

(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
2020年7月2日(02.07.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/138511 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/734 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01) A23L 33/21 (2016.01)
A61P 3/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/000013

(22) 国際出願日: 2020年1月6日(06.01.2020)

(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 2018-247491 2018年12月28日(28.12.2018) JP

(71) 出願人: 森永乳業株式会社(MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1088384 東京都港区芝五丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 小田 巻 俊 孝(ODAMAKI, Toshitaka); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社内 Kanagawa (JP). 橋倉 那波(HASHIKURA, Nanami); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社内 Kanagawa (JP). 村上 隆太

(MURAKAMI, Ryuta); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社内 Kanagawa (JP). 柳澤 詠子(YANAGISAWA, Eiko); 〒2528583 神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社内 Kanagawa (JP).

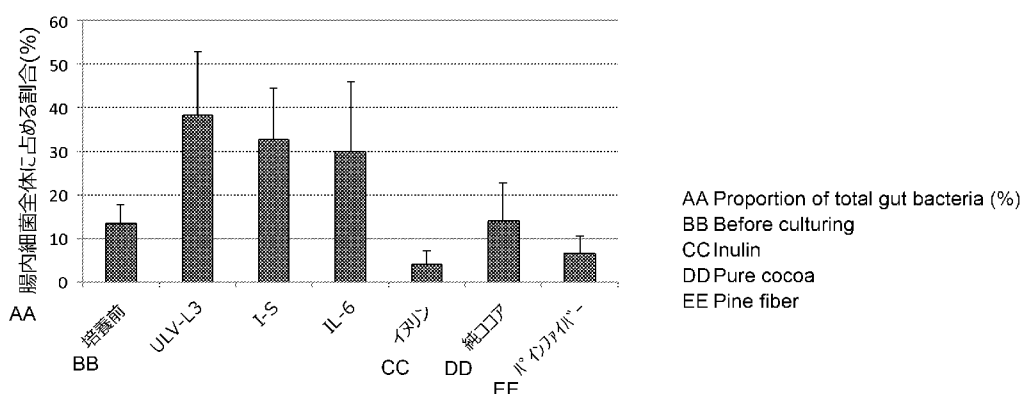
(74) 代理人: 特許業務法人秀和特許事務所(IP FIRM SHUWA); 〒1030004 東京都中央区東日本橋三丁目4番10号 アクロポリス21ビル8階 Tokyo (JP).

(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, JO, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) Title: PREBIOTIC COMPOSITION FOR BUTYRIC ACID BACTERIA

(54) 発明の名称: 酪酸菌用プレバイオティクス組成物



(57) Abstract: The present invention addresses the issue of providing a prebiotic that grows butyric acid bacteria. This prebiotic composition for butyric acid bacteria contains alginic acid and/or a salt thereof.

(57) 要約: 酪酸菌を増殖させるプレバイオティクスを提供することを課題とする。アルギン酸及び/又はその塩を含有する、酪酸菌用プレバイオティクス組成物。

[続葉有]

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：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 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)）

明 細 書

発明の名称： 酪酸菌用プロバイオティクス組成物

技術分野

[0001] 本発明は、酪酸菌用プロバイオティクス組成物に関する。

背景技術

[0002] 近年、腸内細菌と健康との関連性に注目が集まり、世界中で研究が行われている。腸内環境改善に関連する用語として知られる「プロバイオティクス」は、一般に腸内フローラのバランスを改善することにより人に有益な作用をもたらす生きた微生物を指し、ビフィズス菌等が一般的に知られている。また、かかるプロバイオティクスが資化するものとして「プレバイオティクス」があり、これは、消化管上部で分解・吸収されず、大腸に共生する有益な細菌の選択的な栄養源となりそれらの増殖を促進し、大腸の腸内フローラ構成を健康的なバランスに改善し維持し、ヒトの健康の増進維持に役立つものを一般に意味する。

[0003] 大腸に共生する有益な細菌のひとつとして、酪酸菌がある。酪酸は、腸内に存在する短鎖脂肪酸のひとつであり、大腸細胞にエネルギーを提供する主要な栄養素としてだけでなく、宿主の遺伝子発現、細胞分化、腸組織発生、免疫調節、酸化ストレス低下、及び下痢コントロールなど、腸内のみならず種々の機能を調節する細胞メディエーターである（非特許文献1）。

健康のために酪酸を体内に取り込むことは有用であるが、酪酸は非常に強い不快臭を放つため、食品や医薬品等の形態で摂取することは現実的ではない。また、腸内に生息する主な酪酸菌は、酸素感受性が極端に高いために *in vitro* での培養が非常に困難であり、酪酸菌を製剤化して摂取することも難しい（非特許文献2）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Cell. 2016 Jun 2;165(6):1332-1345

非特許文献2 : Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2017 Dec;31(6):643-648.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] かかる状況に鑑み、本発明者らは腸内に生息する酪酸菌を増殖させることが健康の維持・向上のために有用であると考えた。したがって、本発明は、酪酸菌を増殖させるプレバイオティクスを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、アルギン酸及び／又はその塩が、腸内で酪酸菌を著しく増殖させることができることを見出し、これを酪酸菌用のプレバイオティクスの有効成分とすることに想到し、本発明を完成するに至った。

- [0007] すなわち、本発明の一つの態様は、アルギン酸及び／又はその塩を含有する、酪酸菌用プレバイオティクス組成物である。

好ましくは、前記酪酸菌は、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌である。

好ましくは、本発明の組成物はアルギン酸及び／又はその塩を組成物全体の0.1質量%以上含有する。

本発明の組成物は、好ましくは飲食品である。

また、本発明の組成物は、好ましくは医薬品である。

- [0008] 本発明の別の態様は、酪酸菌用プレバイオティクス組成物の製造における、アルギン酸及び／又はその塩の使用である。

本発明の別の態様は、腸内での酪酸菌の増殖における、アルギン酸及び／又はその塩の使用である。

本発明の別の態様は、腸内で酪酸菌を増殖させるために用いられる、アルギン酸及び／又はその塩である。

本発明の別の態様は、アルギン酸及び／又はその塩を動物に投与することを含む、腸内で酪酸菌を増殖させる方法。

これらの態様において、前記酪酸菌は、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌であることが好ましい。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、腸内で酪酸菌を効率的に増殖させることができるプレバイオティクスが提供される。酪酸菌が産生する酪酸は、細胞メディエーターとして機能し健康を維持向上させるため、本発明は産業上非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]試料を添加して腸内細菌を中和培養した後の、酪酸菌（フィーカリバクテリウム・プラスニッチ）の腸内細菌全体に占める割合を示すグラフ（ $n = 6$ ）。

[図2]試料を添加して腸内細菌を中和培養した後の、酪酸菌（ゲンミゲル・フォルミシリス）の腸内細菌全体に占める割合を示すグラフ（ $n = 6$ ）

[図3]試料を添加して腸内細菌を中和培養した後の酪酸濃度を示すグラフ（ $n = 6$ ）。

[図4]アルギン酸ナトリウム素材摂取前後の、各被験者の糞便 1 g あたりのフィーカリバクテリウム・プラスニッチの細菌数を示すグラフ（ $n = 6$ ）。

発明を実施するための形態

[0011] 次に、本発明を詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されず、本発明の範囲内で自由に変更することができるものである。

[0012] 本発明の組成物は、アルギン酸及び／又はその塩（以降「アルギン酸類」とも記す）を含有する。

アルギン酸は、コンブやワカメ等の海藻に含まれる多糖類であり、増粘安定剤として食品への適用を含め広く利用されている。アルギン酸は β -D-マンヌロン酸と α -L-グルロン酸とが1-4結合してなる直鎖構造を有する。アルギン酸の重合度は由来によりさまざまであるが、本発明においては特に限定されない。

アルギン酸の塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、ア

ンモニウム塩等が挙げられ、本発明においては特に限定されないが、ナトリウム塩及びカリウム塩が水溶性の観点から好ましい。

[0013] アルギン酸類は、海藻等から抽出して取得することができる他、市販のものを本発明に用いてもよい。

[0014] 本発明の組成物におけるアルギン酸類の量は、組成物の態様により適宜設定すればよく、特に限定されないが、例えば、好ましくは組成物全体の0.1質量%以上、より好ましくは1質量%以上とするのがよい。アルギン酸類の含有量の上限は特に制限されないが、例えば組成物全体の5質量%以下、又は100質量%以下であってよい。なお、これらの数値は、アルギン酸塩の場合は、アルギン酸に換算した値である。また、これらの含有量は、本発明の組成物の製造時の値、流通時の値、及び摂取（投与）時の値を含む。

[0015] 本発明の組成物は、酪酸菌用プレバイオティクスとして用いられる。すなわち、腸内の酪酸菌により資化されその増殖を促進させることができる。

[0016] なお、酪酸菌とは、酪酸を産生する細菌の総称である。本発明における酪酸菌は、特に限定されないが、例えばフィーカリバクテリウム属、コプロコッカス属、クロストリジウム属、ユーバクテリウム属、ゲンミゲル属等に属する細菌が挙げられ、より具体的にはヒト腸内に存在する、フィーカリバクテリウム・プラスニッチ、ゲンミゲル・フォルミシリス等が挙げられる。

[0017] なお、腸内で酪酸菌を増殖させることができること、すなわち酪酸菌により資化されることは、佐々木らの方法（Sasaki K. et al., PLoS ONE 12(7): e0180991）や、次の評価方法により確認することができる。

具体的には、試料を含有する培地中で腸内細菌を中和培養する培養工程、及び前記培養工程後の培地中の細菌叢の構成を解析する解析工程を含む方法により評価する。

被験試料（素材）がヒト小腸で通常吸収される糖類を含む場合は、前記培養工程の前に被験試料から分子量700以下の糖類を除去する前処理工程を行うことが好ましい。前記前処理工程は、好ましくはエタノール沈殿により行われる。該前処理工程により被験試料（素材）からヒト小腸で通常吸収さ

れる糖類、すなわち分子量700以下の糖類を予め除き、ヒト小腸で通常吸収されず大腸に到達する糖類を中和培養に供することにより、プレバイオティクスのヒト大腸での酪酸菌への影響を正確に感度よく評価することができる。なお、分子量700以下の糖類としては、ニストース、kestース、シュークロース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ラクトース等が挙げられる。

[0018] 前記中和培養工程は、 $\text{pH} > 5.5$ 、より好ましくは > 6.0 の条件下で行われる。好ましくは、培養を通して pH が好ましくは5.5以下にならないように、より好ましくは6.0以下にならないように、炭酸ナトリウム等の適当な中和剤を間欠的に添加する等して制御される。また、中和培養に用いる培地は、グルコース、フルクトース、ガラクトース、ラクトース等の小腸で吸収される糖類を実質的に含有しない限りにおいて特に限定されず、例えば糖類を含有しないYCF A培地が挙げられる。ここで、実質的に含有しないとは、好ましくは0.1% (w/v) 以下、より好ましくは0.05% (w/v) 以下、さらに好ましくは0.01% (w/v) である。

前記試料の培地への添加量としては、培養を妨げない限りにおいて任意に設定でき、例えば0.1~5% (w/v) とすることができる。

中和培養は、通常は嫌気条件下で行われる。

また、培養時間は、好ましくは12時間以上、より好ましくは24時間以上とし、通常は96時間以下、より好ましくは48時間以下とする。

[0019] 解析工程では、培養工程後の培地中の細菌叢の構成を解析する。例えば、シーケンス解析により腸内細菌を同定し、その存在量の割合を算出することにより解析を行う。ここで、培養前後で酪酸菌が増殖し、かつ酪酸菌の割合が通常は15%以上、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは40%以上に維持されている場合に、被験試料は酪酸菌の増殖を促進するプレバイオティクスであると判断される。

[0020] 本発明の組成物は、体内の酪酸が増加することにより予防又は改善しうる疾患や病態、あるいは体内の酪酸が減少することに起因する疾患や病態の対

象者に対して、有用となり得る。例えば、整腸用、免疫調節用、酸化ストレス低減用、又は下痢の予防・改善用、炎症性腸疾患用、大腸がんの予防用等とすることができる。

[0021] 本発明の別の態様は、酪酸菌用プレバイオティクス組成物の製造における、アルギン酸及び／又はその塩の使用である。

本発明の別の態様は、腸内での酪酸菌の増殖における、アルギン酸及び／又はその塩の使用である。

本発明の別の態様は、腸内で酪酸菌を増殖させるために用いられる、アルギン酸及び／又はその塩である。

本発明の別の態様は、アルギン酸及び／又はその塩を動物に投与することを含む、腸内で酪酸菌を増殖させる方法である。ここで、動物は、特に限定されないが、通常はヒトである。

[0022] 本発明の組成物の摂取（投与）時期は、特に限定されず、投与対象の状態に応じて適宜選択することが可能である。

[0023] 本発明の組成物の摂取（投与）量は、摂取（投与）対象の年齢、性別、状態、その他の条件等により適宜選択される。アルギン酸類の量として、好ましくは1～300mg/kg/日、より好ましくは、20～50mg/kg/日の範囲となる量を目安とするのがよい。

なお、摂取（投与）の量や期間にかかわらず、薬剤は1日1回又は複数回に分けて投与することができる。

[0024] 本発明の組成物の摂取（投与）経路は、経口又は非経口のいずれでもよいが、通常は経口である。また、非経口摂取（投与）としては、直腸投与等が挙げられる。

[0025] 本発明の組成物は、アルギン酸類とともに酪酸菌を含有する態様でもよい。また、本発明の組成物は、酪酸菌又は酪酸菌を含有する製剤と併用して摂取されてもよい。かかる態様により、腸内における酪酸菌増殖促進効果、及びそれによる酪酸増加効果がより期待できる。

なお、これらの態様の場合、酪酸菌は生菌であることが好ましい。

- [0026] 本発明の組成物を経口摂取される組成物とする場合は、飲食品の態様とすることが好ましい。
- [0027] 飲食品としては、アルギン酸類の効果を損なわず、経口摂取できるものであれば形態や性状は特に制限されず、アルギン酸類を含有させること以外は、通常飲食品に用いられる原料を用いて通常の方法によって製造することができる。
- [0028] 飲食品としては、液状、ペースト状、ゲル状固体、粉末等の形態を問わず、例えば、錠菓；流動食（経管摂取用栄養食）；パン、マカロニ、スパゲッティ、めん類、ケーキミックス、から揚げ粉、パン粉等の小麦粉製品；即席めん、カップめん、レトルト・調理食品、調理缶詰め、電子レンジ食品、即席スープ・シチュー、即席みそ汁・吸い物、スープ缶詰め、フリーズ・ドライ食品、その他の即席食品等の即席食品類；農産缶詰め、果実缶詰め、ジャム・マーマレード類、漬物、煮豆類、農産乾物類、シリアル（穀物加工品）等の農産加工品；水産缶詰め、魚肉ハム・ソーセージ、水産練り製品、水産珍味類、つくだ煮類等の水産加工品；畜産缶詰め・ペースト類、畜肉ハム・ソーセージ等の畜産加工品；加工乳、乳飲料、ヨーグルト類、乳酸菌飲料類、チーズ、アイスクリーム類、調製粉乳類、クリーム、その他の乳製品等の乳・乳製品；バター、マーガリン類、植物油等の油脂類；しょうゆ、みそ、ソース類、トマト加工調味料、みりん類、食酢類等の基礎調味料；調理ミックス、カレーの素類、たれ類、ドレッシング類、めんつゆ類、スパイス類、その他の複合調味料等の複合調味料・食品類；素材冷凍食品、半調理冷凍食品、調理済冷凍食品等の冷凍食品；キャラメル、キャンディー、チューインガム、チョコレート、クッキー、ビスケット、ケーキ、パイ、スナック、クラッカー、和菓子、米菓子、豆菓子、デザート菓子、ゼリー、その他の菓子などの菓子類；炭酸飲料、天然果汁、果汁飲料、果汁入り清涼飲料、果肉飲料、果粒入り果実飲料、野菜系飲料、豆乳、豆乳飲料、コーヒー飲料、お茶飲料、粉末飲料、濃縮飲料、スポーツ飲料、栄養飲料、アルコール飲料、その他の嗜好飲料等の嗜好飲料類、ベビーフード、ふりかけ、お茶漬けのり等

のその他の市販食品等；育児用調製粉乳；経腸栄養食；機能性食品（特定保健用食品、栄養機能食品）等が挙げられる。

[0029] また、飲食品の一態様として飼料とすることもできる。飼料としては、ペットフード、家畜飼料、養魚飼料等が挙げられる。

飼料の形態としては特に制限されず、アルギン酸類の他に例えば、トウモロコシ、小麦、大麦、ライ麦、マイロ等の穀類；大豆油粕、ナタネ油粕、ヤシ油粕、アマニ油粕等の植物性油粕類；フスマ、麦糠、米糠、脱脂米糠等の糠類；コーングルテンミール、コーンジャムミール等の製造粕類；魚粉、脱脂粉乳、ホエイ、イエローグリース、タロー等の動物性飼料類；トルラ酵母、ビール酵母等の酵母類；第三リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の鉱物質飼料；油脂類；単体アミノ酸；糖類等を含有するものであってよい。

[0030] 本発明の組成物が飲食品（飼料を含む）の態様である場合、酪酸菌用プレバイオティクスであることや腸内の酪酸菌を増殖させるという用途が表示された飲食品として提供・販売されることが可能である。

[0031] かかる「表示」行為には、需要者に対して前記用途を知らしめるための全ての行為が含まれ、前記用途を想起・類推させうるような表現であれば、表示の目的、表示の内容、表示する対象物・媒体等の如何に拘わらず、全て本発明の「表示」行為に該当する。

また、「表示」は、需要者が上記用途を直接的に認識できるような表現により行われることが好ましい。具体的には、飲食品に係る商品又は商品の包装に前記用途を記載したものを譲渡し、引き渡し、譲渡若しくは引き渡しのために展示し、輸入する行為、商品に関する広告、価格表若しくは取引書類に上記用途を記載して展示し、若しくは頒布し、又はこれらを内容とする情報に上記用途を記載して電磁氣的（インターネット等）方法により提供する行為等が挙げられる。

[0032] 一方、表示内容としては、行政等によって認可された表示（例えば、行政が定める各種制度に基づいて認可を受け、そのような認可に基づいた態様で行う表示等）であることが好ましい。また、そのような表示内容を、包装、

容器、カタログ、パンフレット、POP等の販売現場における宣伝材、その他の書類等へ付することが好ましい。

[0033] また、「表示」には、健康食品、機能性食品、経腸栄養食品、特別用途食品、保健機能食品、特定保健用食品、栄養機能食品、機能性表示食品、医薬用部外品等としての表示も挙げられる。この中でも特に、消費者庁によって認可される表示、例えば、特定保健用食品、栄養機能食品、若しくは機能性表示食品に係る制度、又はこれらに類似する制度にて認可される表示等が挙げられる。具体的には、特定保健用食品としての表示、条件付き特定保健用食品としての表示、身体の構造や機能に影響を与える旨の表示、疾病リスク減少表示、科学的根拠に基づいた機能性の表示等を挙げることができ、より具体的には、健康増進法に規定する特別用途表示の許可等に関する内閣府令（平成二十一年八月三十一年内閣府令第五十七号）に定められた特定保健用食品としての表示（特に保健の用途の表示）及びこれに類する表示が典型的な例である。

かかる表示としては、例えば、「酪酸菌を増やしたい方」、「フィーカリバクテリウム属細菌を増やしたい方」、「酪酸で整腸作用」等と表示することが挙げられる。

[0034] 本発明の組成物は、医薬品の態様とすることもできる。

医薬品の投与経路は、経口又は非経口のいずれでもよいが経口が好ましい。また、非経口摂取（投与）としては、直腸投与等が挙げられる。

医薬品の形態としては、投与方法に応じて、適宜所望の剤形に製剤化することができる。例えば、経口投与の場合、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等の固形製剤；溶液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤等の液剤等に製剤化することができる。また、非経口投与の場合、座剤、軟膏剤、注射剤等に製剤化することができる。

製剤化に際しては、アルギン酸類の他に、通常製剤化に用いられている賦形剤、pH調整剤、着色剤、矯味剤等の成分を用いることができる。また、他の薬効成分や、公知の又は将来的に見出されるプレバイオティクスなどを

併用することも可能である。

加えて、製剤化は剤形に応じて適宜公知の方法により実施できる。製剤化に際しては、適宜、製剤担体を配合して製剤化してもよい。

[0035] 賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニット、ソルビット等の糖誘導体；トウモロコシデンプン、馬鈴薯デンプン、 α -デンプン、デキストリン、カルボキシメチルデンプン等のデンプン誘導体；結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等のセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルラン；軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム等の珪酸塩誘導体；リン酸カルシウム等のリン酸塩誘導体；炭酸カルシウム等の炭酸塩誘導体；硫酸カルシウム等の硫酸塩誘導体等が挙げられる。

[0036] 結合剤としては、例えば、上記賦形剤の他、ゼラチン；ポリビニルピロリドン；マクロゴール等が挙げられる。

[0037] 崩壊剤としては、例えば、上記賦形剤の他、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドン等の化学修飾されたデンプン又はセルロース誘導体等が挙げられる。

[0038] 滑沢剤としては、例えば、タルク；ステアリン酸；ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等のステアリン酸金属塩；コロイドシリカ；ピーガム、ゲイロウ等のワックス類；硼酸；グリコール；フマル酸、アジピン酸等のカルボン酸類；安息香酸ナトリウム等のカルボン酸ナトリウム塩；硫酸ナトリウム等の硫酸塩類；ロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム等のラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物等の珪酸類；デンプン誘導体等が挙げられる。

[0039] 安定剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン等のパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコール等のアルコール類；塩化ベンザルコニウム；無水酢酸；ソルビン酸等が挙げられる。

[0040] 矯味矯臭剤としては、例えば、甘味料、酸味料、香料等が挙げられる。

なお、経口投与用の液剤の場合に使用する担体としては、水等の溶剤等が挙げられる。

[0041] 本発明の医薬品を摂取するタイミングは、例えば食前、食後、食間、就寝前など特に限定されない。

実施例

[0042] 以下に実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0043] <試験例1> *in vitro*での酪酸菌増殖確認試験

(1) 被験試料の前処理

被験試料としては、アルギン酸ナトリウム、イヌリン、純ココア、及びバインファイバーを用い、以下のように調製した。

市販のアルギン酸ナトリウム素材（「I-S（分子量約300万～400万）」、「ULV-L3（分子量4万～6万）」、及び「IL-6（分子量約4万～6万）」、いずれも株式会社キミカ製）10gをそれぞれ、50mLの99.5%エタノール（Wako社050-00446）で溶解した。その後1,300×gで10分間遠心、上清を除去し、次いで99.5%エタノールを45mL加え混和し、1,300×gで10分間遠心した。再度上清を除去し、沈殿物を凍結乾燥させそれぞれ粉末を得た。これを0.1%(w/v)になるようMilliQ水に溶解後、0.22μmフィルター（メルクミリポア社製）を通過させ、試験に供する溶液を取得した。

市販のイヌリン（フジ日本精糖株式会社製）10gを100mLのMilliQ水に溶解後、約15mLずつ遠心チューブ（FALCON社352070）に分注し、30mLの99.5%エタノール（Wako社050-00446）を加え、混和した。その後×1,300gで10分間遠心、上清を除去し、次いで99.5%エタノールを45mL加え混和し、×1,300gで10分間遠心した。再度上清を除去し、沈殿物を凍結乾燥させ合計8.7gの粉末を得た。これを0.1%(w/v)になるようMilliQ水に溶解

後、0.22 μ m フィルター（メルクミリポア社製）を通過させ、試験に供する溶液を取得した。

市販の純ココア（森永製菓社製）400 g を2000 mL の Milli Q 水に溶解後、2時間煮沸した。その後約15 mL ずつ遠心チューブ（FALCON社352070）に分注し、30 mL の99.5%エタノール（Wako社050-00446）を加え、混和した。その後1,300 $\times$ g で10分間遠心、上清を除去し、次いで99.5%エタノールを45 mL 加え混和し、1,300 $\times$ g で10分間遠心した。再度上清を除去し、沈殿物を凍結乾燥させ合計14.3 g の粉末を得た。これを0.1% (w/v) になるよう Milli Q 水に溶解後、0.22 μ m フィルター（メルクミリポア社製）を通過させ、試験に供する溶液を取得した。

難消化性デキストリンであるパインファイバー（松谷化学社製）は、小腸で吸収されないため、前処理を行わず以下の中和培養に供した。

[0044] (2) 中和培養

糖を含有しない YCFA 培地を100 mL 作成し、pHコントロール可能な培養装置 Bio Jr. 8（株式会社バイオット社製BJR-25NA1S-8M）のベッセルに入れ、(1) で前処理した各被験試料を1 g 添加した。また、陰性対象として、被験試料を添加しない培地も用意した。各培地をベッセルごと、115℃20分間のオートクレーブ処理にかけた。その後、無菌的にフィルター滅菌処理したビタミン液とシステイン液を添加し、被験試料の終濃度が1% (w/v) となる培養液を調製した。その後、窒素置換を一晩行うことで嫌気状態とし、生理食塩水で10% (w/v) に予め調整しておいた糞便溶液100 μ L を添加し、pHが6以下にならないよう1 M の Na₂CO₃ 液でコントロールしながら24時間37℃で嫌気培養を行った。

なお、前記糞便は、通常の食餌を継続している健康なヒト（40歳代男性1名、30歳代男性2名、20歳代男性2名、及び30歳代女性1名）から提供されたものである。

[0045] (3) 腸内細菌の解析

前記(2)における24時間培養後の培養液を1 mL採取し、15,000×gで10分間遠心して沈殿を得た。前記沈殿を、450 μLの抽出液(100 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA, pH 9.0)に懸濁した後、10% SDS溶液50 μL、0.1 mm径のガラスビーズ300 mg、500 μLのTE飽和フェノール(和光純薬)と混合し、Fast Prep FP 100A(フナコシ社製)にてパワーレベル5、30秒の破碎処理を行った。次いで、14,000×gで5分間遠心後400 μLの上清を取り、250 μLのフェノール・クロロホルム溶液(和光純薬)を加えて混合し、14,000×gで5分間遠心後、250 μLの上清を取得した。さらに2-プロパノールを250 μL加えて得た沈殿を200 μLのTris-EDTAバッファー(pH 8.0)で溶解し、鋳型DNA溶液とした。

[0046] 次に細菌の16S rRNA遺伝子の第3~4可変領域を増幅させるための1stプライマーセット(配列番号1及び2)と、次世代シーケンサーMiseq(イルミナ社製)にて解析するために必要な2ndプライマーセット(配列番号3及び4、なおnは1度の解析で複数サンプルを処理するための任意の塩基配列(インデックス領域))を設計し、Life Technologies社のオリゴプライマー作成サービスによりプライマーを合成した。

鋳型DNA溶液および1stプライマーセットを含む総液量を25 μLとした反応液をTakara Ex Taq HS kit(タカラバイオ社製)を用いて調製した。Veriti 200(Life Technologies社製)により、94℃3分の後、94℃30秒、50℃30秒、72℃30秒を20回、72℃10分のPCR反応を行った。得られたPCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドパターンを確認した。続いて得られたPCR産物1 μLを鋳型とし、2ndプライマーセットを用いて上述した条件と同様にPCRを実施した。ただしPCRのサイクル数は20回ではなく15回とした。得られたPCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドパターンを確認後、QIAquick 96 PCR Puri

f i c a t i o n K i t (キアゲン社製) にて精製を行い、Q u a n t - i
T P i c o G r e e n d s D N A A s s a y k i t (L i f e T e c
h n o l o g i e s 社製) にて濃度を測定した。同濃度のDNA溶液を混合
したものをM i s e q v 2 R e a g e n t k i t (イルミナ社製) に供し
、M i s e q にてシーケンス解析を実施した。

[0047] 得られたペアエンド配列をQ I I M E s o f t w a r e (v e r s i o n
2. 0) (<http://qiime.org/>) にて腸内細菌叢の構成を解析し、その中の最
優勢酪酸菌 (フィーカリバクテリウム・プラスニッチ) 及び別の酪酸菌 (ゲ
ンミゲル・フォルミシリス) の腸内細菌全体に占める割合をそれぞれ算出し
、全被験者の平均を求めた。

[0048] 図1にフィーカリバクテリウム・プラスニッチの腸内細菌全体に占める割
合を示す。図2にゲンミゲル・フォルミシリスの腸内細菌全体に占める割合
を示す。アルギン酸ナトリウム存在下では、既知の酪酸菌の増加が報告され
ているイヌリンや、高カカオチョコと類似の組成を有する純ココア存在下に
比べて、酪酸菌が増殖したことが認められた。

[0049] (4) 酪酸濃度の測定

前記(2)における24時間培養後の培養上清を40 μ L用いて、以下の
測定を実施した。

サンプルのラベル化はラベル化試薬FAキット(YMC)を用いて行い、
N a n o F i l t e r P l u n g e r w (T H O M S O N) を用いて濾過
し、H P L C測定に供した。

酪酸の測定にはa l l i a n c e H P L C (w a t e r s) 及びY M C -
P a c k F A カラム(YMC)を用いた。移動相Aはメタノール、移動相C
は0.1% トリフルオロ酢酸(TFA)水溶液、移動相Dは0.1% T F
Aを溶解したアセトニトリル液を用いた。グラジエントプログラムは、(i)
0~5分: 移動相A 16%、移動相C 79%、移動相D 5%、(i i)
5~30分: 移動相A 16%、移動相C 54%、移動相D 30%、(i i i)
30~35分: 移動相A 16%、移動相C 79%、移動相D 30%、

(i v) 35～40分：移動相A 16%、移動相C 79%、移動相D 5%、
(v) 40～45分：移動相A 16%、移動相C 79%、移動相D 5%
と5段階でプログラムした。流速は1.00 mL/min、カラムオープン
温度は50℃に設定した。蛍光検出器を用いて吸光230 nmで測定した。

[0050] 図3に酪酸濃度の測定結果を示す。接種した糞便に比べて、アルギン酸ナ
トリウム(UL-6及びULV-L3)を添加して中和培養した後の培養溶
液では酪酸濃度の増加が認められた。

[0051] <試験例2>ヒトでの酪酸菌増殖確認試験

(1) アルギン酸ナトリウムの摂取

アルギン酸ナトリウム素材(ULV-L3)を1日2gずつ、5日間摂取
してもらった健常成人6名(男性3名、女性3名)に、摂取開始前及び摂取
5日後にそれぞれ、糞便を10℃以下かつ嫌気状態を保ちながら適量提供し
てもらった。

[0052] (2) 腸内細菌の解析

提供された糞便20mgを計りとり、それぞれ450μLの抽出液(10
mM Tris/HCl, 4mM EDTA, pH9.0)に懸濁した後、
10%SDS溶液50μL、0.1mm径のガラスビーズ300mg、50
0μLのTE飽和フェノール(和光純薬)と混合し、Fast Prep FP
100A(フナコシ社製)にてパワーレベル5、30秒の破碎処理を行った。
次いで、14,000×gで5分間遠心後400μLの上清を取り、25
0μLのフェノール・クロロホルム溶液(和光純薬)を加えて混合し、14
,000×gで5分間遠心後、250μLの上清を取得した。さらに2-ブ
ロパノールを250μL加えて得た沈殿を200μLのTris-EDTA
バッファー(pH8.0)で溶解し、鋳型DNA溶液とした。

[0053] 鋳型DNA溶液およびフィーカリバクテリウム・プラスニッチ検出用のプ
ライマーセット(配列番号5及び6)を含む総液量を20μLとした反応液
をTB Green Premix Ex Taq(タカラバイオ社製)を用い
て調製した。Applied Biosystems 7500リアルタイム

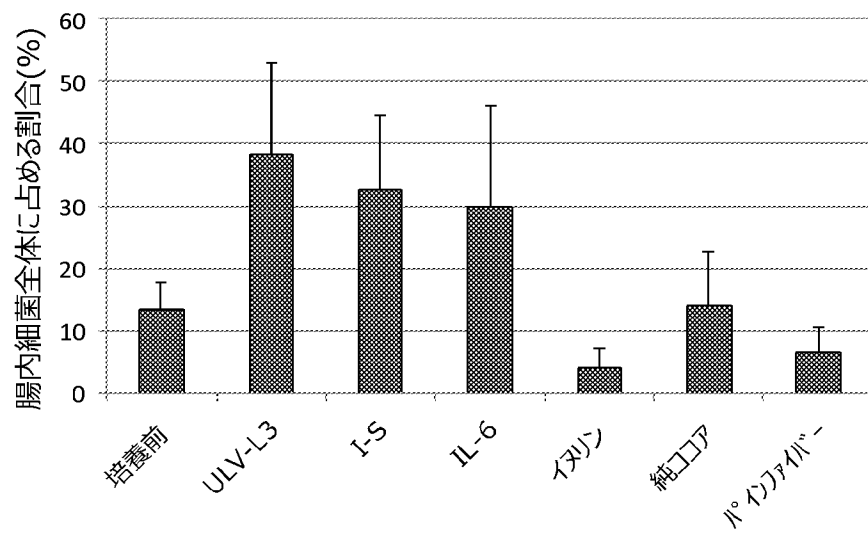
PCRシステム（サーモフィッシャー社製）により、95℃10秒の後、95℃3秒、60℃30秒の定量PCR反応を行い、フィー仮バクテリウム・プラスニッチの細菌数の測定とした。

[0054] 図4に各被験者の糞便1gあたりのフィーカリバクテリウム・プラスニッチの細菌数の、ULV-L3摂取開始前後での変化を示す。ULV-L3摂取により、6名中5名のフィーカリバクテリウム・プラスニッチが増加することが確認された。

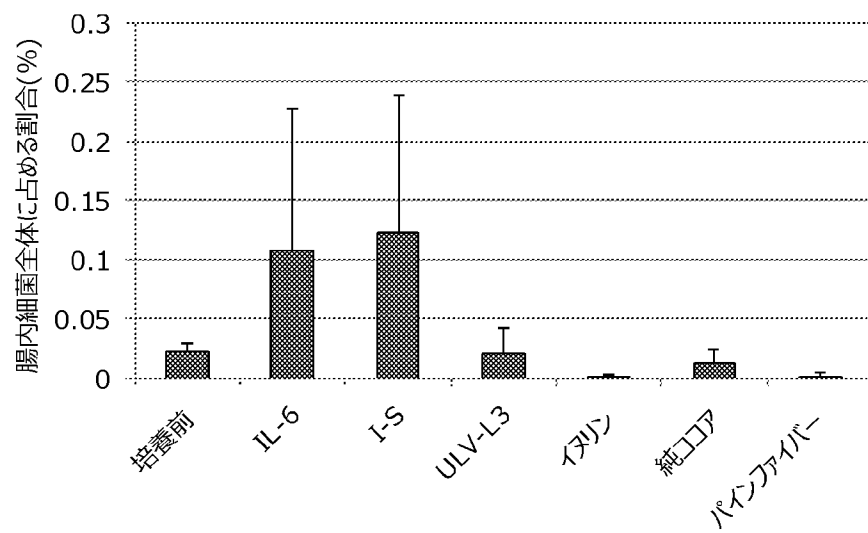
請求の範囲

- [請求項1] アルギン酸及び／又はその塩を含有する、酪酸菌用プレバイオティクス組成物。
- [請求項2] 前記酪酸菌が、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] アルギン酸及び／又はその塩を組成物全体の0.1質量%以上含有する、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 飲食品である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項5] 医薬品である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項6] 酪酸菌用プレバイオティクス組成物の製造における、アルギン酸及び／又はその塩の使用。
- [請求項7] 前記酪酸菌が、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌である、請求項6に記載の使用。
- [請求項8] 腸内での酪酸菌の増殖における、アルギン酸及び／又はその塩の使用。
- [請求項9] 前記酪酸菌が、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌である、請求項8に記載の使用。
- [請求項10] 腸内で酪酸菌を増殖させるために用いられる、アルギン酸及び／又はその塩。
- [請求項11] 前記酪酸菌が、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌である、請求項10に記載のアルギン酸及び／又はその塩。
- [請求項12] アルギン酸及び／又はその塩を動物に投与することを含む、腸内で酪酸菌を増殖させる方法。
- [請求項13] 前記酪酸菌が、フィーカリバクテリウム属細菌及び／又はゲンミゲル属細菌である、請求項12に記載の方法。

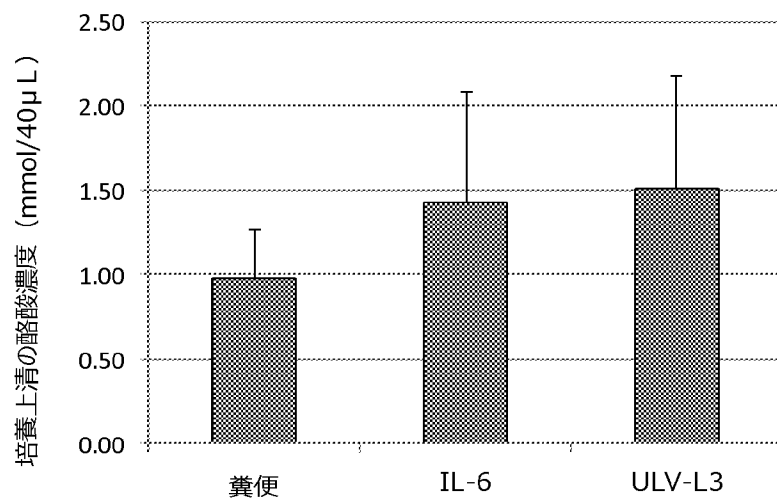
[図1]



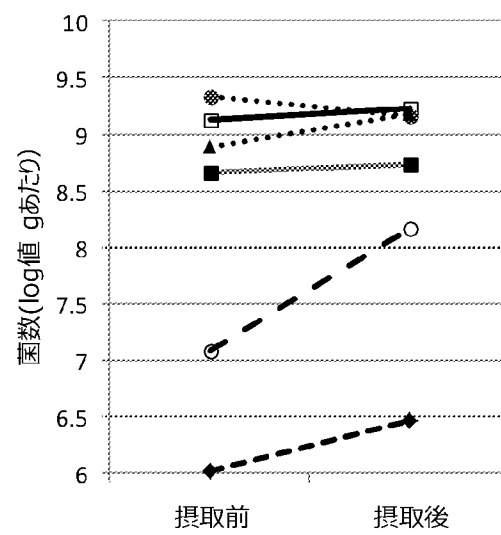
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/000013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A61K31/734(2006.01)i, A61P1/12(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P3/02(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P39/06(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A23L33/21(2016.01)i, C12N1/20(2006.01)n
FI: A23L33/21 ZNA, A61P1/14, A61P3/02, A61P43/00 105, A61P37/02, A61P39/06, A61P1/12, A61K31/734, C12N1/20 A

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)

Int. Cl. A23L33/00-33/195, A61K31/33-33/44, A61P1/00-43/00, C12N1/00-7/05

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	久田孝, 腸内腐敗物産生に及ぼすたん白質の種類の影響, 大豆たん白質研究, 2014, vol. 17, pp. 52-57, in particular, p. 52, "ABSTRACT [English]"; p. 54, right column, "Results and Observations", first paragraph and fig. 2; p. 56, "ABSTRACT [Japanese]" (KUDA, Takashi. Effects of Dietary Proteins on Putrefactive Compound Production in the Intestine. Soy Protein Research, Japan.)	1-13



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

20.02.2020

Date of mailing of the international search report

10.03.2020

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/JP2020/000013

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RAPOSO, Maria Filomena De Jesus et al., Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae, marine drugs (Open access journal), 14(2), 2016, [online], [retrieved on 20 February 2020], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.mdpi.com/1660-3397/14/2/27 > <DOI:10.3390/md14020027> in particular, p. 7, paragraph [0001], p. 16, paragraphs [0003], [0004]	1-13
X	TERADA, A. et al., Effect of Dietary Alginate on the Faecal Microbiota and Faecal Metabolic Activity in Humans, Microbial Ecology in Health and Disease, 1995, 8(6), pp. 259-266, in particular, p. 259 "Abstract"	1-13
X A	ROSE, DJ. et al., Starch-entrapped microspheres extend in vitro fecal fermentation, increase butyrate production, and influence microbiota pattern, Mol. Nutr. Food Res., 2009, 53, pp. 121-130, in particular, p. 121, right column, last paragraph, in particular, p. 127, table 2	10-11 1-13
X A	SEON, J. et al., Bacterial community structure in maximum volatile fatty acids production from alginate in acidogenesis, Bioresour Technol., 2014, 157, pp. 22-27, in particular, p. 22 "Abstract" in particular, p.22 "Abstract"	10-11 1-13

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/734(2006.01)i; A61P 1/12(2006.01)i; A61P 1/14(2006.01)i; A61P 3/02(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 39/06(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; A23L 33/21(2016.01)i; C12N 1/20(2006.01)n FI: A23L33/21 ZNA; A61P1/14; A61P3/02; A61P43/00 105; A61P37/02; A61P39/06; A61P1/12; A61K31/734; C12N1/20 A														
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）） A23L33/00-33/195, A61K31/33-33/44, A61P1/00-43/00, C12N1/00-7/08 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table> 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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年				
日本国実用新案公報	1922-1996年													
日本国公開実用新案公報	1971-2020年													
日本国実用新案登録公報	1996-2020年													
日本国登録実用新案公報	1994-2020年													
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>久田孝, 腸内腐敗物産生に及ぼすたん白質の種類の影響 (Effects of Dietary Proteins on Putrefactive Compound Production in the Intestine), 大豆たん白質研究, 2014, 17, pp.52-57 特にp.52の「ABSTRACT」、p.54右欄の「結果と考察」第1段落、Fig.2、p.56の「要約」</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>RAPOSO, Maria Filomena De Jesus et al., Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae, marine drugs (Open access journal), 14(2), 2016, [online], [retrieved on 2020.02.20], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.mdpi.com/1660-3397/14/2/27><DOI:10.3390/md14020027> 特にp.7 第1段落、p.16第3段落-第4段落</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>TERADA A. et al., Effect of Dietary Alginate on the Faecal Microbiota and Faecal Metabolic Activity in Humans, Microbial Ecology in Health and Disease, 1995, 8(6), pp.259-266 特にp.259「Abstract」</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			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	久田孝, 腸内腐敗物産生に及ぼすたん白質の種類の影響 (Effects of Dietary Proteins on Putrefactive Compound Production in the Intestine), 大豆たん白質研究, 2014, 17, pp.52-57 特にp.52の「ABSTRACT」、p.54右欄の「結果と考察」第1段落、Fig.2、p.56の「要約」	1-13	X	RAPOSO, Maria Filomena De Jesus et al., Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae, marine drugs (Open access journal), 14(2), 2016, [online], [retrieved on 2020.02.20], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.mdpi.com/1660-3397/14/2/27><DOI:10.3390/md14020027> 特にp.7 第1段落、p.16第3段落-第4段落	1-13	X	TERADA A. et al., Effect of Dietary Alginate on the Faecal Microbiota and Faecal Metabolic Activity in Humans, Microbial Ecology in Health and Disease, 1995, 8(6), pp.259-266 特にp.259「Abstract」	1-13
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	久田孝, 腸内腐敗物産生に及ぼすたん白質の種類の影響 (Effects of Dietary Proteins on Putrefactive Compound Production in the Intestine), 大豆たん白質研究, 2014, 17, pp.52-57 特にp.52の「ABSTRACT」、p.54右欄の「結果と考察」第1段落、Fig.2、p.56の「要約」	1-13												
X	RAPOSO, Maria Filomena De Jesus et al., Emergent Sources of Prebiotics: Seaweeds and Microalgae, marine drugs (Open access journal), 14(2), 2016, [online], [retrieved on 2020.02.20], Retrieved from the Internet: <URL: https://www.mdpi.com/1660-3397/14/2/27><DOI:10.3390/md14020027> 特にp.7 第1段落、p.16第3段落-第4段落	1-13												
X	TERADA A. et al., Effect of Dietary Alginate on the Faecal Microbiota and Faecal Metabolic Activity in Humans, Microbial Ecology in Health and Disease, 1995, 8(6), pp.259-266 特にp.259「Abstract」	1-13												
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 20.02.2020		国際調査報告の発送日 10.03.2020												
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 澤田 浩平 4N 3338 電話番号 03-3581-1101 内線 3488												

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	ROSE DJ. et al., Starch-entrapped microspheres extend in vitro fecal fermentation, increase butyrate production, and influence microbiota pattern, Mol. Nutr. Food Res., 2009, 53, pp.121-130 特にp.121右欄最終段落	10-11
A	特にp.127 Table 2	1-13
X	SEON J et al., Bacterial community structure in maximum volatile fatty acids production from alginate in acidogenesis, Bioresour Technol., 2014, 157, pp.22-27 特にp.22「Abstract」	10-11
A	特にp.22「Abstract」	1-13

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見: