルを朝食後に水またはぬるま湯とともに嚙まずに摂取させた。試験食品は摂取する直前に開封するよう指示した。

20

(4) 割付方法

事前検査の結果等で選定された試験対象者を、年齢、性別、WEB日誌（1週間あたりの排便回数、 Bristolスケール（便性状）の排便1回あたりの平均値）を考慮して層別に2群に割付を行った。WEB日誌は前観察期間開始日より2週間の値を用いた。なお、層別因子において試験食品群間で大きく偏らないように考慮した。

【 0 0 2 7 】

(5) 集計・解析方法

(i) 主要評価項目：排便状況（排便回数、排便日数）

0W時は0W時来院直前の1週間、1W時は試験食品摂取開始日（0W時来院日）からの1週間、2W時は2W時来院直前の1週間とし、排便回数と排便日数について期間中の合計数をそれぞれ算出した。算出値および0W時からの変化量を使用した対照食品群と被験食品群の群間比較を対応のないt検定にて評価した。算出値を使用した0W時と1W時、2W時の経時的な比較をDunnett検定にて評価した。

30

【 0 0 2 8 】

追加の解析として、試験対象者の腸内細菌（糞便中細菌叢（アンプリコンシーケンス解析）により検出された腸内細菌種数が0W時の全体平均値に対して「平均値未満」および「平均値以上」）による層別解析を実施した。

(ii) 副次評価項目：糞便中細菌叢（アンプリコンシーケンス解析）

(a) ライブラリー作製とシーケンシング方法

(ア) DNA抽出

サンプルにLysis Solution F（ニッポンジーン）を添加した後、Shake Master Neo bmsを用いて、1500 rpmで2分間粉碎した。破碎したサンプルは、65℃で10分間静置した。その後、12000×gで1分間遠心分離を行い、上清を分取した。MPure 12システムとMPure Bacterial DNA Extraction Kit（MP Bio）を用いて、分取した溶液からDNAを精製した。

40

(イ) DNA溶液の定量測定

Synergy LX（Bio Tek）とQuantiFluor dsDNA System（Promega）を用いて、DNA溶液の濃度測定を行った。

(ウ) ライブラリー作製

2 step tailed PCR法を用いてライブラリーを作製した。

50

(エ)ライブラリーの定量

Synergy H 1 (Bio Tek)とQuantiFluor dsDNA System を用いて、作製されたライブラリーの濃度測定を行った。

(オ)ライブラリーの品質確認

Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いて、作製したライブラリーの品質確認を行った。

(カ)シーケンシング解析

MiSeqシステムとMiSeq Reagent Kit v 3 (Illumina) を用いて、2 × 300 bp の条件でシーケンシングを行った。

【 0 0 2 9 】

10

(b)データ解析方法

(ア)プライマー配列に一致したリードの抽出

Fastx toolkit (ver 0 0 14) のfastq_barcode_splitterを用いて得られたリード配列の読み始めが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。プライマー配列にN mixを含む場合、Nの数(フォワード側6種類、リバーズ側6種類の組み合わせで合計36種類)を考慮して、この操作を繰り返した。

(イ)Qiime 2 を用いた解析

Qiime 2 (ver 2020 2) の dada 2 プラグインでプライマー配列とキメラ配列、ノイズ配列を除去した後、代表配列とOTU表を出力した。

各々の菌においてペアリード数を算出し、すべての菌のペアリード数に対して興味のある菌のペアリード数の割合を計算することによって占有率を算出した。実測値および0W時からの変化量を使用した対照食品群と被験食品群の群間比較を対応のないt検定にて評価した。実測値を使用した0W時と2W時の経時的な比較を対応のあるt検定にて評価した。

20

【 0 0 3 0 】

2. 試験結果

(1)試験の実施期間

試験は2020年2月28日から2020年4月23日に実施した(事前検査日から試験責任医師が有害事象の更なる追跡調査を不要と判断した日まで)。

(2)試験対象者の内訳

試験は目標試験対象者数40名(20名/群)のところ、38名(19名/群)にて開始した。試験対象者の内訳を図10に示した。

30

(3)有効性評価項目

主要評価項目：排便状況(排便回数、排便日数)

解析区分を1週間毎とした際の算出値および0W時からの変化量の結果を表2, 3及び図11, 12にそれぞれ示した。表中において、データは「平均値 ± 標準偏差」で示し、群間比較(対応のないt検定)において「#」は危険率5%未満($p < 0.05$)で有意であったことを、経時的な比較(Dunnett検定)において「**」は危険率1%未満($p < 0.01$)で有意であったことを示した。

【 0 0 3 1 】

40

【表 2】

項目	単位	時期	被験食品群	対照食品群	群間比較 (P値)	経時的な比較 (P値)	
						被験食品群	対照食品群
排便回数	回/1週間	0W	4.1 ± 1.5	4.4 ± 1.4	0.508	-	-
		1W	4.7 ± 2.5	4.3 ± 1.3	0.517	0.265	0.870
		2W	5.6 ± 1.9 ^{**}	4.7 ± 2.1	0.151	0.001	0.688
排便日数	日/1週間	0W	3.8 ± 1.0	3.9 ± 1.3	0.779	-	-
		1W	4.1 ± 1.4	4.1 ± 1.4	1.000	0.693	0.928
		2W	4.9 ± 1.2 ^{**}	4.3 ± 1.5	0.135	0.001	0.535

n=38 (被験食品群n=19、対照食品群n=19)、平均値±標準偏差

群間比較：[#]p<0.05、^{##}p<0.01 (対応のないt検定)

経時的な比較：* p<0.05、** p<0.01 (Dunnett検定)

【 0 0 3 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 3】

項目	単位	時期	被験食品群	対照食品群	群間比較 (P値)
排便回数	回/1週間	0W	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-
		1W	0.6 ± 2.0	-0.2 ± 1.3	0.188
		2W	1.5 ± 1.6 [#]	0.3 ± 1.7	0.024
排便日数	日/1週間	0W	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-
		1W	0.2 ± 1.4	0.1 ± 1.3	0.810
		2W	1.1 ± 1.3	0.3 ± 1.5	0.085

n=38 (被験食品群n=19、対照食品群n=19)、平均値±標準偏差
群間比較：[#]p<0.05、^{##}p<0.01 (対応のないt検定)

【0033】

(i) 群間比較

(ア)算出値を使用した対照食品群と被験食品群の群間比較を行った結果、全ての項目で統計学的に有意な差は認められなかった。

(イ)変化量を使用した対照食品群と被験食品群の群間比較を行った結果、以下の項目で統計学的に有意な差が認められた。

・排便回数：2W時において、対照食品群 0.3 ± 1.7 (回/1週間)と比較して、被験食品群 1.5 ± 1.6 (回/1週間)は統計学的に有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

(ii) 経時的な比較

算出値を使用した0W時と1W時、2W時の経時的な比較を行った結果、以下の項目で統計学的に有意な変動が認められた。

・排便回数：被験食品群において、0W時 4.1 ± 1.5 (回/1週間)と比較して、2W時 5.6 ± 1.9 (回/1週間)で統計学的に有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。

・排便日数：被験食品群において、0W時 3.8 ± 1.0 (日/1週間)と比較して、2W時 4.9 ± 1.2 (日/1週間)で統計学的に有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。

【0034】

(4) 層別解析：腸内細菌種数平均値以上

解析区分を1週間毎とした際の算出値および0W時からの変化量の結果を表4, 5及び図13, 14にそれぞれ示した。表中において、データは「平均値±標準偏差」で示し、群間比較(対応のないt検定)において「#」は危険率5%未満 ($p < 0.05$) で有意であったことを、経時的な比較(Dunnett検定)において「**」は危険率1%未満 ($p < 0.01$) で有意であったことを示した。

【0035】

10

20

30

40

50

【表 4】

項目	単位	時期	被験食品群	対照食品群	群間比較 (P値)	経時的な比較 (P値)	
						被験食品群	対照食品群
排便回数	回/1週間	0W	3.7 ± 1.1	4.4 ± 1.5	0.254	-	-
		1W	4.2 ± 1.8	4.0 ± 1.2	0.791	0.510	0.741
		2W	5.7 ± 1.9 ^{**}	4.4 ± 2.6	0.198	0.001	1.000
排便日数	日/1週間	0W	3.7 ± 1.1	3.9 ± 1.4	0.753	-	-
		1W	3.8 ± 1.1	3.7 ± 1.3	0.819	0.955	0.901
		2W	5.1 ± 1.1 ^{#,**}	3.7 ± 1.6	0.030	0.002	0.901

n=21 (被験食品群n=11、対照食品群n=10)、平均値±標準偏差

群間比較：#p<0.05、##p<0.01 (対応のないt検定)

経時的な比較：*p<0.05、**p<0.01 (Dunnnett検定)

【 0 0 3 6 】

10

20

30

40

50

【表 5】

項目	単位	時期	被験食品群	対照食品群	群間比較 (P値)
排便回数	回/1週間	0W	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-
		1W	0.5 ± 1.6	-0.4 ± 1.5	0.229
		2W	2.0 ± 1.7 [#]	0.0 ± 2.1	0.026
排便日数	日/1週間	0W	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-
		1W	0.1 ± 1.1	-0.2 ± 1.4	0.605
		2W	1.4 ± 1.3 [#]	-0.2 ± 1.8	0.030

n=21 (被験食品群n=11、対照食品群n=10)、 平均値±標準偏差

群間比較：[#]p<0.05、^{##}p<0.01 (対応のないt検定)

【0037】

(i)群間比較

(ア)算出値を使用した対照食品群と被験食品群の群間比較を行った結果、以下の項目で統計学的に有意な差が認められた。

・排便回数：2W時において、対照食品群 3.7 ± 1.6 (日/1週間)と比較して、被験食品群 5.1 ± 1.1 (日/1週間)は統計学的に有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

(イ)変化量を使用した対照食品群と被験食品群の群間比較を行った結果、以下の項目で統計学的に有意な差が認められた。

・排便回数：2W時において、対照食品群 0.0 ± 2.1 (回/1週間)と比較して、被験食品群 2.0 ± 1.7 (回/1週間)は統計学的に有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

・排便日数：2W時において、対照食品群 -0.2 ± 1.8 (日/1週間)と比較して、被験食品群 1.4 ± 1.3 (日/1週間)は統計学的に有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

(ii)経時的な比較

算出値を使用した0W時と1W時、2W時の経時的な比較を行った結果、以下の項目で統計学的に有意な変動が認められた。

・排便回数：被験食品群において、0W時 3.7 ± 1.1 (回/1週間)と比較して、2W時 5.7 ± 1.9 (回/1週間)で統計学的に有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。

・排便日数：被験食品群において、0W時 3.7 ± 1.1 (日/1週間)と比較して、2W時 5.1 ± 1.1 (日/1週間)で統計学的に有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。

【0038】

(5)副次評価項目：糞便中細菌叢 (アンプリコンシーケンス解析)

綱 (class) レベルでの占有率を調べた結果を図15, 16に示した。

(i)経時的な比較

占有率を使用した0W時と2W時の経時的な比較を行った結果、以下の項目で統計学的に有意な変動が認められた。

・ Bacteria-Firmicutes-Clostridia

被験食品群において、0W時 $36.09 \pm 12.96\%$ と比較して、2W時 $31.56 \pm 12.64\%$ で統計学的に有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。

・ Bacteria-Firmicutes-Negativicutes

被験食品群において、0W時 $4.62 \pm 5.03\%$ と比較して、2W時 $7.45 \pm 5.02\%$ で統計学的に有意な上昇が認められた ($p < 0.05$)。

目 (order) レベルでの占有率を調べた結果を図17に示した。「目」分類において認められた項目については以下の通りであった。

(ii)経時的な比較

・ Bacteria-Firmicutes-Negativicutes-Acidaminococcales

被験食品群において、0W時 $1.93 \pm 2.98\%$ と比較して、2W時 $3.18 \pm 3.64\%$ で統計学的に有意な上昇が認められた ($p < 0.01$)。

【 0 0 3 9 】

3. 考察

クロストリジウム菌は、中程度の長さの脂肪酸を生成し、吸水率を高め、続いて糞便を乾燥させ、便秘を引き起こすことが知られている。ラムナン硫酸によって便秘が解消されるメカニズムの一つとして、クロストリジウムクラスの減少にあるかも知れない。

ラムナン硫酸は、ネガティウィクテスとアシッドアミノコッカレスを選択的に増加させた。便秘に対する生物学的効果は不明であるものの、これらの細菌の増加が便秘の改善に正の関係があるという報告が知られている。ネガティウィクテスは、便秘の改善中に、オオバコの殻 (*Plantago ovata*の種子に由来)の投与及びビフィズス菌ベースのプロバイオティクス治療によって増加した。

アシッドアミノコッカスは、便秘を改善するために、臨床および小児における部分的に加水分解されたグアーガム (水溶性繊維)の投与における糞便微生物叢移植中の便秘を治癒する主な要因の一つである可能性がありラムナン硫酸はこれを増やす可能性がある。

このように、本実施形態によれば、特に肥満者または高脂肪食摂取者の腸内環境改善効果を備える便秘解消組成物を提供できた。また、インピトロ系で乳酸菌を培養する際に、本発明品を添加することで、増殖時間を早めたり、増殖率を向上させることができた。

10

20

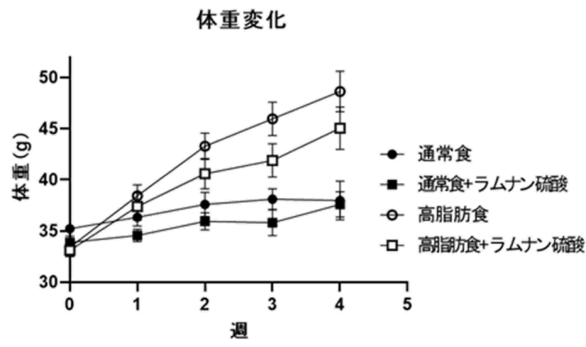
30

40

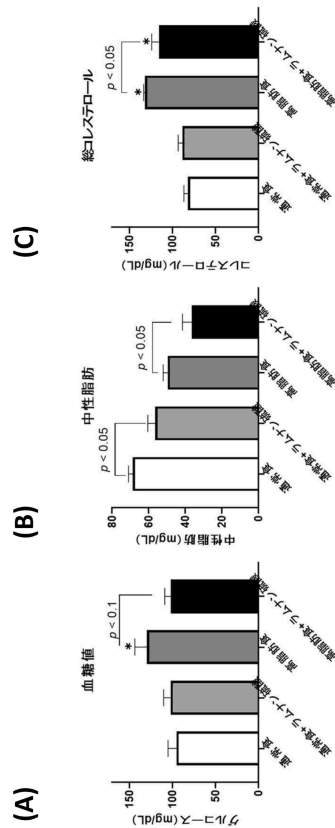
50

【図面】

【図 1】



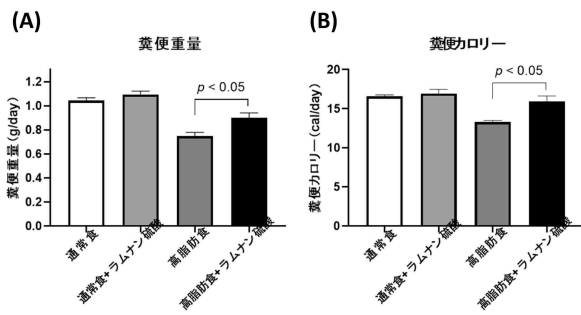
【図 2】



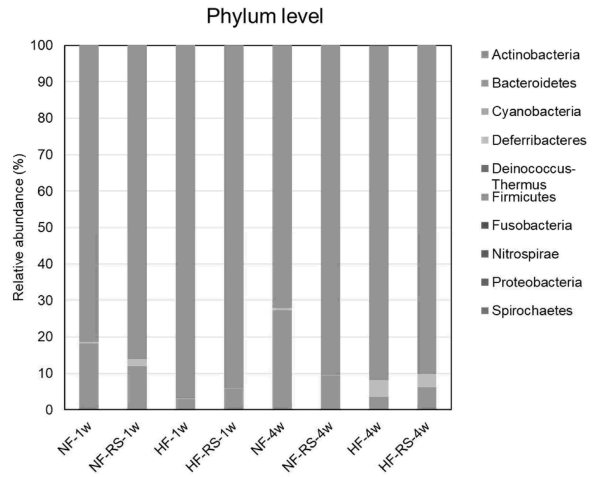
10

20

【図 3】



【図 4】

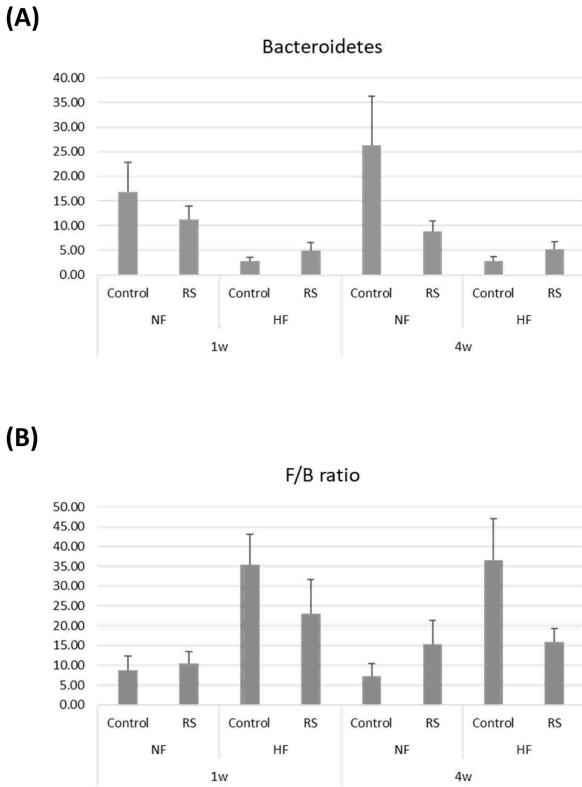


30

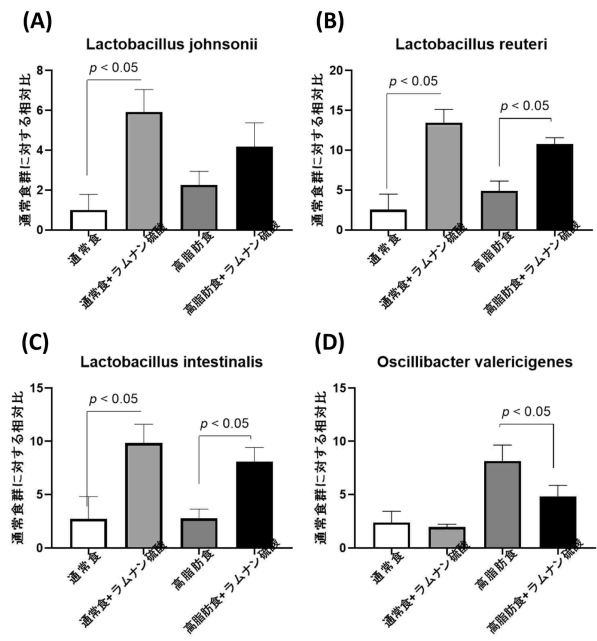
40

50

【 図 5 】



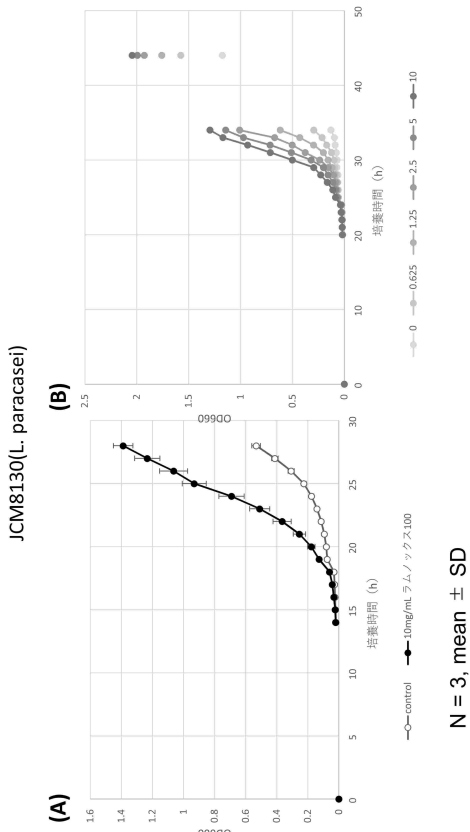
【 図 6 】



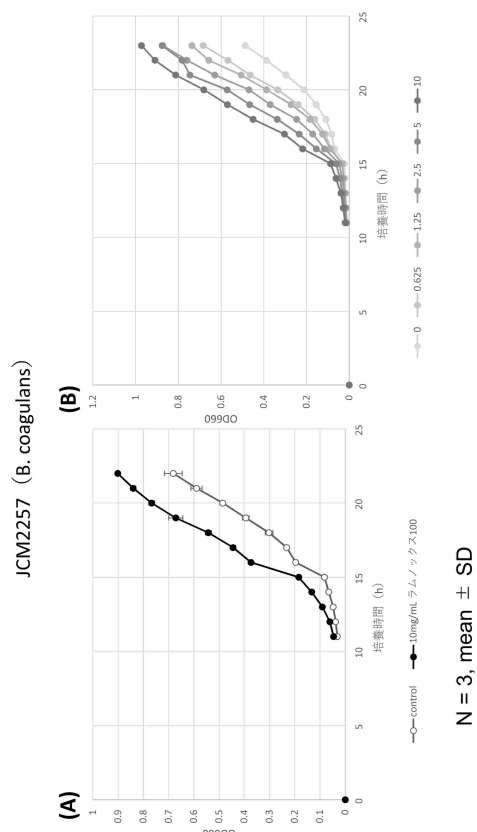
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

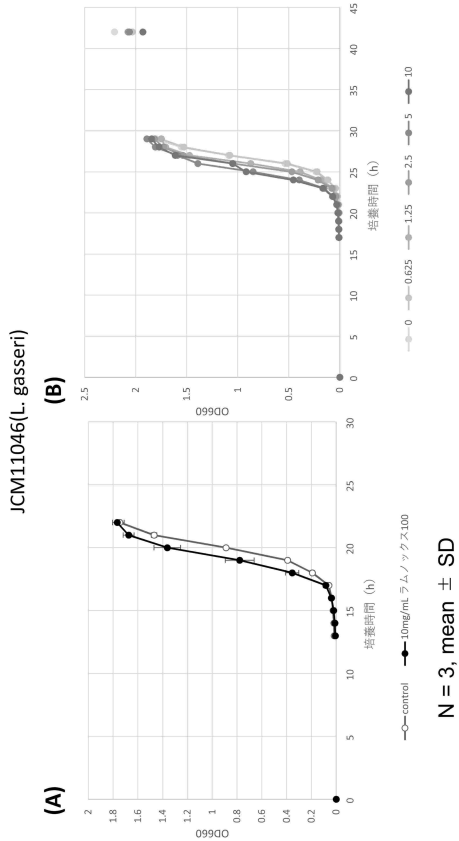


30

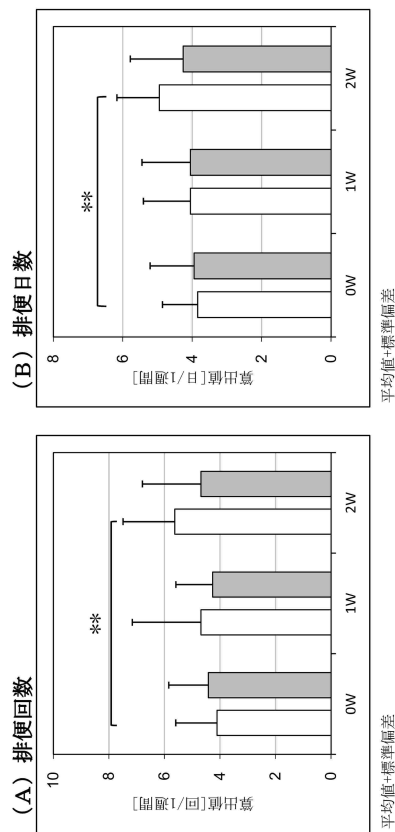
40

50

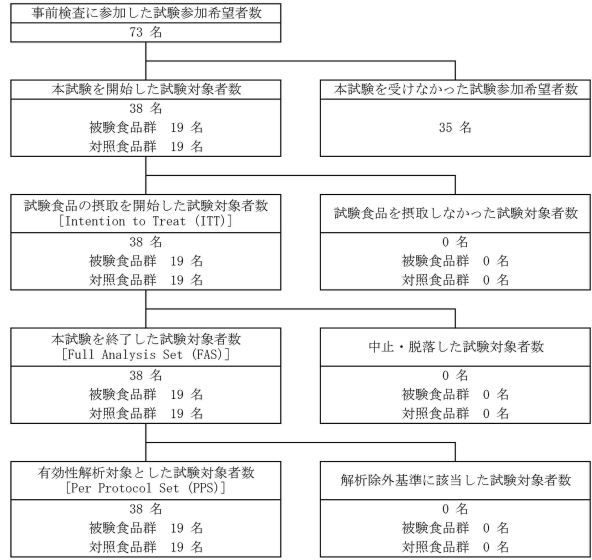
【図 9】



【図 11】



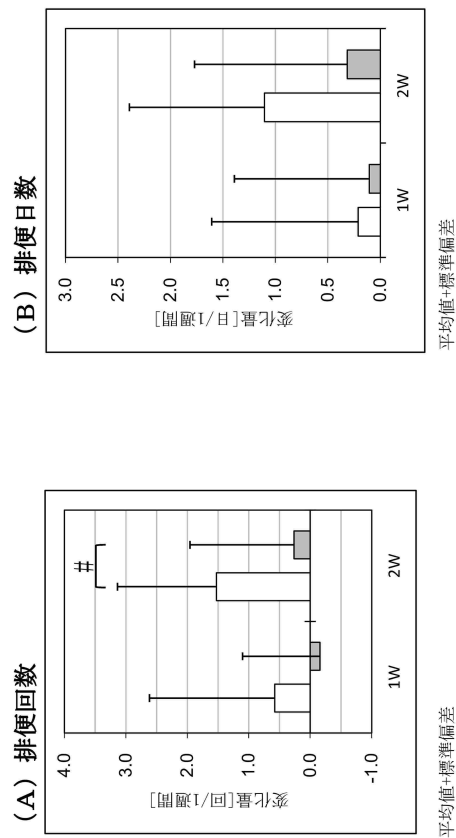
【図 10】



10

20

【図 12】

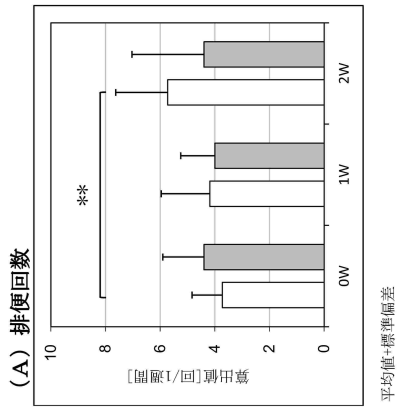
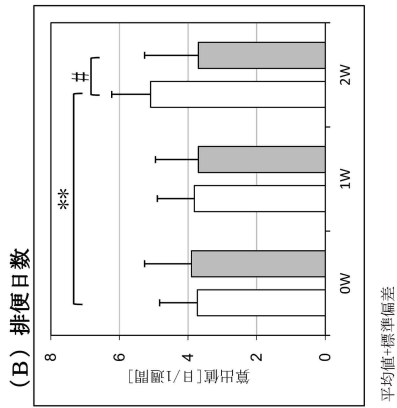


30

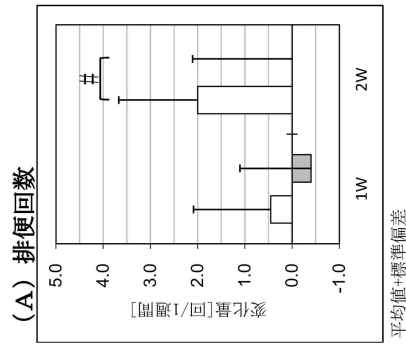
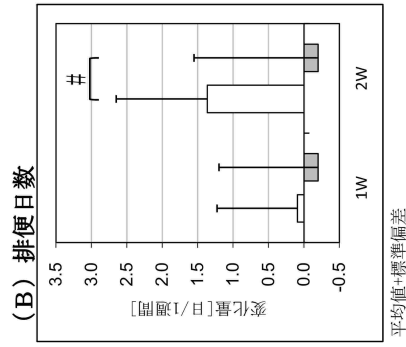
40

50

【图 1 3】



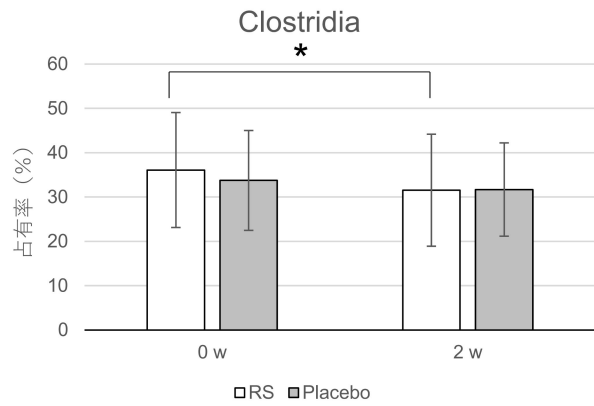
【图 1 4】



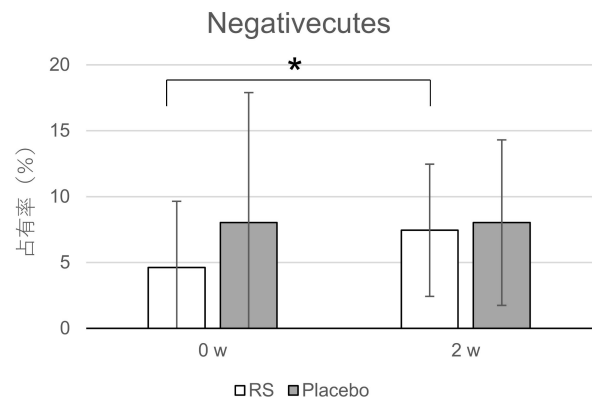
10

20

【图 1 5】



【图 1 6】

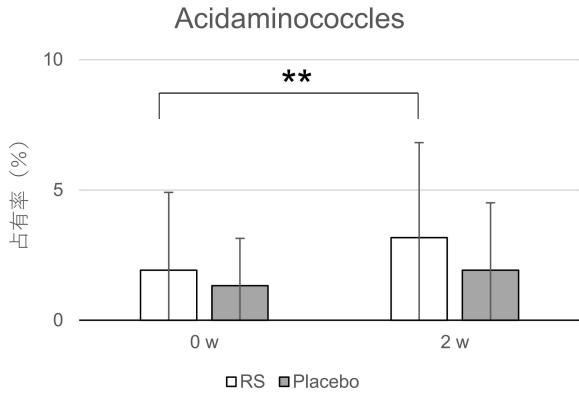


30

40

50

【 17】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 2 3 L 33/10 (2016.01)

F I

A 2 3 L 33/10

(72)発明者 西浦 薫
三重県四日市市楠町北五味塚 1 5 1 5 江南化工株式会社内

(72)発明者 島田 康人
三重県四日市市楠町北五味塚 1 5 1 5 江南化工株式会社内

(72)発明者 臧 黎清
三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 国立大学法人三重大学内

(72)発明者 西村 訓弘
三重県津市栗真町屋町 1 5 7 7 国立大学法人三重大学内

審査官 高山 敏充

(56)参考文献

特開 2 0 1 7 - 1 0 9 9 7 6 (J P , A)

特開 2 0 1 8 - 0 5 8 7 7 0 (J P , A)

特開 2 0 1 7 - 1 6 3 9 8 0 (J P , A)

Chem. Pharm. Bull. , 2001年 , 49(1) , 108-110

2018 年度 実施状況報告書 , KAKEN[オンライン] , [検索日:2024年4月23日] , インターネッ
ト : URL : <https://kaken.nii.ac.jp/ja/report/KAKENHI-PROJECT-18K02204/18K022042018hokoku/>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 2 3 L

A 6 1 P

A 6 1 K

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)