

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6701078号
(P6701078)

(45) 発行日 令和2年5月27日(2020.5.27)

(24) 登録日 令和2年5月8日(2020.5.8)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/06 (2006.01) C 1 2 Q 1/06 Z N A
C 1 2 Q 1/68 (2018.01) C 1 2 Q 1/68

請求項の数 15 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2016-539666 (P2016-539666)	(73) 特許権者	516067302
(86) (22) 出願日	平成26年9月5日(2014.9.5)		ソファル ソチエタ ベル アツィオニ
(65) 公表番号	特表2016-528926 (P2016-528926A)		イタリア国, イー20060 トレッツァ
(43) 公表日	平成28年9月23日(2016.9.23)		ーノ ローザ(ミラノ), ビア フィレン
(86) 国際出願番号	PCT/IB2014/064284		ツェ 40
(87) 国際公開番号	W02015/033304	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成27年3月12日(2015.3.12)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成29年9月5日(2017.9.5)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	M12013A001473		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成25年9月6日(2013.9.6)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)		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】 微生物を含む組成物の腸内微生物叢に対する効果の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコルに従って、微生物を含む組成物又は微生物を含まないプラセボの摂取前、摂取中、及び摂取後に、被験者の健康状態及び/又は食習慣についての情報に基づいて、微生物を含む組成物のプロバイオティクス又はパラプロバイオティクス活性を測定するための方法であって、

(i) (a) 前記微生物を含む組成物又は (b) 前記プラセボの第 1 の摂取前の、前記被験者由来の少なくとも第 1 の糞便試料を準備する工程、

(i i) 前記組成物又は前記プラセボの摂取後の前記被験者由来の少なくとも第 2 の糞便試料を準備する工程、

(i i i) 前記被験者が前記組成物又は前記プラセボを摂取しないウォッシュアウト後の前記被験者由来の少なくとも第 3 の糞便試料を準備する工程、

(i v) 前記組成物又は前記プラセボの摂取後の前記被験者由来の少なくとも第 4 の糞便試料を準備する工程、

(v) 前記糞便試料についてメタゲノム解析を行って微生物叢を解析する工程、及び

(v i) 前記プロトコルに従って、前記組成物又は前記プラセボの摂取前、摂取中、及び摂取後に、前記被験者の糞便微生物叢を定性的及び/又は定量的に比較する工程、を含む、方法。

【請求項2】

前記微生物が、個々の又は組合せの、細菌及び/又は酵母である、請求項1に記載の方

法。

【請求項 3】

前記微生物が、ラクトバシルス (*Lactobacillus*)、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*)、バシラス (*Bacillus*)、プロピオニバクテリウム (*Propionibacterium*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*)、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、アエロコッカス (*Aerococcus*)、及びエンテロコッカス (*Enterococcus*) から選択される属の細菌である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記微生物が、ラクトバシルス (*Lactobacillus*) は、ラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバシルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバシルス・アミロリティカス (*Lactobacillus amylolyticus*)、ラクトバシルス・アミロボルス (*Lactobacillus amylovorus*)、ラクトバシルス・アリメンタリウス (*Lactobacillus alimentarius*)、ラクトバシルス・アビアリエス (*Lactobacillus aviaris*)、ラクトバシルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバシルス・ブクネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバシルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバシルス・セロピオス (*Lactobacillus cellobiosus*)、ラクトバシルス・コリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*)、ラクトバシルス・クリスパツス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバシルス・クルパツス (*Lactobacillus curvatus*)、ラクトバシルス・デルブルエッキイ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバシルス・ファルシミニス (*Lactobacillus farciminis*)、ラクトバシルス・ファーメントム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバシルス・ガリナルム (*Lactobacillus gallinarum*)、ラクトバシルス・ガッセリ (*Lactobacillus gasserii*)、ラクトバシルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバシルス・ヒルガルディイ (*Lactobacillus hilgardii*)、ラクトバシルス・ジョンソニイ (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバシルス・ケフィラノファシエンス (*Lactobacillus kefirianofaciens*)、ラクトバシルス・ケフィリ (*Lactobacillus kefirii*)、ラクトバシルス・ムコセ (*Lactobacillus mucosae*)、ラクトバシルス・パニス (*Lactobacillus panis*)、ラクトバシルス・コリノイデス (*Lactobacillus collinoides*)、ラクトバシルス・パラプランタルム (*Lactobacillus paraplan tarum*)、ラクトバシルス・ペントス (*Lactobacillus pentosus*)、ラクトバシルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバシルス・ポンチス (*Lactobacillus pontis*)、ラクトバシルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*)、ラクトバシルス・ラムノス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバシルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)、ラクトバシルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、及びラクトバシルス・サンフランシセンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) の種から選択されるラクトバシルス (*Lactobacillus*) 属の細菌である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記微生物が、ラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) 種の細菌である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記微生物が、10 ~ 500 億コロニー形成単位 (CFU) の微生物の量で、組成物中に存在する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記微生物が、生きていますか又は死んでいる微生物として、又は溶解物若しくは抽出物の形態で、組成物中に存在する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

微生物を含む前記組成物が経口投与用に調製される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記メタゲノム解析が、以下：

10

20

30

40

50

- 糞便試料から核酸を抽出する工程、及び
 - 糞便微生物叢中に存在する微生物を分子タイピングする工程、
- の少なくとも1つを含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

糞便微生物叢の前記タイピングが、リボゾームの16Sサブユニットをコードする遺伝子の少なくとも一部のヌクレオチド配列を分析することにより行われる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

糞便微生物叢の前記タイピングが、リボゾームの16Sサブユニットをコードする遺伝子の少なくとも一部のヌクレオチド配列をPCRにより増幅することにより行われる、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項12】

前記PCRが、配列番号1及び2を使用して行われる、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

増幅される前記ヌクレオチド配列が配列決定される、請求項11又は12に記載の方法。

【請求項14】

前記微生物が、階層的クラスタリングプログラム及び/又は分類学的解析により、及び/又は系統発生樹状図を構築することにより、性状解析される、請求項9～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記性状解析の結果が、パラメトリック及び/又はノンパラメトリックな統計的手法を用いて分析される、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物、特に細菌を含む組成物のプロバイオティクス/パラプロバイオティクス活性を測定するための方法に関し、この方法は、前記組成物の摂取後の糞便微生物叢 (faecal microbiota) の定性的及び/又は定量的変化の評価に基づく。さらに本発明は、前記方法を実施するためのキットに関する。

【背景技術】

【0002】

胃腸管は、各個体の成長中に発生し増殖した微生物の無数の集団を含み、いわゆる腸内微生物叢 (intestinal microbiota) 又は腸内フローラ (intestinal flora) を形成する。

【0003】

すなわち、腸内微生物叢は極めて複雑な生態系であり、そして、この微生物叢は、宿主個体の小腸粘膜の成長とホメオスタシスを顕著に制御するため、この生態系を構成する微生物の異なる集団間の均衡状態 (いわゆるユービオシス (eubiosis)) は、体の快適性と健康を確保するために基本的なものである。

【0004】

すなわち、腸内微生物叢は、紛れもない臓器である。実際には、個体の腸内微生物叢の定性的及び/又は定量的変化、すなわちいわゆる腸内毒素症 (dysbiosis) 又は微生物不全 (dismicrobism) は、小腸ホメオスタシスの消失を招くことがあり、これは、次に広範囲の病態の疾病原因を制御することができる。

【0005】

腸内毒素症 (dysbiosis) の症状を治療する目的のために、又は腸内微生物叢の均衡を維持する目的のためのどのような場合も、プロバイオティクス/パラプロバイオティクス製品の摂取がますます頻繁になってきている。

【0006】

10

20

30

40

50

FAO/WHOの定義によれば、プロバイオティクスは、「十分な量で投与された場合、宿主に健康上の利益を与える生きた微生物」のセットである。

【発明の概要】

【0007】

上記に基づいて、個体の腸内微生物叢の細菌組成に対する、微生物を含む外因性組成物/調製物の効果を、迅速かつ確実に評価することを可能にする方法の開発に結びついた利点は、十分に明らかである。

【0008】

実際に、そのような方法で測定された効果に基づいて、すなわち、微生物を含む組成物の摂取が腸の微生物叢を定量的及び/又は定性的に改変する方法に基づいて、前記組成物が、人体の快適性と健康を促進及び/又は確保することができるかどうか、従って、これが、プロバイオティクス/パラプロバイオティクスで識別されるための基本的な前提条件の1つを満たしているかどうかを、確立することが可能であろう。

【0009】

本発明は、無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコールに従って、微生物、好ましくは細菌を含む組成物の摂取後の、被験者の糞便微生物叢の組成の定性的及び/又は定量的変化を、分子的解析により測定する方法を提供することにより、上記要件を満足する。

【0010】

実際、著しい被験者間変動が、処置（特に、プロバイオティクス/パラプロバイオティクスによる処置）の効果を隠してしまうことを、又は統計的擬陽性につながることを防ぐために、特に健常な集団についてクロスオーバー介入試験プロトコールを行う必要性を、本出願人は初めて実験的に証明した。

【0011】

本発明の方法は、微生物を含む一般的組成物（すなわち、推定されるプロバイオティクス/パラプロバイオティクス）の、糞便微生物叢に対する効果を測定する目的のために、特に有益であること以外に、人体に対する既知のプロバイオティクス/パラプロバイオティクスの健康促進効果を確認する目的のために、又は、例えば前記組成物の摂取後にその増殖において、どの集団の微生物が刺激され及び/又は阻害されるかを調べることにより、既知のプロバイオティクス/パラプロバイオティクスの新しい特定の効果を測定する目的のためにも、有益である。実際、組成物の摂取後にその増殖が刺激及び/又は阻害される微生物集団が関与する主要な活性に基づいて、その新しい効果の可能性を規定することは可能であろう。例えば、本発明の方法に従ってプロバイオティクスの摂取後に、特定の細菌集団が定量的に増加し、この細菌集団が例えば酪酸の産生に主に関与する代謝を有することがわかった場合、このプロバイオティクスを摂取して腸管内の酪酸の量を増加させることができると推定される。

【0012】

本発明の方法のさらなる利点は、以下の詳細な説明及び実施例から明らかであろうが、これらは、例示するためであり、非限定的である。

詳細な説明のより深い理解を可能にするために、図1～4が添付されている。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】図1は、本発明の組成物（A）による処置の前後の、コプロコッカス（Coprococcus）属の細菌集団の増加（図1.1）、及びブラウチア（Blautia）属の細菌集団の減少（図1.2）を評価し、同時に、プラセボ（B）による処置の前後のコプロコッカス（Coprococcus）属の細菌集団の減少（図1.1）、及びブラウチア（Blautia）属の細菌集団の増加（図1.2）を評価するために行われた統計解析の結果を示す。

【図1B】図1は、本発明の組成物（A）による処置の前後の、コプロコッカス（Coprococcus）属の細菌集団の増加（図1.1）、及びブラウチア（Blautia）属の細菌集団の減少（図1.2）を評価し、同時に、プラセボ（B）による処置の前後のコプロコッカス（

10

20

30

40

50

Coprococcus)属の細菌集団の減少(図1.1)、及びブラウチア(Blautia)属の細菌集団の増加(図1.2)を評価するために行われた統計解析の結果を示す。

【図2】図2.1は、本発明の組成物による処置の前後の、コプロコッカス(Coprococcus)属(濃い灰色)の細菌集団の増加、及びブラウチア(Blautia)属(薄い灰色)の細菌集団の減少を示す。図2.2は、本発明の組成物(A)による処置の前後の、コプロコッカス(Coprococcus)属(濃い灰色)の細菌集団の増加パーセント、及びブラウチア(Blautia)属(薄い灰色)の細菌集団の減少パーセント、及びプラセボ(B)による処置の前後のコプロコッカス(Coprococcus)属(濃い灰色)の細菌集団の減少パーセント、及びブラウチア(Blautia)属(薄い灰色)の細菌集団の増加パーセントを示す。

【図3】図3は、本発明の組成物による処置の前後の、ニコチン酸の代謝の増加と、プラセボによる処置の前後のニコチン酸の代謝の低下とを確立するために行われた統計解析の結果を示す。

10

【図4】図4は、本発明の組成物による処置の前後の、葉酸の生合成の増加と、これに対して、プラセボによる処置の前後に何の変化も無いことを確立するために行われた統計解析の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の第1の態様は、無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコールに従って、微生物を含む組成物/調製物の摂取後の、被験者の糞便微生物叢の組成の変化を測定する方法であって、

20

【0015】

a) 無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコールに従って、本組成物又はプラセボの摂取前及び/又は摂取中及び/又は摂取後に、前記被験者の健康状態及び/又は食習慣についての情報を収集する工程と、

b) 無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコールに従って、本組成物又はプラセボの摂取前及び/又は摂取中及び/又は摂取後に、前記被験者から少なくとも1つの糞便試料を得る工程と、

c) 工程b)で得られた糞便試料についてメタゲノム解析を行って微生物叢を解析する工程と、

d) 無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコールに従って、本組成物又はプラセボの摂取前及び/又は摂取中及び/又は摂取後に、前記被験者の糞便微生物叢を、好ましくは定性的及び/又は定量的に比較する工程と、を含む方法に関する。

30

【0016】

本発明の文脈において、糞便微生物叢という用語は、被験者の糞便内に存在する微生物集団全体を意味し、被験者の小腸内に存在する微生物集団全体を反映する。従って糞便微生物叢という用語は本明細書において、腸内微生物叢と同義語である。具体的には、本発明の組成物内に含まれる微生物は、個々の又は組合せた、細菌及び/又は酵母及び/又は他の微生物である。

【0017】

40

細菌を含む組成物は、本発明の目的において特に好ましい。特に細菌は、ラクトバシルス(Lactobacillus)、ビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)、バシラス(Bacillus)、プロピオニバクテリウム(Propionibacterium)、連鎖球菌(Streptococcus)、ラクトコッカス(Lactococcus)、アエロコッカス(Aerococcus)、及びエンテロコッカス(Enterococcus)から選択される属に属する。より好ましくは、前記細菌は、ラクトバシルス(Lactobacillus)属及び/又はビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)属である。

【0018】

具体的には、前記ラクトバシルス(Lactobacillus)は、ラクトバシルス・パラカゼイ(Lactobacillus paracasei)、ラクトバシルス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)、ラクトバシルス・アミロリティカス(Lactobacillus amylolyticus)、ラクト

50

バシルス・アミロボルス (*Lactobacillus amylovorus*)、ラクトバシルス・アリメンタリウス (*Lactobacillus alimentarius*)、ラクトバシルス・アビアリエス (*Lactobacillus aviaries*)、ラクトバシルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバシルス・ブクネリ (*Lactobacillus buchneri*)、ラクトバシルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバシルス・セロビオスス (*Lactobacillus cellobiosus*)、ラクトバシルス・コリニフォルミス (*Lactobacillus coryniformis*)、ラクトバシルス・クリスパツス (*Lactobacillus crispatus*)、ラクトバシルス・クルバツス (*Lactobacillus curvatus*)、ラクトバシルス・デルブルエッキイ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバシルス・ファルシミニス (*Lactobacillus farciminis*)、ラクトバシルス・ファーマンタム (*Lactobacillus fermentum*)、ラクトバシルス・ガリナルム (*Lactobacillus gallinarum*)、ラクトバシルス・ガッセリ (*Lactobacillus gasserii*)、ラクトバシルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバシルス・ヒルガルディイ (*Lactobacillus hilgardii*)、ラクトバシルス・ジョンソニイ (*Lactobacillus johnsonii*)、ラクトバシルス・ケフィラノファシエンシス (*Lactobacillus kefirianofaciens*)、ラクトバシルス・ケフィリ (*Lactobacillus kefirii*)、ラクトバシルス・ムコセ (*Lactobacillus mucosae*)、ラクトバシルス・パニス (*Lactobacillus panis*)、ラクトバシルス・コリノイデス (*Lactobacillus collinoides*)、ラクトバシルス・パラプランタルム (*Lactobacillus paraplantarum*)、ラクトバシルス・ペントスス (*Lactobacillus pentosus*)、ラクトバシルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバシルス・ボンチス (*Lactobacillus pontis*)、ラクトバシルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuterii*)、ラクトバシルス・ラムノス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバシルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*)、ラクトバシルス・サリバリウス (*Lactobacillus salivarius*)、及びラクトバシルス・サンフランシセンシス (*Lactobacillus sanfranciscensis*) から選択される。

【 0 0 1 9 】

本発明の目的に特に好適なのは、ラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) 種、より好ましくはラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) D G 株に属する細菌である。

【 0 0 2 0 】

細菌ラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) D G 株は、SOFAR S.p.A. により、パリのパスツール研究所の国立微生物寄託機関 (National Collection of Microorganism Cultures of the Pasteur Institute) に、1995年5月5日に、寄託番号 CNCM I - 1572 で寄託された。最初、この株は、ラクトバシルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) D G カゼイ亜種という名前であった。

【 0 0 2 1 】

具体的には、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属の細菌は、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリ (*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィヅム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ブレベ (*Bifidobacterium breve*)、及びビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*) から選択される。

【 0 0 2 2 】

酵母は、好ましくはサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属であり、より好ましくはサッカロミセス・セレピッシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) 種である。

【 0 0 2 3 】

一般に、本発明の組成物に含まれる微生物は、E F S A の Q P S リスト (<http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/3020.pdf>) で特定されている個々の微生物又は任意の微生物種の組合せである。

【 0 0 2 4 】

本発明の組成物の微生物は、好ましくは生きており、従ってこの組成物はプロバイオティクスとしても定義可能である。

【 0 0 2 5 】

10

20

30

40

50

あるいは、本組成物の微生物は死んでおり、及び／又は溶解物又は抽出物の形態であり、従って本組成物もまた、パラプロバイオティクスとして定義可能である。従って、本発明の組成物はまた、既知の又は推定されるプロバイオティクス又はパラプロバイオティクスである。

【0026】

本発明のある実施態様において、本組成物は、約10～500億コロニー形成単位(CFU)の微生物、好ましくは150～300億、より好ましくは200～250億CFUの微生物を含む。

【0027】

本発明のある実施態様において、本組成物は、経口投与用に調製される。特に、本組成物は、固体形態で、好ましくは丸剤、カプセル剤、錠剤、顆粒性粉末、硬カプセル剤、水溶性顆粒、小袋、又はペレットとして調製される。

10

【0028】

あるいは、本発明の組成物は、例えばシロップ又は飲料などの液体として調製されるか、又はヨーグルト、チーズ、又はフルーツジュースなどの食品に添加される。

【0029】

あるいは本発明の組成物は、例えば浣腸剤のような局所的作用を発揮することが可能な形態で調製される。

【0030】

本発明のさらなる実施態様において、本組成物はまた、プロバイオティクス及び／又は医薬品の製造のために一般に受け入れられた賦形剤も含む。

20

【0031】

本発明の更なる実施態様において、本発明の組成物は、ビタミン、微量元素、例えば亜鉛及びセレン、酵素、及び／又はプレバイオティクス物質、例えばフラクトオリゴ糖(FOS)、ガラクトオリゴ糖(GOS)、イヌリン、グアーガム、又はこれらの組み合わせで強化される。

【0032】

先に説明したように、組成物の摂取は、無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバープロトコールに従う。言い換えれば、治験に含まれる研究者も被験者も、摂取時に、割り当てられた処置(処置は、区別がつかない二重盲検である)を認識しておらず、同じ被験者が異なる時間にランダムな順序で、微生物を含む本組成物及びプラセボの両方(クロスオーバー)に曝露される。

30

【0033】

本発明のある実施態様において、前記プロトコールは以下の段階を含む：

【0034】

1) 採用前段階、ここでは、被験者は好ましくは、微生物を含む組成物又はプラセボを摂取しない、及び／又は

2) 第1の処置段階、ここでは、被験者は好ましくは、微生物を含む組成物又はプラセボを摂取する、及び／又は

3) ウォッシュアウト段階、ここでは、被験者は好ましくは、微生物を含む組成物又はプラセボを摂取しない、及び／又は

40

4) 第2の処置段階、ここでは、被験者は好ましくは、プラセボ又は微生物を含む組成物を摂取する。

【0035】

第2段階と第4段階の摂取は、上記した無作為化二重盲検法で行われる。第1段階でプラセボを摂取する被験者は、第2段階で微生物含有組成物を摂取し、そしてその逆が行われる。

【0036】

プロトコールの異なる段階の持続期間は、好ましくは同じである。具体的にはこれらの段階の少なくとも1つの、好ましくはすべての段階の、持続期間は約4週間である。

50

【 0 0 3 7 】

本発明の文脈において、ウォッシュアウトという用語は、微生物含有組成物又はプラセボを摂取する2つの段階の間に入る期間であり、この間、被験者は何も摂取せず、従って、それまでに摂取したものを「追い出す」はずであり、すなわち、すべての残留効果を排除することを目的とする、処置の無い期間である。

【 0 0 3 8 】

本発明のある実施態様において、本発明の組成物は、好ましくは1日に1回、より好ましくは起床直後に摂取される。

【 0 0 3 9 】

あるいは、これを夜摂取することも可能であるが、好ましくは食後少なくとも3時間である。

10

【 0 0 4 0 】

被験者の健康状態及び/又は食習慣についての情報を収集する工程は、好ましくはアンケートによってその情報を集めることにより行われる。このアンケートは特別に準備され、本発明の方法を実施する被験者の健康状態及び/又は食習慣についての情報を収集する。

【 0 0 4 1 】

具体的にはこのアンケートは、それに基づいて前記被験者の健康状態及び/又は食習慣に関する質問が作成される標準シートである。健康状態に関しては、前記被験者は、各質問に関連した評価尺度を使用して答えることができる。評価尺度は、好ましくは、口頭での数値尺度(VNS)、又は視覚的アナログ尺度(VAS)、又は口頭での評価尺度(VRS)である。食習慣に関しては、前記被験者は、彼又は彼女が毎日摂取する食品を示し、また可能であればその摂取量を指定することにより答えることができる。

20

【 0 0 4 2 】

情報を収集する工程は、好ましくは、採用前段階の開始時、及び/又は第1の処置段階の前及び/又は後、及び/又は第2の処置段階の終了の前及び/又は後に行われる。少なくとも1つの糞便試料の取得は、好ましくは第1の処置段階の開始時及び/又は終了時、及び/又は第2の処置段階の開始時及び/又は終了時に行われる。

【 0 0 4 3 】

糞便試料は好ましくは、処理される前、又は+4 ~ -20、より好ましくは-20で、好ましくは7~10日間を超えない期間保存される前、48時間以内に、より好ましくは24時間以内に採取される。処理前の糞便試料の保存又は低温での保存は、好ましくは室温で行われる。

30

【 0 0 4 4 】

糞便試料のメタゲノム解析により微生物叢を分析する工程は、糞便微生物叢から抽出された核酸、好ましくはDNAについて行われる。

【 0 0 4 5 】

具体的には、メタゲノム解析による微生物叢の分析は、以下の工程の少なくとも1つ、好ましくはすべてを含む：

【 0 0 4 6 】

- ・糞便試料から核酸、好ましくはDNAを抽出する工程、
- ・糞便微生物叢を分子タイピングする工程。

40

【 0 0 4 7 】

糞便試料からの一般的には核酸、具体的にはDNAの抽出は、この目的のための当業者に公知の方法を使用して行われる。

【 0 0 4 8 】

本発明のある実施態様において、微生物集団のタイピングは、リボゾームのサブユニット、好ましくはリボゾームの16Sサブユニット、をコードする遺伝子、すなわち16S rRNA分子をコードする遺伝子、の少なくとも一部のヌクレオチド配列を分析することにより行われる。

50

【 0 0 4 9 】

この目的のために、糞便試料から抽出されたDNAは、当該分野で公知の技術、例えばPCRを使用して増幅される。好ましくは増幅は、オリゴヌクレオチド（プライマー）対を使用して、好ましくは配列番号1（Probio_Uni 5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3'）及び配列番号2（Probio_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3'）を使用して行われる（Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, et al. (2013) Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. PLoS ONE 8(7): e68739）。

【 0 0 5 0 】

PCRを行うための条件は、増幅が所望される核酸及び/又は使用されるプライマーの質と量に依存して変化し得る。いずれの場合も、PCR条件を設定することは、すべての当業者にとって日常的活動である。

【 0 0 5 1 】

次に、好ましくは、増幅された核酸の部分は配列決定される。

【 0 0 5 2 】

この目的のために、当業者は任意の公知の方法を使用することができる。好ましくは、使用される方法は、サンガー（Sanger）法に基づく配列決定法、ピロシーケンス（pyrosequencing）法、及びイオントレント（Ion Torrent）配列決定法から選択される。

【 0 0 5 3 】

イオントレントの場合、好ましくは5'末端にアダプター配列を有するプライマーを使用することが好ましい。本発明の特に好ましい実施態様において、アダプター配列は、配列番号1及び2である。

【 0 0 5 4 】

いったん配列が得られると、従っていったん糞便微生物叢の微生物集団がタイピングされると、微生物のコミュニティは、好ましくは、階層的クラスタリングプログラム又は分類学的解析により、及び/又は、好ましくはヒートマップを用いて系統発生樹状図を構築することにより、性状解析される。このためのQIIMEソフトウェアは、本発明の目的に特に好適である。

【 0 0 5 5 】

最後に、性状解析から得られたデータは、好ましくは、パラメトリック及び/又はノンパラメトリック型の統計的手法を用いて分析される。

【 0 0 5 6 】

本発明のさらなる態様は、本発明の方法を実施するためのキットに関し、このキットは、

- キットの識別コードと、
- 微生物、好ましくはラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）種に属する微生物、より好ましくはラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）DG株を、10～500億コロニー形成単位（CFU）の微生物、好ましくは150～300億、より好ましくは200～250億CFUの微生物の量で含む組成物の少なくとも1つの経口製剤と、

- 微生物を含有しないプラセボの少なくとも1つの経口製剤と、を含み、

前記微生物の組成物は、プラセボを対照とする無作為化、二重盲検、クロスオーバープロトコルに従って服用され、微生物を含む前記組成物と前記プラセボはコードにより識別される。

【 0 0 5 7 】

プラセボは、好ましくはラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）種に属する微生物、より好ましくはラクトバシルス（*Lactobacillus*）DG株に属する微生物を含む組成物の経口製剤とは、美的外観すなわち形態は同一であるが実体は異なる。プラセボの経口製剤は微生物を含まない。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

本発明のある好適な実施態様において、本キットは好ましくは、微生物を含む組成物の経口製剤を含有する、少なくとも28個のカプセル剤又は錠剤又は丸剤又は口腔錠剤又は硬カプセル剤又は小袋と、及び好ましくは、プラセボの経口製剤を含有する同数の錠剤又は丸剤又は口腔錠剤又は硬カプセル剤又は小袋を含む。

【0059】

本発明の好適な実施態様において、前記少なくとも1つの経口製剤は、少なくとも1つのカプセル剤、少なくとも一つの錠剤、少なくとも一つの丸剤、少なくとも一つの口腔錠剤、少なくとも一つの硬質カプセル、少なくとも一つの小袋、又は少なくとも一つのペレットである。

【0060】

前記経口製剤は、コード、例えばカラーコード、数値コード、英字コード、又は英数字コードにより識別される。この方法のために、前記コードは、微生物を含む組成物がいつ服用されたか及び前記プラセボがいつ服用されたかを、理解するのに役立つであろう。

【0061】

これらの経口製剤は、一方は微生物を含む組成物を含有し、他方はプラセボを含有するため、これらの経口製剤は、美的外観すなわち形態は同一であるが、実体は異なる。さらに、2つの製剤は、それぞれ各コードによって識別される。

【0062】

このように、キットに含まれる微生物を含む組成物及びプラセボは、いずれの被験者も区別できないものである。さらに、キットに含まれる微生物を含む組成物及びプラセボは、任意のコード、例えばカラーコード、数値コード、英字コード、又は英数字のコードで、一義的に識別される。

【0063】

このコードと物質の本体との対応、すなわちこれが微生物を含む組成物であるか又はプラセボであるかは、キットの製造者のみが理解している。

【0064】

本発明のさらなる実施態様において、本キットは、本発明の方法を実施する被験者の健康状態に関するデータを収集するために特別に準備されたアンケートをさらに含む。

【0065】

具体的には、本アンケートは、それに基づいて前記被験者の健康状態及び/又は食習慣に関する質問が作成される標準シートである。健康状態に関しては、前記被験者は、各質問に関連した評価尺度を使用して答えることができる。評価尺度は、好ましくは、口頭での数値尺度(VNS)、又は視覚的アナログ尺度(VAS)、又は口頭での評価尺度(VRS)である。食習慣に関しては、前記被験者は、彼又は彼女が毎日摂取する食品を示し、また可能であればその摂取量を指定することにより答えることができる。

【0066】

本発明のさらなる態様は、診断及び/又は治療目的の前記キットの使用に関する。

【実施例】

【0067】

処置

健常被験者に対して、食事介入の無作為化、二重盲検、プラセボ対照クロスオーバー試験が行われた。

【0068】

志願者は以下の基準で募集された：

- 組み入れ基準：18～55歳の年齢範囲の健康な男性と女性。インフォームドコンセント用紙に署名。

- 除外基準：検査の前の月に抗生物質による処置；最初の検査の前の2ヶ月にウイルスや細菌性腸炎の症状発現；最初の検査の前の5年間に胃潰瘍又は十二指腸潰瘍；妊娠又は授乳中；アルコール依存症や薬物摂取の最近の又は推定される症例；試験プロトコールを遵守しない他の状態。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 9 】

以下の表 1 に略記するように、クロスオーバーデザインに従って、プロバイオティクス栄養介入を行なった。

【 0 0 7 0 】

【表 1】

	登録前 4 週間	処置 1 4 週間	ウォッシュアウト 4 週間	処置 2 4 週間		
面接	1 (V0)	2 (V2)	3 (V2)	4 (V3)	5 (V4)	
糞便試料の採取		1	2	3	4	10
		糞便微生物叢のメタゲノム解析				

【 0 0 7 1 】

登録前段階（4 週間）中、志願者は、プロバイオティクス発酵乳製品（従って伝統的なヨーグルトは許可された）、プロバイオティクス栄養補助食品、又はプレバイオティクス栄養補助食品を摂取することなく、通常の食事をした。

【 0 0 7 2 】

登録前期間の最後に、志願者は、プロバイオティクス又はプラセボを 1 日 1 カプセルで 4 週間服用するように無作為化された。

【 0 0 7 3 】

例えば、エンテロラクティスプラス（Enterolactis Plus）を、投与されるプロバイオティクスとして使用した。これは、240 億 CFU（コロニー形成単位）のラクトバシルス・パラカゼイ（Lactobacillus paracasei）D G 株を含む 420 mg のカプセルで構成されている。

【 0 0 7 4 】

プラセボは、プロバイオティクス剤が明らかに欠如したプロバイオティクスのものに外観が同一であるカプセルで構成されていた。活性物質（すなわち、プロバイオティクス）とプラセボの風味と色が同一であった。

【 0 0 7 5 】

製品は、朝の空腹時に朝食の少なくとも 10 分前に服用されるか、又は忘れてしまった場合は、夜寝る前に最後の食事の少なくとも 2 時間後に服用される。

【 0 0 7 6 】

最初の 4 週間の処置後、志願者は、登録前期間と同一の 4 週間のウォッシュアウト期間を取った。

【 0 0 7 7 】

ウォッシュアウト期間の最後に、志願者は、上記クロスオーバーデザインに従って、エンテロラクティスプラス（Enterolactis Plus）又はプラセボを、1 日 1 カプセルで 4 週間服用した。

【 0 0 7 8 】

要約すると、試験は、各段階が 4 週間続く 4 つの段階を含んだ：

- ・採用前段階：被験者は、エンテロラクティスプラスによる処置も、プラセボによる治療も受けなかった。
- ・処置 1：被験者は、エンテロラクティスプラスによる処置、又はプラセボによる処置を受けた。
- ・ウォッシュアウト：被験者は、エンテロラクティスプラスによる処置も、プラセボによる処置も受けなかった。
- ・処置 2：被験者は、それぞれプラセボによる処置又はエンテロラクティスプラスによる処置を受けた。

【 0 0 7 9 】

検査と試料採取

各志願者はまず、1人当たり全部で5回の打ち合わせを含む全手順を守るように指示された。

【0080】

1回目の打ち合わせで、志願者の個人的データに沿ってインフォームドコンセントが得られた。志願者はまた、試験の実施方法についての一般的情報を与えられ、以後の採用前の4週間に適用される食事の変化（あらかじめ特定された製品の摂取の禁止）について説明された。4週間後、志願者は、1回目の打ち合わせで渡された特殊な容器に、24時間以内に採取した糞便試料（試料T0）を持参して、2回目の打ち合わせに行った。

【0081】

最適な保存を確保するために、糞便試料は室温で保存され、24時間以内に検査室に送られた。

【0082】

さらに2回目の打ち合わせで、志願者は、次の4週間中に服用すべきプロバイオティクス製品（又はプラセボ）を渡された。さらに、志願者は、その製品の服用方法を指示された。

【0083】

製品（又はプラセボ）の4週間の服用を終了後、志願者は、24時間以内に採取した別の糞便試料（試料T1）を持参して、3回目の打ち合わせに行った。

【0084】

3回目の打ち合わせで、志願者は、製品の摂取に由来する可能な効果（正の効果と負の効果の両方）についてのアンケートを記入した。

【0085】

次に志願者は、次の4週間について、その間、以前の製品は摂取しないように指示された。

【0086】

これらの4週間の最後に、志願者は、糞便試料（試料T2）を持参して4回目の打ち合わせに行き、次の4週間に摂取すべきプロバイオティクス製品（又はプラセボ）を受け取った。

【0087】

最後に、4週間の製品（又はプラセボ）の服用後、志願者は、最後の糞便試料（試料T3）を渡すために5回目の打ち合わせに行った。

【0088】

この最後の打ち合わせ中、志願者は、3回目の打ち合わせで受けたものと同じアンケートに記入した。

【0089】

集められたすべての糞便試料は - 20 で最大7日間保存された後、微生物叢の分析に供された。

【0090】

糞便微生物叢の分析

16S rRNA細菌リボゾームサブユニットをコードする遺伝子の部分のヌクレオチド配列を解析することにより、糞便微生物叢を評価した。さらに詳しくは、メタゲノム法を採用した；これは、簡単に説明すると、以下の工程から構成される：

【0091】

- 1．糞便試料からメタゲノムDNAを抽出し、定量し、そして標準化する工程；
- 2．16S rRNAをコードする遺伝子のV3超可変領域をPCRにより増幅する工程；
- 3．PCR産物を定量する工程；
- 4．増幅生成物を配列決定する工程；
- 5．配列をバイオインフォマティクスの解析する工程。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 2 】

工程 1 と 3 の操作は当該分野で公知の技術であり、従って、当該分野で一般的に使用されるプロトコルを用いて行われる。例えば、Sambrook et al. 2001、又はAusubel et al. 1994などの検査室マニュアルに記載されている方法。16SリボゾームRNA遺伝子のV3領域を増幅する工程2は、PCRとして知られているDNA増幅技術を用いて、Probio_Uni 5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3'（配列番号1）と Probio_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3'（配列番号2）とをオリゴヌクレオチド（プライマー）として使用して行われた。

【 0 0 9 3 】

具体的には、プライマー対である配列番号1と2は、16S rRNA遺伝子のV3領域を増幅する。

10

【 0 0 9 4 】

工程4は、この目的のために当該分野で公知の方法、例えば、サンガー法、ピロシーケンス（pyrosequencing）法、又は、Milani et al. (2013)による科学論文の材料と方法欄に記載されているプロトコルに従って、本発明の具体例で使用されるイオントレント融合プライマー（Ion Torrent Primers）配列決定法に基づく方法を用いて行うことができる。

【 0 0 9 5 】

イオントレント法の場合、プライマーは、この特異的DNA配列決定法で使用される2つのアダプター配列の1つを5'末端に含むように、設計され合成される。この場合、アダプター配列は配列番号1と2であった。

20

【 0 0 9 6 】

PCRが行われた条件は以下の通りである：

- ・ 95 で5分；
- ・ 94 で30秒、55 で30秒、及び72 で90秒、を35サイクル；
- ・ 72 で10分。

【 0 0 9 7 】

PCRの最後に、増幅物の完全性を電気泳動により証明した。

【 0 0 9 8 】

微生物のコミュニティを性状解析するのに必要なこの方法の工程5は、この目的のために現在知られている多数の方法を用いて行うことができる。さらに詳しくは、Milani et al. (2013)による科学論文の材料と方法欄に記載されているプロトコルに従って、ヒートマップを用いる階層的クラスタリング、分類学的解析、及び系統発生樹状図の構築が使用された。さらに詳しくは、配列データの解析は、QIIMEソフトウェアを使用して行われた。

30

【 0 0 9 9 】

データの統計解析

STATISTICAソフトウェア（Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA）を使用して、統計解析を行なった。

【 0 1 0 0 】

有意差を証明するために、データをパラメトリック（多変量及び1変量反復測定ANOVA）及びノンパラメトリック（Wald-Wolfowitz and Mann-Whitney）統計的方法の両方を使用して解析した。

40

【 0 1 0 1 】

シャピロ - ウィルクとコルモゴロフ - スミルノフ（Shapiro - Wilk and Kolmogorov-Smirnov）検定により、データ系列の正規性（ANOVAのための重要な前提）を評価した。

【 0 1 0 2 】

処置の結果

試験は、全部で22人の被験者（女性11人、男性11人）について行われた。

【 0 1 0 3 】

50

まず33人の被験者を登録したが、このうち11人は、以下の様々な理由でやめた：抗生物質の摂取（4人）、試験の継続を拒否（1人）、下痢の頻繁な発症（1人）、試験期間中の他のプロバイオティクスの摂取（3人）、食習慣の急激な変化（1人）、及び下痢の頻繁な発症を伴う季節性インフルエンザ（1人）。

【0104】

試験の完結と2つの処置結果の分析が完了後、盲検が解かれて、処置Aが、ラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）DGを含有する活性処置であり、処置Bが、活性処置と外観的には同一であるが乳酸菌を含まないプラセボであることがわかった。

【0105】

この試験から得られたデータを分析すると、試験参加者の腸内微生物叢の分類学的観点から、高い安定性が観察された。

【0106】

実際には、以下が見いだされた：

a) 同定された15の細菌部門のうちの2つ、すなわちバクテロデス門（*Bacteroidetes*）とフィルミクテス門（*Firmicutes*）が、配列の90%超を構成する；

b) 同定された131の科のうちの11が、配列の90%超を構成する；そして

c) 同定された262の属のうちの20が、配列の90%超を構成する。

【0107】

さらに本試験は、より低い分類学的レベル（すなわち、科や属レベル）のヒトの腸内細菌叢が、個人間で非常に変化し易いことを確認した。

【0108】

従って、顕著な被験者間の変動のために、プロバイオティクス処置の効果の可能性が隠されたり、統計的擬陽性につながったりすることを防ぐために、健常な集団に対してクロスオーバー介入試験を実施する必要性が、実験データにより証明された。2つの処置によって腸内微生物叢に誘導される変化を評価すると、ラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）DGによる処置（活性処置）を受けた群でのみ、属の面で統計的有意差が出現した。より具体的には、コプロコッカス（*Coprococcus*）属の増加が観察された。実際に図1.1、2.1、及び2.2から明らかのように、ラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）DGによる処置の前後で、コプロコッカス（*Coprococcus*）の統計的に有意な増加が観察された。対照的に、プラセボ処置を受けた群では、そのより穏やかな減少が観察された。

【0109】

さらにラクトバシルス・パラカゼイ（*Lactobacillus paracasei*）DGによる処置後に、ブラウチア（*Blautia*）属の細菌の統計的に有意な減少が観察された。対照的に、プラセボ処置を受けた群では、そのわずかな増加が見られた（図1.2、2.1、及び2.2を参照）。

【0110】

コプロコッカス（*Coprococcus*）は、腸のレベルでの酪酸の主な生産者の1つである。酪酸は、一方で腸粘膜の機能的完全性を回復し、時間をかけてこれを維持することに寄与し、他方で重要な抗炎症効果を有するため、腸レベルでの基本的な化合物であり、従ってこれは、小腸結腸疾患（例えば、慢性炎症性腸疾患）の食事療法の補助剤として使用される。

【0111】

さらにこれらのゲノムの分析は、これらの細菌が発酵基質としてコハク酸を使用することができることを証明した。

【0112】

ブラウチア（*Blautia*）属のメンバーが、グルコース発酵の主要な最終生成物として酢酸及びコハク酸を生成するという事実を考慮すると、この情報は基本的である。

【0113】

10

20

30

40

50

従って、コハク酸はおそらく、特に潰瘍性大腸炎の活動期中に存在する粘膜損傷の原因と思われるため、これは、潰瘍性大腸炎を有する被験者の症状を悪化させ得る潰瘍発生因子であると考えられる。

【0114】

結論として、プロバイオティクスによる処置後に、この場合ラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) DG の投与後に、コプロコッカス (*Coprococcus*) 属に属する細菌の増加と、従って酪酸の腸内濃度の増加が観察される。

【0115】

同時に、潰瘍性大腸炎を有する被験者において粘膜損傷の原因と思われるコハク酸の濃度の低下が、直接的に(なぜなら、プロバイオティクスによる処置後に、この場合はラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) DG の投与後に、ブラウチア (*Blautia*) 属に属する細菌が減少するために)、及び間接的に(なぜなら、コプロコッカス集団の増加が、その発酵プロセスでコハク酸を基質として使用することにより、コハク酸の濃度をさらに低下させることができるために)、観察される。

10

【0116】

結論として、プロバイオティクスによる処置後、具体例ではラクトバシルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*) DG の投与後、被験者の糞便中の酪酸濃度が増加し、同時に、コハク酸等の他の有機酸が減少する。

【0117】

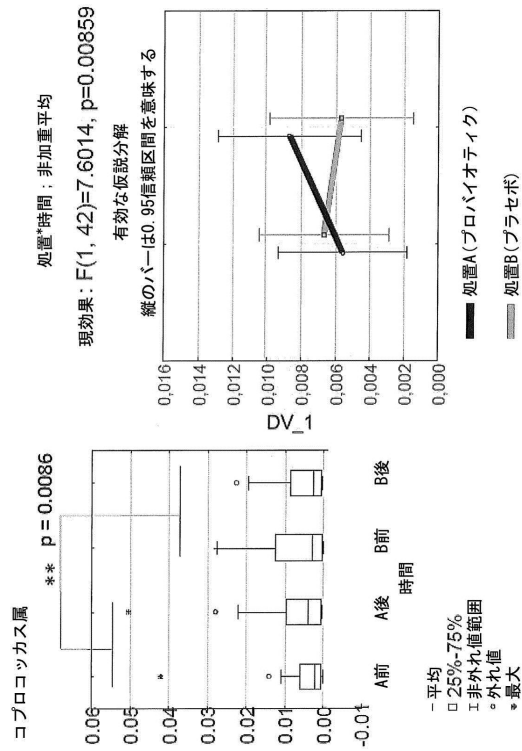
最後に、細菌ゲノムの知識に基づくメタゲノムの実質的再構築を目的としたバイオインフォマティクス解析において、糞便微生物叢の組成に関するデータが使用された (Okuda S, Tsuchiya Y, Kiriyama C, Itoh M, Morisaki H. Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. *Nat Commun.* 2012;3:1203) ; 言い換えれば、ある微生物叢において、どの潜在的な遺伝子が如何に豊富にあるかがコンピューターで確立された。この分析により、葉酸の合成及びニコチン酸の代謝のためのコード遺伝子の、推定上の増加を確認することが可能になった (図3及び4)。これら2つの分子は、ヒト宿主の重要なビタミンである (それぞれビタミンB9とB3と命名されている)。特にビタミンB9は、最重要の栄養因子であり、その欠乏は、特に妊娠などの特定の生理的条件下では、深刻な健康上の結果を招くことがある。従って本研究で使用されたプロバイオティクスによる処置は、葉酸 (ビタミンB9) を産生する腸内微生物叢の能力を促進し、その結果ヒト宿主のために栄養的利点を与えることができるであろう。

20

30

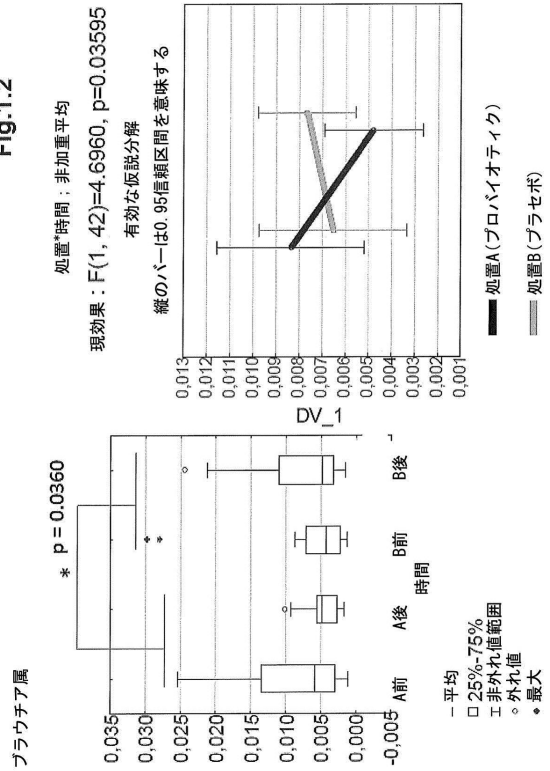
【 図 1 A 】

Fig.1.1



【 図 1 B 】

Fig.1.2



【 図 2 】

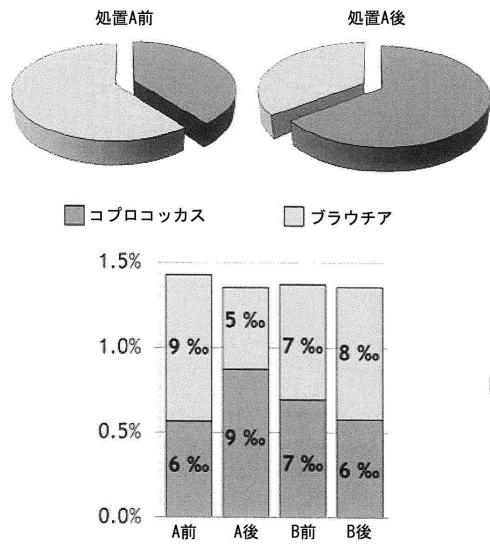


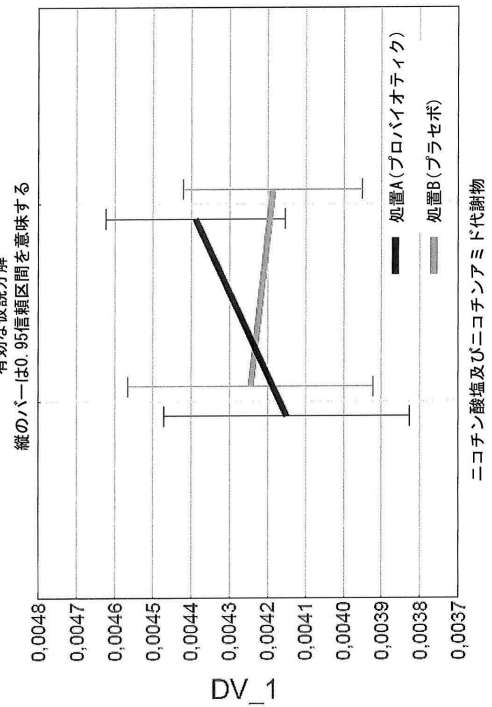
Fig.2.1

Fig.2.2

【 図 3 】

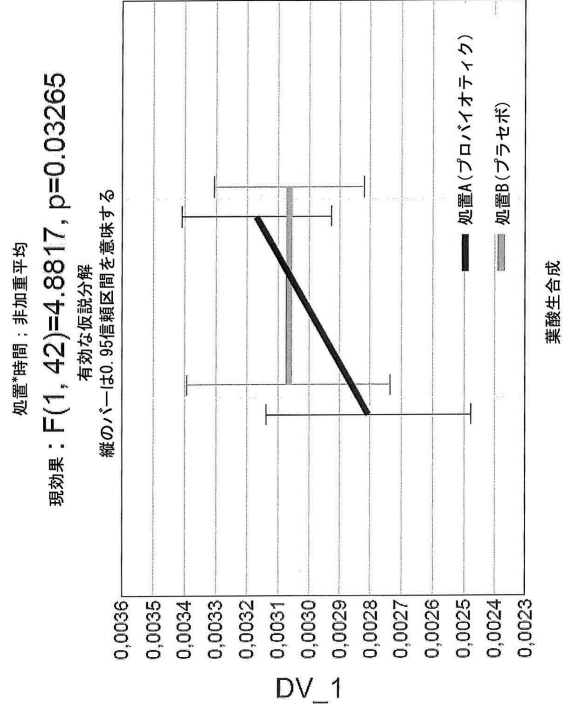
Fig.3

処置*時間：非加重平均
 現効果：F(1, 42)=4.6182, p=0.03744
 有効な仮説分解
 縦のバーは0.95信頼区間を意味する



【 図 4 】

Fig.4



【 配列表 】

[0006701078000001.app](#)

フロントページの続き

- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100134784
弁理士 中村 和美
- (72)発明者 アンドレーア ビッフィ
イタリア国, イ - 2 4 0 5 9 ウルニャーノ (ベルガモ), ピア ムリーノ ベッキオ 1 4 6
- (72)発明者 ルッジェーロ ロッシ
イタリア国, イ - 2 0 1 5 3 ミラノ, ピア フェデリコ エンジェルス 1
- (72)発明者 ウォルター フィオーレ
イタリア国, イ - 2 0 0 6 0 トレッツァーノ ローザ (ミラノ), ピア ジュゼッペ ロッシーニ 1 2
- (72)発明者 シモーネ ドメニコ グリエルメッティ
イタリア国, イ - 2 0 1 3 4 ミラノ, ピア チーマ オット エ カミッロ 2 3

審査官 植原 克典

- (56)参考文献 特開2010-161944 (JP, A)
Am J Clin Nutr, 2009年, Vol.90, p.578-86
FEMS Microbiol Ecol, 2011年, Vol.75, No.3, p.482-496
Probiotics Antimicrob Proteins, 2011年, Vol.3, No.1, p.1-7
, Applied and Environmental Microbiology, 1993年, Vol.59, No.3, p.695-700

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/00 - 3/00
C12N 1/00 - 7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)