

(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  
2017年8月31日(31.08.2017)



(10) 国際公開番号  
WO 2017/146213 A1

- (51) 国際特許分類:  
A61K 31/715 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)  
A23K 10/16 (2016.01) A61P 3/04 (2006.01)  
A23K 20/163 (2016.01) A61P 3/06 (2006.01)  
A23L 33/10 (2016.01) A61P 3/08 (2006.01)  
A61K 35/744 (2015.01) A61P 3/10 (2006.01)  
A61P 1/16 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/007137
- (22) 国際出願日: 2017年2月24日(24.02.2017)
- (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 2016-032889 2016年2月24日(24.02.2016) JP  
特願 2016-134997 2016年7月7日(07.07.2016) JP
- (71) 出願人: 日東薬品工業株式会社(NITTO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒6170006 京都府向日市上植野町南開35-3 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 木村 郁夫(KIMURA, Ikuo); 〒1860003 東京都国立市富士見台4丁目52-13 t e t e 国立106 Tokyo (JP). 山本 憲二(YAMAMOTO, Kenji); 〒5200248 滋賀県大津市仰木の里東六丁目9-3 Shiga (JP). 久 景子(HISA, Keiko); 〒6170006 京都府向日市上植野町南開35-3 日東薬品工業株式会社内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 高島 一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))



WO 2017/146213 A1

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING METABOLISM DISORDERS COMPRISING LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES-PRODUCING EXOPOLYSACCHARIDE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: ロイコノストック メセンテロイデスが産生する菌体外多糖を有効成分として含む代謝異常の予防または治療用組成物

(57) Abstract: The present invention provides: a composition for preventing or treating metabolism disorders, the composition comprising *Leuconostoc mesenteroides*-producing exopolysaccharide; a composition for amplifying the amount of short-chain fatty acids in the intestines; a composition for reducing the ratio of bacteria belonging to the phylum *Firmicutes* to bacteria belonging to the phylum *Bacteroidetes* in the intestines; and a food product, pharmaceutical product, feed, and the like comprising the compositions.

(57) 要約: 本発明は、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドを含む代謝異常の予防または治療用組成物、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物、腸管におけるバクテロイデーテス門(Bacteroidetes)に属する細菌に対するフィルミクテス門(Firmicutes)に属する細菌の割合の低下用組成物、さらに、当該組成物を含む食品、医薬品、飼料等を提供する。

## 明 細 書

発明の名称：

ロイコノストック メセンテロイデスが産生する菌体外多糖を有効成分として含む代謝異常の予防または治療用組成物

### 技術分野

[0001] 本発明は、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、特に受託番号NITE BP-1519で寄託されたロイコノストック メセンテロイデスNTM048株またはその変異株が産生する菌体外多糖（エキソポリサッカライド (exopolysaccharide ; EPSともいう)）を有効成分として含む代謝異常の予防または治療用組成物または腸管における短鎖脂肪酸 (Short-chain fatty acids:SCFA)量の増幅用組成物に関する。より詳細には、本発明は、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドの生理機能（体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門(Bacteroidetes)に属する細菌に対するフィルミクテス門(Firmicutes)に属する細菌の割合の低下作用）を利用した、例えば、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症または脂肪肝などの予防または治療用組成物、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物または腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下用組成物に関する。また、本発明は、食品、医薬品または飼料等である当該組成物にも関する。

### 背景技術

[0002] 近年、過食および運動不足等による肥満、特に内臓脂肪の蓄積を伴うメタボリックシンドロームが社会的問題となっている。メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪型肥満に、高血糖、高血圧、脂質異常症のうち2つ以上を合併し、動脈硬化が引き起こされやすくなった状態のことをいう。40~74歳の日本人、男性では2人に1人、女性では5人に1人が、メタボリックシ

ドローム及びその予備軍と推計されている。そのため、メタボリックシンドロームにおける脂質蓄積の進行防止・解消を目的に、食事療法により摂取カロリーの適正化を図ることの重要性が提唱されている。

[0003] また最近、腸内細菌叢の変化が宿主のエネルギー調節や栄養摂取、免疫機能等に関与し、肥満や糖尿病等の病態に対して、直接影響することが明らかとなっている。発明者らは以前に、腸内細菌による発酵産物である短鎖脂肪酸がGPR41を介して交感神経を制御し、エネルギー消費を調節していること（非特許文献1）、短鎖脂肪酸が脂肪細胞のGPR43を介してインスリンシグナルを抑制することによってグルコース取り込みを抑制し、結果として脂肪蓄積を抑制していること、ならびに脂肪蓄積による肥満を抑制することで全身のインスリン感受性の低下を抑制していることを報告している（非特許文献2）。

[0004] しかし、メタボリックシンドロームの予防や治療を目的として腸管における短鎖脂肪酸量を増加させるためには、適切に腸内細菌叢をコントロールする必要がある。そのためには、食習慣を含む生活様式を長期的に改善する必要があるため、より簡便かつ効率的な腸管における短鎖脂肪酸量の増幅方法が求められていた。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0005] 非特許文献1：I. Kimura, et al., "Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via GPR41.", Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 8030-8035 (2011).

非特許文献2：I. Kimura, et al., "The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43", Nature Communications 4, 1829 (2013).

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、腸管における短鎖脂肪酸量を増加させること等による、代謝異常の予防または治療用組成物または腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用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

[0007] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意研究を行なった結果、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドが従来知られていない生理機能である、体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下作用を有することを見出した。

[0008] 以上の知見に基づき、本発明が完成された。

即ち、本発明は下記のとおりである：

[1] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、代謝異常の予防または治療用組成物。

[2] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[1]に記載の組成物。

[3] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、[1]または[2]に記載の組成物。

[4] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物。

[5] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[4]に記載の組成物。

[6] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選

択される少なくとも1種である、[4]または[5]に記載の組成物。

[7] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、腸管におけるバクテロイデーテス門(*Bacteroidetes*)に属する細菌に対するフィルミクテス門(*Firmicutes*)に属する細菌の割合の低下用組成物。

[8] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[7]に記載の組成物。

[9] 食品または食品添加物である、[1] - [8] のいずれか1項に記載の組成物。

[10] 医薬品である、[1] - [8] のいずれか1項に記載の組成物。

[11] 飼料または飼料添加物である、[1] - [8] のいずれか1項に記載の組成物。

[12] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの有効量を対象に投与することを含む、代謝異常の予防または治療方法。

[13] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[12]に記載の方法。

[14] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、[12]または[13]に記載の方法。

[15] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの有効量を対象に投与することを含む、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅方法。

[16] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[15]に記載の方法。

[17] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、[15]または[16]に記載の方法。

[18] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの有効量を対象に投与することを含む、腸管におけるバクテロイデーテス門(*Bacteroidetes*)に属する細菌に対するフィルミクテス門(*Firmicutes*)に属する細菌の割合の低下方法。

[19] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[18]に記載の方法。

[20] 代謝異常の予防または治療における使用のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライド。

[21] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[20]に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[22] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、[20]または[21]に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[23] 腸管における短鎖脂肪酸量の増幅における使用のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライド。

[24] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[23]に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[25] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、[23]または[24]に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[26] 腸管におけるバクテロイデーテス門(Bacteroidetes)に属する細菌に対するフィルミクテス門(Firmicutes)に属する細菌の割合の低下における使用のための、ロイコノストック メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) が産生するエキソポリサッカライド。

[27] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[26] に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[28] 代謝異常の予防または治療用組成物を製造するための、ロイコノストック メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) が産生するエキソポリサッカライドの使用。

[29] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[28] に記載の使用。

[30] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、[28] または [29] に記載の使用。

[31] 腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物の製造のための、ロイコノストック メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) が産生するエキソポリサッカライドの使用。

[32] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、[31] に記載の使用。

[33] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、[31] または [32] に記載の使用。

[34] 腸管におけるバクテロイデーテス門(Bacteroidetes)に属する細菌に対するフィルミクテス門(Firmicutes)に属する細菌の割合の低下用組成物の製造のための、ロイコノストック メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides) が産生するエキソポリサッカライドの使用。

[35] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である[34]に記載の使用。

### 発明の効果

[0009] 本発明において、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドが、従来知られていなかった生理機能である体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下作用を有することを見出した。本発明は、当該機能に基づき、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、代謝異常の予防または治療用組成物、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物または腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下用組成物を提供する。当該組成物は、医薬品、食品、飼料等、様々な分野において使用し得ることからも、本発明は、産業上極めて有用である。

### 図面の簡単な説明

- [0010] [図1]高脂肪食負荷マウスにEPSを摂取させた際の体重の推移を示す。  
[図2]高脂肪食負荷マウスにEPSを摂取させた後の血糖値を示す。\*: $P<0.01$   
[図3]高脂肪食負荷マウスにEPSを摂取させた後の皮下脂肪組織重量を示す。\*: $P<0.05$   
[図4]高脂肪食負荷マウスにEPSを摂取させた後の精巣周囲脂肪組織重量を示す。\*: $P<0.05$   
[図5]高脂肪食負荷マウスにEPSを摂取させた後の腎臓周囲脂肪組織重量を示す。\*: $P<0.01$   
[図6]高脂肪食負荷マウスにEPSを摂取させた後の糞便中の短鎖脂肪酸量を示す。\*: $P<0.05$ 、\*\*: $P<0.01$   
[図7]マウスにEPSを摂取させ、グルコース負荷した際の血糖値を示す。

[図8]高脂肪食負荷マウスにEPSを長期摂取させた際の体重の推移を示す。

[図9]高脂肪食負荷マウスにEPSを長期摂取させた後の糞便中の短鎖脂肪酸量を示す。

[図10]高脂肪食負荷マウスにEPSを長期摂取させた後の糞便中のFirmicutes/Bacteroidetesを示す。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、ロイコノストック メセンテロイデス（好ましくは、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株）が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、代謝異常の予防または治療用組成物、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物または腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下用組成物を提供する。

[0012] 本発明において、エキソポリサッカライド（以下、本発明のエキソポリサッカライド）とは、ロイコノストック メセンテロイデスが産生する多糖類であり、ホモ多糖類及びヘテロ多糖類に分類することができる。ホモ多糖類は、単一の型の単糖から構成される。例えば、 $\alpha$ -グルカン、 $\beta$ -グルカン、ガラクトタン等が挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロ多糖類は、2種類以上の異なる単糖の反復単位から構成される。反復単位を構成する単糖の種類としては、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ラムノース、アセチルグルコサミン、アセチルガラクトサミン、フコース、グルクロン酸、非糖置換基（例えば、アセチル基、グリセロール等）などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のエキソポリサッカライドは、グルコースを構成糖とするホモ多糖類で $\alpha$ -1,6結合を主鎖とし $\alpha$ -1,3結合を分岐鎖とする $\alpha$ -グルカン、あるいはフルクトースを構成糖とするホモ多糖類で $\beta$ -2,1結合のフルクタンあるいは $\beta$ -2,6結合のフルクタンが好ましい。さらには、構成糖が官能基によって修飾されていてもよい。また、ロイコノストック メセンテロイデスを培養し、分離することによって得られるエキソポリサッカライドの平均分子量は、公知の方法により求めることができ、例えば、GPC液体

クロマトグラフィーやGFC液体クロマトグラフィーによる相対分子量測定法等を使用することができる。本発明のエキソポリサッカライドの分子量は、特に制限されるわけではないが、30,000~50,000であることが好ましい。

[0013] 本発明において、エキソポリサッカライドを産生するロイコノストック メセンテロイデス（以下、本発明のロイコノストック メセンテロイデス）は、特定の株に限定されないが、特に受託番号NITE BP-1519で寄託されたロイコノストック メセンテロイデスNTM048株またはその変異株が好ましい。上記NTM048株は、2013年1月25日に、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8に住所を有する、独立行政法人 製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託されている。また、上記変異株は、上記変異株が産生するエキソポリサッカライドの体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下作用が、NTM048株が産生するエキソポリサッカライドにおける当該作用と同等以上であるような変異株であることがより好ましい。変異の導入法としては、ニトロソ化合物（ニトロソアミン、ニトロソグアニジン等）、アルキル化剤（EMS；ethyl methanesulfonate）のような化学物質処理による方法、紫外線照射、放射線照射等が挙げられるが、これらに限定されない。得られた変異株が産生するエキソポリサッカライドが、NTM048株が産生するエキソポリサッカライドと同等以上の体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下作用を示すか否かは、該変異株が産生するエキソポリサッカライドについて後述する代謝異常の指標を測定し、これをNTM048株が産生するエキソポリサッカライドで策定された結果と比較することにより検定することができる。

[0014] 本発明のエキソポリサッカライドは、本発明のロイコノストック メセン

テロイデスを培養して製造することができる。本発明のロイコノストック  
メセンテロイデスは、MRS培地などの乳酸菌培養用の培地（固形培地、又は液  
体培地等）を用いて培養することができる。

- [0015] 当該培地には、必要に応じて、各種ビタミン類（ビタミンA、ビタミンB1、  
ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等、又はこれら  
の誘導体も含む）、各種アミノ酸（天然アミノ酸又は合成アミノ酸も含む）  
、核酸塩基（プリン、ピリミジン）、無機塩類（ $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、NaCl等  
）等を添加することができる。
- [0016] 本発明のロイコノストック メセンテロイデスは、培養温度として、30  
～37℃、より好ましくは30～35℃、培養期間は、16時間～3日間、  
より好ましくは1～2日間、pHは3～8、より好ましくはpH4～7で培養し  
、調製することができる。
- [0017] 培養液からのエキソポリサッカライドの分離法は、エキソポリサッカライ  
ドが得られれば特に限定はないが、培養液を遠心分離等により、上清と細胞  
とに分離し、該上清に酸（例えば、トリクロロ酢酸、過塩素酸等）又は有機  
溶剤（例えば、アセトン、メタノール、エタノール等）を添加してタンパク  
質を除去し、さらにアルコール（例えば、エタノール、イソプロパノール等  
）を添加してエキソポリサッカライドを沈殿させて回収することができる。  
該沈殿はさらに精製（例えば、透析等）を行ってよい。前記分離法は、培養  
液、培養条件等に応じて、適宜調整することができる。
- [0018] 後述する実施例の通り、本発明のエキソポリサッカライドは、体重増加に  
対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制  
作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイ  
デーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低  
下作用を示した。従って、本発明のエキソポリサッカライドは、代謝異常の  
予防または治療用組成物または腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物（  
以下、本発明の組成物）として使用することができる。
- [0019] 本発明において、「代謝異常」とは、脂質代謝、糖代謝及びエネルギー代

謝からなる群から選択される少なくとも1つの代謝の異常をいう。

脂質代謝の異常とは、体組織、血中、又はリンパ組織中に存在する脂質の分解が過度に抑制される状態、脂質の合成が過度に促進される状態、および該脂質分解抑制と脂質合成促進の結果、脂肪組織等の体組織へ脂質が過度に蓄積される状態をいう。ここで「脂質」とは、中性脂肪（トリグリセリド、ジグリセリド、モノグリセリド）、コレステロール（特に、LDLコレステロール）をいう。

糖代謝の異常とは、空腹時血糖値が過度に上昇する状態、食事後の糖代謝が過度に抑制される状態をいう。さらに、糖代謝の異常には、耐糖能異常も含まれる。ここで「糖」とは、単糖、二糖または多糖をいう。

エネルギーの代謝異常とは、摂取エネルギー量及び放出エネルギー量のバランスが、異常である状態又は正常に調節できない状態をいう。

[0020] 本発明における「代謝異常」としては、具体的には、肥満（成人肥満、小児肥満）、糖尿病（例えば、1型糖尿病、2型糖尿病、妊婦糖尿病、糖尿病合併症（動脈硬化症、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害等）など）、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症（高脂血症）（例えば、高コレステロール血症、高トリグリセリド血症、高LDLコレステロール血症、低HDLコレステロール血症）、脂肪組織（例えば、皮下脂肪、腹腔内脂肪）の増加、脂肪肝などが挙げられる。また本発明の「代謝異常」には、生活習慣病も含まれ得る。「生活習慣病」とは、食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣がその発症、進行に関与する疾患群をいい、栄養失調症、拒食症、胃がん、大腸がん、痛風、高血圧、腎臓結石、心筋梗塞、狭心症、胃潰瘍、腎臓病、骨粗しょう症、歯周病、アルコール性肝炎、肝硬変、肝臓がん、肺がん、気管支炎、肺気腫、歯周病、脳卒中、脳梗塞、動脈瘤、過労死、不眠症等が挙げられる。

[0021] 前記代謝異常の指標として、腸管における短鎖脂肪酸の量を用いることができる。本発明の短鎖脂肪酸としては、炭素数が6以下の脂肪酸が挙げられ、そのような短鎖脂肪酸としては、例えば、乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪

酸（より好ましくは、乳酸、酢酸およびプロピオン酸）等が挙げられ、これらは日々のエネルギー利用において重要な部分を占める。発明者らは以前に、腸内細菌による発酵産物である短鎖脂肪酸が脂肪酸受容体GPR41を介して、交感神経を直接的に調整することを明らかにしている。GPR41は交感神経節という交感神経細胞の集合体に豊富に存在し、短鎖脂肪酸はこのGPR41を介して交感神経を活性化し、エネルギー消費を増大させる。また、発明者らは、短鎖脂肪酸が脂肪細胞の脂肪酸受容体GPR43を介してインスリンシグナルを抑制することによってグルコース取り込みを抑制し、結果として脂肪蓄積を抑制していること、ならびに脂肪蓄積による肥満を抑制することで全身のインスリン感受性の低下を抑制していることを報告している。従って、腸管における短鎖脂肪酸量を測定することによって、代謝異常の程度や治療効果を評価することができる。より具体的には、腸管における短鎖脂肪酸量が代謝異常の治療前より増加している場合、代謝異常が改善していると判断することができる。

[0022] または、代謝異常の指標として、高脂肪食を摂取させた動物の体重、皮下または臓器周囲の脂肪重量、血糖値を用いることができる。高脂肪食を摂取させる動物としては、当該性質を示す動物であれば限定されない。例えば、前記モデル動物として、市販のC57BL/6Jマウス、KKAyマウス、NODマウス、NSYマウス、TSODマウス、ZDF/CrI-Leprfaラット、SDT/Jclラット等が挙げられる。従って、体重、皮下または臓器周囲の脂肪重量または血糖値を測定することによって、代謝異常の程度や治療効果を評価することができる。より具体的には、体重、皮下または臓器周囲の脂肪重量または血糖値が代謝異常の治療前より減少している場合、代謝異常が改善していると判断することができる。一方、体重、皮下または臓器周囲の脂肪重量または血糖値が代謝異常の治療前より増加している場合、代謝異常が増悪していると判断することができる。

[0023] あるいは、代謝異常の指標として、腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合を用いることがで

きる。ヒトの腸内には100兆以上の細菌が存在しており、その約90%がフィルミクテス門及びバクテロイデーテス門に分類される。フィルミクテス門はさらに、Bacilli、Clostridia、及びErysipelotrichiaの綱に分類され、Bacillus、Alicyclobacillus、Listeria、Paenibacillus、Pasteuria、Planococcus、Sporolactobacillus、Staphylococcus、Lactobacillus、Pediococcus、Aerococcus、Carnobacterium、Enterococcus、Leuconostoc、Weissella、Streptococcus、Lactococcus、Clostridium、Eubacterium、Gracilibacter、Heliobacterium、Peptococcus、Peptostreptococcus、Ruminococcus、Syntrophomonas、Veilonella、Anaerococcus、Acidaminobacter、Anaerovorax、Anaerobranca、Aminobacterium、Carboxydocella、Sulfobacillus、Symbiobacterium、Acetoanaerobium、Halanaerobium、Caldicellulosiruptor、Erysipelothrixなどの属の細菌が含まれる。バクテロイデーテス門はさらに、Bacteroidetes、Flavobacteria、及びSphingobacteriaの綱に分類され、Bacteroides、Fusobacterium、Flavobacteria、Sphingobacteriumなどの属の細菌が含まれる。

腸内細菌叢の大部分を構成するフィルミクテス門に属する細菌及びバクテロイデーテス門に属する細菌は肥満との関連性があり、肥満の個体ではフィルミクテス門に属する細菌が多く、バクテロイデーテス門に属する細菌が少ないことが知られている。従って、腸内細菌叢を解析して求められるFirmicutes/Bacteroidetesは、代謝異常の程度や治療効果を評価することができる。より具体的には、腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合が代謝異常の治療前より低下している場合、代謝異常が改善していると判断することができる。

[0024] 本発明の組成物は、例えば、医薬品、食品、飼料等として、あるいはそれらに配合して使用することができる。

[0025] 本発明の組成物を医薬品として使用する場合、当該医薬品の剤型としては、散剤、顆粒剤、丸剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤、懸濁剤、座剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、粘付剤、吸入剤、注射剤等が挙げられる。これらの製剤は常法に従って調

製される。

- [0026] 製剤化のために用いることができる添加剤には、例えば大豆油、サフラワール油、オリーブ油、胚芽油、ひまわり油、牛脂、いわし油等の動植物性油、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール等の多価アルコール、ソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル等の界面活性剤、精製水、乳糖、デンプン、結晶セルロース、D-マンニトール、レシチン、アラビアガム、ソルビトール液、糖液等の賦形剤、甘味料、着色料、pH調整剤、香料等を挙げることができる。なお、液体製剤は、服用時に水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形であってもよい。また、錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしても良い。
- [0027] 注射剤の形で投与する場合には、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経皮、関節内、滑液嚢内、胞膜内、骨膜内、舌下、口腔内等に投与することが好ましく、特に静脈内投与又は腹腔内投与が好ましい。静脈内投与は、点滴投与、ボラス投与のいずれであってもよい。
- [0028] 本発明の組成物を食品もしくは食品添加物として使用する場合、当該食品は、溶液、懸濁物、粉末、固体成形物等、経口摂取可能な形態であればよく、特に限定するものではない。具体例としては、サプリメント（散剤、顆粒剤、ソフトカプセル、ハードカプセル、錠剤、チュアブル錠、速崩錠、シロップ、液剤等）、飲料（炭酸飲料、乳酸飲料、スポーツ飲料、果汁飲料、野菜飲料、豆乳飲料、コーヒー飲料、茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、栄養飲料、アルコール飲料等）、菓子（グミ、ゼリー、ガム、チョコレート、クッキー、キャンデー、キャラメル、和菓子、スナック菓子等）、即席食品類（即席麺、レトルト食品、缶詰、電子レンジ食品、即席スープ・みそ汁類、フリーズドライ食品等）、油、油脂食品（マヨネーズ、ドレッシング、バター、クリーム、マーガリン等）、小麦粉製品（パン、パスタ、麺、ケーキミックス、パン粉等）、調味料（ソース、トマト加工調味料、風味調味料、調理ミックス、つゆ類等）、畜産加工品（畜肉ハム・ソーセージ等）が挙げられる。

- 。
- [0029] 上記食品には、必要に応じて各種栄養素、各種ビタミン類（ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK等）、各種ミネラル類（マグネシウム、亜鉛、鉄、ナトリウム、カリウム、セレン等）、食物繊維、分散剤、乳化剤等の安定剤、甘味料、呈味成分（クエン酸、リンゴ酸等）、フレーバー、ローヤルゼリー、プロポリス、アガリクス等を配合することができる。
- [0030] 本発明の組成物を飼料もしくは飼料添加物として使用する場合、当該飼料としては、ペットフード、畜産又は水産養殖飼料添加物等が挙げられる。
- [0031] 本発明の組成物を投与するまたは摂取させる対象としては、ヒト、又はヒト以外の動物（例えば、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ウシ、ニワトリ、インコ、九官鳥、ヤギ、ウマ、ヒツジ、サル等）が挙げられる。
- [0032] 本発明の組成物の投与または摂取量は、投与または摂取対象、対象疾患、症状、投与または摂取ルートなどによっても異なるが、例えば、本発明の組成物に含まれるエキソポリサッカライドを1日投与または摂取量として、通常、 $0.5\mu\text{g}\sim 30\text{g}$ 、好ましくは、 $5\mu\text{g}\sim 10\text{g}$ 、より好ましくは、 $50\mu\text{g}\sim 5\text{g}$ を、経口的または非経口的に投与または摂取することができる。投与または摂取は1日に複数回に分けてもよい。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。
- [0033] 以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示にすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

## 実施例

### [0034] 培地、菌株

培地：MRS培地（Difco社製）

菌株：NTM048株 [えんどう豆から単離した（受託番号：NITE BP-1519、寄託日：2013年1月25日）]、JCM6124株（*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*） [独立行政法人 理化学研究所 筑波研究所 バイオリソース

センター 微生物材料開発室 (JCM) より購入した。]

[0035] エキソポリサッカライド (EPS) の産生と精製方法

EPSの抽出はthe production and purification method for EPS of *L. mesenteroides* strain (Sarwat, Ul Qader, Aman, & Ahmed, 2008) に従った。

一晩培養したロイコノストック メセンテロイデス培養液500  $\mu$ LをEPS産生用培地50mL (組成: 15% sucrose、0.5% bacto-peptone、0.5% yeast extract、1.5%  $K_2HPO_4$ 、0.001%  $MnCl_2 \cdot H_2O$ 、0.001% NaCl、0.005%  $CaCl_2$ ) に添加し、30°Cで24時間培養した後、遠心分離して菌体を取り除いた。上清と同量の冷エタノールを添加して沈殿させ、激しく振とうした後、10,000rpmで15分間遠心分離し上清を取り除いた。この工程を2回繰り返した。沈殿したEPSは12時間、塩化カルシウム上で乾燥させた。不純物を取り除くために、蒸留水にEPSの沈殿物を溶かし、再びその懸濁液と同量の冷エタノールを添加して沈殿させた。この工程を2回繰り返し、沈殿したEPSは12時間、塩化カルシウム上で乾燥させた。このEPSを高脂肪食マウスにおける効果の測定に使用した。NTM048株より産生したEPSを「NTM048-EPS」、JCM6124T株より産生したEPSを「JCM6124T-EPS」と示す。

[0036] 実施例1 高脂肪食マウスにおけるEPSの効果

高脂肪食を与えたマウスにおけるロイコノストック メセンテロイデス由来EPSの体重、脂肪組織および血糖値に対する効果を評価した。C57BL/6Jマウス (オス、6週齢で日本クレアから購入し、個別飼育した) を、市販の普通飼育飼料 (ND) で2週間予備飼育した後、3群に分け、それぞれに、高脂肪飼料 (HFD) を基本飼料として、基本飼料にCelluloseが10%になるように配合した飼料 (Control群用)、基本飼料にNTM048-EPSが5%及びCelluloseが5%になるように配合した飼料 (NTM048群用)、基本飼料にJCM6124T-EPSが5%及びCelluloseが5%になるように配合した飼料 (JCM6124T群用) を17日間投与し、飼育した。各群のC57BL/6Jマウスの体重の推移を図1に示す。NTM048群及びJCM6124T群において、Control群よりも体重増加の抑制が認められた。また、飼育17日目に血糖値を測定し、各群のC57BL/6Jマウスを解剖後、皮下脂肪

組織、精巣周囲脂肪組織、腎臓周囲脂肪組織をそれぞれ測定した。各群のC57BL/6Jマウスの血糖値を図2に示す。NTM048群においてControl群よりも血糖値の有意な低下が認められた。また、JCM6124T群においても、Control群に比べて血糖値の低下傾向が認められた。また、皮下脂肪組織重量（図3）及び精巣周囲脂肪組織重量（図4）においても、NTM048群においてControl群よりも有意な低下が認められ、JCM6124T群においても、Control群に比べて低下傾向が認められた。腎周囲脂肪組織重量（図5）ではNTM048群とJCM6124T群のいずれもControl群よりも有意に低い結果が得られた。

#### [0037] 実施例2 高脂肪食マウスにおける糞便中短鎖脂肪酸の測定

ロイコノストック メセンテロイデス由来EPSおよび高脂肪食を与えたマウスの糞便中に産生された短鎖脂肪酸を測定した。実施例1と同様に、C57BL/6Jマウスを、市販の普通飼育飼料（ND）で2週間予備飼育した後、3群に分け、それぞれに、高脂肪飼料（HFD）を基本飼料として、基本飼料にCelluloseが10%になるように配合した飼料（Control群用）、基本飼料にNTM048-EPSが10%になるように配合した飼料（NTM048群用）、基本飼料にJCM6124T-EPSが10%になるように配合した飼料（JCM6124T群用）を投与し17日間飼育した。飼育17日目の糞便を採取し、短鎖脂肪酸（SCFAs：乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸）を測定した。C57BL/6Jマウスの糞便中の短鎖脂肪酸（SCFAs）はYMC社製「高速液体クロマトグラフィー用長鎖・短鎖脂肪酸分析用ラベル化試薬」を用いて測定した。採取したマウス糞便0.1gに対し、蒸留水0.2mL、12%過塩素酸0.03mLを添加し懸濁後、遠心分離し（14000 rpm, 1min）、上層100 $\mu$ Lを採取した。1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride（1-EDC/HCL）存在下、これに2-nitrophenyl-hydrazine hydrochloride（2-NPH/HCL）を反応させ、ヘキサンおよびエーテルにて抽出し、得られたサンプルをHigh-performance liquid chromatography（HPLC）装置にて測定した。HPLC条件は以下の通りである。

#### HPLC条件

・測定装置：SCL-10Av および SPD-20A（Shimadzu Seisakusho, Kyoto, Japa

n)

- ・ カラム：YMC-Pack FA（脂肪酸分析専用カラム）
- ・ アセトニトリル：メタノール：水＝22：8：70
- ・ 流速：1.0ml/min
- ・ 分析時間：30分
- ・ 検出感度：UV at 400nm
- ・ 温度：50℃

C57BL/6Jマウスの糞便について短鎖脂肪酸（SCFAs：乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸）の測定結果を図6に示す。NTM048群及びJCM6124T群において、Control群よりも短鎖脂肪酸量が多いことが認められた。

#### [0038] 実施例3 マウスにおける食後過血糖値に対するEPSの効果

ロイコノストック メセンテロイデス由来EPSの食後高血糖に対する効果を評価した。C57BL/6Jマウス（オス、6週齢で日本クレアから購入し、個別飼育した）を、市販の普通飼育飼料（ND）で予備飼育した後、3群に分け、24時間絶食させた後、それぞれに、Celluloseを含まない飼料を基本飼料として、基本飼料0.1g（Control群用）、基本飼料0.1gにCellulose 0.1gを配合した飼料0.2g（Cellulose群用）、基本飼料0.1gにNTM048-EPS 0.1gを配合した飼料0.2g（NTM048群用）を与えた。その後、グルコース溶液（300mg/mL）を100 $\mu$ L/20g体重で経口投与し、経時的（グルコース負荷後0, 15, 30, 60, 120分後）に血糖値を測定した。各群のC57BL/6Jマウスの血糖値の推移を図7に示す。NTM048群において、グルコース投与後15分および60分でCellulose群よりも血糖値が低い結果が得られた。

#### [0039] 実施例4 高脂肪食マウスにおけるEPSの効果

C57BL/6Jマウス（オス、6週齢で日本クレアから購入し、個別飼育した）を、市販の普通飼育飼料（ND）で2週間予備飼育した後、3群に分け、高脂肪飼料（HFD）を基本飼料として、基本飼料にCelluloseが10%になるように配合した飼料（Control群用）、基本飼料にNTM048-EPSが10%になるように配合した飼料（NTM048群用）、基本飼料にJCM6124T-EPSが10%になるように配合し

た飼料（JCM6124T群用）を、それぞれ16週間投与し飼育した。実施例1と同様に、各群のC57BL/6Jマウスの体重の推移を図8に示す。NTM048群及びJCM6124T群において、Control群よりも体重増加の抑制が認められた。

また、飼育16週目の糞便を採取し、実施例2と同様に、短鎖脂肪酸（SCFAs：酢酸、プロピオン酸、酪酸）を測定した。C57BL/6Jマウスの糞便について短鎖脂肪酸（SCFAs：酢酸、プロピオン酸、酪酸）の測定結果を図9に示す。NTM048群及びJCM6124T群において、Control群よりも短鎖脂肪酸量が多いことが認められた。

さらに、同じく飼育16週目に採取した糞便の菌叢を解析した。糞便からDNAを抽出及び精製し、バクテロイデーテス門(Bacteroidetes)に属する細菌の測定には5´-CRAACAGGATTAGATACCCT-3´（配列番号：1）及び5´-GGTAAGTTCC TCGCGTAT-3´（配列番号：2）を共通のプライマーとして用いて、フィルミクテス門(Firmicutes)に属する細菌の測定には5´-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3´（配列番号：3）及び5´-AGCTGACGACAACCATGCAC-3´（配列番号：4）を共通のプライマーとして用いてリアルタイムPCRを実施し、バクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合（Firmicutes/Bacteroidetes）を測定した（図10）。NTM048群及びJCM6124T群において、Control群よりもFirmicutes/Bacteroidetesが低下した。

[0040] 以上の結果から、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドは体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下作用を有することが示された。特に、NTM048株が産生するエキソポリサッカライドは代謝異常の改善作用が強いことが示された。

[0041] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様の変更され得ることは当業者にとって自明である。

ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載され

た内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

### 産業上の利用可能性

[0042] 本発明は、ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドの生理機能として、従来知られていない、体重増加に対する抑制作用、脂肪組織増加に対する抑制作用、血糖値上昇に対する抑制作用、腸管における短鎖脂肪酸量の増加作用および腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下作用を有することを明らかにした。当該ロイコノストック メセンテロイデスが産生するエキソポリサッカライドを含む代謝異常の予防または治療用組成物、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物または腸管におけるバクテロイデーテス門に属する細菌に対するフィルミクテス門に属する細菌の割合の低下用組成物は、医薬品、食品、飼料等様々な分野へ適用可能であり、本発明は産業上極めて有用である。

本出願は、日本で出願された特願2016-032889（出願日：平成28年2月24日）および特願2016-134997（出願日：平成28年7月7日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1]       ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、代謝異常の予防または治療用組成物。
- [請求項2]       ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3]       代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項4]       ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物。
- [請求項5]       ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項4に記載の組成物。
- [請求項6]       短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項4または5に記載の組成物。
- [請求項7]       ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドを有効成分として含む、腸管におけるバクテロイデーテス門(*Bacteroidetes*)に属する細菌に対するフィルミクテス門(*Firmicutes*)に属する細菌の割合の低下用組成物。
- [請求項8]       ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項7に記載の組成物。
- [請求項9]       食品または食品添加物である、請求項1－8のいずれか1項に記載

の組成物。

[請求項10] 医薬品である、請求項1-8のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項11] 飼料または飼料添加物である、請求項1-8のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項12] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの有効量を対象に投与することを含む、代謝異常の予防または治療方法。

[請求項13] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項12に記載の方法。

[請求項14] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項12または13に記載の方法。

[請求項15] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの有効量を対象に投与することを含む、腸管における短鎖脂肪酸量の増幅方法。

[請求項16] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項15に記載の方法。

[請求項17] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項15または16に記載の方法。

[請求項18] ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの有効量を対象に投与することを含む、腸管におけるバクテロイデーテス門(*Bacteroidetes*)に属する細菌に対するフィルミクテス門(*Firmicutes*)に属する細菌の割合の低下方法。

[請求項19] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で

寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項18に記載の方法。

[請求項20] 代謝異常の予防または治療における使用のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライド。

[請求項21] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項20に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[請求項22] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項20または21に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[請求項23] 腸管における短鎖脂肪酸量の増幅における使用のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライド。

[請求項24] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項23に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[請求項25] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項23または24に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[請求項26] 腸管におけるバクテロイデーテス門(*Bacteroidetes*)に属する細菌に対するフィルミクテス門(*Firmicutes*)に属する細菌の割合の低下における使用のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライド。

[請求項27] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で

寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項26に記載の使用のためのエキソポリサッカライド。

[請求項28] 代謝異常の予防または治療用組成物を製造するための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの使用。

[請求項29] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項28に記載の使用。

[請求項30] 代謝異常が、肥満、糖尿病、耐糖能異常、高インスリン血症、脂質異常症、脂肪組織の増加及び脂肪肝からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項28または29に記載の使用。

[請求項31] 腸管における短鎖脂肪酸量の増幅用組成物の製造のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの使用。

[請求項32] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はその変異株である、請求項31に記載の使用。

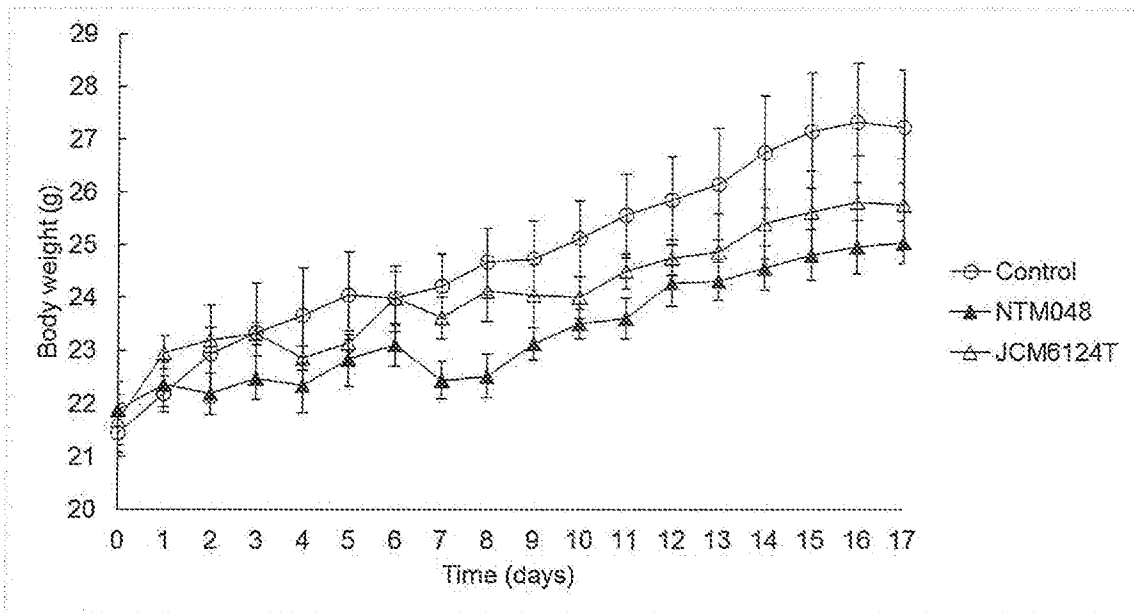
[請求項33] 短鎖脂肪酸が、乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項31または32に記載の使用。

[請求項34] 腸管におけるバクテロイデーテス門(*Bacteroidetes*)に属する細菌に対するフィルミクテス門(*Firmicutes*)に属する細菌の割合の低下用組成物の製造のための、ロイコノストック メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) が産生するエキソポリサッカライドの使用。

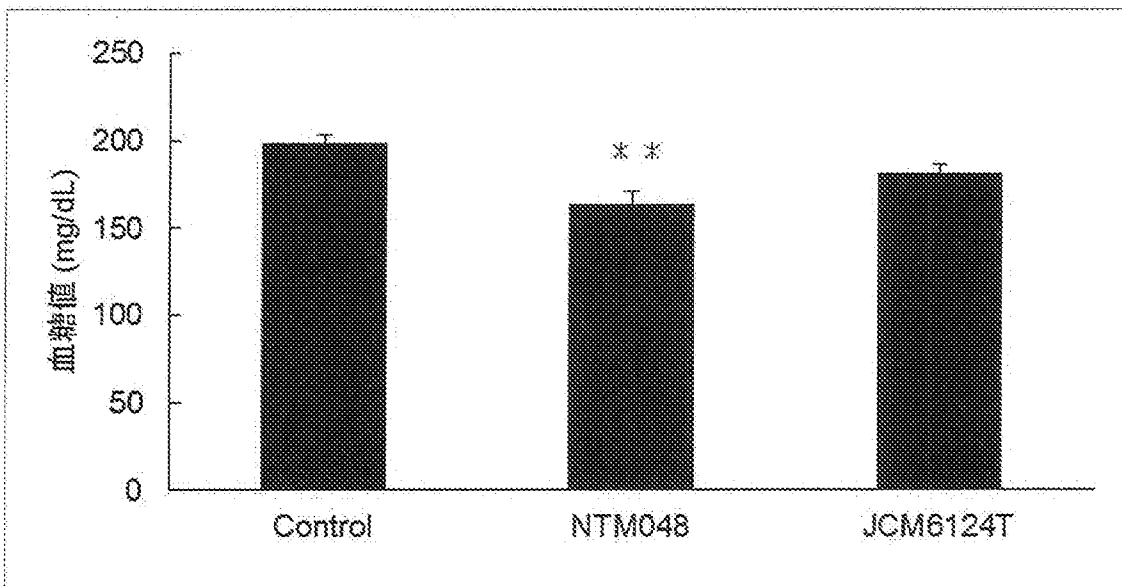
[請求項35] ロイコノストック メセンテロイデスが、受託番号NITE BP-1519で寄託されているロイコノストック メセンテロイデスNTM048株又はそ

の変異株である、請求項 3 4 に記載の使用。

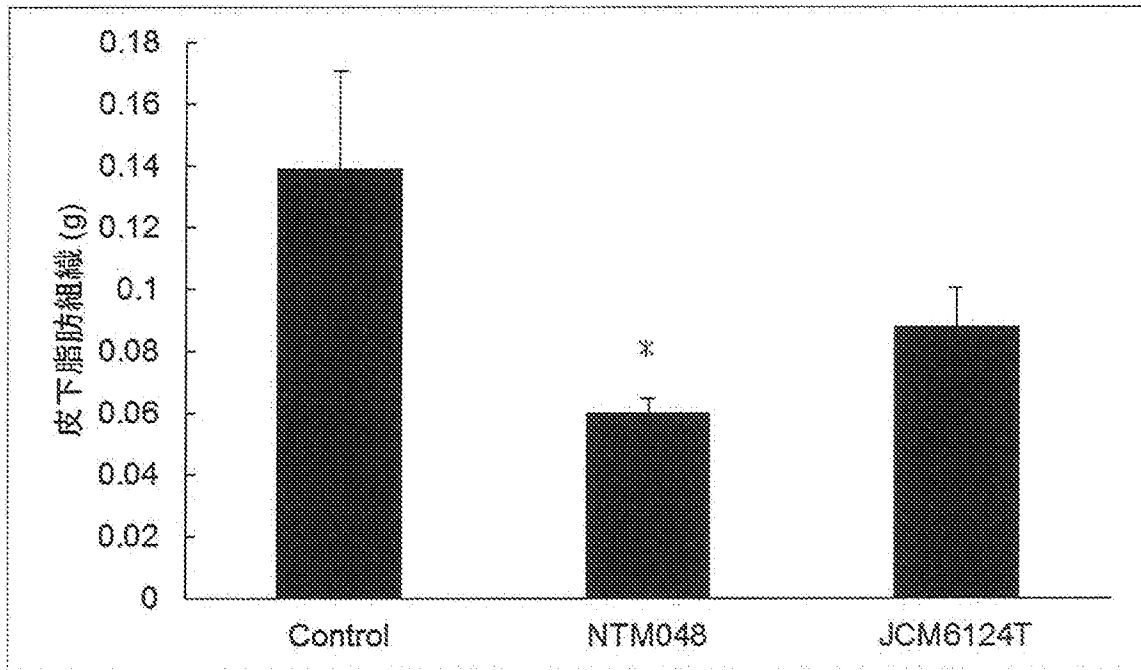
[図1]



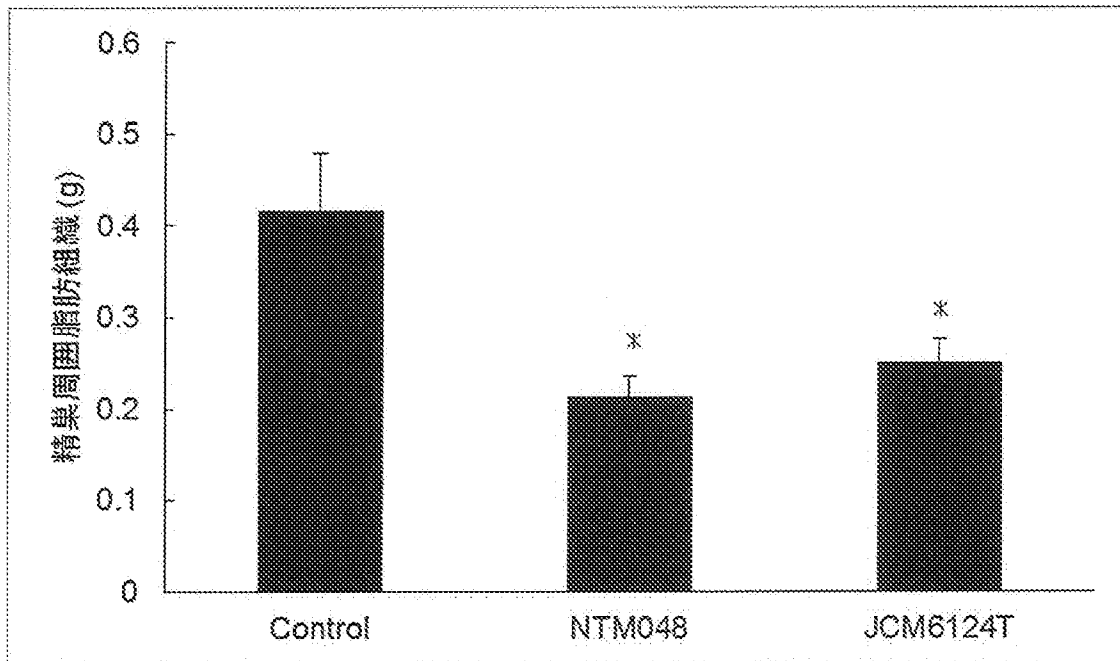
[図2]



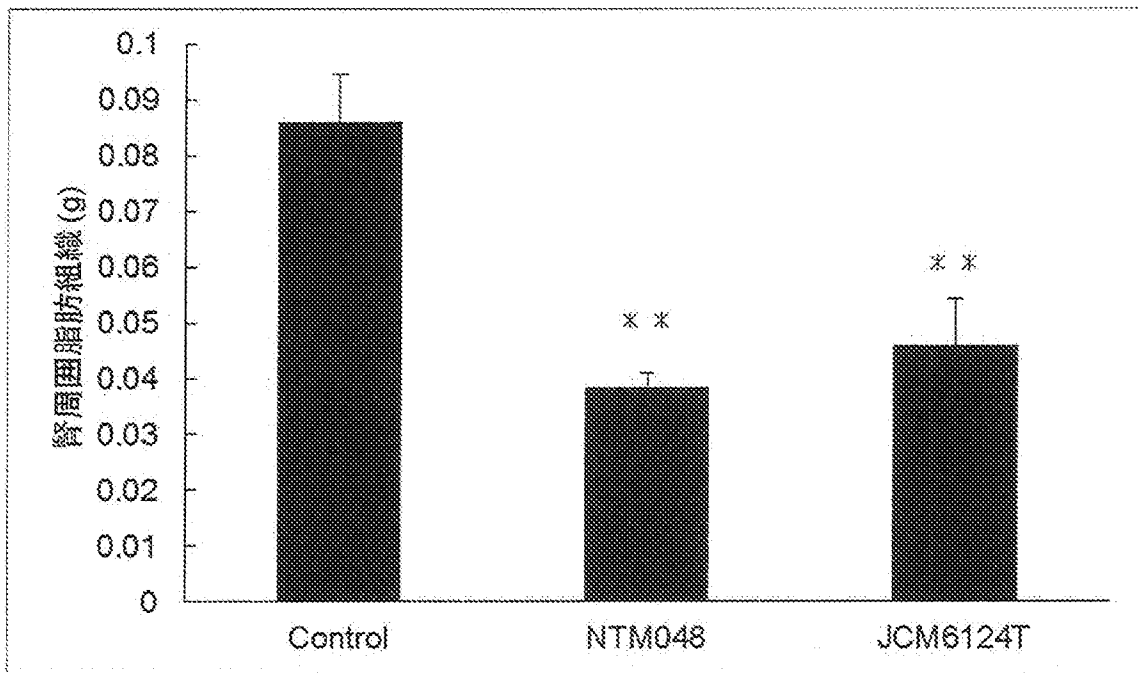
[図3]



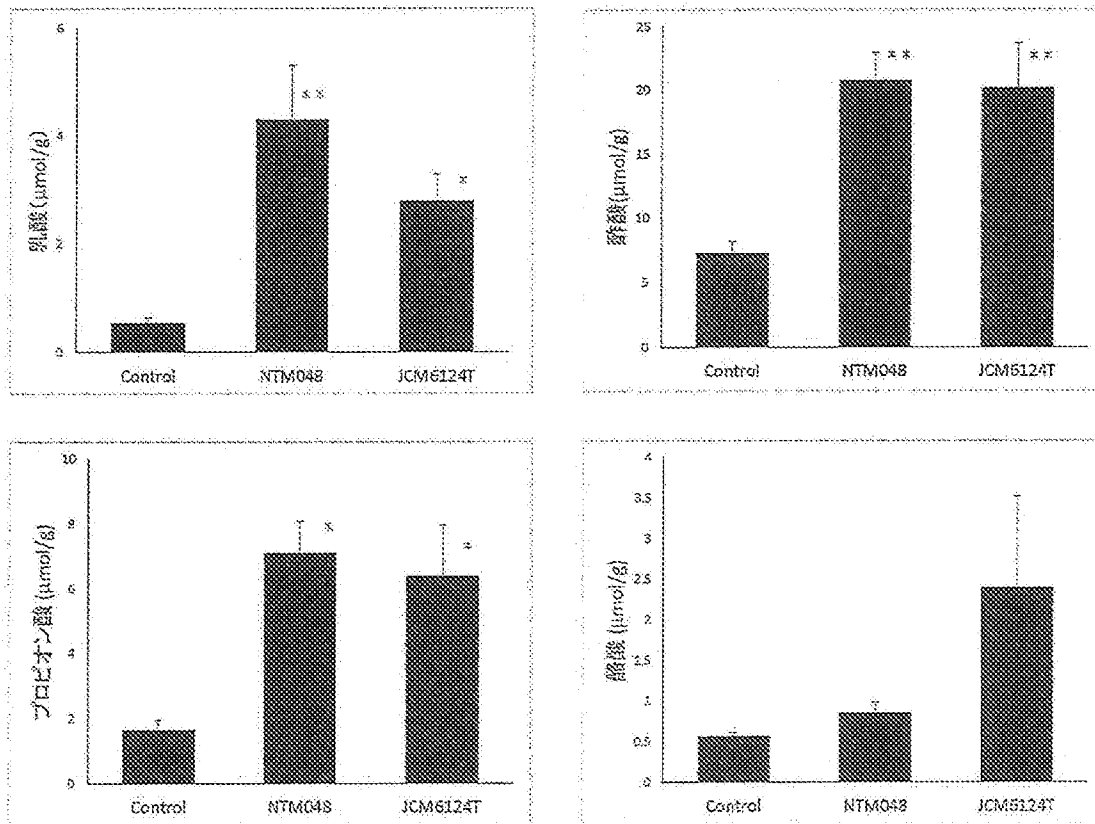
[図4]



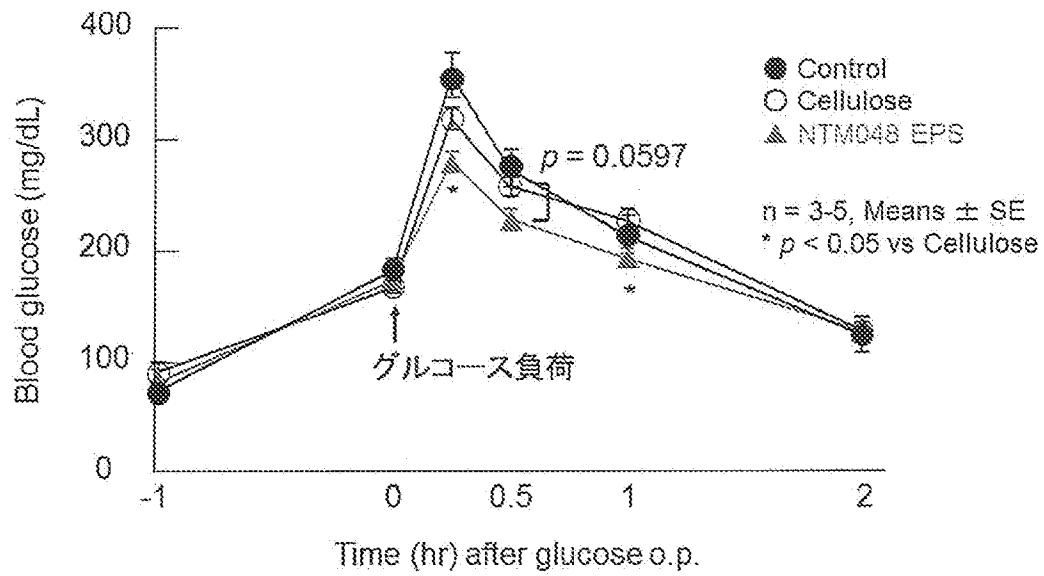
[図5]



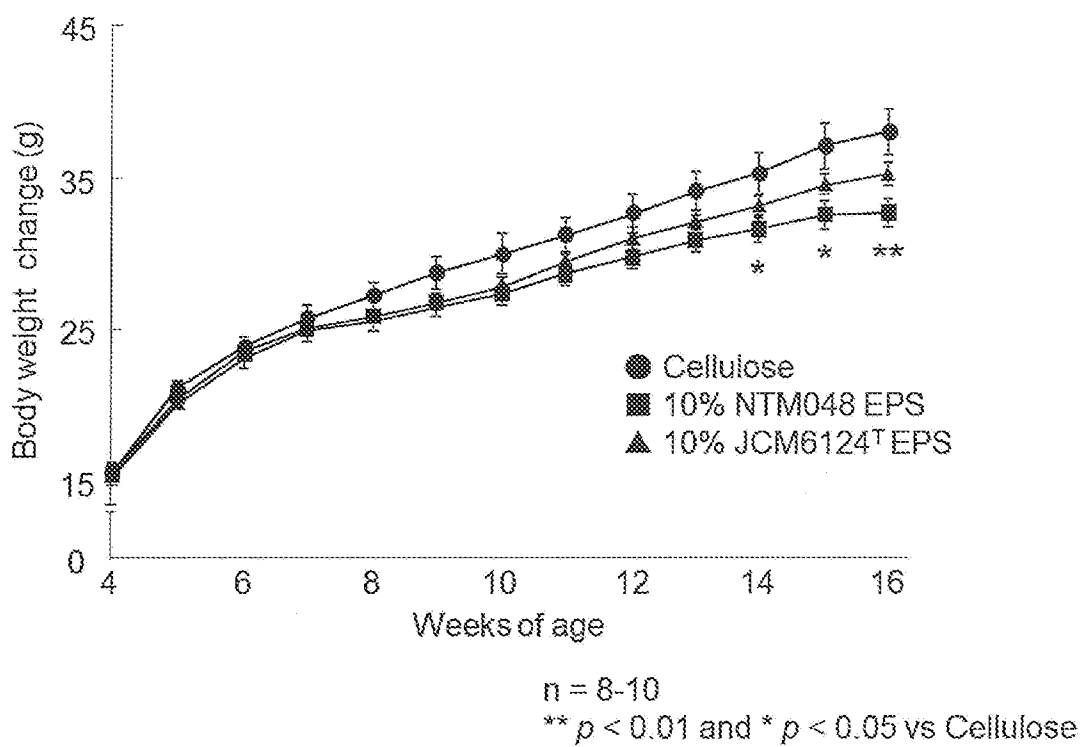
[図6]



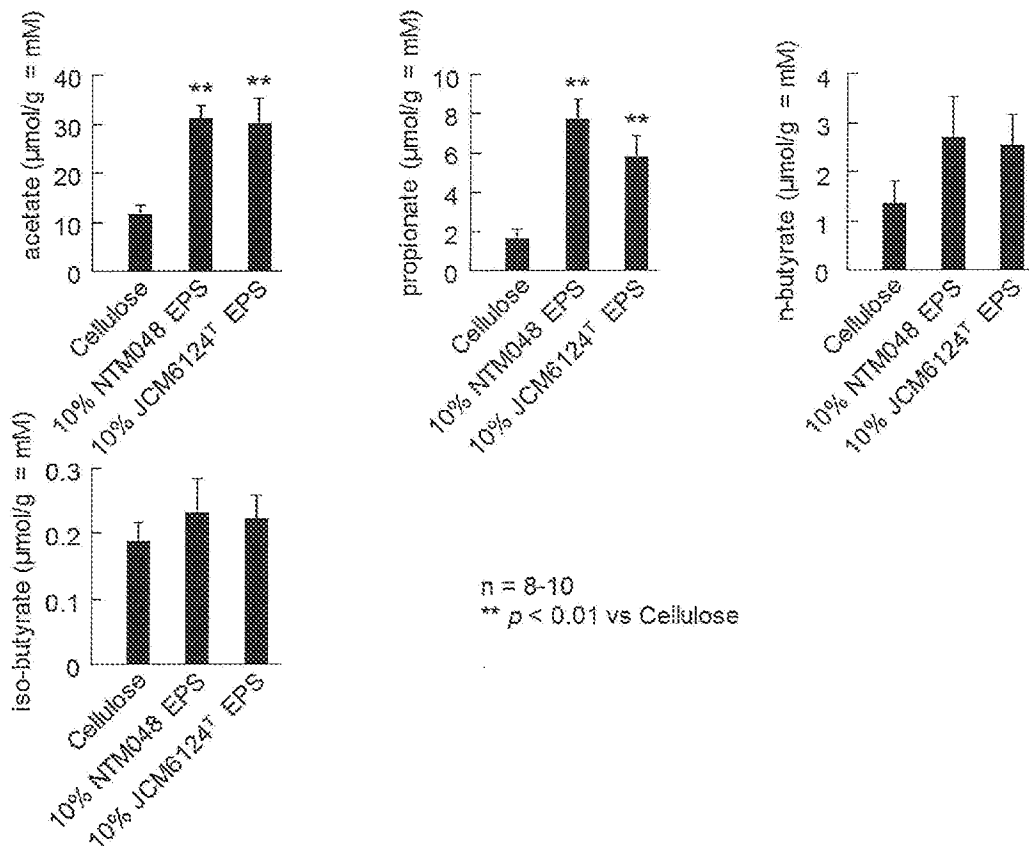
[図7]



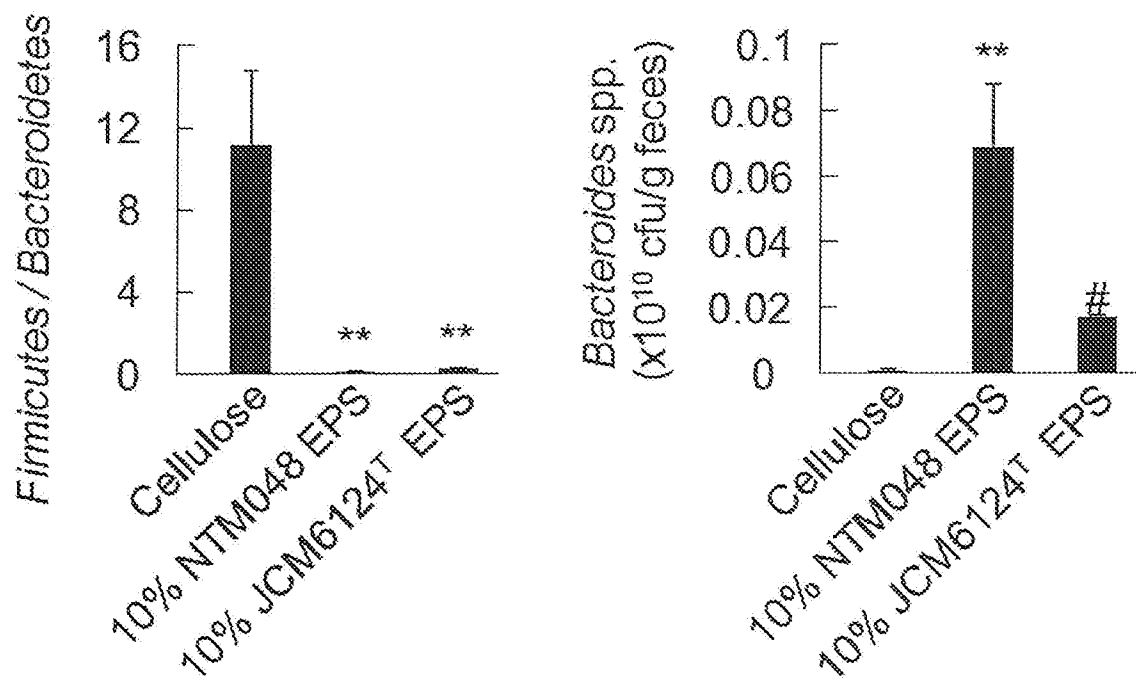
[図8]



[9]



[10]



n = 4-5

\*\* p &lt; 0.01 vs Cellulose

# p &lt; 0.05 vs 10% NTM048 EPS

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2017/007137

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 A61K31/715(2006.01)i, A23K10/16(2016.01)i, A23K20/163(2016.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K35/744(2015.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/08(2006.01)i,  
 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)  
 A61K31/715, A23K10/16, A23K20/163, A23L33/10, A61K35/744, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/08, A61P3/10, A61P43/00

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 1996-2017  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Ichushi WEB

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2015/041299 A1 (Nitto pharmaceutical Industries, Ltd.), 26 March 2015 (26.03.2015), claim 1; examples 1, 4; claims 7, 8, 10 & US 2016/0229925 A1 claim 1; examples 1, 4; claims 7, 8, 10	20-27 1-19, 28-35
Y	RUSS-MADIEDO, Patricia et al., An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, International Dairy Journal, 2002, Vol.12, p.163-171 Table1	1-19, 28-35

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 15 March 2017 (15.03.17)	Date of mailing of the international search report 04 April 2017 (04.04.17)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/007137

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-526145 A (Tate & Lyle Ingredients France SAS), 25 October 2012 (25.10.2012), paragraphs [0049], [0054], [0068]; examples; figures & US 2010/0284972 A1 paragraphs [0008], [0057] to [0060]; examples; figures & WO 2010/129839 A1 & EP 2427499 A1 & CN 102439048 A & KR 10-2012-0027314 A	1-19,28-35
Y	TURNBAUGH, Peter J. et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest, Nature, 2006, Vol.444, p.1027-1031, page 1027, left column, 3rd paragraph	1-19,28-35
P,X	Junki MIYAMOTO et al., "Leuconostoc mesenteroides NTM048 ga Sansei suru Kintaigai	1-6,9-17, 20-33
P,Y	Tato no Taisha Kaizen Sayo", Journal of Japan Society for Lactic Acid Bacteria, vol.27, no.2, 26 June 2016 (26.06.2016), page 133, column of <Results and Study>	7-11,18,19, 34,35
A	Kenji FUKUDA, "Nyusankin no Saibogai Tato", Bulletin of Applied Glycoscience, 2015, vol.5, no.1, pages 31 to 37	1-35
A	Kenji FUKUDA et al., "Exopolysaccharides from dairy lactic acid bacteria", Bulletin of Japan Dairy Technical Association, 2010, vol.60, pages 66 to 92	1-35
A	JP 2008-179595 A (Nisshin Pharma Inc.), 07 August 2008 (07.08.2008), claims 1, 7; paragraph [0039] (Family: none)	1-35
A	JP 2010-200611 A (Hiroshima University), 16 September 2010 (16.09.2010), entire text & US 2011/0311502 A1 entire text & WO 2010/098131 A1 & EP 2402431 A1 & KR 10-2011-0121688 A	1-35

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2017/007137

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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

<b>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</b> Int.Cl. A61K31/715(2006.01)i, A23K10/16(2016.01)i, A23K20/163(2016.01)i, A23L33/10(2016.01)i, A61K35/744(2015.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/08(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K31/715, A23K10/16, A23K20/163, A23L33/10, A61K35/744, A61P1/16, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/08, A61P3/10, A61P43/00		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017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） CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), 医中誌WEB (Ichushi WEB)		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の 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 請求項の番号
X	WO 2015/041299 A1（日東薬品工業株式会社）	20-27
Y	2015.03.26, 請求項1、実施例1、4、請求項7、8、10 & US 2016/0229925 A1, 請求項1、実施例1、4、請求項7、8、10	1-19, 28-35
Y	RUSS-MADIEDO, Patricia et al., An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, International Dairy Journal, 2002, Vol.12, p.163-171 T a b l e 1	1-19, 28-35
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 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 15.03.2017	国際調査報告の発送日 04.04.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 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） 砂原 一公 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 4763

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の 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 請求項の番号
Y	JP 2012-526145 A (タト エ リル アングルディアント フラン ス ソシエテ パ アクシオンス シンプリフィエ) 2012.10.25, 段落 [0049]、[0054]、[0068]、実施例、 図 & US 2010/0284972 A1, 段落 [0008]、[0057] - [006 0]、実施例、図 & WO 2010/129839 A1 & EP 2427499 A1 & CN 102439048 A & KR 10-2012-0027314 A	1-19, 28-35
Y	TURNBAUGH, Peter J. et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest, Nature, 2006, Vol. 444, p. 1027-1031 第 1 0 2 7 頁左欄第 3 段落	1-19, 28-35
P, X P, Y	宮本潤基ほか, Leuconostoc mesenteroides NTM048 が産生する菌体 外多糖の代謝改善作用, 日本乳酸菌学会誌, Vol. 27, No. 2, 2016.06.26, p. 133 <結果と考察>欄	1-6, 9-17, 20-33 7-11, 18, 19, 34, 35
A	福田健二, 乳酸菌の細胞外多糖, 応用糖質科学, 2015, Vol. 5, No. 1, p. 31-37	1-35
A	福田健二ほか, 乳業用乳酸菌の生産する細胞外多糖, 乳業技術, 2010, Vol. 60, p. 66-92	1-35
A	JP 2008-179595 A (日清ファルマ株式会社) 2008.08.07, 請求項 1、7、段落 [0039] (ファミリーなし)	1-35
A	JP 2010-200611 A (国立大学法人広島大学) 2010.09.16, 全文 & US 2011/0311502 A1, 全文 & WO 2010/098131 A1 & EP 2402431 A1 & KR 10-2011-0121688 A	1-35