(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
2014 年 12 月 31 日(31.12.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/208511 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 31/122 (2006.01) *A61P 1/14* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/066600

(22) 国際出願日: 2014 年 6 月 24 日(24.06.2014)

(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 2013-134704 2013 年 6 月 27 日(27.06.2013) JP

(71) 出願人: 学校法人同志社 (DOSHISHA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6028580 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武町６０１番地 Kyoto (JP). 富士化学工業株式会社 (FUJI CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒9300397 富山県中新川郡上市町横法音寺５５番地 Toyama (JP).

(72) 発明者: 米井 嘉一 (YONEI Yoshikazu); 〒6100394 京都府京田辺市多々羅都谷１－３ 同志社大学内 Kyoto (JP). 富永 久美 (TOMINAGA Kumi); 〒9300397 富山県中新川郡上市町横法音寺５５番地 富士化学工業株式会社内 Toyama (JP). 山下英次 (YAMASHITA Eiji); 〒9300397 富山県中新川郡上市町横法音寺５５番地 富士化学工業株式会社内 Toyama (JP).

(74) 代理人: 大谷 嘉一 (OTANI Kaichi); 〒9330023 富山県高岡市末広町１４－４５ Toyama (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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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.

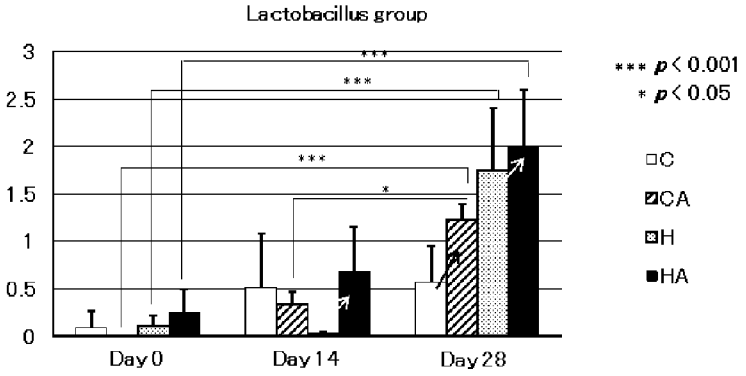
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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)）

(54) **Title**: INTESTINAL FLORA IMPROVING COMPOSITION CONTAINING ASTAXANTHIN

(54) 発明の名称 : アスタキサンチン含有腸内フローラ改善組成物



(57) **Abstract**: [Problem] The purpose of the present invention is to provide a composition which, when orally ingested, has the action of improving the balance of intestinal flora. [Solution] This oral composition improves the intestinal flora when orally ingested, and is characterized by containing astaxanthin as an effective ingredient (but containing no ingredient that could function as a constituent material of dermal tissue), the improvement in intestinal flora acting in a direction of inhibiting proliferation of gram-negative bacteria, and/or inhibiting proliferation of Clostridium coccoides group bacteria.

(57) 要約: 【課題】経口摂取により腸内フローラのバランスを改善する作用を有する組成物の提供を目的とする。 【解決手段】経口摂取により腸内フローラを改善する経口用組成物であって、有効成分としてアスタキサンチンを含有し（ただし、皮膚組織の構成材料となり得る成分を含まない。）、前記腸内フローラの改善はグラム陰性細菌の増加を抑制し、又は／及びクロストリジウムコッコイデスグループ細菌の増加を抑制する方向に作用することを特徴とする。

WO 2014/208511 A1

明　細　書

発明の名称 ： アスタキサンチン含有腸内フローラ改善組成物

技術分野

[0001] 本発明は、腸内フローラ（腸内細菌叢）の改善作用を有する経口摂取組成物に関する。

背景技術

[0002] アスタキサンチンは、フリーラジカル捕捉型抗酸化物質の１つであり、経口摂取すると小腸より吸収され抗酸化作用を発揮することが知られている。

例えば、本出願人の発明者によりアスタキサンチンに抗酸化能の増強，血圧の下降，便秘や更年期愁訴を改善する作用があることを確認されている（非特許文献１）。

しかし、アスタキサンチンは小腸にて吸収される割合が約５％程度であり、多くは吸収されないまま腸管内に残存し、便の色が赤色系に呈色することが見出された。

そこで、本発明者らはアスタキサンチンが腸管内にて腸内細菌叢にどのような影響を与えるか調査した結果、本発明に至った。

[0003] 腸内細菌叢は、腸内にて多くの種類の常在細菌により形成された生態系をいう。

腸は、摂取した食物等を分解し吸収するための器官であるために、生物が成育するのに必要な栄養分が豊富であり、ヒトや動物において他の器官よりも最も常在細菌が多い。

このような多様な細菌群は、腸管内部で生存競争を繰り広げ、互いに排除したり共生関係を築きながら、一定のバランスが保たれた均衡状態にある腸内細菌叢を形成する。

この腸内細菌叢は、腸内フローラとも呼ばれている。

腸内フローラは、加齢や生活環境により変動し、健康状態や癌等の疾病に関与し、健全な腸内フローラを保つことは若くて健康な身体を保ために重要

である。

腸内フローラを構成する腸内細菌は、ヒト等の宿主に対して有益に働く善玉菌、腸内の腐敗等宿主に害を及ぼす悪玉菌、及び健康状態では善玉とも悪玉とも言えないが、体調が悪かったり腸内細菌叢のバランスが崩れると、悪玉として作用する日和見菌に分類されて論ずることも多い。

近年、脂肪過多となる食生活が腸内フローラのバランスを悪化させる原因の１つであると言われ、社会問題となっている。

これまではバランスが悪化した腸内フローラの改善方法として、消化蠕動運動を促進させる目的で食物繊維を摂取することや、善玉菌の餌となるオリゴ糖の摂取については公知であるが、腸内フローラに対してのアスタキサンチンの影響については知られていない。

[0004] 非特許文献1：Iwabayashi M, Fujioka N, Nomoto K, Miyazaki R, Takahashi H, Hibino S, Takahashi Y, Nishikawa K, Nishida M, Yonei Y.「Efficacy and safety of eight-week treatment with astaxanthin in individuals screened for increased oxidative stress burden.」Anti-Aging Medicine 6 : 15-21, 2009.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、経口摂取により腸内フローラのバランスを改善する作用を有する組成物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明に係る腸内フローラ改善組成物は、経口摂取により腸内フローラを改善する経口用組成物であって、有効成分としてアスタキサンチンを含有し（ただし、皮膚組織の構成材料となり得る成分を含まない。）、前記腸内フローラの改善はグラム陰性細菌の増加を抑制し、又は／及びクロストリジウムコッコイデスグループ細菌の増加を抑制する。

また、経口摂取により腸内フローラを改善する経口用組成物であって、有効成分としてアスタキサンチンを含有し（ただし、皮膚組織の構成材料とな

り得る成分を含まない。）、前記腸内フローラの改善は、ラクトバチルス属及びストレプトコッカス属の細菌を増加させる。

これにより、腸内フローラの改善は悪玉菌の増殖を抑制し、善玉菌の増殖を促進する方向に作用し、日和見菌による感染症の惹起を抑制する方向に作用するものであり、グラム陰性細菌の増加を抑制し、クロストリジウムコッコイデスグループ細菌の増加を抑制し、ラクトバチルス属及びストレプトコッカス属の細菌を増加させる方向に作用する。

ここで、腸内フローラの改善は腸内フローラの乱れを抑制する方向に作用するもの、腸内フローラ改善は悪玉菌の増殖を抑制し、善玉菌の増殖を促進する方向に作用するもの、及び腸内フローラ改善は、日和見菌による感染症の惹起を抑制する方向に作用するものが含まれる。

また、有効成分としてアスタキサンチンを含有する腸内フローラ改善組成物の経口摂取により腸内フローラを改善するための使用に特徴がある。

よって、本発明に係る腸内フローラ改善組成物には、低分子化コラーゲン，デルマタン硫酸，ヒアルロン酸コンドロイチン及びセラミド等の皮膚組織の構成材料となるものは含まれていない。

[0007] 腸内細菌のうち、善玉菌に属する代表例には、ラクトバチルス属，ストレプトコッカス属及びビフィズス菌が例として挙げられる。

＜ラクトバチルス属（乳酸菌）＞

ラクトバチルス（Lactobacillus）属細菌はグラム陽性の桿菌である。

種によって乳酸のみを産生（ホモ乳酸発酵）するものと、乳酸以外のものを同時に産生（ヘテロ乳酸発酵）するものがある。

ヒトや動物の消化管にも多く生息しており、その糞便からも分離される。

ラクトバチルス属は発酵食品や動物消化管など幅広い環境に生息している細菌群である。

ラクトバチルス属は１００種以上の菌種で構成され、多岐にわたる。

＜ストレプトコッカス属（乳酸菌）＞

ストレプトコッカス（Streptococcus）属はレンサ球菌属と呼ばれ、グラム

陽性球菌である真正細菌の総称である。

レンサ球菌は、直径１μｍ程度で、個々の菌体が規則的に直鎖状に並んだ配列をとる。

生化学的にカタラーゼを持たない点が、他のグラム陽性球菌と異なる。

一般に呼吸によるエネルギー産生は行わず、主に乳酸発酵によってエネルギーを得ている。

腸管内では乳酸菌として作用するものが多い。

以前レンサ球菌属として分類されていたグループから腸球菌（Enterococcus）が独立した科(Enterococcaceae)として分類された。

フェカリス（E.faecalis）、フェシウム（E.faecium）などがあり、回腸、盲腸、大腸に生息している。

＜ビフィズス菌＞

ビフィズス菌とはグラム陽性の偏性嫌気性桿菌の一種で、放線菌綱Bifidobacteriales目Bifidobacterium属に属する細菌の総称である。ヒトおよび動物の腸内に生息する。

ヒト腸管にはB. bifidum、B. breve、B. infantis (B. longum subsp. infantis に再分類)、B. longum、B. adolescentisの５種が検出される。

糖を分解して乳酸、酢酸を生成し、善玉菌として腸内の環境を整える作用がある。

近年では、腸管内のビフィズス菌がインフルエンザウイルス感染予防効果、花粉症などアレルギー症状の緩和作用の報告がある。

母乳栄養児の糞便には特に多く存在するが、加齢や食事環境によって次第にその割合が減ってくる。

[0008] 悪玉菌に属する代表例には、クロストリジウム属が例として挙げられる。

＜クロストリジウム属＞

クロストリジウム（Clostridium）属は真正細菌の一属で、偏性嫌気性で芽胞を形成するグラム陽性の桿菌である。

クロストリジウム属の菌は、土壌内部や生物の腸内などの酸素濃度が低い

環境に生息する偏性嫌気性菌であり、酸素存在下では増殖できない。

一般に偏性嫌気性菌は、抗酸化酵素であるスーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼを持たないため、酸素の存在下では不活化するが、クロストリジウム属細菌は酸素存在下で、耐久性の高い芽胞を作って長期休眠する性質がある。

このため他の偏性嫌気性菌が生き残れない状態でも生存できる。

破傷風菌（C. tetani）、ボツリヌス菌（C. botulinum）、ウェルシュ菌（C. perfringens）、ガス壊疽菌群（C. novyi, C. septicum など）、クロストリジウム・ディフィシレ（C. difficile）などが知られる。

腸管に生息するクロストリジウム（Clostridium）属のうち優勢を占めるのはクロストリジウムコッコイデス（C. coccoides）、クロストリジウムレプタム（C. leptum）であるが、ウェルシュ菌（Clostridium perfringens）、C. difficileも検出される。

ウェルシュ菌はヒトや動物の腸内に生息する常在菌の一種であるが、一部の菌種は毒素を産生して、食中毒の原因になる。

[0009] 日和見菌に属する代表例には、バクテロイデス属とプレボテラ属が例として挙げられる。

＜バクテロイデス属＞

Bacteroides fragilisなどバクテロイデス属はグラム陰性の偏性嫌気性非芽胞形成桿菌である。

ヒトや動物の腸内に大量に存在し、糖を発酵して、乳酸や酢酸などを産生する。

人間の大便には１ｇあたり１００億から１０００億個存在する。

基本的には病気の原因とはならないが、日和見感染症の原因となる細菌のひとつである。

＜プレボテラ属＞

プレボテラ（Prevotella）属は口腔内、腸管内で検出される嫌気性のグラム陰性桿菌である。

口腔の感染症の殆どは、常在菌やその他の病原性の弱い細菌による感染症であるが、これら弱毒菌感染症の特徴として日和見感染症を惹起することがある。

プレボテラ属細菌は抜歯後の菌血症など口腔内感染症、高齢者では誤嚥性肺炎の起炎菌の一つとなっている。

ヒト嫌気性菌感染症の大部分は好気性菌と嫌気性菌の混合感染であるが、プレボテラ属細菌は起炎菌の一つである。

[0010] 本発明に用いる、アスタキサンチンは、キサントフィル類に分類されるカロテノイドの一種である。

ＩＵＰＡＣ名は、３，３’－ジヒドロキシ－β，βカロテン－４、４’ジオンであり、３及び３’位のヒドロキシ基の位置により（３Ｒ，３’Ｒ）体、（３Ｒ，３’Ｓ）体（メソ体）、（３Ｓ，３’Ｓ）体の三種が存在し、共役二重結合のシス－トランスによる異性体を有する。

本発明では、いずれのアスタキサンチンを用いても良い。

また、遊離型、モノエステル型、ジエステル型として存在可能である。

天然物由来のものとしては、例えば、緑藻ヘマトコッカスなどの微細藻類、赤色酵母ファフィアなどの酵母類、エビ、オキアミ、カニ、ミジンコなどの節足動物類の甲殻、イカ、タコなどの軟体動物類の内臓や生殖巣、種々の魚介類の皮、ナツザキフクジュソウなどのフクジュソウ属の花弁、Paracoccus sp. N81106、Brevundimonas sp. SD212、Erythrobacter sp. PC6などのα－プロテオバクテリア類、Gordonia sp. KANMONKAZ-1129などのゴードニア属、Schizochytriuym sp. KH105などのラビリンチュラ類（特にヤブレツボカビ科）やアスタキサンチン産生遺伝子組み換え生物体などから得られるものをあげることができる。

また、経口摂取の方法として、サプリメント、健康食品、栄養機能食品や特定保健用食品などの保健機能食、特別用途食品、一般食品、医薬部外品さらにはスポーツ用のサプリメントとして用いることができ、摂取のしやすさや摂取量が決めやすいことから、サプリメント、スポーツ用のサプリメント

、保健機能食、特別用途食品が好ましく、錠剤、口腔内速崩壊錠、カプセル、顆粒、細粒などの固形投与形態、液剤、ドリンク、シロップ及び懸濁液のような液体投与形態で摂取することができる。

また、食物繊維等の繊維物質と組み合わせても良い。

発明の効果

[0011] 腸管にはヒトそれぞれ特徴的な常在細菌が生息し、腸内細菌叢を構成する。

通常は、腸内細菌叢と宿主との間、および菌叢を構成する菌種間には平衡関係が成立しているが、何らかの原因でこの平衡関係が破れると、菌交代や日和見感染を惹き起こし、その結果、宿主の老化をはじめ、栄養、薬効、生理機能、免疫機構、癌の発症に大きな影響を及ぼす。

今回、後述するようにマウスに高脂肪食を負荷した際の腸内細菌叢の乱れに対し、アスタキサンチン投与が制御的に作用することが示された。

ヒトにおいても高脂肪食による腸内細菌叢の乱れに対し、吸収されずに腸管内に残ったアスタキサンチンが好影響をもたらすと推定される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]体重の推移を示す。

[図2]糞便重量の推移を示す。

[図3]ＮａｎｏＤｒｏｐ法によるＤＮＡ量の推移を示す。

[図4]全菌種プライマー測定値に対するラクトバチルスグループ（乳酸菌）の推定コピー数（%）の推移を示す。

[図5]全菌種プライマー測定値に対するストレプトコッカスグループ（乳酸菌）の推定コピー数（%）の推移を示す。

[図6]全菌種プライマー測定値に対するビフィズス菌の推定コピー数（%）の推移を示す。

[図7]全菌種プライマー測定値に対するクロストリジウムコッコイデスグループの推定コピー数（%）の推移を示す。

[図8]全菌種プライマー測定値に対するクロストリジウムレプタムグループの

推定コピー数（％）の推移を示す。

[図9]全菌種プライマー測定値に対するバクテロイデス属菌の推定コピー数（％）の推移を示す。

[図10]全菌種プライマー測定値に対するプレボテラ属菌の推定コピー数（％）の推移を示す。

発明を実施するための形態

[0013] マウスに高脂肪食を与えた際の腸内フローラの変化と、それに対するアスタキサンチンの作用について、リアルタイムＰＣＲ法を用いて検討したので以下説明する。

[0014] ＜被験物質を含む通常食および高脂肪食の調製＞

標準食はラボＭＲストック（日本農産工業、横浜市西区）、高脂肪食はＨＦＤ－６０（オリエンタル酵母、東京都板橋区）を使用し、被験物質（アスタキサンチン）が０．０２％となるよう通常食、高脂肪食を調製した。

アスタキサンチンは、富士化学工業株式会社の商品アスタリールオイル５０Ｆを用いた。

[0015] ＜動物飼育およびアッセイ方法＞

４週齢のＩＣＲマウス２０匹をそれぞれ個別ケージで飼育し１週間馴化した。

馴化後、体重測定を行ない、１群５匹として次の４群：通常食群（Ｃ群）、通常食＋アスタキサンチン群（ＣＡ群）、高脂肪食群（Ｈ群）、高脂肪食＋アスタキサンチン群（ＨＡ群）に分けた。

馴化最終日の２４時間糞便を回収しＤａｙ０とした。

Ｄａｙ１より各群飼料を与え、１週間に１度体重測定を行なった。

給餌は、通常食については１週間に１度、高脂肪食群は、２日に１回（給餌前日に室温に戻してから使用する）の給餌とした。

糞便回収は飼育１３日から１４日目にかけて（Ｄａｙ１４）および飼育２７日から２８日目にかけて（Ｄａｙ２８）にも行い、飼育終了とした。

回収した糞便は－２０℃にて保存した。

[0016] ＜ＤＮＡの抽出＞

Ｄａｙ０、Ｄａｙ１４、Ｄａｙ２８に回収した糞便を解凍し重量を秤量後、一晩室温にて乾燥を行った。

翌日乾燥重量を秤量後、糞便を全量粉末化した。

各粉末化糞便を１００ｍｇ前後マイクロテストチューブに測り取り、QIAampR DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands)を用いてＤＮＡ抽出を行った。

抽出したＤＮＡ溶液はナノドロップにて濃度を測定した。

[0017] ＜リアルタイムＰＣＲ＞

ＤＮＡ溶液を、全菌種、Lactobacillus、Streptococcus、Clostridium coccoides、およびClostridium leptumについて１００倍希釈、その他のターゲットについて最終濃度を２０μｇ／μＬに揃え、LightCyclerR 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics K.K., 東京都港区)のプロトコルに従い、プライマー配列については、松木らまたは遠藤らの方法によってリアルタイムＰＣＲ解析を行った。

なお、解析対象は全菌種、バクテロイデス（Bacteroides）、ビフィズス菌（Bifidobacterium）、プレボテラ（Prevotella）、ラクトバチルス（Lactobacillus）、ストレプトコッカス（Streptococcus）、クロストリジウムコッコイデス（Clostridium coccoides）、クロストリジウムレプタム（Clostridium leptum）の８種とした。

[0018] ＜統計解析＞

平均値±標準偏差で示した。

各群の平均値はＴｕｋｅｙ多重比較検定により解析した。

標準食と高脂肪食と食餌による比較については標準食摂取時（Ｃ群とＣＡ群）と高脂肪食摂取時（Ｈ群とＨＡ群）のＤａｙ０，１４，２８の菌数変化率をMann-Whitney's U test（両側検定）にて解析した。

アスタキンチン添加の有無による比較は菌数変化率をMann-Whitney's U test（片側検定）にて解析した。

統計解析にはSPSS for Windows（登録商標） Ver.15.0（SPSS Inc. Chicago、IL、USA）を用いた。

[0019] 次に測定結果および解析結果を説明する。

＜体重推移および糞便の性状＞

体重推移を図１に示す。

Ｈ群はＣ群と比較して、体重増加が顕著であった（ｐ＜０．０１、ｐ＜０．０５）。

ＨＡ群はＣＡ群と比較して、体重増加が顕著であった（ｐ＜０．０５）。

アスタキサンチン添加群（ＣＡ群、ＨＡ群）と非添加群（Ｃ群、Ｈ群）間において有意差は認められなかった。

なお、糞便の色調はＣ群で濃緑色、ＣＡ群で赤茶色、Ｈ群で薄緑がかった灰色、ＨＡ群で赤色～橙色を呈していた。

図２に示すようにＤａｙ１４およびＤａｙ２８の糞便重量はＣ群に比べＨ群で有意に軽く、ＣＡ群に比べＨＡ群において有意に軽かった。

[0020] ＜ＤＮＡ量＞

ＮａｎｏＤｒｏｐ法により糞便より抽出したＤＮＡ量（Ｄａｙ０，１４，２８の平均）の変化を図３に示す。

Ｃ群：８９．８±２１．５ｎｇ／μＬ、ＣＡ群：１０２．７±２８．５ｎｇ／μＬ、Ｈ群：７０．２±２１．２ｎｇ／μＬ、ＨＡ群：６６．９±２８．４ｎｇ／μＬであった高脂肪食群（Ｈ群＋ＨＡ群）では標準食群（Ｃ群＋ＣＡ群）に比べてＤＮＡ量が低下する傾向が認められた（ｐ＝０．００１）。

[0021] 次に各細菌の変化について説明する。

＜ラクトバチルスグループ（乳酸菌）＞

全菌種におけるラクトバチルスグループ菌数は３％未満であった。

その変化を図４に示す。

高脂肪食により菌数は有意に増加した（ｐ＝０．００４）。

標準食群（Ｃ群およびＨＡ群）もＤａｙ１４、Ｄａｙ２８と経過とともに

菌数の増加傾向がみられた。

標準食と高脂肪食との間で菌数増加率に有意差はなかった（ｐ＝０．０６９）。

アスタキサンチン添加の有無による比較では、添加により菌数増加率が増すことが示された（ｐ＝０．０３１）。

[0022] ＜ストレプトコッカスグループ（乳酸菌）＞

全菌種におけるストレプトコッカスグループ菌数は１６％未満であった。

その変化を図５に示す。

標準食摂取時には菌数は顕著に増加したが、高脂肪食による菌数の変化は軽微であった（ｐ＝０．０２８）。

高脂肪食群では標準食群に比べ菌数増加率が極めて低値であった（ｐ＝０．００８）。

アスタキサンチンを添加したＨＡ群Ｄａｙ２８では標準食群（Ｃ群およびＣＡ群）のレベルまで回復した。

脂肪食摂取時においてアスタキサンチン添加の有無による群間有意差を認めた（ｐ＝０．０４４）。

[0023] ＜ビフィズス菌＞

全菌種におけるビフィズス菌数は０．０００００６％未満で極微量であった。

その変化を図６に示す。

極微量のため参考値として示した。

[0024] ＜クロストリジウムコッコイデスグループ＞

全菌種におけるクロストリジウムコッコイデスグループ菌数は１．４％未満であった。

その変化を図７に示す。

高脂肪食により菌数は有意に増加した（ｐ＝０．０１６）。

高脂肪食群では標準食群に比べ菌数増加率が高かった（ｐ＝０．０１２）。

アスタキサンチン添加の有無による比較では、高脂肪食摂取時において添加により菌数増加率が低下することが示された（ｐ＝０．０２９）。

[0025] ＜クロストリジウムレプタムグループ＞

全菌種におけるクロストリジウムレプタムグループ菌数は１．６％未満であった。

その変化を図８に示す。

高脂肪食により菌数は有意に増加した（ｐ＝０．０１７）。

高脂肪食群では標準食群に比べ菌数増加率が高かった（ｐ＝０．００２）。

ＨＡ群Ｄａｙ１４で一過性に菌量増加（Ｈ群に対しｐ＜０．００１）がみられたが、Ｄａｙ２８にはＨ群とＨＡ群に差はみられなかった。

[0026] ＜バクテロイデス属＞

全菌種におけるバクテロイデス属菌数は０．００３％未満と微量であった。

その変化を図９に示す。

高脂肪食摂取により菌数は有意に増加した（ｐ＝０．００６）。

Ｈ群ではＤａｙ１４で有意に増加していた（Ｄａｙ０に対しｐ＜０．０１、Ｃ群に対しｐ＜０．０５）が一過性で、Ｄａｙ２８にはＤａｙ０レベルまで戻った。

ＨＡ群ではこのような一過性増加はみられなかった。

食餌の差については、高脂肪食群では標準食群に比べ菌数増加率が高かった（ｐ＝０．００２）。

[0027] ＜プレボテラ属＞

全菌種におけるプレボテラ属菌数は０．０６％未満で微量であった。

その変化を図１０に示す。

高脂肪食により菌数は著明に低下した（ｐ＜０．００１）。

食餌の差については、標準食群では高脂肪食群に比べ菌数増加率が高かった（ｐ＜０．００１）。

[0028] 以下の結果から、次のことが考察される。

第一に、図９のグラフにてアスタキサンチンは高脂肪食によるバクテロイデス属（グラム陰性細菌）の短期的な増加を抑制している。

具体的には、Ｄａｙ１４にてＨ群は大きな増加を示しているのに対して、ＨＡ群は増加が抑えられている。

ラクトバチルス（乳酸菌）については、図４に示すようにアスタキサンチン添加がＣ群とＣＡ群を比較しても、Ｈ群とＨＡ群を比較してもラクトバチルス属菌数を増やしている。

同様に、図５のグラフにてＤａｙ２８のＨ群とＨＡ群を比較すると明らかに高脂肪食摂取時にストレプトコッカス（乳酸菌）を増加させている。

以上より、アスタキサンチン投与が腸内フローラを改善する（グラム陰性菌の暴走を抑制し、乳酸菌群を増やす）ことが明らかになった。

また、図７のグラフから悪玉菌の１つであるクロストリジウムコッコイデスグループは、Ｄａｙ１４，２８における高脂肪食摂取時にてＨ群とＨＡ群を比較すると分かるように、アスタキサンチンは増殖を抑えている。

産業上の利用可能性

[0029] 本発明に係る組成物等は、腸内フローラの改善に有用である。

請求の範囲

[請求項1] 経口摂取により腸内フローラを改善する経口用組成物であって、有効成分としてアスタキサンチンを含有し（ただし、皮膚組織の構成材料となり得る成分を含まない。）、

前記腸内フローラの改善はグラム陰性細菌の増加を抑制し、又は／及びクロストリジウムコッコイデスグループ細菌の増加を抑制する方向に作用することを特徴とする経口用腸内フローラ改善組成物。

[請求項2] 経口摂取により腸内フローラを改善する経口用組成物であって、有効成分としてアスタキサンチンを含有し（ただし、皮膚組織の構成材料となり得る成分を含まない。）、

前記腸内フローラの改善は、ラクトバチルス属及びストレプトコッカス属の細菌を増加させる方向に作用することを特徴とする経口用腸内フローラ改善組成物。

[請求項3] 経口摂取により腸内フローラを改善する経口用組成物であって、有効成分としてアスタキサンチンを含有し（ただし、皮膚組織の構成材料となり得る成分を含まない。）、

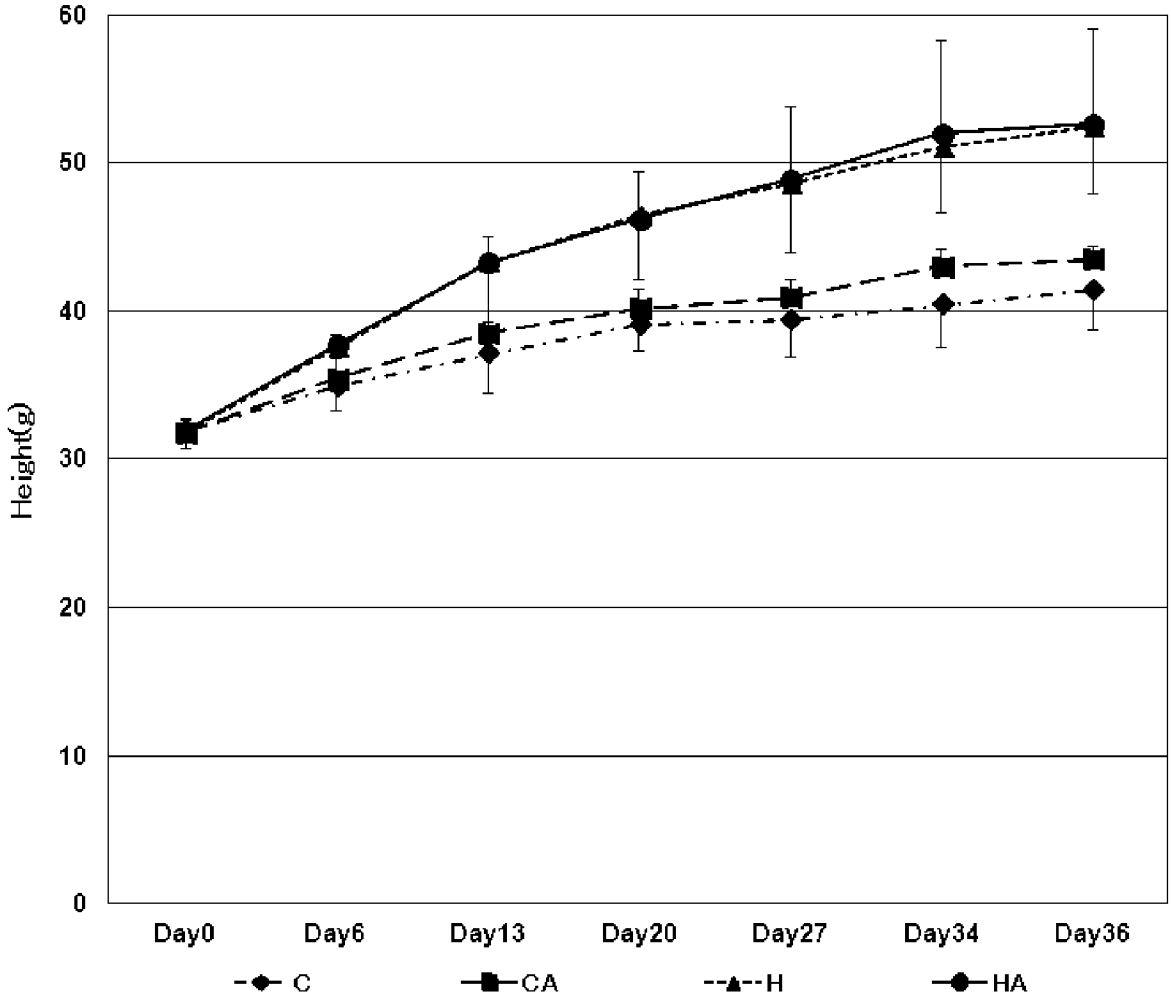
前記腸内フローラの改善は悪玉菌の増殖を抑制し、善玉菌の増殖を促進する方向に作用し、

日和見菌による感染症の惹起を抑制する方向に作用するものであり、

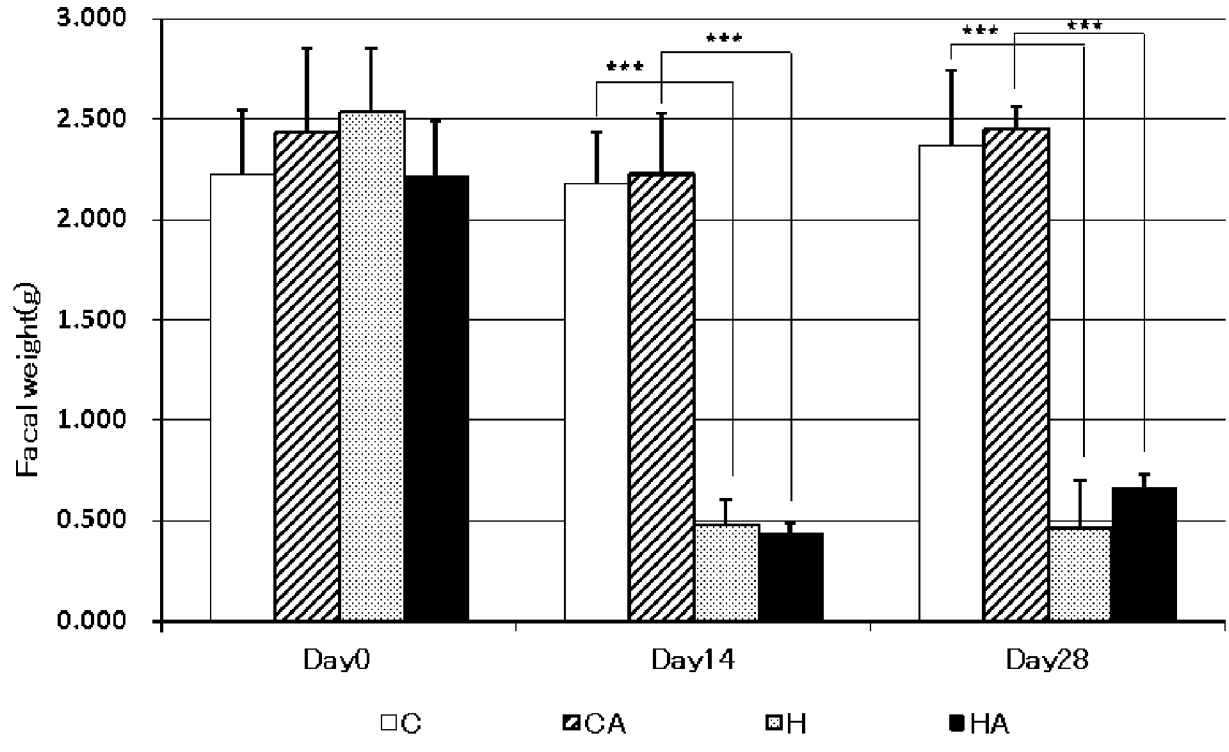
グラム陰性細菌の増加を抑制し、クロストリジウムコッコイデスグループ細菌の増加を抑制し、ラクトバチルス属及びストレプトコッカス属の細菌を増加させる方向に作用することを特徴とする経口用腸内フローラ改善組成物。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか１項の経口用腸内フローラ改善組成物を経口摂取する腸内フローラの改善のための使用。

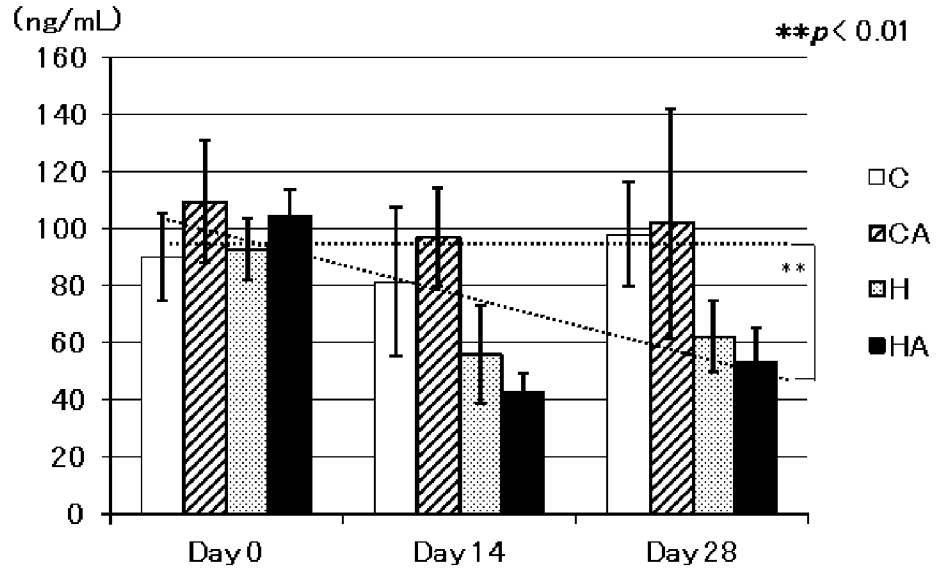
[図1]


60
50
40
30
20
10
0
Height(g)
Day0
Day6
Day13
Day20
Day27
Day34
Day36
C
CA
H
HA

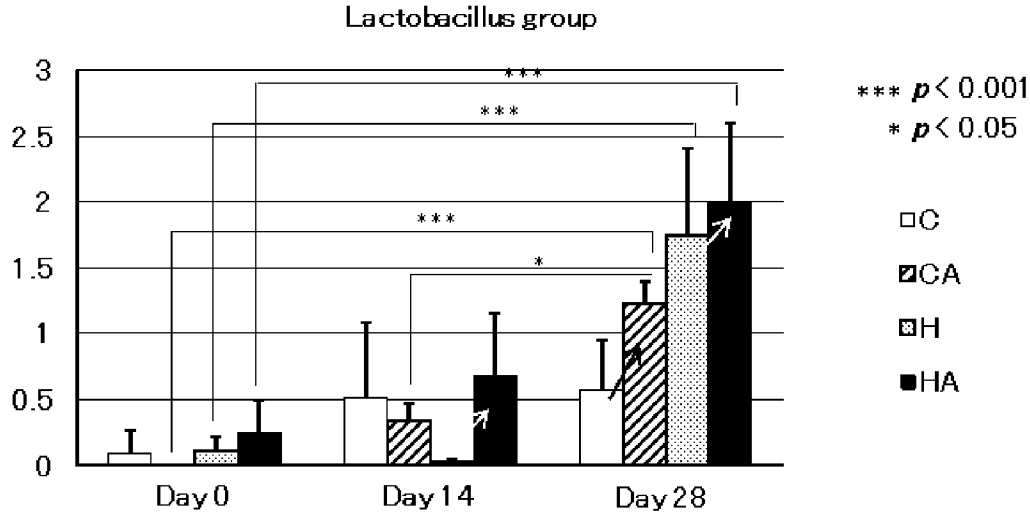
[図2]


3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
Facal weight(g)
***
***
***
***
Day0
Day14
Day28
C
CA
H
HA

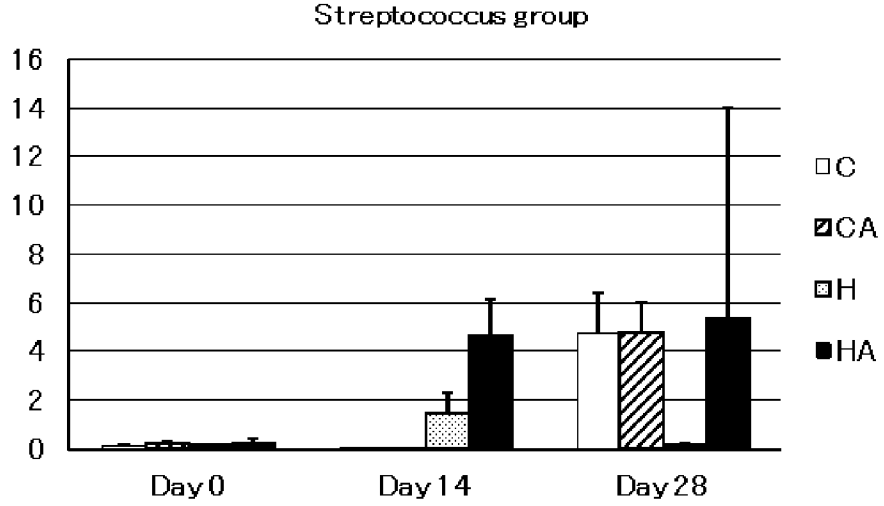
[図3]


(ng/mL)
**p< 0.01
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Day 0
Day 14
Day 28
**
□C
▨CA
▩H
■HA

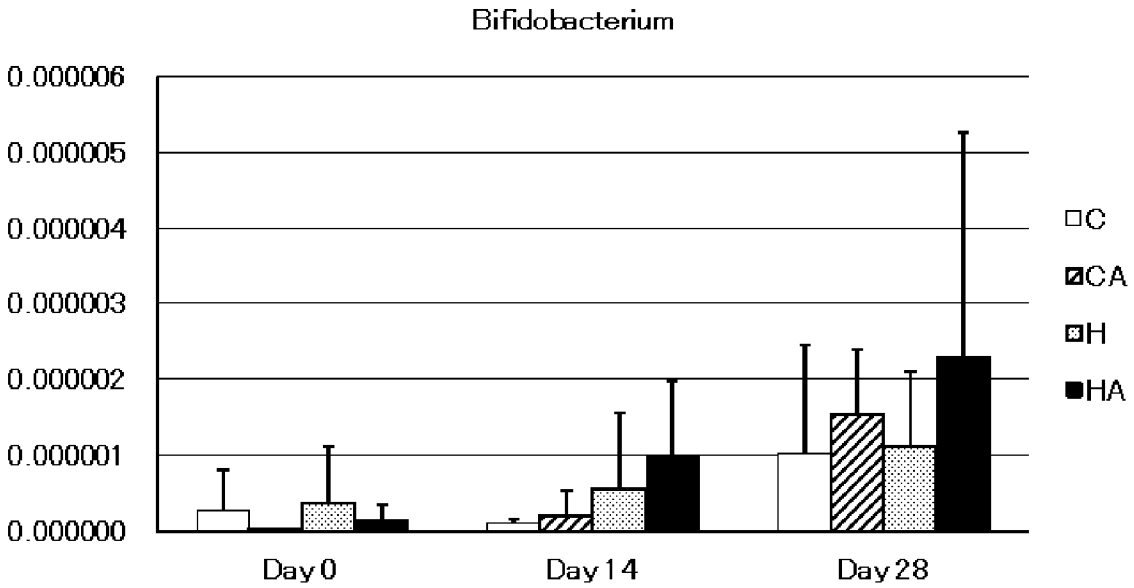
[図4]


Lactobacillus group
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
***
***
***
*
Day 0
Day 14
Day 28
*** p< 0.001
* p< 0.05
□C
▨CA
▩H
■HA

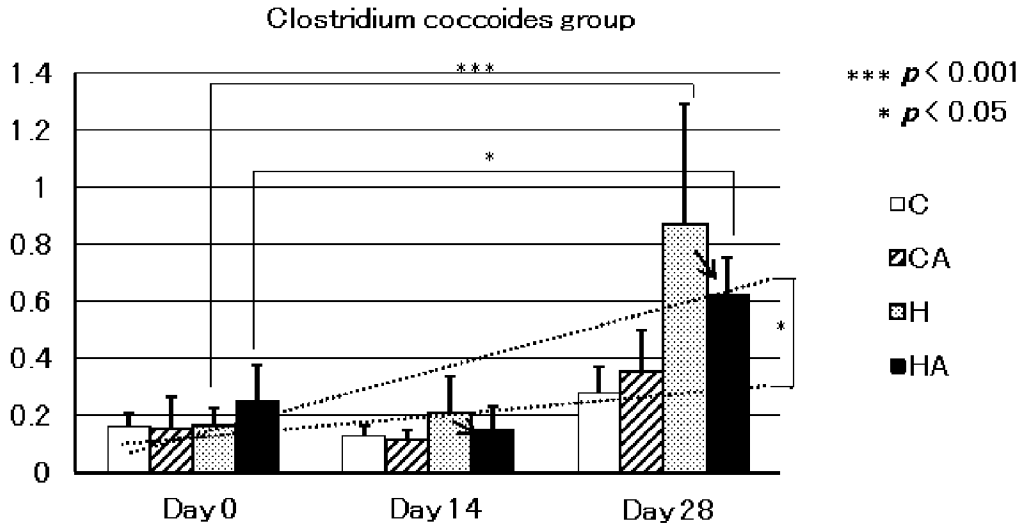
[図5]


Streptococcus group
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Day 0
Day 14
Day 28
□C
▨CA
▩H
■HA

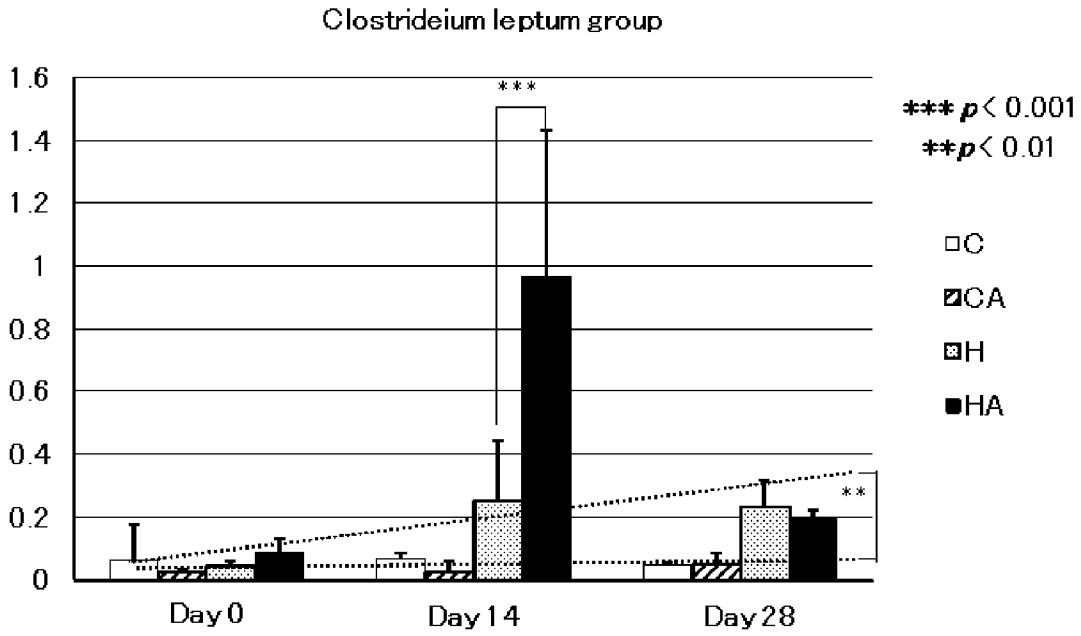
[図6]


Bifidobacterium
0.000006
0.000005
0.000004
0.000003
0.000002
0.000001
0.000000
Day 0
Day 14
Day 28
□C
▨CA
▩H
■HA

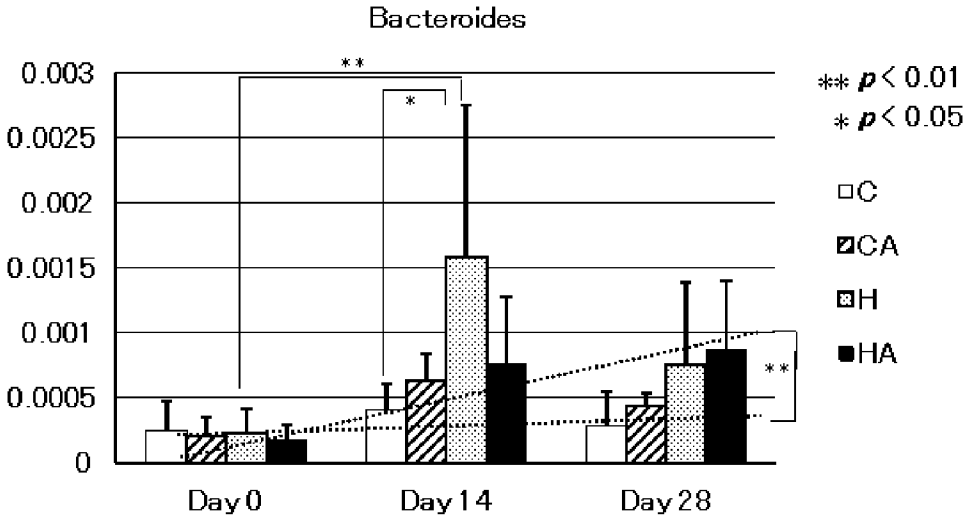
[図7]


Clostridium coccoides group
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
*
*
Day 0
Day 14
Day 28
*** p < 0.001
* p < 0.05
□C
▨CA
▩H
■HA

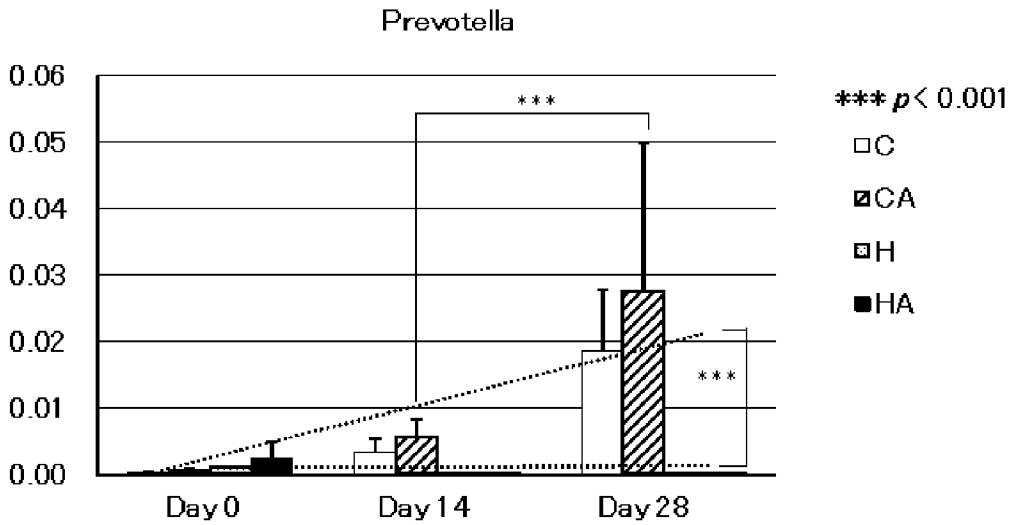
[図8]


Clostrideium leptum group
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
**
Day 0
Day 14
Day 28
*** p < 0.001
** p < 0.01
□C
▨CA
▩H
■HA

[図9]


Bacteroides
0.003
0.0025
0.002
0.0015
0.001
0.0005
0
**
*
**
Day 0
Day 14
Day 28
** p < 0.01
* p < 0.05
□C
▨CA
▩H
■HA

[図10]


Prevotella
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
***
***
Day 0
Day 14
Day 28
*** p < 0.001
□C
▨CA
▩H
■HA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/066600

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/122(2006.01)i, *A61P1/14*(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)
A61K31/122, A61P1/14

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102342415 A (WUHAN EAST ANGEL BIOENGINEERING CO., LTD.), 08 February 2012 (08.02.2012), particularly, abstract; example 3 (Family: none)	1-3
X	HOSOKAWA M.et al,Preventive effects of marine carotenoids on inflammatory bowel disease and colon carcinogenesis., Japan Oil Chemists' Society Nenkai Koen Yoshishu, 2012, vol.50th/ 51st, no.Abstracts, page 120, O-79, entire text	1-3
X	Yumiko YASUI et al., "Astaxanthin inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice", Proceedings of the Japanese Cancer Association, 2009, vol.68, page 497, P-1265, entire text	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
10 September, 2014 (10.09.14)	22 September, 2014 (22.09.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/066600

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NANAU R. M. et al, Nutritional and probiotic supplementation in colitis models., Digestive Diseases and Sciences, 2012,Vol. 57, No. 11, p.2786-2810, particularly, abstract	1-3
X	JP 2007-238441 A (Fuji Chemical Industry Co., Ltd.), 20 September 2007 (20.09.2007), particularly, scope of claims; claim 1; paragraph [0041] & JP 5165894 B2 & US 2009/0047304 A1 & EP 1829537 A1 & WO 2006/059730 A1 & KR 10-2007-0109981 A & CN 101111239 A	1-3
A	JP 2005-034135 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 10 February 2005 (10.02.2005), & JP 4553604 B2	1-3
A	JP 2002-527472 A (Astacarotene AB), 27 August 2002 (27.08.2002), & US 6923967 B1 & EP 1121106 A & WO 2000/023064 A1 & DE 69918152 D & DE 69918152 T & SE 524337 C & AU 6201699 A & CA 2346647 A & AU 763995 B & AT 269065 T & ES 2222732 T	1-3
P,X	Yoshikazu YONEI, "Astaxanthin Sesshu ni yoru Chonai Flora eno Eikyo (Kaigiroku)", Japanese Society of Anti-Aging Medicine Sokai Program Shorokushu Dai 13 Kai, 28 June 2013 (28.06. 2013), page 277, LS08-2	1-3
P,X	CN 103815223 A (Shandong Bailong Chuangyuan Bio-tech Co., Ltd., Peop. Rep. China), 28 May 2014 (28.05.2014), (Family: none)	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/066600

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.: 4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 4 pertains to a method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
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:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０６６６００

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/122(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/122, A61P1/14

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	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４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）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ), 医中誌 WEB,WPI

Ｃ．　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
X	CN 102342415 A (WUHAN EAST ANGEL BIOENGINEERING CO TD)2012.02.08 特に要約、実施例３(ファミリーなし)	1-3
X	HOSOKAWA M.et al,Preventive effects of marine carotenoids on inflammatory bowel disease and colon carcinogenesis., 日本油化学会年会講演要旨集 ,2012,Vol.50th/51st, No.Abstracts, p.120,O-79 全文	1-3

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　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	国際調査報告の発送日
１０．０９．２０１４	２２．０９．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　４Ｕ　９７３５
六笠　紀子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

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
X	安井由美子他,炎症関連マウス大腸発癌に対するアスタキサンチンの抑制作用,日本癌学会学術総会記事,2009,Vol.68,p.497,P-1265 全文	1-3
X	NANAU R. M. et al, Nutritional and probiotic supplementation in colitis models., Digestive Diseases and Sciences, 2012,Vol. 57, No. 11, p.2786-2810　特に要約	1-3
X	JP 2007-238441 A (富士化学工業株式会社) 2007.09.20　特に特許請求の範囲請求項１、段落【００４１】 & JP 5165894 B2 & US 2009/0047304 A1 & EP 1829537 A1 & WO 2006/059730 A1 & KR 10-2007-0109981 A & CN 101111239 A	1-3
A	JP 2005-034135 A (明治製菓株式会社)2005.02.10 & JP 4553604 B2	1-3
A	JP 2002-527472 A (アスタカロネ　アクチボラゲット) 2002.08.27 & US 6923967 B1 & EP 1121106 A & WO 2000/023064 A1 & DE 69918152 D & DE 69918152 T & SE 524337 C & AU 6201699 A & CA 2346647 A & AU 763995 B & AT 269065 T & ES 2222732 T	1-3
P,X	米井 嘉一,アスタキサンチン摂取による腸内フローラへの影響(会議録),日本抗加齢医学会総会プログラム・抄録集13回 ,2013.06.28,p.277,LS08-2	1-3
P,X	CN 103815223 A (Shandong Bailong Chuangyuan Bio-tech Co., Ltd., Peop. Rep. China) 2014.05.28 (ファミリーなし)	1-3

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０６６６００

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　4　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項４は手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。