

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-511469

(P2009-511469A)

(43) 公表日 平成21年3月19日(2009.3.19)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 35/74</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74	C	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 P 3/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 3/04		4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 3/06</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 3/06		
<b>A 6 1 P 3/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10		
<b>A 2 3 L 1/30</b>	<b>(2006.01)</b>	A 2 3 L 1/30	Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)				

(21) 出願番号	特願2008-534487 (P2008-534487)	(71) 出願人	508104282
(86) (22) 出願日	平成18年10月2日 (2006.10.2)		アルラ フーズ アンバ
(85) 翻訳文提出日	平成20年6月3日 (2008.6.3)		デンマーク国, デーコー-8260 ビビ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2006/001117		ュ ヨッド, スカンデルボルウバイ 27
(87) 国際公開番号	W02007/043933		7
(87) 国際公開日	平成19年4月19日 (2007.4.19)	(74) 代理人	100099759
(31) 優先権主張番号	0502214-0		弁理士 青木 篤
(32) 優先日	平成17年10月7日 (2005.10.7)	(74) 代理人	100077517
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 脂肪代謝及び肥満に影響を及ぼすプロバイオティクス

## (57) 【要約】

体重増加の抑制、肥満の予防、満腹の増大、飽食の延長、食物摂取の軽減、脂肪蓄積の軽減、エネルギー代謝の改善、インスリン感受性の増強、肥満の処置及びインスリン不感受性の処置に使用される、食品、飼料、栄養補助食品、栄養製品、自然療法、医薬活性製剤及び医薬品の製造のための、プロバイオティクス細菌の使用。プロバイオティクス細菌は、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) F19 (LMG P-17806)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) NCFB 1748 又はビフィドバクテリウム・ラクティス (Bifidobacterium lactis) Bb12 の少なくとも1つである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

体重増加の抑制、肥満の予防、満腹の増大、飽食の延長、食物摂取の軽減、脂肪蓄積の軽減、エネルギー代謝の改善、インスリン感受性の増強、肥満の処置及びインスリン不感受性の処置に使用される、食品、飼料、栄養補助食品、栄養製品、自然療法、医薬活性製剤及び医薬品の製造のための、プロバイオティクス細菌の使用であって、前記プロバイオティクス細菌が、ラクトバチルス・カゼイ ( *Lactobacillus casei* ) F19 ( LMG P - 17806 )、ラクトバチルス・アシドフィルス ( *Lactobacillus acidophilus* ) NCFB 1748 又はビフィドバクテリウム・ラクティス ( *Bifidobacterium lactis* ) Bb12 の少なくとも 1 つであることを特徴とする前記使用。

10

## 【請求項 2】

ミルク、シリアル又はフルーツの少なくとも 1 つを含んで成る組成物又はそれから得られる組成物中での請求項 1 の使用。

## 【請求項 3】

食品、飼料、栄養補助食品、栄養製品、自然療法、医薬活性製剤及び医薬品として使用される製品中での請求項 1 に記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

20

本発明の分野

本発明は、体重増加の抑制、肥満の予防、満腹の増大、飽食の延長、食物摂取の軽減、脂肪蓄積の軽減、エネルギー代謝の改善、インスリン感受性の増強、肥満の処置及びインスリン不感受性の処置に使用される、食品、飼料、栄養補助食品、栄養製品、自然療法、医薬活性製剤及び医薬品の製造のための、プロバイオティクス細菌の使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

本発明の背景

健康に影響を与える食品の使用における興味は、研究者、健康専門家及び食品産業において急速に増大している。肥満、腹部脂肪蓄積及び 2 型糖尿病を含むメタボリック・シンドロームは、ヒトの健康及び健康に対する主な脅威の 1 つである。今日では、食べる量が少ないために死亡するヒトの数よりも、食べる量が多すぎるために死亡するヒトの数の方が多い。従って、肥満及び体脂肪蓄積の危険を低下させる可能性は、世界中の健康の観点において非常に価値があり、この領域で食品を開発する可能性は、食品産業にとって非常に興味がある。

30

## 【0003】

食品産業は既に、低エネルギー密度の製品、例えば低脂肪及び低炭水化物製品を開発することによりこの要求に対応してきた。肥満、脂肪代謝、グルコース代謝及び満腹に影響を及ぼす食品中に天然に存在する又は添加することができる生物活性成分を見つける可能性は、この産業が、すなわち実証された健康効果を有する機能性食品を開発する新規の可能性を開く。最近、ミルク中の高レベルのカルシウムの消費と低いボディー・マス・インデックス ( BMI ) との間の相関関係を示す試験が発表された。今日では、ミルク中のカルシウム、ミルク製品が、肥満、体脂肪蓄積及びインスリン耐性を低下させるという結論が、多くの総説で出されてきた。カルシウムはそれ自体、それらの特性を有しているようであり、カルシウムに加えて、ミルク中に存在する生物活性成分に対する必要性が存在すると考えられてきた。

40

## 【0004】

プロバイオティクスは、追加された「健康に対して有益な効果を有する微生物」として、I L S E ( 国際生命科学研究所 ) により定義された。プロバイオティクスは、一般的に、腸の健康、感染及び免疫系に影響を及ぼすために、食品、飼料及び栄養補助食品中で使

50

用される。いくつかのプロバイオティクス株は、全てが試験されたわけではないが、血中コレステロール濃度に影響を及ぼすことも示されており、最近では、タンパク質分解乳酸菌により発酵されるミルク製品の使用により血圧を低下させる可能性が発見された。従って、プロバイオティクスにおける興味は広く、腸の健康及び健康及び免疫系に対する腸管内菌叢の中心的役割は、強く確立されている。

#### 【 0 0 0 5 】

ここ数年の間に、しばしばゲノミクス及びニュートリゲノミクスと呼ばれている技術が開発されてきた。それらの技術は、食品、栄養素の健康への影響を試験するための新規の独特な可能性をもたらす。この技術は、同時に多くの遺伝子の遺伝子発現を試験することを可能にする。従って、健康効果に関する新規で予想されない領域が発見され、健康効果の背後のメカニズムが示唆され得る。

10

#### 【 0 0 0 6 】

本出願の基礎は、プロバイオティクス製品が、満腹に影響を及ぼし、脂肪蓄積及び肥満の危険性を低下させることを興味深く示すヒト及びマウスでの試験である。観察された効果の背後の有力なメカニズムは、プロバイオティクス製品の消費後の遺伝子発現の試験から説明された。

#### 【 0 0 0 7 】

##### 背景技術の説明

肥満、メタボリック・シンドローム及び2型糖尿病の危険性に寄与する代謝機能は説明されており、一般的な栄養素とそれらの疾患との間の関係も周知である。しかし、それらの疾患を生み出す危険性を減少させる際に、個々の食品及び食品グループの役割を確立させるための食事に基づいた介入研究が必要とされている。この領域の研究においては、エネルギー密度、脂肪及び炭水化物に焦点が当てられてきた。

20

#### 【 0 0 0 8 】

メタボリック・シンドロームにおける重要な因子は、インスリン感受性を含むグルコース代謝である。体脂肪蓄積、インスリン非感受性及び肥満の間には関連性が存在する。満腹及び飽食への関連性も存在する。それらの全ての機能の間の相互作用及び関係は複雑であり、健康又は疾患をもたらす事象の正確な順序を同定することは困難である。

#### 【 0 0 0 9 】

エネルギー恒常性に関わる多くの遺伝子及びそれらの対応するタンパク質が説明されてきた。脂肪組織はサイトカインと構造の類似した多くのタンパク質を合成し、それにより、これらはアディポカインと呼ばれている。それらのいくつかは腸でも合成されており、その合成は腸から制御されている。核受容体であるPPARガンマは、例えばアディポネクチンの合成に関係しており、その合成はカロリー摂取量及びレプチンシグナル伝達に関連する。アディポネクチンの合成の増大は、脂肪酸輸送、酸化及び骨格筋中の消費を増大させることにより、及び肝細胞のインスリンに対する感受性を増大させることにより、インスリン感受性を改善する。インスリン感受性に影響を及ぼす別の栄養的に制御された脂肪細胞に由来する因子は、レジスチンである。循環するレジスチン濃度は、肥満症において増大し、一方、レジスチンによるマウスの処理は、グルコース産生の増大及びインスリン作用の低下をもたらした。従って、レジスチンはグルコース恒常性において機能を有し、インスリン作用に対するアンタゴニストとして作用し、インスリン耐性を引き起こす。レジスチン様タンパク質は、胃腸管においても発現している(14)。アポリポタンパク質A-I Vは、ヒト及びげっ歯類において、小腸により分泌される。この合成は脂肪摂取により刺激され、このタンパク質は恐らく、脂肪の摂取後に食物摂取量の阻害に関わる。研究は、アポリポタンパク質A-I Vが、恐らく、食物摂取量の短期的及び長期的制御に関わることを示した。

30

40

#### 【 0 0 1 0 】

Hooperら(11)は、バクテロイデス・テトライオタオミクロン(*Bacteroides thetaiotaomicron*)に暴露したマウスの腸内の遺伝子発現を研究した。彼らは、この実験が腸マイクロフローラと宿主との間の相互作用に対して必

50

須の役割を示すと結論付けた。エネルギー代謝又は肥満への効果は無いことが報告された。小腸粘膜内の遺伝子発現へのプロバイオティクスの影響を、ラクトバチラス・ラムノーザス・GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG) に関して試験した(8)。彼らの結論は、ラクトバチラス・GG (*Lactobacillus* GG) の投与が、複雑な遺伝子応答に関連するというものである。見られるその主な応答は、免疫系、炎症、アポトーシス、細胞成長及び分化、細胞接着及びシグナル転写及び伝達への効果である。エネルギー代謝、脂肪代謝、グルコース代謝又はインスリン代謝への効果は無いことが報告されている。2005年の第4回NIZO Dairy会議でのW. de Vosによる口頭発表において、乳酸菌、例えばL. プランタラム 299v (*L. plantarum* 299v) の腸内の遺伝子発現への影響について発表され、結論は、異なる株からの遺伝子発現への効果はかなり変動するというものであった。エネルギー代謝又は脂肪代謝への効果は無いことが報告された。

10

20

30

40

50

#### 【0011】

腸管内菌叢を体重増加及び脂肪蓄積と結びつけるいくつかの論文が公表されている。Bäckhedら(7)は、体重増加及び体脂肪蓄積に対する正常な腸管内菌叢の重要性について研究した。正常な微生物叢が確立されたノトパイオート・マウスが、食物摂取量の減少に関わらず、14日間の給餌期間において、体脂肪を60%まで増大させ、そしてインスリン耐性を増大させたことが示された。微生物叢がどのようにトリグリセリド蓄積に影響し得るかに関する示唆が示されている。このように、正常な腸管内微生物叢が脂肪代謝に影響することが知られているが、この調査までは、その正常な細菌叢が脂肪代謝に関して変わり得るかどうかは知られていなかった。

#### 【0012】

Aliら(2、3)は、コレステロール代謝に影響するプロバイオティクスを含む又は含まない大豆イソフラボンの影響を試験し、使用したプロバイオティクスがコレステロール又は脂肪蓄積に影響しないことを見出す。他の調査の参考文献は、いくつかのプロバイオティクス株が、血中コレステロール濃度に影響し得ることを示した(1、13)。プロバイオティクス株を比較したこの試験及び他の試験は、異なるプロバイオティクス株は異なる特徴を有し、具体的な健康効果に関して正しい株を選択することが重要であることを示す。

#### 【0013】

PCT特許出願WO04/014403(15)には、食品中の単糖類及び二糖類の量を減少するためのプロバイオティクスの使用、及びそれによる肥満の危険性の処置又は予防について記載されている。米国特許第6696057号において、Bojrab(4)は、消化器疾患、脂質異常症及び自己免疫疾患の処置のための、ヨーグルト細菌、例えばラクトバチルス・ブルガリカス(*Lactobacillus bulgaricus*)及びストレプトコッカス・サーモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)の組成物について特許権を得、米国特許第6641808において、Bojrab(5)は、肥満症の処置に対しても同一の組成物の使用について記載している。この発明は、欧州特許出願第1177794号(6)にも記載されている。それらの特許/出願は、消化管の健康、感染及び免疫へのプロバイオティクスの影響に関する長い説明を有しているが、肥満への影響を確認する示された唯一の実験がヒトにおける単回飼育試験である。多くの生物活性成分及び体重減少のためのプロバイオティクスと組み合わせた緑茶又は緑茶抽出物の使用は、米国特許第6383482号(9)及び同第6565847号(10)においてGorsekにより特許されている。両方の特許において、主な活性成分は緑茶及び生物活性成分であり、プロバイオティクスは基礎組成物の一部として添加される。米国特許第6808703号及び日本国特許出願2001-292728号(16)においては、酵母、腸内細菌、乳酸菌、オリゴ糖及び植物繊維を含む肥満処置のための食品を調製する方法が記載されている。肥満の処置に関する実施例又は特許請求の範囲は示されていない。

#### 【発明の開示】

## 【 0 0 1 4 】

## 本発明の説明

本発明の目的は、体重増加の抑制、肥満の予防、満腹の増大、飽食の延長、食物摂取の軽減、脂肪蓄積の軽減、エネルギー代謝の改善、インスリン感受性の増強、肥満の処置及びインスリン不感受性の処置に使用される、食品、飼料、栄養補助食品、栄養製品、自然療法、医薬活性製剤及び医薬品の製造のための、プロバイオティクス細菌の使用である。

## 【 0 0 1 5 】

この目的は、プロバイオティクス細菌が、乳酸菌、特にラクトバチルス・カゼイ ( *Lactobacillus casei* )、ラクトバチルス・アシドフィルス ( *Lactobacillus acidophilus* )、及びビフィドバクテリウム・ラクティス ( *Bifidobacterium lactis* )、より好ましくはラクトバチルス・カゼイ ( *Lactobacillus casei* ) F19 ( LMG P - 17806 )、ラクトバチルス・アシドフィルス ( *Lactobacillus acidophilus* ) NCFB 1748、及びビフィドバクテリウム・ラクティス ( *Bifidobacterium lactis* ) Bb12 ( この細菌は、ゲントの LMG カルチャー・コレクションに寄託されており、NCFB カルチャー・コレクション及び Chr. Hansen Company DK からそれぞれ入手可能である ) から成るグループから選択されることにおいて達成される。これらの株は、以下では LMG P - 17806、NCFB 1748 及び Bb12 と呼ばれる。

## 【 0 0 1 6 】

ラクトバチルス・カゼイ ( *Lactobacillus casei* ) F19 ( LMG P - 17806 )、ラクトバチルス・アシドフィルス ( *Lactobacillus acidophilus* ) NCFB 1748、及びビフィドバクテリウム・ラクティス ( *Bifidobacterium lactis* ) Bb12 及びその使用は、既に特許されている ( WO99 / 29833 )。この3つの株は、食品中及び消化管を通過する間、十分に生存する。

## 【 0 0 1 7 】

今日の一般的な生活スタイルが、肥満、腹部脂肪蓄積及び2型糖尿病を含むメタボリック・シンドロームの危険性を増大させる過剰の食品摂取を意味するので、本発明の効果は非常に重要である。2型糖尿病は、インスリンの低感受性又はインスリン耐性により引き起こされる。このヒトの健康に対する脅威は、世界中の全ての年齢グループにおいて引き続き増大している。プロバイオティクスとしての乳酸菌は、食品、飼料、天然物、栄養補助食品、栄養製品、自然療法、医薬活性製剤及び医薬品として受け入れられている。それらは、それらの送達系において使用するのが容易であり、日常的に容易に消費することができる。それらの最近の日常的な消費は、体重増加の抑制、肥満の予防、満腹の増大、飽食の延長、食物摂取の軽減、脂肪蓄積の軽減、エネルギー代謝の改善、インスリン感受性の増強、肥満の処置及びインスリン不感受性の処置を助け、それによりメタボリック・シンドロームに含まれる疾患の危険性を軽減する。

## 【 0 0 1 8 】

以下の試験が本発明に含まれる：

試験は、プロバイオティクス製品がヒトにおいて体重増加を低下させることができることを示す。更に、試験は、プロバイオティクスを与えられたヒトが、プロバイオティクスを含まない同じ酸乳又は偽薬を与えられたヒトよりも高い満腹を報告し、より長い満腹を有することを示した。プロバイオティクスを与えたマウスは、プロバイオティクスを与えられないマウスよりも、総エネルギー摂取が低く、脂肪組織中の脂肪蓄積が小さく、総体重増加が低かった。遺伝子発現試験は、観察された効果の背後の機構が、エネルギー、脂肪、糖及びインスリン代謝及び満腹に関わる遺伝子のクラスターへの影響であることを確認する。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 1 9 】

## 1) ヒトにおける体重制御

二重盲検プラセボ対照試験において、ヒトは、プロバイオティクス (LMG P - 17806 及び NCFB 1748) を含む酸乳又はプロバイオティクスを含まない同一の酸乳又はカルシウム錠剤のいずれかが与えられた。それらのグループは、それぞれ15、14及び10人のヒトから成る。プロバイオティクス細菌は、 $5 \times 10^7$  CFU/ml の最終濃度で製品に添加され、細菌の数は、実験時間の間、製品中で安定であった。参加者は、 $2 \times 2.5$  dl の製品を毎日食べた。含まれるヒトは、少し超過体重 (BMI 25 ~ 30) であった。この試験の目的は、プロバイオティクスのコレステロール代謝への効果を試験することであり、管理基準として体重増加を測定した。体重管理に関するアドバイスは与えられなかったが、参加者は、試験後に体重減少処置が提供された。細菌は消化管内の通過を生き残り、因子5により参加者からの糞便中に見出される乳酸菌の数は増大した。4週間後に、3つのグループの間の体重増加における驚くべきであるが顕著な差異が存在した。体重増加の平均値は、プロバイオティクス製品を受けたグループにおいては0.25 kgであり、プロバイオティクスを含まない酸乳を受けたグループにおいては0.75 kgであり、錠剤を受けたグループでは1.4 kgであった。図1を参照のこと。

10

## 【0020】

## 2) ヒトにおける満腹及び飽食

二重盲検プラセボ対照試験において、2つの異なる用量のプロバイオティクスを含む酸乳又はプロバイオティクスを含まない同じ酸乳から成る偽薬 no. 1 又は乳酸菌を全く含まない酸乳から成る偽薬 no. 2 のいずれかをヒトに与えた。プロバイオティクス微生物である LMG P 17806、NCFB 1748 及び Bb 12 を、各株について  $1 \times 10^6$  CFU/ml 及び  $5 \times 10^7$  CFU/ml の最終濃度で製品中に添加した。3dl の4つの製品のいずれかを含む管理された標準的な朝食の後、参加者は、食事の直後及び連続して30分おきに4時間、満腹及び空腹をVASスケール (視覚アナログ尺度) で示すように求められた。全部で10人のヒトがこの試験に含まれ、全ての参加者には全ての4つの製品が異なる時に与えられ、相対的差異が計算された。食事の直後に、それらの製品間において満腹のスコアにわずかな相違が存在した。 $5 \times 10^7$  CFU/ml 及び  $1 \times 10^6$  の濃度のプロバイオティクスを有する酸乳は最も高いスコア (それぞれ6.6及び6.4の相対的なVASスコア) を与え、偽薬 no. 1 は中間のスコア (6.2の相対的なVASスコア) を有し、偽薬 no. 2 は最も低いスコア (5.9の相対的なVASスコア) を有した。満腹スコアは、3.5時間後に、それぞれ3.1、3.0、2.5及び2.2まで低下した。これらの相違は小さいが、製品間の相違は持続し、飽食への影響は、2つの異なる濃度の細菌を含むプロバイオティクス製品に対して観察された。空腹に関しては、反対の状況が見られた。すなわち、プロバイオティクス製品は、2つの偽薬製品よりも低い空腹を与えた。食事の直後に、2つのプロバイオティクス製品は、両方の製品ともVASスケールで0.4の空腹スコアをもたらし、偽薬 no. 1 は中間 (0.9のVASスコア) であり、偽薬 no. 2 は空腹に関して1.1のVASスコアを与えた。4時間後に、それらの値は、それぞれ6.0、6.2、7.0及び6.9であった。

20

30

40

## 【0021】

上記の標準的な朝食後で、満腹及び空腹に関するデータが観察された4時間後に、参加者は標準的な昼食を食べるように指示された。参加者は、心地よく満足し、それぞれの異なる朝食後と同じレベルの膨満が得られるよう試みることを要求された。プロバイオティクス製品を食べた後に、昼食時のエネルギー摂取量は、高レベルのプロバイオティクスを含む製品に関しては3690 KJであり、低レベルのプロバイオティクスに関しては3810 KJであった。偽薬 no. 1 に関しては3850 KJであり、偽薬 no. 2 に関しては3995 KJであった。これは、プロバイオティクス製品が、朝食の一部としてプロバイオティクス製品を食べた後の食事におけるエネルギー摂取量を減少させ得ることを示す。

## 【0022】

## 3) マウスの食物摂取量

50

Swiss Webster 系統の正常フローラマウスに、LMG P - 17806 又は NCFB 1748 のいずれかを含む酸乳、あるいは同一の組成であるがプロバイオティクスを含まない偽薬製品を 10 日間与えた。マウスは、投与の開始時に 6 ~ 8 週齢であった。プロバイオティクスが与えられたグループは、各グループにおいて 7 匹のマウスを含み、偽薬グループは 5 匹の動物から成った。プロバイオティクス微生物は、 $1 \times 10^8$  CFU / ml の濃度で製品に添加され、細菌の数は給餌期間中、製品中で安定であった。マウスは、2 つの標準的な 1 日投与量の製品が与えられ、1 つは経口強制給餌により与えられ、1 つは舌下注入により与えられた。両方のプロバイオティクス細菌は、消化管の通過の際も生き残り、マウスの小腸及び大腸において相当な数で存在した。プロバイオティクス製品及び偽薬製品に加えて、マウスは随意に精製成分食事にアクセスした (Research Diets Inc., New Jersey, USA からの D12450B) 。毎日の食事摂取量を、乳酸菌株を受けるマウスの 2 つのグループとマウスの偽薬グループとの間で比較した。これらの製品は、マウスにより十分に許容された。

10

#### 【0023】

第二の部分の給餌期間中、偽薬製品を受けるグループと比較して、食事摂取量は、プロバイオティクスが与えられた動物のグループにおいて顕著に減少した。図 2 を参照のこと。

#### 【0024】

##### 4) マウスにおける腹部脂肪の蓄積

正常フローラマウスは、LMG P - 17806 を含む酸乳プロバイオティクス製品又は同じ組成であるがプロバイオティクスを含まない偽薬製品のいずれかが与えられ、或いは酸乳を含まない 2 つの他のグループと同じ飼料が与えられた対照グループとされた。選ばれたマウス系統は、食餌誘導性肥満に対して感受性の C57B16 (チャールズ・リバー) であった。異なるグループに含まれる動物の数は、酸乳が与えられたグループはそれぞれ 15 匹であり、対照グループは 3 匹であった。これらのマウスは、それらが 9 週齢のときに試験に導入された。プロバイオティクス細菌の数は、 $1 \times 10^8$  CFU / ml であり、マウスは、週に 5 日、合計で 12 週間随意に製品を食べることが許された。急速な体重増加のために、マウスには、高脂肪食餌 (最初の 5 週間は、36 % の脂肪を含む Research Diets Inc., New Jersey, USA からの D12309、その後、試験の残りの週は、同一の会社からの D12492 (35 % の脂肪)) が給餌された。12 週間後に、マウスは屠殺され、体重増加、食物消費量及び腹部脂肪の量に関するデータが分析された。酸乳製品が与えられたマウスは、酸乳を受けていない対照マウスよりも体重増加が少なかった。プロバイオティクスを含む酸乳が与えられたマウスも、プロバイオティクスを含まない酸乳を受けたグループ及び酸乳を全く受けていない対照グループと比較して、腹部脂肪の蓄積が低かった。

20

30

#### 【0025】

##### 5) マウスにおける遺伝子発現

Swiss Webster 系統の無菌で正常フローラのマウスに、LMG P - 17806 又は NCFB 1748 のいずれかを含む酸乳、あるいは同一の組成であるがプロバイオティクスを含まない偽薬製品を 10 日間与えた。マウスは、投与の開始時に 6 ~ 8 週齢であった。プロバイオティクスが与えられたグループは、各グループにおいて 6 匹のマウスを含み、偽薬グループは 4 匹の動物から成った。プロバイオティクス微生物は、 $1 \times 10^8$  CFU / ml の濃度で製品に添加され、細菌の数は給餌期間中、製品中で安定であった。マウスは、毎日経口強制給餌により製品が与えられた。試験期間中、マウスは随意に精製成分食事にアクセスした (Research Diets Inc., New Jersey, USA からの D12450B) 。両方のプロバイオティクス細菌は、消化管中の通過を生き残り、マウスの小腸及び大腸中で相当な数で存在した。マウスは屠殺され、小腸における遺伝子発現を、オリゴヌクレオチドマイクロアレイ技術により分析した。免疫系への予想された効果に加えて、エネルギー代謝及び恒常性に関連する多くの遺伝子の発現への予想されない効果が、2 つのプロバイオティクスグループと比較して、偽

40

50

薬グループにおいて異なることが見出された。発現の顕著な変化を示す遺伝子は、*Scd 1*、*Acrlp 30*、*Adn*、*Thrsp*、*Car 3* 及び *Apoa - 4* であり、それらの全ては、偽薬グループと比較して、プロバイオティクスグループにおいて上方制御され、*Retnlb* はプロバイオティクスグループにおいて下方制御された。差次的遺伝子発現のパターンは、用いられたプロバイオティクス系統に対して非常に似ていた。無菌マウスにおけるアジプシン (*Adn*)、アディポネクチン (*Acrlp 30*)、炭酸脱水酵素 3 (*Car 3*) 及びレジスチン様ベータ (*Retnlb*) 遺伝子を、定量的リアルタイム PCR 技術により確認した。図 3 を参照のこと。図 4 は、定量的リアルタイム PCR 法により確認した正常フローラコロニー形成マウスにおけるアポリポタンパク質 A - IV (*Apoa 4*) の発現レベルを示す。

10

#### 【0026】

##### 6) 用量

上記の異なる実験におけるプロバイオティクス細菌の個々の株の全用量は、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$  CFU (マウスの実験) 及び  $2.5 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^{10}$  (ヒトの実験) であった。この用量は、部分で又は日用量で投与される必要がある。これは、200 ~ 500 ml の量で消費されるヒト用の飲料は、有効性のために  $0.5 \times 10^6 \sim 1.25 \times 10^8$  CFU/ml の個々の株を含む必要があり、カプセルは、カプセル中に約 1 g の含量で全量の細菌 (すなわち、 $1 \times 10^8 \sim 2.5 \times 10^{10}$ ) を含む必要があることを意味する。最も高い濃度の細菌については、細菌は凍結乾燥又は噴霧乾燥により濃縮される必要がある。

20

#### 【0027】

##### 7) 製品の調製

プロバイオティクス細菌は、ミルク、シリアル又はフルーツをベースとした製品に添加される必要がある。細菌は、濃縮物、例えば凍結乾燥として添加され、全てのツリー・マトリクス (*tree matrix*) において生存性が分析された。ミルクベース及びシリアルベースの製品中で、生存性は非常に優れていた。フルーツベースの製品中では、生存性はフルーツのタイプに影響される。凍結乾燥粉末の場合には、水分活性及び酸素への曝露に関して注意が必要である。製品製造からの結果は、表 1 において見ることができる。

30

#### 【0028】

異なる種類の培養製品の製造のために、プロバイオティクス細菌は、他の乳酸菌と共にミルクベースの製品に添加することもできる。この環境において、プロバイオティクス細菌は増殖することができ、それらの製品中の低い最終 pH の優れた生存性を与える酸環境にも十分に順応するだろう。製品製造からの結果は、表 1 において見ることができる。

#### 【0029】

表 1 . 百万 CFU/g として測定した異なる製品マトリクス中のプロバイオティクス細菌の生存性。製品は 8 ヶ月で貯蔵した。



【表 1】

細菌	ミルク	スムージー ミルク／果物	シリアル 飲料	シリアル ミックス中の 凍結乾燥粉末	フルーツ ジュース クロフサスグリ	フルーツ ジュース リンゴ	ヨーグルト 飲料	ヨーグルト	酸乳
LMG P-17806, 1日目	53	56	50	45	46	53	67	70	74
LMG P-17806, 21日目	55	51	52	39	13	35	55	75	63
NCFB 1748, 1日目	50	53	56	43	50	55	57	56	60
NCFB 1748, 21日目	42	43	43	37	3	30	32	42	44
Bb 12, 1日目	59	60	65	65	62	67	62	73	68
Bb 12, 21日目	49	47	60	31	14	49	51	68	60

【 0 0 3 0 】

10

20

30

40

## 【表 2】

## 参考文献：

- 1) Agerholm, L., M.I. Bell, G.k. Grunwald and A. Astrup. 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J. clin. Nutr.* 54:856-860.
- 2) Ali A. A., I. A. Mohamed, C. T. Hansen, T. Wang, M. T. Velasquez and S. J. Bhathena. 2002. Effect of probiotics and isoflavones on metabolic parameters in a genetic model of obesity and diabetes. *FASEB J.* 16:p A1014.
- 3) Ali. A. A., M. T. Velasquez, C. T. Hansen, A. I. Mohamed, and S. J. Bhathena. 2004. Effect of soybean isoflavones, probiotics and their interactions on the metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. *J. Nutritional Bioch.* 15:583-590.
- 4) Bojrab G.. 2000. Composition and method for treatment of gastrointestinal disorders and hyperlipidemia. US patent 6 696 057
- 5) Bojrab G.. 2000. Composition for treatment of obesity. US patent 6 641 808.
- 6) Bojrab G.. 2001. Composition, of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, for the treatment of gastrointestinal disorders, hyperlipidemia, autoimmune diseases, and obesity. European patent application 1 177 794.
- 7) Bäckhed F., H Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS* 101:15718-15723.
- 8) Di Caro S., H. Tao, A. Grillo, C. Elia, G. Gasbarrini, A. R. Sepulveda, and A. Gasbarrini. 2005. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Digestive and Liver Disease* 37:320-329.
- 9) Gorsek W. F. 2000. Weight loss composition containing green tea, hydroxycitric acid, 5-hydroxytryptophane, glucomannan, picolinate and *Lactobacillus*. US patent 6 383 482.
- 10) Gorsek W. F.. 2002. Thermogenic weight management composition. US patent 6 565 847.
- 11) Hooper L. V., M Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk and J.I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationship in the intestine. *Science* 291 (5505):881-884.
- 12) Park H. O., Y. B. Bang, H. J. Joung, B. C. Kim and H. R. Kim. 2004. *Lactobacillus* KTCK 0774BP and *acetobacter* KCTC 0773BP for treatment or prevention of obesity and diabetes mellitus. US patent 6 808 703.
- 13) Pereira D. I. and G. R. Gibson. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem Mol Biol.* 37:259-281.
- 14) Steppan C. M., S. T. Bailey, S. Bath, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahlma, and M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307.
- 15) Song S.H., S. K. Kang, j. H. Kim, y. H. Park, and H. O. Park 2002. Microorganisms for inhibiting obesity and diabetes mellitus. PCT patent application WO 04/014403.
- 16) Yanagida F., and K. Sano. 2000. Obesity preventative food. Japanese patent application 2001-292728.

10

20

30

40

## 【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 1 】

( 原文記載なし )

【図 1】

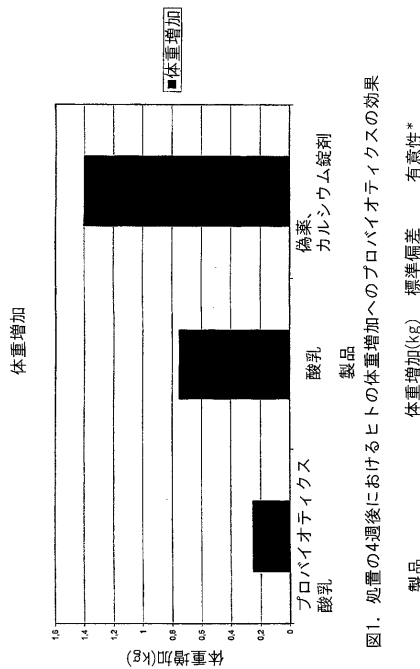
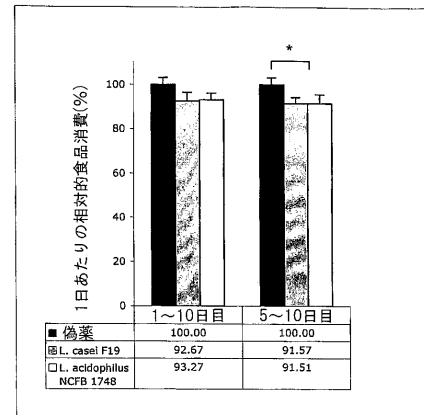


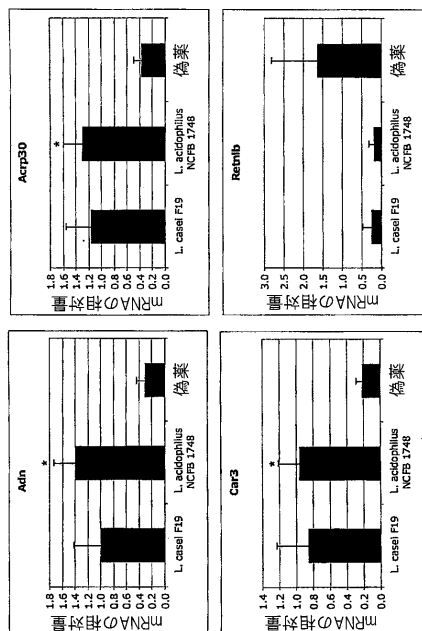
図1. 処置の4週後におけるヒトの体重増加へのプロバイオティクスの効果

\*異なる文字=有意差 $p < 0.05$ 

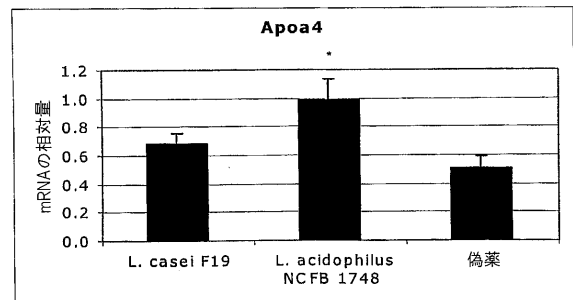
【図 2】

図2. 酸乳のみを受けるマウスの偽薬グループと比較した、酸乳中のプロバイオティクス細菌であるラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) F19、LMG P-17806又はラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) NCFB 1748を受けたマウスの2つのグループにおける毎日の食品摂取。食品消費は、製品投与の全期間(1~10日目)及び調整の期間の後(5~10日目)に関して評価する。結果は、マウスの偽薬グループと比較したパーセンテージとして表す。統計的有意性は、両側対称スチューデントt検定により決定する。\*は、 $p \leq 0.05$ を表す。

【図 3】

図3. 無菌マウス中のRT-PCRにより定量した、アジプシン(Adn)、アジポネクチン(Acp30)、炭酸脱水酵素(Car3)、及びレチンベータ(Retnib)遺伝子の発現。マウスの2つの試験グループは、乳酸中のプロバイオティクス細菌であるラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) F19、LMG P-17806又はラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) NCFB 1748を受け、一方、マウスの偽薬グループは、酸乳のみを受けた。それぞれのバーは、平均値±SEMを表す。統計的有意性は、両側対称スチューデントt検定により決定する。\*は、 $p \leq 0.05$ を表す。2つのプロバイオティクスグループはn=6であり、偽薬グループはn=5である。

【図 4】

図4. 正常マイクロフローコロニー形成マウスにおけるRT-PCRにより定量したアポリポタンパク質A-IV(ApoA4)の発現。マウスの2つの試験グループは、酸乳中のプロバイオティクス細菌であるラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei) F19、LMG P-17806又はラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) NCFB 1748を受け、一方、マウスの偽薬グループは、酸乳のみを受けた。それぞれのバーは、平均値±SEMを表す。統計的有意性は、両側対称スチューデントt検定により決定する。\*は、 $p \leq 0.05$ を表す。2つのプロバイオティクスグループはn=6であり、偽薬グループはn=4である。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001117

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>IPC: see extra sheet</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
<b>IPC: A61K, A61P, C12N</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
<b>SE,DK,FI,NO classes as above</b>		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NUTRACEUT</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9929833 A1 (ARLA, EKONOMISK FÖRENING), 17 June 1999 (17.06.1999), page 17, line 11 - line 13; page 1, line 8 - line 10, claims 1-12  --	1-3
A	WO 2004014403 A1 (BIONEER CORPORATION), 19 February 2004 (19.02.2004), page 17, line 6 - page 18, line 16; page 29, line 1 - line 31, claims 1-13, cited in the application  --	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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		Date of mailing of the international search report
6 February 2007		07 -02- 2007
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer  Ida Christensen/Els Telephone No. +46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2006/001117

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TABUCHI, MIHOKO ET AL, "Antidiabetic Effect of Lactobacillus GG in Streptozotocin-induced Diabetic Rats", Biosci. Biotechnol. Biochem., 2003, vol. 67, no. 6, page 1421 - page 1424, page 1423, column 2, paragraph 2, figure 1B, 2, abstract --	1-3
A	KALAVATHY, R. ET AL, "Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens", British Poultry Science, 2003, vol. 44, page 139 - page 144, page 141, column 2, paragraph 2 - page 142, column 1, paragraph 1, abstract --	1-3
A	MATSUZAKI, TAKESHI ET AL, "Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of Lactobacillus casei", APMIS, 1997, vol. 105, no. 8, page 643 - page 649, page 647, column 2 - page 648, column 1, abstract -- -----	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001117

**International patent classification (IPC)**

**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61P 3/04** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/23** (2006.01)  
**C12R 1/245** (2006.01)

**Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)**

The cited patent documents can be downloaded at [www.prv.se](http://www.prv.se) by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **CJJKQQUAH**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001117

## 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.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 1 (partially)  
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:  
  
Claim 1 comprises the following unclear expression:  
The expression "improving energy metabolism" is unclear  
.../...
  
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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001117

## Box II.2

because "energy metabolism" can include a very large number of possible conditions and mechanisms in the body and because "improving" is a vague expression which does not indicate how the energy metabolism is supposed to be changed. Further it is not evident from the present application what is considered to be an "improved energy metabolism". A meaningful search on the basis of the claims is therefore impossible (see Article 6 PCT).

Consequently, the search of claims 1-3 has been carried out for those parts of the claims which do appear to be clear and well-defined, namely the use of *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 and/or *Bifidobacterium lactis* Bb12 for the manufacture of a product for controlling weight gain, preventing obesity, increasing satiety, prolonging satiation, reducing food intake, reducing fat deposition, enhancing insulin sensitivity, treating obesity and treating insulin insensitivity. The expression "improving energy metabolism" has not been included in the search.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

30/12/2006

International application No.

PCT/SE2006/001117

WO	9929833	A1	17/06/1999	AT	318889	T	15/03/2006
				AU	751284	B	08/08/2002
				AU	1896899	A	28/06/1999
				CA	2313245	A	17/06/1999
				DE	69833691	D,T	31/08/2006
				DK	1036160	T	08/05/2006
				EE	4724	B	16/10/2006
				EE	200000339	A	15/08/2001
				EP	1036160	A,B	20/09/2000
				ES	2255195	T	16/06/2006
				HU	0100428	A	28/06/2001
				JP	2001526024	T	18/12/2001
				NO	20002919	A	08/08/2000
				PL	341010	A	12/03/2001
				PT	1036160	T	31/07/2006
				RU	2205871	C	10/06/2003
				SE	510813	C	28/06/1999
				SE	9704577	A	09/06/1999
				US	6599504	B	29/07/2003
<hr/>							
WO	2004014403	A1	19/02/2004	AU	2003251191	A	25/02/2004
				JP	2004073178	A	11/03/2004
				KR	20040014058	A	14/02/2004
				US	6942857	B	13/09/2005
				US	20040071680	A	15/04/2004
				JP	2005040123	A	17/02/2005
				KR	20050010451	A	27/01/2005
<hr/>							

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100145436

弁理士 小池 慎太郎

(72)発明者 オールソン, カユサ

スウェーデン国, エス - 1 8 1 4 7 リディングー, グランコッテベージェン 1 0

(72)発明者 マーラプー, マルギット

スウェーデン国, エス - 4 1 3 0 8 ゲーテボルイ, リンネガタン 3 9

(72)発明者 スペンソン, ウラ

スウェーデン国, エス - 2 2 3 6 1 ルンド, ロービューガタン 1 2 デー

Fターム(参考) 4B018 MD86 ME14

4C087 AA01 AA02 BC57 BC58 BC59 CA47 NA14 ZA70 ZC33 ZC35