(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-525794
(P2024-525794A)
(43)公表日　令和6年7月12日(2024.7.12)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/747(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/747	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*1/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全42頁）

(21)出願番号　特願2024-502018(P2024-502018)
(86)(22)出願日　令和4年7月15日(2022.7.15)
(85)翻訳文提出日　令和6年3月12日(2024.3.12)
(86)国際出願番号　PCT/IB2022/056538
(87)国際公開番号　WO2023/286027
(87)国際公開日　令和5年1月19日(2023.1.19)
(31)優先権主張番号　102021000018740
(32)優先日　令和3年7月15日(2021.7.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
イタリア(IT)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　317013544
アルファシグマ ソシエタ ペル アチオニ
イタリア国，４０１３３ ボローニャ，ヴィア ラガッツイ デル ’９９ エヌ．５
(74)代理人　100142594
弁理士　阪中 浩
(74)代理人　100090686
弁理士　鍬田 充生
(72)発明者　ビッフィ， アンドレア
イタリア国，４０１３３ ボローニャ，ヴィア ラガッツィ デル ’９９， ５，アルファシグマ ソシエタ ペル アチオニ内
(72)発明者　フィオーレ， ウォルター
イタリア国，４０１３３ ボローニャ，
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　新生児の治療におけるラクトバチルス・パラカゼイ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｐａｒａｃａｓｅｉ）菌株の使用

(57)【要約】
本発明は、炎症性及び／又は機能性の消化管障害、病原微生物の胃腸感染、寄生生物の胃腸感染、アレルギー、免疫介在性又は自己免疫性障害の治療、予防及び／又は治癒において、並びに被験体の成長のサポートにおいて、新生児及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用するための、ラクトバチルス・パラカゼイ種に属する少なくとも１つの菌株、好ましくは、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－０１ ＤＳＭ ２６７６０、並びにその組成物に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
炎症性及び／又は機能性の消化管障害を有する被験体の治療、予防及び／又は治癒方法に使用するための菌株であって、前記障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎、敗血症、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、主に便秘（prevalent constipation）を伴う又は便秘型腸（constipated bowel）のＩＢＳ、主に下痢（prevalent diarrhoea）を伴う又は下痢型腸（diarrhoeic bowel）のＩＢＳ、交代型腸（alternating bowel）のＩＢＳ、未分類のＩＢＳ、慢性炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病、潰瘍性直腸結腸炎、喘息、肥満、１型糖尿病、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、癌、自閉症、アレルギー、免疫介在性・自己免疫性障害を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、前記免疫介在性・自己免疫性障害が、セリアック病、グレーブス病、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、１型糖尿病、全身性エリテマトーデス（狼瘡）、脈管炎、アジソン病、多発性筋炎、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、糸球体腎炎（腎臓の炎症）、不妊及び前記被験体の体重増加のサポートから選択され、
・前記菌株が、ラクトバチルス・パラカゼイ（Lactobacillus paracasei）種に属し、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、
・前記被験体が、生後４週間以内の新生児被験体である、
菌株。
【請求項２】
前記被験体の月齢が、１か月から１２か月以下である、請求項１記載の使用のための菌株。
【請求項３】
前記株が、生存可能な菌株（viable strain of bacteria）又は前記菌株の誘導体であり、後者が、間欠滅菌した（tyndallized）菌株、超音波処理した菌株、放射線、好ましくは、ガンマ放射線による不活性化菌株、溶解した菌株又は細菌ホモジネート、前記菌株抽出物又は壁画分を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、好ましくは、間欠滅菌した菌株である、請求項１又は２記載の使用のための菌株。
【請求項４】
前記障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎、敗血症、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、主に便秘を伴う又は便秘型腸のＩＢＳ、主に下痢を伴う又は下痢型腸のＩＢＳ、交代型腸のＩＢＳ、未分類のＩＢＳ、慢性炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病、潰瘍性直腸結腸炎を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用のための菌株。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための混合物Ｍであって、
ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択されるラクトバチルス・パラカゼイ種に属する菌株、並びに
食品グレード又は医薬品グレードの少なくとも１つの添加物及び／又は賦形剤
を含むか、あるいはそれらからなる、混合物Ｍ。
【請求項６】
請求項５記載の使用のための混合物Ｍであって、
ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択されるラクトバチルス・パラカゼイ種に属する菌株、並びに
・ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＢｂＩＢＳ０１

ＤＳＭ　３３２３１、
・ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０２　ＤＳＭ　３３２３２、
・ビフィドバクテリウム・アニマリス・亜種・ラクティス（Bifidobacterium animalis subsp. lactis）ＢｌＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３３、
・ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）ＬｐＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３４、
・ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）ＢｂｆＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３２７０８、及び
それらの混合物
を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される少なくとも１つのさらなる菌株を含むか、あるいはそれらからなる、混合物Ｍ。

【請求項７】
請求項５又は６のいずれか一項に記載の使用のための混合物Ｍであって、
・ビタミンＡ群、Ｂ群、Ｃ群、Ｄ群、Ｅ群及び／又はＫ群から少なくとも１つのビタミン、好ましくは、ビタミンＢ群及び／又はビタミンＤ群、
・グルタチオン、レスベラトロール及びｔｒａｎｓ－レスベラトロールなどのポリフェノール、コエンザイムＱ１０、アスタキサンチン、リコペンを含むか、あるいはそれらからなる群より選択される１又は複数の抗酸化物質、
・ボタニカル（植物粗加工物、botanicals）又はその抽出物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される、好ましくは、バレリアン、パッションフラワー、レモンバーム、セイヨウサンザシ及びカモミールから選択される、腸弛緩作用を有する１又は複数の植物物質、
・ミネラル又はその塩、例えば、亜鉛、セレン、マグネシウム、カリウム、
・オメガ９を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される１又は複数の一不飽和脂肪酸、並びに／あるいは多不飽和脂肪酸、オメガ３及びオメガ６、
・１又は複数の免疫賦活物質、下痢止め物質及び／又は栄養素、
・好ましくは、イヌリン、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）、キシロオリゴ糖（xylitol-oligosaccharide）（ＸＯＳ）、グアーガム、ラクトフェリン及びそれらの混合物からなる群（ＩＩ）より選択される少なくとも１つのプレバイオティック、より好ましくは、イヌリン、
並びにそれらの混合物
を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される少なくとも１つのさらなる活性成分をさらに含む、混合物Ｍ。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、炎症性及び／又は機能性の消化管（胃腸管）障害、好ましくは、新生児仙痛又は早産新生児の慢性腸炎（例えば、壊死性腸炎）の治療（treatment）、予防（preventive）及び／又は治癒（curative）において、病原微生物（例えば、ウイルス又は細菌）の胃腸感染、寄生生物の胃腸感染、アレルギー、免疫介在性又は自己免疫性障害の治療、予防及び／又は治癒において、並びに被験体の成長のサポート治療（支持治療、supportive treatment）において、生後４週間以内の新生児被験体に使用するための、ラクトバチルス・パラカゼイ（Lactobacillus paracasei）種に属する少なくとも１つの菌株、好ましくは、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（Lactobacillus paracasei DG）（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、並びにそれらの組成物に関する。

【０００２】
新生児の腸への微生物定着は、出生（誕生）直後から始まり、粘膜バリア機能の発達、腸の恒常性、及び免疫系の成熟に不可欠なものである。

【０００３】

本発明の文脈において、用語「新生児（newborn）」又は「新生児被験体（newborn subject）」は、出生（誕生）の瞬間から生後４週間（２８日）までの期間における哺乳動物（ヒト又は動物被験体）を指す。

【０００４】

赤ん坊（baby）の生後数日においては、多数の因子が腸内微生物叢（gut microbiota）の組成に影響を及ぼす：母親の膣及び／又は皮膚の微生物叢、経膣分娩又は帝王切開、母乳（授乳）又は人工乳の授乳、並びに抗生物質及び／又は他の薬物の投与。特に、帝王切開、人工乳、早産及び抗生物質の使用は、微生物叢中の有益な細菌（善玉菌）種の存在量（abundance）及び多様性を低減させ、ディスバイオシスの状態を促進する。これは、結果として、腸仙痛、早産新生児の壊死性腸炎の発病のリスク、及び晩年の免疫介在性疾患（アレルギー又は炎症性若しくは機能性腸疾患、及び／又は関連する症状など）の発症を増大させるおそれがある。

【０００５】

現在、体重１，５００ｇ未満の早産新生児の約１２％が壊死性腸炎を患い、約１／３が敗血症又は他の合併症で死亡している。

【０００６】

生後数週間では、内臓の成熟が完全ではなく、その結果として内臓機能が子供又は成人（衰弱していたり、病気であったりする子供又は成人であっても）の機能に匹敵しないため、新生児は、生理学的に、「虚弱な（fragile）」成人にも、幼い子供にさえも匹敵しない。

【０００７】

「腸内微生物叢」は、胃腸（gastro-enteric又はgastro-intestinal）環境に存在するすべての微生物（すべての細菌、古細菌、真核生物及びウイルス）を指す。

【０００８】

微生物叢は、宿主生物に対して多くの有用な活動を行う。実際に、微生物叢を構成する微生物は、多糖類を分解して消化機能を補助し、ビタミンを合成し、病原性種の定着（colonisation）を阻害し、腸の発達に必要なシグナルを提供し、炎症及び免疫反応（応答）の調節に寄与する。多くの胃腸障害の病因は、他の器官系（systems）に影響を及ぼす障害と同様に、腸内微生物に対する異常な免疫学的反応（応答）であると考えられている。また、腸内微生物叢は、微生物叢が産生する代謝物及び腸細胞とともに障壁（バリア）を構成し、その機能不全は、病原微生物の感染のみならず多くの免疫介在性障害の病態生理に関与している。

【０００９】

良好な健康状態を維持するためには、免疫系と腸内に存在する微生物とのバランスが保たれていることが必要である。したがって、このバランスの状態は、腸内微生物叢の組成に依存することも示されている。微生物叢がアンバランスであることは、用語「ディスバイオシス」として知られ、免疫系障害をもたらす可能性があり、腸内及び他の器官系内の両方に有害な影響を引き起こす。

【００１０】

したがって、プロバイオティック菌株（プロバイオティック細菌株、probiotic bacterial strains）（すなわち、適切な量で投与されると健康上の利益をもたらす生きた微生物）の有益な効果は、主に、腸管バリアの透過性を正常化し、腸内微生物叢（intestinal microbiota）を整え（regularising）、そして微生物叢と免疫学的反応とのバランスを回復させることに起因する。

【００１１】

本発明が取り組み解決する技術的課題は、新生児被験体及び／又は生後数か月以内（１か月から１２か月以内；１か月は２８日又は２９日又は３０日又は３１日であってもよい。）の哺乳動物被験体において、炎症性又は機能性の胃腸疾患又は症状（例えば、腸仙痛、慢性腸炎など）及び病原微生物の胃腸感染又は寄生生物の胃腸感染の治療（処置）のための有効な解決策を提供することにある。

【００１２】
さらに、本発明は、治療（処置）した被験体の晩年において、胃腸系に関連するアレルギー及び／又は免疫介在性若しくは自己免疫性障害（例えば、セリアック病）の発病を予防的に治療（処置）するという技術的課題に取り組み解決する。最後に、本発明の目的は、新生児及び／又は生後数か月以内の哺乳動物被験体の身体成長をサポート（支持）するための有効な解決策を提供することにある。
【００１３】
本出願人は、研究開発活動に続いて、新生児及び／又は生後数か月以内の被験体において適切でラクトバチルス（特に、ラクトバチルス・パラカゼイ）に富む腸内微生物叢の発達に効果的にかつ効率的に寄与する、ラクトバチルス・パラカゼイ種に属する少なくとも１つの菌株（ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０など）、並びにそれらの組成物（要するに、本発明の組成物）を提供することにより、上述の技術的課題に取り組み解決する。
【００１４】
ラクトバチルス属（genus Lactobacillus）の菌株（細菌株、strains of bacteria）のうち、ラクトバチルス・パラカゼイ種［ラクトバチルス・パラカゼイ株ＤＧ（Lactobacillus paracasei strain DG）（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイ株ＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０など］は、プロバイオティック菌株として一般的に使用される種に属する。特に、Ｌ．パラカゼイ株ＤＧ（L. paracasei strain DG）（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２は、その有益な特性に関して広く研究されている。しかし、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に対するＬ．パラカゼイＤＧ（L. paracasei DG）（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２の効果は、現在まで研究されていなかった。
【００１５】
留意すべきことは、Ｚｈｅｎｇらによって科学雑誌Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020に発表されたラクトバチルス属の再分類を受けて、菌株Ｌ．カゼイＤＧ（L. casei DG）（登録商標）（ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）又はＬ．パラカゼイＤＧ（登録商標）（ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）が、２０２２年２月２日にラクチカゼイバチルス・パラカゼイＤＧ（Lacticaseibacillus paracasei DG）Ｉ－１５７２　ＤＳＭ　３４１５４として再寄託されたことである。上述の２つの名称は、常に同じ菌株（細菌株）を指すため、互いに交換可能である。
【００１６】
新生児時期（生後４週間）以内の被験体に投与される本発明によるＬ．パラカゼイ株ＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及びＬ．パラカゼイ株ＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、それらの混合物及び組成物は、投与期間中及び／又は生後数か月の間、効果的にかつ効率的に腸管に定着できるようであり、腸内微生物叢と免疫系とのバランスを宿主にとって有益なものとし、かつ腸管バリアの透過性を強化する。
【００１７】
最後に、本発明の菌株、それらの混合物及び組成物は、忍容性が良好であり、関連する副作用がなく、容易に調製され、かつ費用対効果が高い。
【００１８】
これらの目的などは、以下の詳細な説明から明らかになり、添付の特許請求の範囲に係る技術的特徴により、本発明の組成物及び混合物によって達成される。
【図面の簡単な説明】
【００１９】
【図１】図１：臨床試験（clinical study）のスキーム。
【図２】図２Ａ～２Ｅ：群（アーム、arm）１（分析対象の組成物；Ｔｘ）及び群２（プラセボ）において、Ｖ１～Ｖ５の予定来院（control visits）中に収集した糞便サンプル中のＬ．カゼイＤＧ（登録商標）の定量化。

【図３】図３Ａ～３Ｄ：Ｖ１～Ｖ５の予定来院の時点でのラクトバチルス種（Lactobacillus spp.）の相対存在量のヒストグラム。
【図４】図４：ブタン酸及びプロパン酸を含む、同定した代謝物を示す部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ）のメタボロームの優位性（metabolomic predominance）。
【図５】図５．試験デザインのフローチャート。６０名の参加者を治験（clinical trial）に登録し、１：１の比で投与群の１つにランダム化（無作為化）した。プラセボ群のうち２０名及び治療群のうち２６名が試験を完了した。プラセボ群のうち２０名の被験体及び治療群のうち２６名の被験体が試験を完了した。
【図６Ａ】図６．Ｌ．カゼイＤＧ（ＬＣＤＧ）は、最初の投与の１０日後から腸内で検出され、最終来院（last visit）（８４日）まで持続したままであった。（Ａ）箱ひげ図は、プラセボ群と治療群とを区別した、各経過観察（フォローアップ）時点のＬＣＤＧ濃度を示す。
【図６Ｂ】図６．Ｌ．カゼイＤＧ（ＬＣＤＧ）は、最初の投与の１０日後から腸内で検出され、最終来院（last visit）（８４日）まで持続したままであった。（Ｂ）データを被験体の出生体重に応じて層別化した：ＶＬＷ（極低体重）、ＬＷ（低体重）、ＮＷ（正常体重）。Ｌ．カゼイＤＧ濃度（ＣＦＵ／ｍＬ）の中央値、２５パーセンタイル、７５パーセンタイル、最小値及び最大値を、各群について示した。上部のバーは、統計的に有意な比較を表す（ｐ値＜０．０５）。
【図８Ａ】図８．ＬＣＤＧ治療は、腸内マイクロバイオーム（gut microbiome）の異種性（heterogeneity）を維持することができた。（Ａ）１０日目、２８日目、５６日目及び８４日目（それぞれ、Ｖ２、Ｖ３、Ｖ４及びＶ５）でのプラセボ群と治療群との間のα多様性分析（解析）。
【図８Ｂ】図８．ＬＣＤＧ治療は、腸内マイクロバイオームの異種性を維持することができた。（Ｂ）β多様性分析（解析）。多様性マトリックスを、プラセボ群と治療群との間の様々な時点でのＰＣｏＡとして表されるＵｎｗｅｉｇｈｔｅｄ　ＵｎｉＦｒａｃアルゴリズムを用いて得た。
【図８Ｃ】図８．ＬＣＤＧ治療は、腸内マイクロバイオームの異種性を維持することができた。（Ｃ）様々な時点での比較に適用した門（phylum）レベルでのＯＴＵ分布及びクラスカル・ウォリス検定のヒストグラム。
【図８Ｄ】図８．ＬＣＤＧ治療は、腸内マイクロバイオームの異種性を維持することができた。（Ｄ）すべての時点でのラクトバチルス種の相対存在量を示すヒストグラム。
【図９Ａ】図９．ＬＣＤＧの投与は短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）の濃度を増大させた。代謝物分析を、各時点でのプラセボ群と治療群とを比較する部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ；左：スコアグラフ；右：ＶＩＰスコア）として示す。（Ａ）Ｖ１。
【図９Ｂ】図９．ＬＣＤＧの投与は短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）の濃度を増大させた。代謝物分析を、各時点でのプラセボ群と治療群とを比較する部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ；左：スコアグラフ；右：ＶＩＰスコア）として示す。（Ｂ）Ｖ２。
【図９Ｃ】図９．ＬＣＤＧの投与は短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）の濃度を増大させた。代謝物分析を、各時点でのプラセボ群と治療群とを比較する部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ；左：スコアグラフ；右：ＶＩＰスコア）として示す。（Ｃ）Ｖ３。
【図９Ｄ】図９．ＬＣＤＧの投与は短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）の濃度を増大させた。代謝物分析を、各時点でのプラセボ群と治療群とを比較する部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ；左：スコアグラフ；右：ＶＩＰスコア）として示す。（Ｄ）Ｖ４。
【図９Ｅ】図９．ＬＣＤＧの投与は短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）の濃度を増大させた。代謝物分析を、各時点でのプラセボ群と治療群とを比較する部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ；左：スコアグラフ；右：ＶＩＰスコア）として示す。（Ｅ）Ｖ５。
【図１０Ａ】図１０．ＬＣＤＧの投与は、微生物叢の生態（ecology）及び機能の両方に影響を与え、腸内に存在する細菌の生態的地位（ecological niches）及び対応する機能的プロファイル（functional profile）を変化させた。ラクトバチルス・パラカゼイと、代謝物と、ＯＴＵとの間の２８日での相関分析（Ｖ３；治療の終了）。（Ａ）代謝

物とラクトバチルス・パラカゼイ（ＣＦＵ／ｍＬ）との間の相関のヒートマップ。
【図１０Ｂ】図１０．ＬＣＤＧの投与は、微生物叢の生態及び機能の両方に影響を与え、腸内に存在する細菌の生態的地位及び対応する機能的プロファイルを変化させた。ラクトバチルス・パラカゼイと、代謝物と、ＯＴＵとの間の２８日での相関分析（Ｖ３；治療の終了）。（Ｂ）ＯＴＵとＬ．パラカゼイ（ＣＦＵ／ｍＬ）との間の相関のヒートマップ。
【図１０Ｃ】図１０．ＬＣＤＧの投与は、微生物叢の生態及び機能の両方に影響を与え、腸内に存在する細菌の生態的地位及び対応する機能的プロファイルを変化させた。ラクトバチルス・パラカゼイと、代謝物と、ＯＴＵとの間の２８日での相関分析（Ｖ３；治療の終了）。（Ｃ）ＯＴＵと代謝物との間の相関のヒートマップ。
【発明を実施するための形態】
【００２０】
発明の詳細な説明
本発明の目的は、新生児仙痛又は腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎、敗血症、過敏性腸症候群（略してＩＢＳ）、主に便秘（prevalent constipation）を伴う又は便秘型腸（constipated bowel）のＩＢＳ、主に下痢（prevalent diarrhoea）を伴う又は下痢型腸（diarrhoeic bowel）のＩＢＳ、交代型腸（alternating bowel）のＩＢＳ、未分類のＩＢＳ、又は慢性炎症性腸疾患（ＩＢＤ）（クローン病など）、潰瘍性直腸結腸炎、喘息、肥満、１型糖尿病、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、癌及び自閉症などの炎症性及び／又は機能性の消化管障害の治療（処置）、予防及び／又は治癒において、新生児被験体（生後４週間）及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用するための、ラクトバチルス・パラカゼイ種に属する少なくとも１つの菌株、好ましくは、ラクトバチルス・パラカゼイ株ＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイ株ＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、本発明の以下に示されるそれらの混合物又は組成物（要するに、本発明の混合物又は組成物）である。
【００２１】
好ましくは、本発明の株、それらの混合物又は組成物は、新生児仙痛又は早産新生児の慢性腸炎又は壊死性腸炎の治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用するためのものである。
【００２２】
本発明の目的は、病原微生物［例えば、ウイルス（ロタウイルス、アデノウイルス・エンテリカス（Adenovirus entericus）、カリシウイルス、アストロウイルス、インフルエンザウイルスなど）又は細菌（サルモネラ、赤痢菌、ブドウ球菌、カンピロバクター、大腸菌など）］の胃腸感染、寄生生物の［好ましくは、蠕虫又は回虫（例えば、蟯虫（Ossiuri）、ジアルジアなど）によって生じる］胃腸感染、アレルギー、免疫介在性又は自己免疫性障害［例えば、セリアック病、グレーブス病、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、１型糖尿病、全身性エリテマトーデス（狼瘡）、脈管炎、アジソン病、多発性筋炎、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、糸球体腎炎（腎臓の炎症）、不妊、喘息、肥満、１型糖尿病、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、癌及び自閉症］の治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体（生後４週間）及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用するための、ラクトバチルス・パラカゼイ種に属する少なくとも１つの菌株、好ましくは、ラクトバチルス・パラカゼイ株ＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイ株ＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、本発明の以下に示されるそれらの混合物又は組成物（要するに、本発明の混合物又は組成物）にある。
【００２３】
本発明の目的は、被験体の成長のサポート（補助）治療において、新生児被験体（生後４週間）及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用するための、ラクトバチルス・パラカゼイ種に属する少なくとも１つの菌株、好ましくは、ラクトバチルス・パラカゼイ株ＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイ株ＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、本発明の以下に示されるそれらの混合物又は組成

物（要するに、本発明の混合物又は組成物）であり、被験体の成長は、投与された被験体の体重の増加として理解され、ｇ／週として評価される。

【００２４】

ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）（イタリア国ソファー・エッセ・ピ・ア（SOFAR S.p.A.）の登録商標）として同定された菌株は、パリにあるパスツール研究所の国立微生物寄託機関（the National Collection of Cultures of Microorganisms of the Institut Pasteur）に、ソファー・エッセ・ピ・アによって１９９５年５月５日に受託番号（accession number）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２で、ソファー・エッセ・ピ・アにより寄託された（要するに、ＤＧ（登録商標）又はＬ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）。当初、この株は、ラクトバチルス・カゼイＤＧ（登録商標）サブ・カゼイ（Lactobacillus casei DG(R) sub. casei）という名前であり、後に、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２として再分類された。ラクトバチルス・カゼイＤＧ（登録商標）又はラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）の名称にかかわらず、常に唯一の同じ菌株であることは明らかである。

【００２５】

ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１（あるいはラクトバチルス・パラカゼイＳ０１と命名される）として同定された菌株は、ドイツ微生物細胞培養コレクション（Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH）（ＤＳＭＺ）に、ソファー・エッセ・ピ・アによって２０１２年１１月２０日に受託番号ＤＳＭ　２６７６０で寄託された（要するに、ＬＰＣ－Ｓ０１又はＬ．パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０）。本出願人によって採用されたラクトバチルス・パラカゼイＳ０１　ＤＳＭ　２６７６０又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０の名称にかかわらず、常に唯一の同じ菌株であることは明らかである。

【００２６】

本発明の方法又は治療に使用するための本発明の前記組成物は、（ｉ）ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０を含むか、あるいはそれらからなる、本発明の混合物Ｍ、並びに必要に応じて（ｉｉ）食品グレード（food grade）又は医薬品グレード（pharmaceutical grade）の少なくとも１つの添加物（添加剤）及び／又は賦形剤を含む。

【００２７】

本発明の一態様によると、本発明の組成物に含まれる前記混合物Ｍは、
・ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、並びに
・以下からなる群（Ｉ）より選択される少なくとも１つのさらなる菌株：
（ａ）ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＢｂＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３１、
（ｂ）ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０２　ＤＳＭ　３３２３２、
（ｃ）ビフィドバクテリウム・アニマリス・亜種・ラクティス（Bifidobacterium animalis subsp. lactis）ＢｌＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３３、
（ｄ）ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）ＬｐＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３４、
（ｅ）ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）ＢｂｆＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３２７０８、及び
それらの混合物
を含むか、又はこれらからなっていてもよい。

【００２８】

ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０１として同定されたビフィドバクテリウム・ブレーベ種に属する菌株は、ドイツ微生物細胞培養コレクション（ＤＳＭＺ）に、ソ

ファー・エッセ・ピ・アによって２０１９年７月３１日に寄託番号（deposit number）ＤＳＭ　３３２３１で寄託された（要するに、ＢｂＩＢＳ０１又はＢ．ブレーベ（B. breve）ＢｂＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３１）。

【００２９】

ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０２として同定されたビフィドバクテリウム・ブレーベ種に属する菌株は、ドイツ微生物細胞培養コレクション（ＤＳＭＺ）に、ソファー・エッセ・ピ・アによって２０１９年７月３１日に寄託番号ＤＳＭ　３３２３２で寄託された（要するに、ＢｂＩＢＳ０２又はＢ．ブレーベＢｂＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３２）。

【００３０】

ビフィドバクテリウム・アニマリス・亜種・ラクティスＢｌＩＢＳ０１として同定されたビフィドバクテリウム・アニマリス（Bifidobacterium animalis）種に属する菌株は、ドイツ微生物細胞培養コレクション（ＤＳＭＺ）に、ソファー・エッセ・ピ・アによって２０１９年７月３１日に寄託番号ＤＳＭ　３３２３３で寄託された（要するに、ＢｌＩＢＳ０１又はＢ．アニマリス・亜種・ラクティス（B. animalis subsp. lactis）ＢｌＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３３）。

【００３１】

ラクトバチルス・プランタルムＬｐＩＢＳ０１として同定されたラクトバチルス・プランタルム種に属する菌株は、ドイツ微生物細胞培養コレクション（ＤＳＭＺ）に、ソファー・エッセ・ピ・アによって２０１９年７月３１日に寄託番号ＤＳＭ　３３２３４で寄託された（要するに、ＬｐＩＢＳ０１又はＬ．プランタルム（L. plantarum）ＬｐＩＢＳ０１）。

【００３２】

ビフィドバクテリウム・ビフィダムＭＩＭＢｂ２３ｓｇ　＝　ＢｂｆＩＢＳ０１として同定されたビフィドバクテリウム・ビフィダム種に属する菌株又はその誘導体（derivative）。前記菌株は、ドイツ微生物細胞培養コレクション（ＤＳＭＺ）に、ソファー・エッセ・ピ・アによって２０１７年１２月４日に寄託番号ＤＳＭ　３２７０８で寄託された（要するに、ＢｂｆＩＢＳ０１又はビフィドバクテリウム・ビフィダムＢｂｆＩＢＳ０１ＤＳＭ　３２７０８）。本出願人によって採用されたビフィドバクテリウム・ビフィダムＢｂｆＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３２７０８又はビフィドバクテリウム・ビフィダムＭＩＭＢｂ２３ｓｇ　ＤＳＭ　３２７０８の名称にかかわらず、常に唯一の同じ菌株であることは明らかである。

【００３３】

本発明に記載の菌株（すなわち、ＤＧ（登録商標）、ＬＰＣ－Ｓ０１、ＢｂＩＢＳ０１、ＢｂＩＢＳ０２、ＢｌＩＢＳ０１、ＬｐＩＢＳ０１及びＢｂｆＩＢＳ０１）はすべて、ブダペスト条約の規定に従って寄託された。本特許出願に記載の及び／又は本特許出願に係る菌株の寄託者、並びに本特許出願の所有者は、ここに、本特許の存続期間中、このようなすべての株を利用可能にすることに同意を表明する。

【００３４】

有利には、本発明の組成物に含まれる前記菌株（すなわち、ＤＧ（登録商標）、ＬＰＣ－Ｓ０１、ＢｂＩＢＳ０１、ＢｂＩＢＳ０２、ＢｌＩＢＳ０１、ＬｐＩＢＳ０１及びＢｂｆＩＢＳ０１）は、生存可能な菌株（viable bacterial strains）（プロバイオティクス）である。あるいは、本発明の前記菌株は、本発明に定義されるような生存可能な株の誘導体であってもよい。

【００３５】

本発明の文脈において、菌株の用語「誘導体」（又は生存可能な菌株の「誘導体」）は、例えば、間欠滅菌した（tyndallized）菌株、超音波処理した菌株、放射線（好ましくは、ガンマ放射線）による不活性化菌株、菌株のライセート（溶解産物、溶解物、崩壊産物又は崩壊物）又はホモジネート（破砕物）、菌株抽出物又は壁画分（wall fraction）、菌株によって生成された代謝物又は代謝性バイオ産物（metabolic bioproducts

）又は菌体外多糖（ＥＰＳ）及び／又は当業者に公知の任意の他の菌株の誘導体産物（derivative product）などのポストバイオティック（postbiotic）又はパラバイオティック（parabiotic）を意味すると理解される。前記誘導体は、当業者に公知の方法論に従って得られる。好ましくは、菌株の用語「誘導体」は、間欠滅菌した株、超音波処理した株、放射線（好ましくは、ガンマ放射線）による不活性化株、菌株のライセート又はホモジネート、菌株抽出物又は壁画分（parietal fraction）を意味し、より好ましくは、間欠滅菌した株を意味する。

【００３６】

混合物Ｍに含まれる菌株（Ｅｎ）と、必要に応じて群（ＩＩ）から選択される少なくとも１つのプロバイオティック（probiotic）及び／又は群（ＩＩＩ）から選択されるさらなる活性成分とを含む混合物の例（ここで、前記混合物Ｍは本発明の組成物に含まれる。）としては、以下のものが挙げられる：

Ｅ１：ＤＧ（登録商標）及びＬＰＣ－Ｓ０１、

Ｅ２：ＤＧ（登録商標）及び群（Ｉ）から選択される少なくとも１つの株、

Ｅ３：ＬＰＣ－Ｓ０１及び群（Ｉ）から選択される少なくとも１つの株、

Ｅ４：ＤＧ（登録商標）及び／又はＬＰＣ－Ｓ０１、並びにＢｂｆＩＢＳ０１、並びに群（Ｉ）から選択される少なくとも１つの株、

Ｅ５：ＤＧ（登録商標）及び／又はＬＰＣ－Ｓ０１、並びにＢｂＩＢＳ０１、ＢｂＩＢＳ０２、ＢｌＩＢＳ０１及びＬｐＩＢＳ０１の混合物、

Ｅ６：ＤＧ（登録商標）及び／又はＬＰＣ－Ｓ０１、ＢｂｆＩＢＳ０１、並びにＢｂＩＢＳ０１、ＢｂＩＢＳ０２、ＢｌＩＢＳ０１及びＬｐＩＢＳ０１の混合物。

【００３７】

本発明の組成物に含まれる混合物Ｍは、株Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ Ｉ－１５７２及び／又はＬ．パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１ ＤＳＭ ２６７６０、並びに必要に応じて群（Ｉ）から選択される少なくとも１つの又は複数の菌株及び／又は以下に記載の群（ＩＩＩ）から選択される少なくとも１つのさらなる活性成分に加えて、少なくとも１つのプレバイオティック（prebiotic）をさらに含んでいてもよく、前記プレバイオティックは、好ましくは、イヌリン、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）、キシロオリゴ糖（xylitol-oligosaccharide）（ＸＯＳ）、グアーガム、ラクトフェリン及びそれらの混合物からなる群（ＩＩ）より選択され、好ましくは、イヌリンである。

【００３８】

有利には、本発明の組成物に含まれる混合物Ｍは、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ Ｉ－１５７２及び／又はＬ．パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１ ＤＳＭ ２６７６０並びにイヌリンを含むか、あるいはそれらからなり、好ましくは、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ Ｉ－１５７２及びイヌリンを含むか、あるいはそれらからなる。

【００３９】

本発明の組成物に含まれる混合物Ｍは、Ｌ．パラカゼイ株ＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ Ｉ－１５７２及び／又はＬ．パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１ ＤＳＭ ２６７６０、並びに必要に応じて群（Ｉ）から選択される少なくとも１つの又は複数の菌株及び／又は群（ＩＩ）から選択される少なくとも１つのプレバイオティクスに加えて、

・ビタミンＡ群、Ｂ群、Ｃ群、Ｄ群、Ｅ群及び／又はＫ群、好ましくは、ビタミンＢ群及び／又はビタミンＤ群、

・グルタチオン、レスベラトロール及びｔｒａｎｓ－レスベラトロールなどのポリフェノール、コエンザイムＱ１０、アスタキサンチン、リコペンなどの抗酸化物質、

・バレリアン、パッションフラワー、レモンバーム、セイヨウサンザシ（ホーソン）、カモミールなどの腸弛緩作用を有する植物物質（ボタニカル、botanicals）又はその抽出物、

・ミネラル又はその塩、例えば、亜鉛、セレン、マグネシウム、カリウム、

・オメガ９などの一不飽和脂肪酸（一価不飽和脂肪酸）、並びに／又はオメガ３及びオ

メガ６などの多不飽和脂肪酸（多価不飽和脂肪酸）、
・免疫賦活物質、下痢止め物質及び／又は栄養素、並びに
それらの混合物。
からなる群（ＩＩＩ）より選択される少なくとも１つのさらなる活性成分をさらに含んでいてもよい。

【００４０】

有利には、本発明の組成物に含まれる混合物Ｍは、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はＬ．パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、並びにビタミンＢ群及びビタミンＤ群を含むか、あるいはそれらからなり、好ましくは、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及びビタミンＢ群及びビタミンＤ群を含むか、あるいはそれらからなる。

【００４１】

本発明の文脈において、前記菌株とともに、本発明の組成物に必要に応じて含まれる食品グレード又は医薬品グレードの許容可能な「添加物（additive）及び／又は賦形剤（excipient）」は、固形状、半固形状又は液状の組成物を調製するための当業者に公知のすべての補助物質を含み、補助物質としては、例えば、担体、希釈剤、溶媒、可溶化剤、酸性化剤、増粘剤、甘味料、香料、着色料、甘味料、滑沢剤、界面活性剤、防腐剤（保存剤）、安定化剤、ｐＨ安定化緩衝剤及びそれらの混合物などが挙げられる。例えば、新生児又は１～１２か月の被験体に経口投与するための液滴（ドロップ）状（drops form）組成物の場合、種子油を希釈剤として用いてもよい。

【００４２】

本発明の前記混合物Ｍ又は組成物は、記載された実施形態のいずれか１つによれば、医薬組成物（又は腸内細菌製剤（Live Biotherapeutic Products））、医療機器（medical device）用組成物、フードサプリメント（food supplement）用組成物、食品（又は新規食品又は特殊医療用食品（ＦＳＭＰ））、フードサプリメント又は食品用組成物であってもよい。

【００４３】

本発明の菌株、それらの混合物及び組成物は、記載された実施形態のいずれか１つによれば、経口又は経鼻投与用に製剤化されてもよく、好ましくは、経口用途用に、固形状に、あるいは液状に、例えば、水性又は油性（例えば、様々な種子油又はヒマワリ種子油）ベースの液滴状に製剤化されてもよい。

【００４４】

有利には、前記少なくとも１つの菌株又は各菌株は、本発明のＭ混合物又は組成物の１日用量（daily dose）に関して、10×10^{6}ＣＦＵ～10×10^{12}ＣＦＵ、好ましくは、10×10^{8}ＣＦＵ～10×10^{10}ＣＦＵの範囲の濃度で、より好ましくは、約10×10^{8}ＣＦＵ又は10×10^{9}ＣＦＵ（ＣＦＵ：コロニー形成単位（Colony Forming Unit））の濃度で、本発明の混合物Ｍ中又は組成物中に存在する。

【００４５】

例えば、本発明の混合物又は組成物（例えば、経口投与用液滴）の１日用量は、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２の生菌（live bacteria）1×10^{9}個以上、及び種子油を含む。

【００４６】

上記１日投与量（daily dosages）は、それを必要としている被験体に、個々の用量（単回用量）で又は反復用量で、例えば、１日２回、３回若しくは４回の用量で投与されてもよい。例えば、１日２回の１５～５滴（油ベース）、好ましくは、１２～８滴、例えば、約９～１０滴の本発明の組成物は、約２０億個の菌株、好ましくは、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２に相当する。

【００４７】

本発明の組成物又は混合物Ｍ中の生菌株（live bacterial strains）の数を評価するために、これらの組成物又は混合物Ｍをプレートカウント法（plate count method）

によって分析して、ＣＦＵ値を測定できる。

【００４８】

明確にする目的で、本発明の目的を達成するために、本発明の混合物（Ｍ）に含まれる菌株(単数又は複数）、プレバイオティクス及び／又はさらなる（任意の）活性成分は、別々に（好ましくは、３０分～６０分の時間間隔で）かつ任意の順番で投与されてもよいが、好ましくは、被験体に同時に投与され、さらにより好ましくは、より迅速な効果を得るため、かつ投与を容易にするために、単一の組成物で投与される。前記株及び（任意の）活性成分が単一の組成物で投与される場合、前記単一の組成物は、本発明の組成物に相当する。

【００４９】

特に断りのない限り、「ｘ～ｙの範囲内」の量の成分を含む組成物又は混合物などの表現は、前記成分が、組成物などの中に、前記範囲にあるすべての量で存在してもよいことを意味し、明示的に記載されていないとしても、範囲の両端の値は含まれる。

【００５０】

特に断りのない限り、組成物が１又は複数の成分又は物質を「含む（comprises）」という記載は、具体的に記載された成分又は物質（単数又は複数）に加えて他の成分又は物質が存在していてもよいことを意味する。

【００５１】

本発明の文脈において、「治療方法（method of treatment）」は、それを必要としている被験体への介入（intervention）を意味し、本発明の菌株又は組成物を治療有効量で被験体へ投与することを含み、病状（pathology）又は疾患及び関連する症状又は障害の除去（elimination）、低減／縮小（reduction/decrease）、又は予防（prevention）をその目的とする。

【００５２】

本発明の文脈において、用語「被験体（単数又は複数）」は、哺乳動物（動物及びヒト）、好ましくは、新生児時期（０～４週齢）及び／又は生後１か月から１２か月以内（２か月目の始めから１２か月目の終わりまで）のヒト被験体を指す。

【００５３】

有利には、本発明の株又は混合物又は組成物で治療又は投与される被験体は、帝王切開及び／又は早産により生まれた新生児被験体又は生後１か月～１２か月以内の被験体であってもよい。

【００５４】

用語「治療有効量」は、組織、系統（器官）、哺乳動物又はヒトにおける生物学的又は医学的反応（応答）を誘発する活性化合物及び／又は菌株の量を指し、個人、研究員、獣医師、医師又は他の臨床医若しくは医療従事者によって求められかつ定義される。

【００５５】

本発明の文脈において、用語「医療機器」は、１９９７年２月２４日の政令第４６号（Legislative Decree No. 46 of 24 February 1997）に基づくか又は新医療機器規則（ＥＵ）２０１７／７４５（ＭＤＲ）（new Medical Device Regulation (EU) 2017/745 (MDR)）に基づく意味で用いられる。

【００５６】

本発明の文脈において、用語「新規食品」は、１９９７年のＥＣ規則２５８（EC Regulation 258 of 1997）に基づく意味で用いられる。

【００５７】

実施形態

本発明の好ましい実施形態ＦＲｎは、以下のとおりである。

【００５８】

ＦＲ１．炎症性及び／又は機能性の消化管障害を有する被験体の治療、予防及び／又は治癒において、

新生児被験体、生後４週間以内の被験体、及び／又は１か月から１２か月以内の被験体

に使用するための菌株又は組成物であって、
　このような障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎、敗血症、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、主に便秘を伴う又は便秘型腸のＩＢＳ、主に下痢を伴う又は下痢型腸のＩＢＳ、交代型腸のＩＢＳ、未分類のＩＢＳ、慢性炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病、潰瘍性直腸結腸炎、喘息、肥満、１型糖尿病、アトピー性皮膚炎、多発性硬化症、癌、自閉症、アレルギー、免疫介在性・自己免疫性障害を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、前記免疫介在性・自己免疫性障害が、セリアック病、グレーブス病、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、１型糖尿病、全身性エリテマトーデス（狼瘡）、脈管炎、アジソン病、多発性筋炎、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、糸球体腎炎（腎臓の炎症）、不妊及び前記被験体の体重増加のサポートから選択され、
　前記菌株が、ラクトバチルス・パラカゼイ種に属し、
　前記組成物が、
　（ｉ）ラクトバチルス・パラカゼイ種に属する少なくとも１つの株を含むか、あるいはそれらからなる混合物Ｍ、並びに
　（ｉｉ）食品グレード又は医薬品グレードの少なくとも１つの添加物及び／又は賦形剤を含む、
菌株又は組成物。
【００５９】
　ＦＲ２．前記菌株が、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物から選択され、
　前記組成物が、
　（ｉ）ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０を含むか、あるいはそれらからなる混合物Ｍ、並びに
　（ｉｉ）食品グレード又は医薬品グレードの少なくとも１つの添加物及び／又は賦形剤を含む、
ＦＲ１に記載の使用のための株又は組成物。
【００６０】
　ＦＲ３．前記株又は組成物が、新生児仙痛若しくは腸仙痛、又は慢性腸炎若しくは早産新生児の慢性腸炎の治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月未満の被験体に使用される、ＦＲ１又はＦＲ２に記載の使用のための株又は組成物。
【００６１】
　ＦＲ４．前記株又は組成物が、病原微生物の胃腸感染又は寄生生物の胃腸感染の治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用される、ＦＲ１又はＦＲ２に記載の使用のための株又は組成物。
【００６２】
　ＦＲ５．前記株又は組成物が、アレルギーの治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用される、ＦＲ１又はＦＲ２に記載の使用のための株又は組成物。
【００６３】
　ＦＲ６．前記株又は組成物が、セリアック病、グレーブス病、関節リウマチ、橋本甲状腺炎、１型糖尿病、全身性エリテマトーデス（狼瘡）、脈管炎、アジソン病、多発性筋炎、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、糸球体腎炎（腎臓の炎症）及び不妊などの免疫介在性・自己免疫性障害の治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用される、ＦＲ１又はＦＲ２に記載の使用のための株又は組成物。
【００６４】

ＦＲ７．前記株又は組成物が、被験体の体重増加をサポートする治療、予防及び／又は治癒において、新生児被験体及び／又は１か月から１２か月以内の被験体に使用される、ＦＲ１又はＦＲ２に記載の使用のための株又は組成物。

【００６５】

ＦＲ８．前記（ｉ）混合物Ｍが、

ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２及び／又はラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０、並びに

・ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３１、

・ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０２　ＤＳＭ　３３２３２、

・ビフィドバクテリウム・アニマリス・亜種・ラクティスＢｌＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３３、

・ラクトバチルス・プランタルムＬｐＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３３２３４、

・ビフィドバクテリウム・ビフィダムＢｂｆＩＢＳ０１　ＤＳＭ　３２７０８、及びそれらの混合物

からなる群より選択される少なくとも１つのさらなる菌株

を含むか、あるいはそれらからなる、ＦＲ１～７のいずれか１つに記載の使用のための組成物。

【００６６】

ＦＲ９．前記（ｉ）混合物Ｍが、

・ビタミンＡ群、Ｂ群、Ｃ群、Ｄ群、Ｅ群及び／又はＫ群から選択される少なくとも１つのビタミン、好ましくは、ビタミンＢ群及び／又はビタミンＤ群、

・グルタチオン、レスベラトロール及びｔｒａｎｓ－レスベラトロールなどのポリフェノール、コエンザイムＱ１０、アスタキサンチン、リコペンなどの抗酸化物質、

・腸弛緩作用を有する植物物質、ボタニカル（植物粗加工物又は植物由来物）又はそれらの抽出物、好ましくは、バレリアン、パッションフラワー、レモンバーム、セイヨウサンザシ及びカモミールから選択される植物物質、ボタニカル又はそれらの抽出物、

・ミネラル又はその塩、例えば、亜鉛、セレン、マグネシウム、カリウム、

・オメガ９などの一不飽和脂肪酸、並びに／又はオメガ３及びオメガ６などの多不飽和脂肪酸、

・免疫賦活物質、下痢止め物質及び／又は栄養素、

・少なくとも１つのプレバイオティック、好ましくは、イヌリン、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）、キシロオリゴ糖（ＸＯＳ）、グアーガム、ラクトフェリン及びそれらの混合物からなる群（ＩＩ）より選択される少なくとも１つのプレバイオティック、より好ましくは、イヌリン、

並びにそれらの混合物

から選択される少なくとも１つのさらなる活性成分をさらに含む、ＦＲ１～８のいずれか１つに記載の使用のための組成物。

【００６７】

ＦＲ１０．前記株が、生存可能な菌株又は菌株の誘導体であり、前記菌株の誘導体が、間欠滅菌した菌株、超音波処理した菌株、放射線（好ましくは、ガンマ放射線）による不活性化菌株、ライセート又はホモジネートした菌株、菌株抽出物又は壁画分から選択され、好ましくは、間欠滅菌した菌株である、ＦＲ１～９のいずれか１つに記載の使用のための株又は組成物。

【００６８】

実験（ＥＸＰＥＲＩＭＥＮＴＡＬ　ＰＡＲＴ）

本出願人は、生後３か月以内の宿主の腸内微生物叢に対して、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ株（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２プロバイオティック（生存可能な細胞（ｖｉａｂｌｅ　ｃｅｌｌｓ））の投与の効果を評価するために、新生児における臨床試験（ｃｌｉｎｉｃａｌ　ｓｔｕｄｙ）を実施した。

【００６９】

１．臨床試験の目的
試験の主要目的：
Ｌ．パラカゼイ株ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２を含む、経口投与用の液滴状（油ベース）の本発明の組成物（要するに、分析対象の組成物）を２８日間補給（supplementation）して、試験対象集団（study population）におけるラクトバチルス・パラカゼイＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２の濃度換算で、糞便腸内微生物叢（faecal gut microbiota）の組成が変化するかどうかを評価すること。
【００７０】
分析対象の組成物：
ヒマワリ種子油（Heliantus annuus Ｌ．）、ＤＬ－α－トコフェロール、ラクトバチルス・パラカゼイＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２（８ｍｌあたり１４０億個以上の生細胞）。
【００７１】
試験の副次的目的：
分析対象の組成物を２８日間摂取して、以下について評価すること：
・摂取の５６日後及び８４日後での微生物叢系（microbiota system）の生態予測による、糞便腸内微生物叢の組成（リアルタイムＰＣＲ）の変化、
・摂取の２８日後、５６日後及び８４日後での微生物叢系の生態予測による、糞便腸内微生物叢の機能活性の変化（メタボロミクス）、
・便の量及び質（頻度及び硬さ（consistency））の変化、
・Ｒｏｍｅ　ＩＶ基準に従って定義された新生児仙痛の発生、
・製品（product）の安全性及び忍容性、
・患者の成長。
【００７２】
２．試験の構成
調査のタイミング（図１）
・登録期間：２４週、
・治療期間：４週、
・経過観察期間：８週、
・患者あたりの試験の期間：１２週（８４日）、
・総試験期間：３６週。
【００７３】
３．試験デザイン
ランダム化プラセボ対照二重盲検単一施設臨床試験。新生児を、出生体重によって３つの群に層別化した：
・正出生体重（＞２５００ｇ、ＮＢＷ）、
・低出生体重（１５００～２５００ｇ　ＬＢＷ）、
・極低出生体重（１０００～１５００ｇ、ＶＬＢＷ）。
【００７４】
治験（trial）を、唯一の参加及び調整施設（participating and coordinating centre）として、ローマにあるカジリーノ総合病院新生児科のＵ．Ｏ．（the U.O. of Neonatology of the Policlinico Casilino）で実施した。
【００７５】
３．１．試験対象集団
試験には、以下のように分けられた６０名の早産及び正期産新生児を登録した：２０名のＮＢＷ、２０名のＬＢＷ、２０名のＶＬＢＷ。
【００７６】
３．２　介入の種類
登録した６０名の被験体を、３つの群のそれぞれにおいて、１：１の比で２つの群にランダム化した（無作為に割り当てた）。
【００７７】

群１：
液滴状の試験組成物、１日２回９滴、Ｌ．パラカゼイＤＧ（登録商標）（ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）の２０億ＣＦＵ（コロニー形成単位）に相等、４週間（２８日）。
【００７８】
群２：
対照：プラセボ、１日２回９滴、４週間（２８日）。
【００７９】
３．３　試験期間
１２週の期間により、分析対象の組成物の摂取によって測定されたＬ．カゼイＤＧ株（登録商標）（ラクトバチルス・パラカゼイＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）の持続性に基づいて腸内微生物叢の変化を評価することができる。この１２週の期間を、４週の治療期間と８週の経過観察期間とに分ける。およそ２４週の登録期間を含めて、試験の合計期間は３６週になる。
【００８０】
４．試験の被験体の選択
４．１　適格基準
・生後０～４８時間、
・出生体重１０００ｇ以上の男女の新生児、
・帝王切開による新生児。
【００８１】
４．２　除外基準（主要なもののみを含む）
・経膣分娩、
・超低出生体重（ＥＬＢＷ）（＜１０００ｇ）、
・全身感染が確立しているか又はその疑いがある、
・治療を妨げるおそれがあると治験責任医師が判断した重度の病状、
・試験の開始以降に、新生児又は授乳中の母親による治験製品以外のプロバイオティクスの摂取、
・出生時から試験期間全体にわたる抗生物質を用いた全身療法又は予防法（ＮＢＷのみ）、
・出生前３０日間及び試験期間全体にわたる、（ＮＢＷ新生児の）授乳中の母親による抗生物質を用いた全身療法又は予防法。
【００８２】
新生児は、処方された治療の少なくとも８０％及び１２０％を超えない場合に、治験実施計画書に適合した集団（Per Protocol population）に適格であるとみなされる。
【００８３】
５．手順及び方法
可能であれば便サンプルの状況に応じた収集（contextual collection）を伴う、予定来院：
Ｖ１　１日目（生後０～４８時間）、Ｖ２　１０日目（±２日）、Ｖ３　２８日目（±３日）、Ｖ４　５６日目（±３日）、Ｖ５　８４日目（±３日）（図１）。
【００８４】
さらに、試験中、親（両親）から受け取った糞便サンプルを、以下のスキームに従って提供した（各来院前２４時間以内に収集した１サンプル）：
【００８５】
治療前：
・生後４８時間以内の糞便、及び入手可能である場合は、胎便。
【００８６】
治療期において：
・摂取開始から１０日後の糞便、
・摂取開始から２８日後の糞便、

経過観察期において：
・摂取開始から５６日後の糞便、
・摂取開始から８４日後の糞便、
【００８７】
糞便サンプルの化学物理分析：
・Ｌ．カゼイ株ＤＧ（登録商標）（ラクトバチルス・パラカゼイＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）の細菌数を評価するためのリアルタイムＰＣＲ分析、
・プロバイオティックの投与前及び投与後の腸内微生物叢を特徴付けるためのメタゲノミクス及びメタボロミクス分析。
【００８８】
具体的には、微生物叢を、細菌のリボソームサブユニット１６Ｓ　ｒＲＮＡをコードする遺伝子の一部のヌクレオチド配列分析によって分析した。具体的には、以下の工程からなるメタゲノム戦略（metagenomic strategy）を採用する：
・糞便サンプルからのメタゲノムＤＮＡの抽出、定量化及び正規化（normalisation）、
・１６Ｓ　ｒＲＮＡをコードする細菌遺伝子のＶ３－Ｖ４超可変領域（hypervariable regions）のＰＣＲ増幅、
・ＰＣＲ産物の定量化、
・Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ技術による配列決定、
・バイオインフォマティクス（bioinformatic）配列分析（微生物群集のキャラクタリゼーション、階層的クラスタリング（hierarchical clustering）、分類学的分析（taxonomic analysis）、ヒートマップによる系統樹解析（分析）（phylogenetic dendrograms）の構築）。
【００８９】
メタボローム解析（分析）のために、揮発性有機化合物（ＶＯＣ）として産生された微生物由来の代謝物を同定し、定量化した。これらの化合物を、ＧＣ－ＭＳ／ＳＰＭＥ（固相マイクロ抽出によるガスクロマトグラフィー－質量分析法）システムを用いて抽出した。ＶＯＣ抽出のために、カルボキシ－ポリジメチルシロキサン（ＣＡＲ－ＰＤＭＳ）被覆繊維（８５μｍ）を、ＳＰＭＥプロセスにおいて使用した。３回ずつ分析した各サンプルから、平均１００～５００ｍｇを１０ｍｌガラスバイアルに入れ、内部標準（ＩＳ）として４－メチル－２－ペンタノールを添加した。続いて、糞便サンプルを４５℃で１０分間平衡化した。５９７３Ｃ質量選択検出器に接続しかつＳｕｐｅｌｃｏｗａｘ　１０キャピラリーカラムを備えたＧＣ－ＭＳ（Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　６８９０　ＧＣ）に注入する前に、繊維を各サンプルに４５分間曝露した。代謝物を、純粋化合物に対するその代謝物の保持時間（Ｒｔ）を用いて同定する。フラグメントパターンをＮＩＳＴライブラリのフラグメントパターンと比較し、その後手動で目視検査することによって、クロマトグラムを統合及び同定する。定量的な代謝物データを、ＩＳ領域に対する相対領域を補間（interpolation）することによって得る。
【００９０】
６．有効性（effectiveness）及び安全性の評価
６．１．有効性の評価
主要評価項目
・リアルタイムＰＣＲによる２８日目のＬ．カゼイＤＧ（登録商標）の細菌ゲノム数。
【００９１】
副次的評価項目
・２８日目、５６日目及び８４日目の腸内微生物叢（α多様性及びβ多様性）のディスバイオシスの指標、
・５６日目及び８４日目のＬ．カゼイＤＧ（登録商標）細菌ゲノム数、
・新生児用のアムステルダム便スケール（Amsterdam stool scale for newborns）を用いて、来院（１日目、１０日目、２８日目、５６日目、８４日目）前日の排便の回数

、硬さ、量及び色、
・糞便（１日目、１０日目、２８日目、５６日目、８４日目）の化学物理分析、
・２８日目、５６日目、８４日目の微生物叢の全体的な代謝プロファイルの変化を評価することによる、ボラチローム（volatilome）、すなわち、揮発性糞便中代謝物（化学物質カテゴリー：短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）、アルコール、ケトン、アルデヒド、チオール、酸、エステル、ピラジン、ピリジン、フェノール、フラン、テルペン、アルカン、アルケンなど）、の定量的評価、
・「Ｒｏｍｅ　ＩＶ」診断基準に基づく仙痛の存在の評価、
・有害事象の評価。

【００９２】

７．統計分析

統計的手法

カテゴリーデータ（カテゴリカルデータ）を、カウント（数）及びパーセンテージとして表し、一方、連続データ（連続型データ）を、平均値及び標準偏差又は中央値及び範囲として表す。

【００９３】

カテゴリーデータの比較を、適宜、カイ二乗検定又はフィッシャーの正確確率検定によって行う。連続データを、スチューデントのｔ検定（独立又は従属データについて）、分散分析（Anova）及び反復測定の分散分析（Anova for repeated measures）によって比較し、適切な統計的検定によってデータの正規性を決定する。データが正規分布していない場合は、順位和検定（マン・ホイットニーの順位和検定）又は符号順位和検定（ウィルコクソンの符号順位）、クラスカル・ウォリス検定又はフリードマン検定などのノンパラメトリック検定を用いる。必要であれば、応答変数に対するいくつかの独立変数の同時効果を評価するため又は時間データ（temporal data）の考えられる交絡因子及び／若しくは分析を同定するために、多変量回帰手法を用いる。結果は、Ｐ値＜０．０５で統計的に有意であるとみなされる。

【００９４】

すべての分析を、Ｓｔａｔａ　１５ソフトウェア（ＳｔａｔＣｏｒｐ）を用いて実行する。

【００９５】

８．試験の微生物学的結果

８．１　主要評価項目：リアルタイムＰＣＲによる２８日目のＬ．カゼイＤＧ（登録商標）の細菌ゲノム数

【００９６】

Ｖ１～Ｖ５の予定来院の間に収集した糞便サンプルの結果を、図２Ａ～２Ｅに概略的に図示する。

【００９７】

このような図（箱ひげ図）は、各経過観察時点について、プラセボ群及び分析対象の組成物を投与した「Ｔｘ」群のＬ．カゼイＤＧ（登録商標）の濃度を示す。各群について、Ｌ．カゼイＤＧ（登録商標）濃度（ＣＦＵ／ｍｌ）の中央値、２５パーセンタイル、７５パーセンタイル、最小値及び最大値が示されている。

【００９８】

プロバイオティックＬ．カゼイＤＧ（登録商標）は、最初の投与の１０日後から治療群の被験体の腸内に検出され始め、摂取後８４日目まで持続したが、経過観察のＶ３時点（治療の５６日目）からわずかに減少し始めた。

【００９９】

８．２　メタゲノム解析（分析）

図３Ａ～３Ｄは、予定来院のＶ２～Ｖ５の時点におけるラクトバチルス種の相対存在量のヒストグラムを示す。

【０１００】

微生物叢の生態分析から、分析対象の組成物の投与（Ｔｘ群）により、投与開始の１０日後（Ｖ２時点）までラクトバチルス属種の相対存在量が統計的に有意に増大すること（ｐＦＤＲ≦０．０５）、及びこの増大はＶ４及びＶ５の時点においてｐ＜０．０５の傾向で継続していることが推測できる。

【０１０１】

８．３　メタボローム解析（分析）

図４は、ＰＬＳ－ＤＡメタボローム解析の結果を図示する。縦軸は、同定した代謝物を記載し、横軸は、変数重要度（variable importance in projection）（ＶＩＰ）を示す。

【０１０２】

ＰＬＳ－ＤＡ解析により、ブタン酸及びプロパン酸代謝物（ＳＣＦＡ）が、Ｔｘサンプル中の前記代謝物の濃度が増大することに伴って、プラセボ群とＴｘ群との間のクラスタリングに主要な役割を果たすことを同定した。

【０１０３】

ＰＬＳ－ＤＡによってそれぞれの時点を個別に考慮すると、Ｔｘサンプル中のＳＣＦＡの濃度が増大するにつれ、サンプル間の最大の分離がＶ２時点とＶ４時点との間に起こることが分かる。

【０１０４】

このような傾向は、分析対象の組成物を投与されたＴｘ群の被験体におけるラクトバチルス（lactobacilli）の相対存在量がより高いこと（８．２項）と一致している。

【０１０５】

８．４　得られたすべての微生物学的データの相関

前の段落で考察した３つの異なるアプローチ（リアルタイムＰＣＲ、メタゲノム解析、メタボローム解析）から得られた結果を、スピアマン相関によって互いに相関付けた。

【０１０６】

相関分析について、メタゲノム解析、メタボローム解析及びリアルタイムＰＣＲ解析が、プラセボ群と分析対象の組成物で治療したＴｘ群との間で最も統計的に有意な差を示したので、分析対象の組成物の投与に対応するＶ２時点及びＶ３時点（Ｖ２：１０日；Ｖ３：２８日）を選択した。

【０１０７】

３つのアプローチから得られたデータを統合することにより、プロバイオテッィクＬ．カゼイＤＧ（登録商標）の投与が微生物叢の生態及び機能の両方に影響を及ぼし、腸内に存在する細菌の生態的地位及び対応する機能的プロファイルを改変させる（modifying）ことが示される。

【０１０８】

特に、ブタン酸及びプロパン酸などのある特定の短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）は、フィーカリバクテリウム属（Faecalibactarium）、オシロスピラ属（Oscillospira）、エガセラ属（Eggerthella）、バクテロイデス属（Bacteroides）及びビフィドバクテリウム属（Bifidobacterium）のある特定の有益な細菌と正の相関を示した。

【０１０９】

９．試験の臨床結果：便の回数、硬さ、量及び色

各試験来院時に観察した排泄の回数は、プラセボで治療した被験体よりも、分析対象の組成物で治療した被験体のほうが実質的に多かった。

【０１１０】

排泄量に関して、治療開始の１０日後、５６日後及び８４日後に２つの試験群の間に統計的に有意な差はなかった（それぞれ、Ｐ＝０．１２、０．６１及び０．２５）。

【０１１１】

治療期間の終わり（２８日目、Ｖ３）にのみ、排泄量について、分析対象の組成物で治療した被験体に有利な統計的に有意な差が観察された（Ｐ＝０．０３）。

【０１１２】

便の色及び硬さ（「アムステルダム乳児便スケール」（Amsterdam Infant stool scale）に従って評価したパラメーター）に関して、便の色については治療開始の１０日後（Ｐ＜０．０００１）及び５６日後（Ｐ＝０．００７）に、便の硬さについては１０日後（Ｐ＝０．００１６）、５６日後（Ｐ＜０．０００１）及び８４日後（Ｐ＝０．０５）に、統計的に有意な差が、分析対象の組成物で治療した被験体に有利に観察された。

【０１１３】

１０．試験の安全性の結果

安全性分析の結果を、以下の表１にまとめる。

【０１１４】

【表１】

		治療群	
		プラセボ（Ｎ＝２９）	Ｔｘ（Ｎ＝３０）
少なくとも１つのＡＥ*を有する患者の数	Ｎ(％)	１５（５１．７）	１２（４０．０）
少なくとも１つの製品関連ＡＥ*を有する患者の数	Ｎ(％)	０（０．０）	０（０．０）
少なくとも１つの重篤なＡＥ*を有する患者の数	Ｎ(％)	８（２７．６）	４（１３．３）
少なくとも１つの重度のＡＥ*を有する患者の数	Ｎ(％)	２（６．９）	２（６．７）
ＡＥ*により試験を事前に中止した患者の数	Ｎ(％)	１（３．４）	０（０．０）
ＡＥ*の数	Ｎ	２１	１６
重篤なＡＥ*の数	Ｎ	１０	６
関連ＡＥ*の数	Ｎ	０	０
重度のＡＥ*の数	Ｎ	２	４
死亡数	Ｎ	０	１

表１

＊ＡＥ＝有害事象

【０１１５】

合計３７件の有害事象（ＡＥ）が記録されており、そのうち２１件がプラセボ治療群、１６件が分析対象の組成物（Ｔｘ）で治療した被験体群であった。

【０１１６】

登録してランダム化した５９名の被験体のうち２７名が、１又は複数の有害事象を示した（プラセボ群の被験体１５名、Ｔｘ群の被験体１２名）。

【０１１７】

２件の重篤な有害事象（壊死性大腸炎、及び敗血症の疑い）のみが、分析対象の組成物で治療した被験体１名において報告された。しかし、この重篤な有害事象はいずれも、分析対象の組成物の投与に関連しているようにはみえなかった。

【０１１８】

プラセボ群で観察された重篤な有害事象（入院を必要とする軽度の胃食道逆流症）についても、同様の判断をすることができる。

【０１１９】

分析対象の組成物で治療した患者で記録された死亡は、播種性血管内凝固症候群及び敗血症性ショックによって引き起こされ、治験責任医師によって、試験治療とは「おそらく関連なし」と分類された。

【０１２０】

残りのすべての重度な及び非重度な有害事象は、投与した試験治療（プラセボ又は分析対象の組成物）と関連なし（Ｎ＝２９）又はおそらく関連なし（Ｎ＝３）のいずれかであ

るとみなされた。
【０１２１】
試験期間中、２つの群において湿疹又は皮膚疾患は記録されていない。
【０１２２】
１１．結論
以上を踏まえ、以下のように結論付けられる：
・主要評価項目に関して、分析対象の組成物で治療したＴｘ群では、プロバイオティックＬ．カゼイＤＧ（登録商標）が、治療開始の１０日後から腸内で検出され（Ｖ２；図２Ｂ）、観察期間Ｖ５の終わりまで持続した（図２Ｅ）。
・ラクトバチルス種の相対存在量に関連して、分析対象の組成物は、観察期間Ｖ５の終わりまでラクトバチルスの相対存在量に統計的に有意な増加をもたらすことを示した（図３Ｄ）。
・ＰＬＳ－ＤＡメタボローム解析に関して、ブタン酸及びプロパン酸代謝物を同定し、Ｔｘサンプル中で濃度がより高いことを示した（図４）。
・以前の微生物学的分析の相関から、ブタン酸及びプロパン酸の存在は、治療した被験体の微生物叢に有益な特定の細菌種と正の相関を示したと推測できる。
・分析対象の組成物で治療した被験体は、プラセボ治療群よりも、統計的に有意に排泄量が多く、新生児用のアムステルダム便スケールに従って評価された便の色及び硬さが良好であった。
・最後に、両方の試験群で記録した重度の有害事象の評価と同様に、上記で分析した安全性及び忍容性プロファイルに基づいて、分析対象の組成物は安全でありかつ忍容性が良好であり、プラセボと同等の安全性プロファイルを有することが証明された。
【０１２３】
得られた結果は自明とは程遠い。なぜなら、上述したように、哺乳動物、特にヒトは、生後数週間では内臓の成熟が完全ではないので、子供と同等に扱うことさえできないからである。したがって、本明細書に記載の株が得られた薬理学的反応（応答）を提供できたことも、新生児にも忍容性が良好であることも、決して予見できなかったので、これらの株の効力（efficacy）及び安全性を確かめるために上記の治験を実施する必要があった。
【０１２４】
実験
これまでのところ、（早産及び正期産新生児における）健康な新生児などの脆弱な集団に対するＬＣＤＧの効果を評価する研究は行われていない。
【０１２５】
本二重盲検プラセボ対照試験の目的は、投与期間中及び投与期間後に、ＬＣＤＧの小児用処方物（又は製剤）が新生児（出生体重に応じて３つの群に層別化：正出生体重、低出生体重、極低出生体重）の消化管を生きたまま通過する能力を、微生物叢の組成にプラスの影響を与える能力を評価することによって確認することであった。製品の安全性（体重、身長及び頭囲パラメーターもモニタリング）、排便回数、便の硬さ及び仙痛の発生も評価した。
【０１２６】
材料及び方法
実験製品（Experimental product）
ラクトバチルス・パラカゼイ（Ｌ．カゼイＤＧ（登録商標）－ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２；ＬＣＤＧ）は、ソファー・エッセ・ピ・アから供給された。
【０１２７】
１０億コロニー形成単位（ＣＦＵ）のＬＣＤＧに相当するラクトバチルス・パラカゼイ９滴を、１日２回、２８日間投与した。この液滴は、舌に直接投与するか、又は冷たいか若しくはぬるい液体と混ぜて投与した。
【０１２８】
試験の被験体

この試験を、２０１８年９月から２０２１年３月まで実施した。試験に参加する患者を、イタリア国ローマにあるカジリーノ総合病院新生児科（Hospital Neonatology Unit, Policlinico Casilino）において、早産及び正期産の新生児の一群から選択した。試験の適格基準を、以下のように決定した：生後０～４８時間、出生体重≧１０００ｇの男女新生児、帝王切開により生まれかつ親／保護者から書面によるインフォームド・コンセントが得られた新生児。除外基準は、以下のとおりであった：経膣分娩、超低出生体重（ＥＬＢＷ）（＜１０００ｇ）、全身性感染の確立又は疑い、既知の重度の神経学的疾患、既知の重度の代謝性疾患、既知の遺伝性疾患及び染色体障害、重度の奇形（例えば、短腸症候群；腸閉塞；無症状で治療が必要ない場合は動脈管開存症（ductus arteriosus patency）が含まれる場合がある。）、既知の重度の原発性又は続発性母体免疫不全症、既知の母体の食物アレルギー、母体の糖尿病（妊娠糖尿病を含む。）、最近のアルコール若しくは薬物乱用歴又はその疑いのある母親、治療を妨げる可能性があると治験責任医師が考える重度の状態、不十分な信頼性、又は患者によるプロトコルの不遵守（non-compliance）若しくは不順守（non-observance）を引き起こす可能性のある状態の存在。さらに、新生児には、試験の期間全体にわたり治験製品以外のプロバイオティクスの投与が禁止され、授乳中の母親には、試験期間全体にわたりいかなるプロバイオテッィクの投与も禁止された。正出生体重（ＮＢＷ）の新生児の場合に限り、出生時から試験期間全体にわたる抗生物質を用いた全身治療又は予防法は許可されず、（ＮＢＷ乳児の）授乳中の母親には、試験前３０日間及び試験期間全体にわたり、抗生物質を用いた全身治療又は予防法は許可されなかった。

【０１２９】

新生児の各親／保護者は、試験に参加するためのインフォームド・コンセントに署名し、治験製品の使用条件が記載された説明シートを受領した。適格／除外基準に基づいて、６０名の早産及び正期産の新生児を選択した。

【０１３０】

<u>試験デザイン</u>

この１２週のランダム化二重盲検単一施設プラセボ対照治験の目的は、出産後最初の４８時間以内の新生児へのＬＣＤＧの投与が、製品を２８日間補給した後に、糞便腸内微生物叢の組成を変化させるか否かを評価することであった。１２週の期間を、４週の治療期間と８週の経過観察期間とに分けた。

【０１３１】

子供たちは、５回の現場来院（on-site visits）に参加した：来院１（Ｖ１；生後０～４８時間）、来院２（Ｖ２；１０日±２日）、来院３（Ｖ３；２８日±３日；製品摂取終了）、来院４（Ｖ４；５６日±３日）及び来院５（Ｖ５；８４日±３日；試験終了）。

【０１３２】

Ｖ１では、新生児を、出生体重に応じて３つの群に層別化する：正出生体重（＞２５００ｇ、ＮＢＷ）、低出生体重（１５００～２５００ｇ　ＬＢＷ）、極低出生体重（１０００～１５００ｇ、ＶＬＢＷ）。

【０１３３】

このように層別化した適格患者を、１：１の比で以下の群の１つにランダム化する：群１：治療群：生後４８時間から開始して４週間（２８日）、２０億ＣＦＵ（コロニー形成単位）に相当するＬＣＤＧを１日２回９滴；群２：プラセボ群：生後４８時間から開始して４週間（２８日）、プラセボ（試験製品と区別できない製品）を１日２回９滴。

【０１３４】

同じ来院中に、赤ん坊及び母親の人口統計学的データ（demographic data）並びに子供からの便サンプルを収集した。主要アウトカム評価項目は、リアルタイムＰＣＲによる治療２８日目（Ｖ３）のＬＣＤＧの細菌ゲノム数に関する糞便腸内微生物叢の組成であった。試験中に評価された副次的アウトカム評価項目は、以下のとおりであった：投与開始後２８日目、５６日目及び８４日目（それぞれ、Ｖ３、Ｖ４及びＶ５）における微生物叢生態の予測による、糞便腸内微生物叢の機能活性の変化（modification）（メタボロ

ミクス分析－α多様性及びβ多様性）；投与開始から５６日目及び８４日目（それぞれＶ４及びＶ５）における微生物叢の生態予測による、糞便腸内微生物叢の組成の変化（リアルタイムＰＣＲ）；便の質及び量の変化（頻度及び硬さ）；Ｒｏｍｅ　ＩＶ基準［Ｃａｓｔｅｌｌｕｚｚｏ］に従って定義された新生児仙痛の発生；製品の安全性及び忍容性；患者の繁栄（prosperity）。

【０１３５】

倫理

この試験を、ヘルシンキ宣言に由来又は派生した倫理原則に従って、かつ医薬品の臨床試験の実施の基準ガイドライン（Good Clinical Practice Guidelines）に従って実施した。治験責任医師は、すべての試験書類を関連する倫理委員会に提出し、倫理委員会から受領した承認／肯定的見解（approval/favourable opinion）の写しを治験依頼者に転送した（ＡＳＬ　Ｒｏｍａ　２：Ｐｒｏｔ．ｎ°０１２２０６７２／２０１８）。新生児のすべての親／保護者は、署名したインフォームド・コンセントを提供した。

【０１３６】

結果の評価

便サンプルを、各来院前２４時間以内に収集した。

各新生児について、排便の回数を記録し、便サンプルの色及び硬さを、アムステルダム便スケールを用いて評価した（後述）。

【０１３７】

さらに、ステルコビリノーゲン、中性脂肪、脂肪酸、石鹸、アミド、肉及び野菜繊維、粘膜及びｐＨを含む糞便サンプルの物理化学分析を、カジリーノ病院の臨床病理学研究室（the Clinical Pathology Laboratory of the Casilino Hospital）によって各来院日に実施した。最適な保存条件を確保するために、便サンプルを、病院の冷凍庫に入れて－２０℃で保存し、治験依頼者が負担する宅配便で、ドライアイスとともに、分子分析のためにバンビーノ・ジェズ小児科病院の寄生虫学／ヒトマイクロバイオーム研究室（the Laboratory of Parasitology/Human Microbiome of the Bambino Gesu Paediatric Hospital）（サン・パオロ・サイト（San Paolo site））へ毎月送られた。

【０１３８】

Ｌ．カゼイＤＧ（登録商標）株の細菌量を評価するために、（既に検証され公開されている方法（Ｆｅｒｒａｒｉｏ）に従って）リアルタイムＰＣＲ分析を行い、メタゲノム及びメタボローム解析を実施して、プロバイオティックの投与前後の腸内微生物叢を特徴付けた。特に、微生物叢を、細菌のリボソームサブユニット１６Ｓ　ｒＲＮＡをコードする遺伝子の一部のヌクレオチド配列分析によって評価した。メタゲノムＤＮＡを便サンプルから抽出し、定量化及び正規化した。１６Ｓ　ｒＲＮＡをコードする細菌遺伝子のＶ３～Ｖ４超可変領域をＰＣＲによって増幅し、ＰＣＲ産物をＩｌｌｕｍｉｎａ　ＭｉＳｅｑ技術を用いて定量化及び配列決定した。微生物群集のキャラクタリゼーション、階層的クラスタリング、分類学的分析及びートマップによる系統樹解析の構築のために、バイオインフォマティクス配列分析を実施した。

【０１３９】

メタボローム解析のために、揮発性有機化合物（ＶＯＣ－化学物質カテゴリー：短鎖脂肪酸、アルコール、ケトン、アルデヒド、チオール、酸、エステル、ピラジン、ピリジン、フェノール、フラン、テルペン、アルカン、アルケンなど）として産生された微生物由来の代謝物を同定し、定量化した。これらの化合物を、ＧＣ－ＭＳ／ＳＰＭＥ（固相マイクロ抽出によるガスクロマトグラフィー－質量分析法）システムを用いて抽出した。ＶＯＣ抽出のために、カルボキシル－ポリジメチルシロキサン（ＣＡＲ－ＰＤＭＳ）被覆繊維（８５μｍ）を、ＳＰＭＥプロセスにおいて使用した。各サンプルを３回ずつ分析し、平均１００～５００ｍｇを１０ｍｌガラス瓶に入れ、内部標準（ＩＳ）として４－メチル－２－ペンタノールを添加した。続いて、便サンプルを４５℃で１０分間平衡化した。５９７３Ｃ質量選択検出器に接続しかつＳｕｐｅｌｃｏｗａｘ　１０キャピラリーカラムを備

えたＧＣ－ＭＳ（Ｈｅｗｌｅｔｔ　Ｐａｃｋａｒｄ　６８９０　ＧＣ）に注入する前に、繊維を各サンプルに４５分間曝露した。代謝物を、それらの特性に従って検出した。代謝物を、純粋化合物に対するそれらの保持時間（Ｒｔ）に従って検出した。クロマトグラムを、フラグメントパターンをＮＩＳＴライブラリのフラグメントパターンと比較し、その後手動で目視検査することによって、統合及び同定した。定量的な代謝物データを、ＩＳ領域に対する相対領域を補間することによって得た。

【０１４０】

試験中に有害事象をモニターし、かつ１日目（Ｖ１）、１０日目（Ｖ２）、２８日目（Ｖ３）、５６日目（Ｖ４）及び８４日目（Ｖ５）における新生児の体重、身長及び頭囲を測定することによって、安全性を評価した。

【０１４１】

最後に、疝痛の発生の評価を、「Ｒｏｍｅ　ＩＶ」診断基準（後述）に従って行い、Ｖ１で母親に渡された特定の日誌によって、毎日の便の頻度及び硬さをモニターした。

【０１４２】

アムステルダム便スケール

このスケールは、便の量を４つのクラスに分類する：１：塗抹（smear）、２：２５％まで、３：２５～５０％、及び４：＞５０％。

【０１４３】

便の硬さを、以下のように分類する：Ａ：水様便（watery）、Ｂ：軟便（soft）、Ｃ：有形便（formed）、及びＤ：固形便（hard）。

【０１４４】

最後に、便の色を、６つのクラス（Ｉ～ＶＩ）に分類する。

【０１４５】

乳児仙痛についての「Ｒｏｍｅ　ＩＶ’」診断基準

臨床目的のために、乳児仙痛の診断は、以下のすべての基準の存在に基づかなければならない：症状の発現時及び解消時に子供が生後５か月未満であること；明白な原因もなく発生し、かつ親が予防したり解消したりすることができない、長期間にわたる啼泣（泣き、crying）、激越（agitation）又は過敏性（irritability）が反復的に起こること；根拠がない成長不足、発熱又は病気。用語「激越」は、断続的な発声を指し、「正確には泣いているわけでないが、目が覚めていて幸せな人の行動ではない（行動）」として定義される。子供たちは、啼泣と激越とを交互に繰り返すことが多く、２つの症状を区別することは困難である。

【０１４６】

研究目的のために、乳児仙痛の診断は、以前の基準とともに、以下の両方を含む必要がある：研究員又は医師との通話又は１対１の面接中に、親（両親）が、１日あたり少なくとも３時間、週に少なくとも３日にわたって、啼泣又は激越の期間が続いていることを報告する；選択された子供の群において２４時間継続していると報告され、少なくとも３時間続いていることが確認された、啼泣及び激越の持続時間は、毎日の日誌を記入することで、前向きに（prospectively）定量化される。

【０１４７】

統計分析

この作業仮説では、Ｌ．カゼイＤＧ（登録商標）（ラクトバチルス・パラカゼイＣＮＣＭＩ－１５７２；ＬＣＤＧ）が、同一の試験において２８日後に［Ｐｕｔｉｇｎａｎｉら、投稿中］２．３６Ｌｏｇ１０／２００ｍｇの便コピー（stool copies）の差異を示したＬ．サリバリス（L. salivaris）と同様の挙動を示すと仮定している（ＳＤ０．４で０．０４～ＳＤ２．５で２．５）。各群（ＮＢＷ、ＬＢＷ、ＶＬＢＷ）において、治療群が２０億ＣＦＵ／日摂取することを考慮すると、各治療群の９名の患者のサンプルは、両側ｔ検定及び各層の９５％有意水準により、この試験に８０％の検出力（power）を与える。

【０１４８】

留意すべきことは、Ｚｈｅｎｇらによって科学雑誌Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020に発表されたラクトバチルス属の再分類を受けて、菌株Ｌ．カゼイＤＧ（登録商標）（ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）又はＬ．パラカゼイＤＧ（登録商標）（ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２）が、２０２２年２月２日にラクチカゼイバチルス・パラカゼイＤＧ　Ｉ－１５７２　ＤＳＭ　３４１５４として再寄託されたことである。上述の２つの名称は、常に同じ菌株（細菌株）を指すため、互いに交換可能である。

【０１４９】

経過観察での潜在的な損失（１０％の脱落）を見込んで、各体重層につき２０名の新生児（そのうち１０名が積極的な治療を受け、１０名はプラセボを投与された。）、合計６０名の新生児を登録した。

【０１５０】

カテゴリーデータを、カウント（数）及びパーセンテージとして表し、一方、連続データを、平均値及び標準偏差又は中央値及び範囲として表した。

【０１５１】

カテゴリーデータの比較を、適宜、カイ二乗検定又はフィッシャーの正確確率検定を用いて行った。連続データを、スチューデントのｔ検定（独立又は従属データについて）、分散分析検定（Anova’s test）及び反復測定の分散分析を用いて比較し、適切な統計的検定によってデータの正規性を決定した。正規分布していない場合は、マン・ホイットニーの順位和検定又はウィルコクソンの符号順位検定、クラスカル・ウォリス検定又はフリードマン検定などのノンパラメトリック検定を適用した。必要であれば、応答変数に対する一連の独立変数の同時効果を評価するため又は時間データの考えられる交絡因子及び／若しくは分析を同定するために、多変量回帰手法を用いた。得られた結果は、Ｐ値＜０．０５で統計的に有意であるとみなされた。すべての分析を、Ｓｔａｔａ　１５ソフトウェア（ＳｔａｔＣｏｒｐ）を用いて実行した。

【０１５２】

結果

患者の手配及び基本的な特徴

６０名の被験体を、カジリーノ総合病院新生児科（Neonatology Unit of the Policlinico Casilino Hospital）において、早産及び正期産新生児から選択し、１：１の比率で２つの治療群にランダム化した：３０名にはＬＣＤＧで治療し、３０名にはプラセボを投与した（図５）。

【０１５３】

プラセボ群において、２０名の被験体（６６．７％）が試験を完了し、１０名（３３．３％）が試験を完了しなかった。２名（６．７％）の被験体が同意を撤回し、１名（３．３％）の患者が有害事象（ＡＥ）のために試験を早期に中止し、６名（２０．０％）の被験体が経過観察（ＦＵＰ）期間中に追跡不能となり（lost during follow-up）、１名（３．３％）の被験体が下咽頭の過誤腫の手術が必要であったために中止した。

【０１５４】

ＬＣＤＧ群において、２６名の被験体（８６．７％）が試験を完了し、４名（１３．３％）が試験を完了しなかった。このうち、３名（１０．０％）がＦＵＰ期間中に追跡不能となり、１名（３．３％）が「播種性血管内凝固症候群」及び「敗血症性ショック」により死亡した。

【０１５５】

人口統計学的特徴及び基本的特徴に関して、母親の平均年齢は、プラセボ群で３５歳±６歳、ＬＣＤＧ（治療）群で３５歳±５歳であり（Ｐ＝０．９４）、この２つの治療群の間に、母親の民族、授乳の種類、母親の体重及び身長、食事の種類、喫煙状況、身体活動、ペットの有無、並びに教育レベルに関して統計的に有意な差はなかった。

【０１５６】

新生児の特徴に関して、試験では、新生児を、出生体重に応じて３つの群に分類した：正出生体重（ＮＢＷ）、低出生体重（ＬＢＷ）及び極低出生体重（ＶＬＢＷ）。試験中に

、１２組の双子（合計２４名の新生児）が生まれ、具体的には、１４名（４６．７％）の被験体がＬＣＤＧ群に含まれ、１０名（３４．５％）の被験体がプラセボ群に含まれた（Ｐ＝０．３４）。プラセボ群において１８名（６２．１％）の新生児、ＬＣＤＧ群において１７名（５６．７％）の新生児が女性であり（Ｐ＝０．６７）、新生児の平均出生体重は、プラセボ群において２０５０ｇ±７８４ｇ、ＬＣＤＧ群において２００５ｇ±７６８ｇであった（Ｐ＝０．８２）。ＡＰＧＡＲスコア、妊娠（在胎）期間及びＰＮ／ＥＧ比（ＡＧＡ及びＳＧＡ）に関しても、２つの治療群の間に統計的に有意な差はなかった。

【０１５７】

Ｌ．カゼイＤＧ（ＬＣＤＧ）は、最初の投与の１０日後から腸内で検出され、最終来院（８４日）まで持続した。

【０１５８】

本発明者らは、ＶＬＷ（ｎ＝２０）、ＬＷ（ｎ＝２０）及びＮＷ（ｎ＝１９）に層別化した５９名の被験体から出生時に収集した２５１の便サンプルを分析した。ＬＣＤＧ株は、最初の投与の１０日後（Ｖ２）から便サンプル中に検出され、最終来院（８４日；試験終了時の来院）まで持続し、最初の経過観察時点（試験５６日目；製品の最終投与から２８日）からわずかに減少した（図６Ａ）。治療期間（１０日及び２８日）及び経過観察（５６日及び８４日）の両方の来院時に収集したサンプルにおいて、ＬＣＤＧの存在は、対照群よりも治療群で有意に高かった。この根拠は、出生体重に応じた各群（ＮＷ、ＬＷ及びＶＬＷ）からのサンプルを層別化することによっても確認された。特に、プラセボ群における３つの体重クラス間の比較（群内分析）では、Ｖ２（最初の投与の１０日後）でのＬＣＤＧ濃度において統計的な差を示した（ｐ値＝０．０１）が、一方、治療群では、３つの体重クラス間のＬＣＤＧ濃度の統計的な差（ｐ値＝０．０１）は、Ｖ３（製品の最終投与の２８日後）でみられた。評価した他の時点では、体重クラス間で統計的に有意な差は観察されなかった（図６Ｂ）。さらに、５６日目では、治療群とプラセボ群との間のＬＣＤＧ濃度の差は、ＮＷ及びＶＬＷの赤ん坊について、統計的に有意であった（図６Ｂ）。

【０１５９】

ウィルコクソンの符号順位検定を実施して、各群について異なる時点でのＬＣＤＧ濃度を比較した。プラセボ群では、Ｖ１とＶ２との比較（ｐ値＝０．０１２）、Ｖ１とＶ３との比較（ｐ値＝０．０１６）及びＶ１とＶ４との比較（ｐ値＝０．０１２）は、統計的に有意であった。治療群については、Ｖ１とＶ２との比較（ｐ値＝１．５×１０－１２）、Ｖ１とＶ３との比較（ｐ値＝５．８×１０－９）、Ｖ１とＶ４との比較（ｐ値＝１．８×１０－８）、Ｖ１とＶ５との比較（ｐ値＝２．０×１０－６）、Ｖ２とＶ４との比較（ｐ値＝１．６×１０－３）及びＶ２とＶ５との比較（ｐ値＝９．７×１０－３）は、統計的に有意であった（図７）。

【０１６０】

ＬＣＤＧによる治療は、腸内マイクロバイオームの異種性を維持することができた。

【０１６１】

ＬＣＤＧ治療が腸内マイクロバイオームの異種性を維持できるか否かを検証するために、１６Ｓ－ｒＮＡ．ｓを標的とするメタゲノム手法を用いて、便サンプルに対してα及びβ多様性分析を実施した。

【０１６２】

プラセボ群及び治療群に分けられた被験体の各時点でのα多様性の分析により、Ｖ２（１０日）及びＶ３（２８日）の時点では、プラセボ群の微生物叢が、治療群よりも微生物種の豊富さにおいて優れているように見えた（ｐ≧０．０５）。Ｖ４時点では、α多様性指数は同等であるようであり（ｐ≧０．０５）、一方、Ｖ５時点では、治療群が、プラセボ群よりも豊富さにおいて優れている（ｐ≧０．０５）（図８Ａ）。しかし、様々な時点で、プラセボ群と治療群との間の比較は統計的に有意でない（ｐ≧０．０５）。

【０１６３】

β多様性分析に関して、Ｕｎｗｅｉｇｈｔｅｄ　ＵｎｉＦｒａｃアルゴリズムを用いて

得られた多様性マトリックスは、プラセボ群と治療群との間の様々な時点でのＰＣｏＡとして表され、様々な時点においてこれらの２つの群の間の比較は統計的に有意でないことを示した（ｐ≧０．０５）。この結果を、ＰＥＲＭＡＮＯＶＡ統計分析によって確認し、ｕｎｗｅｉｇｈｔｅｄ　Ｕｎｉｆｒａｃアルゴリズムを用いて計算した距離行列に適用した（図８Ｂ）。

【０１６４】

様々な時点での比較に適用した門レベルでの操作的分類単位（ＯＴＵ）の分布の分析及びクラスカル・ウォリス検定を実施したところ、プラセボ／治療の比較のいずれにおいても統計的に有意な差を示さなかった（ｐ≧０．０５）（図８Ｃ）。

【０１６５】

属レベルでは、プラセボ群と治療群との間の比較で、Ｖ２時点で唯一統計的に有意であった（ｐ＜０．０５）。特に、ラクトバチルス属は、治療群でより高かった（図８Ｄ）。

【０１６６】

ＬＣＤＧの投与は、短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）の濃度を増大させる。

【０１６７】

メタボローム解析を、すべての経過観察時点（Ｖ１～Ｖ５）で収集が完了した被験体から収集した便サンプル（ｎ＝８５）について実施した。便サンプルを、固相マイクロ抽出システムによるガスクロマトグラフィー－質量分析法（ＧＣ－ＭＳ－ＳＰＭＥ）によって分析した。

【０１６８】

４９２個の代謝物を同定し、定量化し、１５の化学物質クラスに分類した：酸、アルコール、アルデヒド、アルカン、アルケン、アミン、芳香族炭化水素、エステル、フラン、フラノン、インドール、ケトン、フェノール、ピラジン及びテルペン。予想された通り、各サンプルの代謝プロファイルは、被験体間でかなりのばらつきを示した。分析に可能な限り頑健性をもたせるために、生データマトリックスを、サンプルセット全体の少なくとも１０％に存在する代謝物を含む９８個の代謝物のマトリックスに凝縮した。データ分析全体を、この凝縮したマトリックスに基づいて展開した。多変量解析を、各時点について、教師付きアプローチ（supervised approach）、すなわち、部分的最小二乗判別分析（ＰＬＳ－ＤＡ）を用いて実行した。治療（プラセボ／治療）に応じたサンプルの最大のクラスタリングは、Ｖ２時点（１０日）とＶ４時点（５６日）との間に発生し、治療サンプル中のＳＣＦＡ濃度が増大した（図９）。

【０１６９】

さらに、各試験来院時に、便の物理化学評価を行って、中性脂肪、酸性脂肪、石鹸、デンプン、肉及び野菜繊維、粘液及びｐＨ値の存在を評価した。カイ二乗検定を適用して、２つの治療群間の差を比較したが、いずれのパラメーターにも有意な差（Ｐ＞０．０５）は見られなかった。

【０１７０】

ＬＣＤＧの投与は、微生物叢の生態及び機能の両方に影響を与え、腸内に存在する細菌の生態的地位及び対応する機能的プロファイルを改変させた（modifying）。

【０１７１】

リアルタイムＰＣＲ、メタゲノム及びメタボロームの３つの異なるアプローチで得られた結果を、スピアマン相関によって互いに相関付けた。Ｖ２時点及びＶ３時点は、それぞれ１０日及び２８日でのプロバイオティックの投与に一致し、これらの時点を相関分析のために選択した。なぜなら、これらの時点で、メタゲノム解析、メタボローム解析及びリアルタイム解析が、プラセボ群と治療群との間で最も統計的に有意な差を示したからである。

【０１７２】

特に、Ｖ２時点では、ラクトバチルス・パラカゼイ（ＣＦＵ／ｍＬ）は、代謝物のシクロヘキサノン、ｎ－デカン酸及び３，４－ジメチルヘプタンと、及びＯＴＵのラクトバチルス属（Lactobacillus）、グラニュリカテラ属（Granulicatella）と正の相関を示

した（ｐ≦０．０５）。さらに、ＯＴＵと代謝物との間にいくつかの統計的に有意な正の相関が認められる。プロバイオティック摂取後に最も興味深いものは、ブタン酸を含むＳＣＦＡであり、ブタン酸は、ルミノコッカス属（Ruminococcus）、プレボテラ属（Prevotella）、コリンセラ属（Collinsella）、フィーカリバクテリウム属及びオシロスピラ属と有意な相関を示す（ｐ≦０．０５）。ペンタン酸は、ストレプトコッカス属（Streptococcus）、グラニュリカテラ属及びエンテロコッカス属（Enterococcus）と有意な相関を示し（ｐ≦０．０５）、一方、プロピオン酸は、エガセラ属、バクテロイデス属及びビフィドバクテリウム属と有意な相関を有する（ｐ≦０．０５）。

【０１７３】

Ｖ３時点では、ラクトバチルス・パラカゼイ（ＣＦＵ／ｍＬ）は、２，３－ジメチルペンタナール、１－ヘキサノール、デカナール及びドデカン酸と正の相関と示した（ｐ≦０．０５）（図１０Ａ）が、ラクトバチルス・パラカゼイ（ＣＦＵ／ｍＬ）と様々なＯＴＵとの間には有意な相関が見られなかった（図１０Ｂ）。最後に、ＯＴＵと代謝物との間にはいくつかの統計的に有意な正の相関（ｐ≦０．０５）が認められ、特に、ブタン酸及びプロパン酸は、コリンセラ属と有意な相関を示し（ｐ≦０．０５）、一方、ペンタン酸は、プロピオニバクテリウム属（Propionibacterium）、フィーカリバクテリウム属、プレボテラ属及びコプロコッカス属（Coprococcus）と正の相関を有する（図１０Ｃ）。

【０１７４】

ＬＣＤＧの投与では仙痛の数は減少しなかった。

【０１７５】

「Ｒｏｍｅ　ＩＶ」診断基準に従って、治験責任医師は、１日あたり少なくとも３時間の激越状態とともに、啼泣が週に少なくとも３日、３時間を超えた場合に、仙痛のエピソード（発現）を記録した。試験中、母親は、乳児の啼泣が３時間を超えた場合に、その啼泣を記録する日誌を記入する必要があった。関与したすべての試験来院（ランダム化の１０日後、２８日後、５６日後及び８４日後）において、２つの試験群（プラセボ及びＥｎｔｅｒｏｌａｃｔｉｓ　Ｂａｂｙ）の間に統計的に有意な差は見られなかった。実際、各試験群において１日あたり３時間を超えて啼泣した患者の数及び平均啼泣時間は、各試験来院でほぼ同様であり、試験中に合計８回の仙痛が発生した（プラセボ群で４回、及びＬＣＤＧ群で４回）。

【０１７６】

便の硬さ、量及び色

治験中、便の硬さ、量及び色を、アムステルダム便スケールを用いて評価した。色及び硬さは、１０日目（Ｖ２）及び５６日目（Ｖ４）で、プラセボ群と治療群との間で有意に異なっていた。

【０１７７】

Ｖ２では、ｐ値は、排泄物の色についてはＰ＜０．０００１であり、排泄物の硬さについてはＰ＝０．００１６であった。具体的には、プラセボ群及び治療群に属するＰＴについて記録されたそれぞれ合計１４３個及び２２１個の排泄物のうち、色ＩＩに分類された排泄物は、プラセボ群で３７個（２５．９％）及び治療群で１８個（８．１％）であり、色ＩＶに分類された排泄物は、プラセボ群で７個（４．９％）及び治療群で０個であった。硬さに関して、硬さＢに分類された排泄物は、プラセボ群で８０個（５５．９％）及び治療群で１５２個（６８．８％）であり、硬さＣ／Ｄ及びＤに分類された排泄物は、プラセボ群で０個、並びに治療群でそれぞれ６個（２．７％）及び２個（０．９％）であった。

【０１７８】

来院４では、プラセボ群及び治療群のＰＴについてそれぞれ１１９個の排泄物及び１８３個の排泄物が生じ、治療群間で色及び硬さにおいて統計的に有意な差を有した（アムステルダムスケールを用いて、排泄物の色についてＰ＝０．００７及び排泄物の硬さについてＰ＜０．０００１）。

【０１７９】
量に関しては、２８日目（Ｖ３）に収集したサンプルで唯一有意であり、プラセボ群及び治療群について記録された総排泄数は、それぞれ、１２２回及び２１９回であった。
【０１８０】
セキュリティ評価
登録した新生児の成長をモニターするために、体重、身長及び頭囲パラメーターを、各試験来院時に評価した。治療群とプラセボ群とを比較すると、試験中に統計的に有意な差は見られなかった。最後に、バイタルサインに差は見られなかった（治療群よりもプラセボ群において高かったＲＲを除く）。
【０１８１】
有害事象（ＡＥ）に関して、試験中に、プラセボ群で合計２１件のＡＥ及びＬＣＤＧ群で合計１６件のＡＥを記録した。これらの有害事象のうち、プラセボ群で１０件のＳＡＥ及び治療群で６件のＳＡＥを記録し、プラセボ群で２件の重度ＡＥ及び治療群で４件の重度ＡＥを記録した。
【０１８２】
プラセボ群では、１０件（４７．６％）のＡＥが軽度、９件（４２．９％）のＡＥが中等度の重症度（moderate severity）、及び２件（９．５％）のＡＥが重度の重症度（severe severity）であるとみなされたが、ＬＣＤＧ群では、８件（５０．０％）のＡＥが軽度、４件（２５．０％）のＡＥが中等度の重症度、及び４件（２５．０％）のＡＥが重度の重症度であるとみなされた。
【０１８３】
プラセボ群に属するＰＴで発生したＡＥのうち、３件（１４．３％）のＡＥは、おそらく治療に関連ないとみなされ（１件は「新生児呼吸窮迫症候群」、２件は「腹痛」）、１件（４．８％）のＡＥは、おそらく治療に関連するとみなされた（「胃食道逆流症」）。ＬＣＤＧ群に属するＰＴにおいて、２件（１２．５％）のＡＥは、おそらく治療に関連ないとみなされ（来院２の９日後にＰＴの死亡を引き起こした「播種性血管内凝固症候群」及び「敗血症性ショック」）、２件（１２．５％）のＡＥは、おそらく治療に関連するとみなされた（「壊死性大腸炎」及び「敗血症」）。
【０１８４】
考察
ある特定の新生児治験では、腸仙痛の治療におけるプロバイオティクスの作用が研究されており、プラセボと比較して、啼泣エピソード及び仙痛症状の期間を短縮する効力があることが明らかとなっている［Ｌｕｎｄｅｌｉｎ］。
【０１８５】
新生児期間のプロバイオティック治療の長期経過観察研究では、プロバイオティック治療群の被験体は、プラセボ群に割り当てられた被験体よりもアレルギー発症率が低いことが明らかとなった［Ｄｅｎｋｅｌ］。
【０１８６】
さらに、プロバイオティックの投与は、早産新生児において壊死性腸炎の発生の低下及び死亡率の低下と相関していた[Ｌｕｎｄｅｌｉｎ、Ｓｔｒｕｎｋ、Ｓｈａｎｅ、Ｃｏｓｔｅｌｏｅ]。
【０１８７】
これらの知見によると、プロバイオティクスは、優れた安全性プロファイルを特徴とする。プロバイオティクスに含まれる菌株によって引き起こされる菌血症の症例が記録されているが、それらの症例は極めてまれであり、重度の免疫不全の存在によって決定される［Ｌｕｎｄｅｌｉｎ、Ｓａｌｍｉｎｅｎ、Ｔｈｏｍａｓ］。
【０１８８】
しかし、新生児におけるプロバイオティック補給の安全性及び潜在的な効果については、さらなる証拠が必要である。
【０１８９】

プロバイオティック混合物においてラクトバチルスの使用が増加していることを考慮すると、糞便中のＬＣＤＧ細胞を正確に同定してカウント（計数）することにより、ヒトの腸内微生物叢におけるこれらのプロバイオティクスの実際の安定性及び持続性の研究が改善されるであろう［Ａｒｉｏｌｉ］。

【０１９０】

本件試験（the present study）では、初めて、ＬＣＤＧの安全性及びＬＣＤＧが微生物叢の組成にプラスの影響を与える能力を、ＮＭＷ乳児のみならずＬＷ及びＶＬＷ被験体を含む特別な集団において試験した。

【０１９１】

ＬＣＤＧは、最初の投与の１０日後から腸内で検出され、最終来院（８４日；試験の終了）まで持続したが、最初の経過観察時点（試験の５６日目；製品の最終投与から２８日）からわずかに減少した。ＬＣＤＧの存在は、ＮＷ及びＶＬＷの赤ん坊について、Ｖ３（２８日目；治療の最終日）では対照群よりも治療群で有意に多かった。

【０１９２】

便サンプル中のプロバイオティック株の分析において、α及びβ多様性分析を考慮すると、微生物叢全体のプロファイルの変化は、時間依存性であり、治療によって影響を受けないようであった（治療が腸内マイクロバイオームの異種性を持続できることが実証された）が、属レベルでは、一時解析によると、プロバイオティックの投与により、投与開始から１０日後にラクトバチルス属の種が統計的に有意に増大する。この増大は後の時点でも検出されるが、統計的に有意ではなくなる。

【０１９３】

メタボローム解析に関しては、予想どおり、各サンプルの代謝プロファイルは、被験体間でかなりのばらつきを示した。ＰＬＳ－ＤＡ解析により、ブタン酸（酪酸）及びプロパン酸（短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ））代謝物が、プラセボ群と治療群との間のクラスタリングの主因であることが明らかにされ、治療群から収集したサンプル中のそれらの濃度が増大している。

【０１９４】

これらのすべての結果は、腸内微生物叢の異種性を維持しながら胃腸通過を生き延びるＬＣＤＧの能力を強調し、確認した。これらの結果は、健康な小児（３～１２歳）［Ｒａｄｉｃｉｏｎｉ］又は成人集団［Ｄｒａｇｏ］で実施された試験の結果と一致している。

【０１９５】

さらに、３つの異なるアプローチ（リアルタイムＰＣＲ、メタゲノミクス及びメタボロミクス）で得られた結果を、スピアマン相関によって互いに相関付けた。

【０１９６】

これらのアプローチから得られたデータを統合すると、プロバイオティックＬＣＤＧの投与が微生物叢の生態及び機能の両方に影響を与え、腸内に存在する細菌の生態的地位及び対応する機能的プロファイルを変化させることが示される。特に、ブタン酸及びプロピオン酸などのいくつかのＳＣＦＡは、フィーカリバクテリウム属、オシロスピラ属、エガセラ属、バクテロイデス属及びビフィドバクテリウム属などのある特定の有益な細菌と正の相関を示した。これらの分子は、栄養素の吸着に影響を与える能力を示した［Ｈｅｉｍａｎｎ］。さらに、試験２８日目に、ラクトバチルス・パラカゼイ（ＣＦＵ／ｍＬ）と、シクロヘキサノン、ｎ－デカン酸及び３，４－ジメチルヘプタンとの間に正の相関（ｐ≦０．０５）が見られた。

【０１９７】

治験中に、便の硬さ、量及び色も記録した。量は、２８日目に収集したサンプルにおいてのみ有意であったが、色及び硬さは、１０日目及び５６日目（投与終了の４週後）で有意に異なっていた。

【０１９８】

一方、「Ｒｏｍｅ　ＩＶ」診断基準に基づく疝痛の発生には差は観察されなかったが、これらの結果は、このパラメーターの改善を確認するには治療及び総試験期間の両方が不

十分である可能性を考慮して分析される必要があるかもしれない。例えば、Ｐａｒｔｔｙら［Ｐａｒｔｔｙ］は、最長１年間の経過観察期間を設けてプロバイオティックの補給を最長２か月間（この試験の期間の２倍）延長して、早産新生児において啼泣及び激越に伴う症状を軽減できることを実証した。

【０１９９】

安全性に関しては、前述したように、バイタルサインに差は見られなかった（治療群よりもプラセボ群において高かったＲＲを除く）。

【０２００】

試験中、登録した新生児の成長をモニターするために、体重、身長及び頭囲パラメーターも、各試験来院時に評価した。治療群とプラセボ群とを比較すると、試験中に統計的に有意な差は見られなかった。以前の文献では、プロバイオティクスとプレバイオティクスとの組み合わせを含む市販の共生（シンバイオティック）液（symbiotic solution）が早産新生児の体重及び頭囲を改善できることが示されていた［Ｇｕｎｅｙ］が、他の研究では、本発明者らの結果（すなわち、治療群とプラセボ群との間に差がない）と一致するデータ［Ｖｌｉｅｇｅｒ］、特に、体重パラメーターについてのデータ［Ｉｎｄｒｉｏ、Ｕｎｄｅｒｗｏｏｄ］が示されている。新生児の体重増加は、多くの併存する病状、並びに完全腸外補給（total parental supplementation）及び／又は母乳強化のアベイラビリティ（availability）の影響を受けており［Ｍｏｎｉ］、これが、その研究の両群の体重傾向に影響を与えた可能性がある。

【０２０１】

近年、Ｍａｔｉｎら［Ｍａｔｉｎ］は、プロバイオティクス（１．５×１０^{9}ＣＦＵ／ｇのラクチカゼイバチルス・パラカゼイ・亜種・パラカゼイ（Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei））を授乳中の母親又はその母親の極低出生体重（ＶＬＢＷ）新生児に経口投与して、新生児の血清総ビリルビン（ＴＳＢ）レベル及び体重増加の変化を調べた試験の結果を発表した。選択したプロバイオティクスの投与は、新生児のＴＳＢレベルを低下させたが、介入の最初の週以降の体重増加には有意な影響はなかった。

【０２０２】

さらに、両方の試験群において記録された重度のＡＥの評価のみならず、分析された安全性及び忍容性プロファイルに基づいて、試験製品は、この試験においてプラセボと同様に安全でありかつ忍容性が良好であることが示された。

【０２０３】

制限及び今後の計画

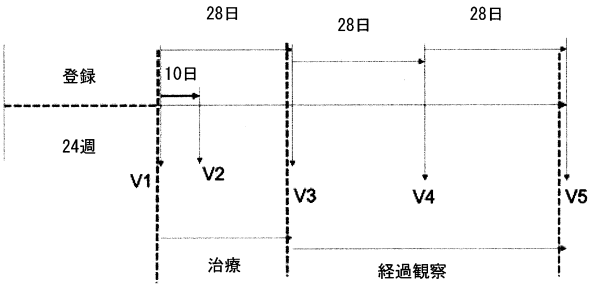
全体として、この試験の結果により、ＮＢＷ、ＬＢＷ及びＶＬＢＷ新生児などの脆弱な集団に対してさえ、この製品の高い安全性プロファイルが確認された。ＬＤＣＧは、消化管内で生き延びて腸内微生物叢及びＳＣＦＡ組成に影響を与える能力が確認されたが、栄養素の吸収及びその結果としての新生児の成長における腸内微生物叢の重量な役割を考慮すると、将来的には、少なくとも１年の経過観察を検討することによってこの製品の長期的効果を分析することが有用であろう。

【０２０４】

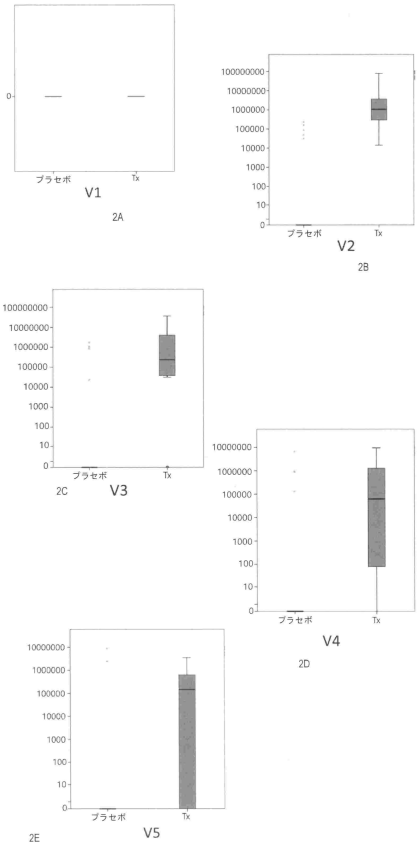
この治験では十分に強調されていないもう１つの興味深い側面は、さまざまな栄養条件下におけるマイクロバイオーム及び血清メタボロームに対するこの製品の潜在的な影響である。実際、幼児期の栄養が、腸内微生物叢の発達を決定する。母乳（授乳）とは異なり、人工乳の授乳は、腸内微生物叢及び血清メタボロームがより好ましくない状態に向かうほうに影響を与えることが示されている。近年、別のラクトバチルス・パラカゼイ株が、人工乳の授乳の影響を打ち消すわけではないものの、マイクロバイオーム及び血清メタボロームに影響を与え、人工乳の授乳による代謝への何らかの好ましくない影響を軽減する可能性があることが示されている［Ｌｅｅ］。

【図面】

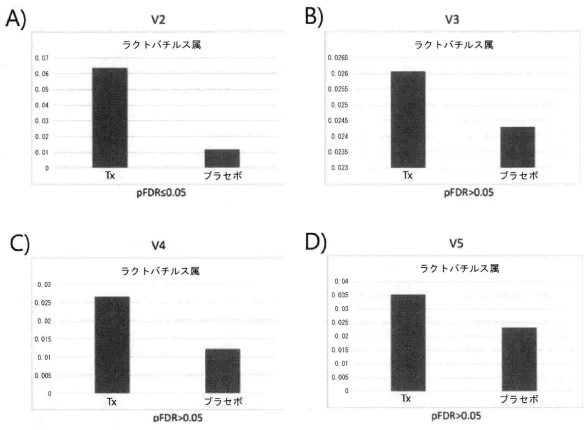
【図１】


28日
28日
28日
登録
10日
24週
V1
V2
V3
V4
V5
治療
経過観察

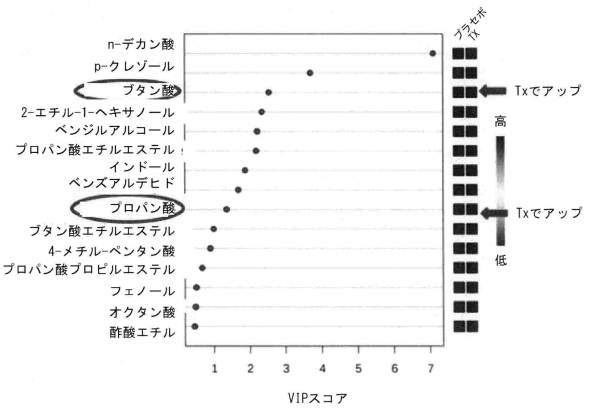
【図２】


プラセボ
Tx
V1
2A
V2
2B
V3
2C
V4
2D
V5
2E

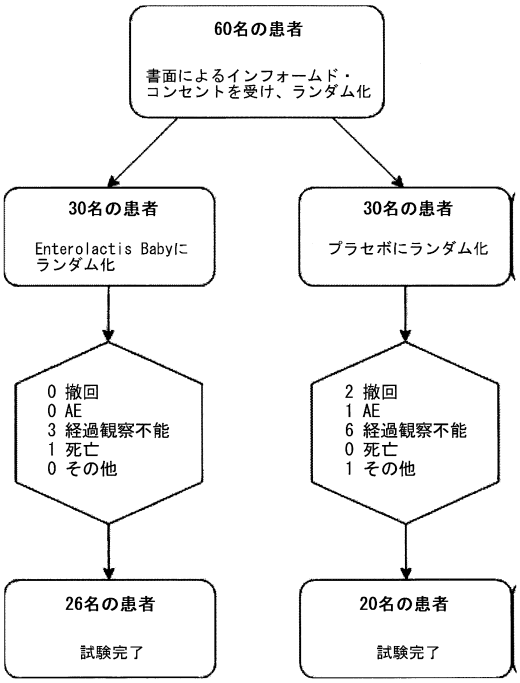
【図３】


A)
V2
ラクトバチルス属
pFDR≤0.05
B)
V3
ラクトバチルス属
pFDR>0.05
C)
V4
ラクトバチルス属
pFDR>0.05
D)
V5
ラクトバチルス属
pFDR>0.05
Tx
プラセボ

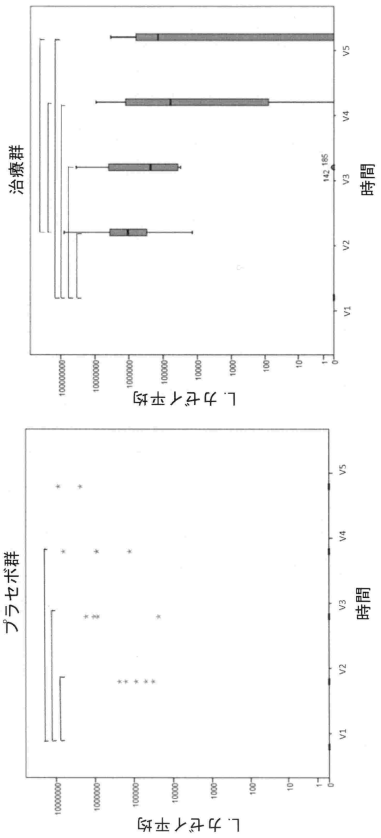
【図４】


n-デカン酸
p-クレゾール
ブタン酸
2-エチル-1-ヘキサノール
ベンジルアルコール
プロパン酸エチルエステル
インドール
ベンズアルデヒド
プロパン酸
ブタン酸エチルエステル
4-メチル-ペンタン酸
プロパン酸プロピルエステル
フェノール
オクタン酸
酢酸エチル
プラセボ
Tx
Txでアップ
高
低
Txでアップ
VIPスコア

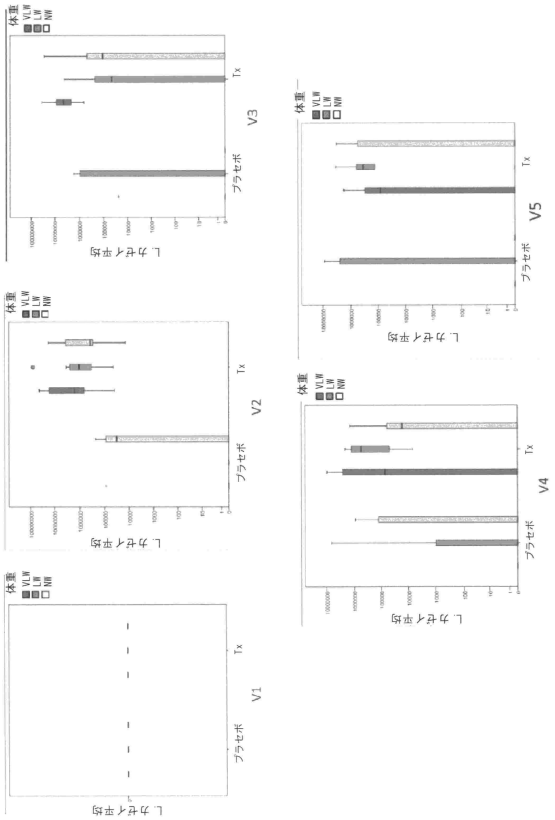
【図５】


60名の患者
書面によるインフォームド・
コンセントを受け、ランダム化
30名の患者
Enterolactis Babyに
ランダム化
30名の患者
プラセボにランダム化
0 撤回
0 AE
3 経過観察不能
1 死亡
0 その他
2 撤回
1 AE
6 経過観察不能
0 死亡
1 その他
26名の患者
試験完了
20名の患者
試験完了

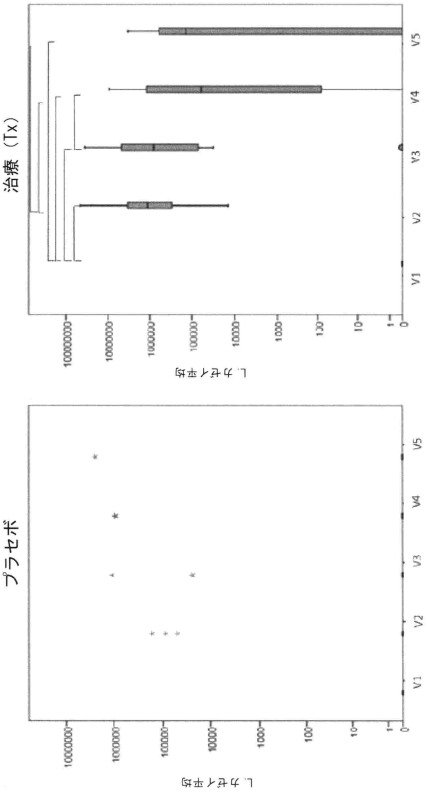
【図６Ａ】


治療群
プラセボ群
時間
L. カゼイ平均

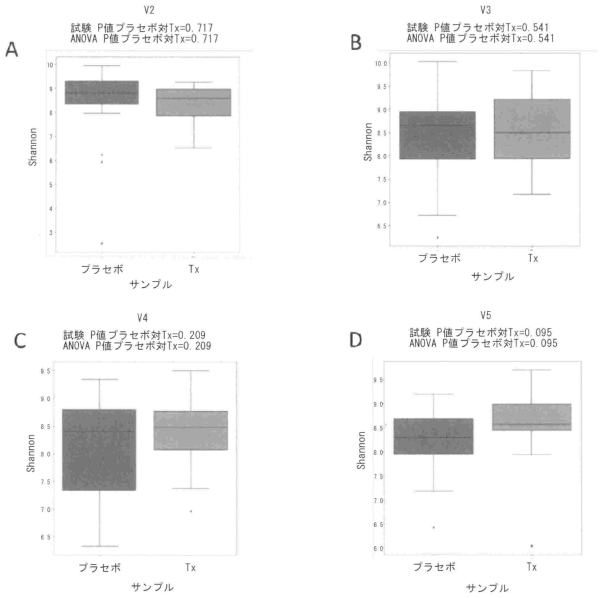
【図６Ｂ】


体重
VLW
LW
NW
Tx
プラセボ
V1
V2
V3
V4
V5
L. カゼイ平均

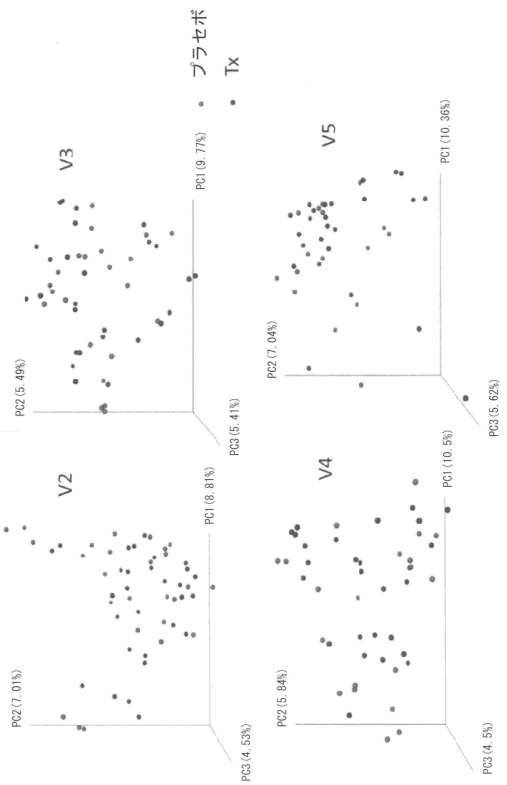
【図７】


治療（Tx）
プラセボ
V1
V2
V3
V4
V5
L. カゼイ平均

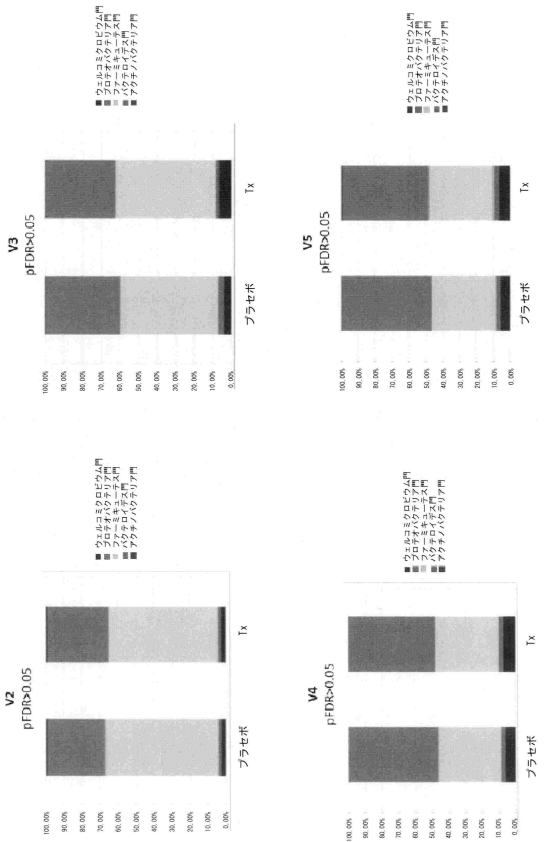
【図８Ａ】



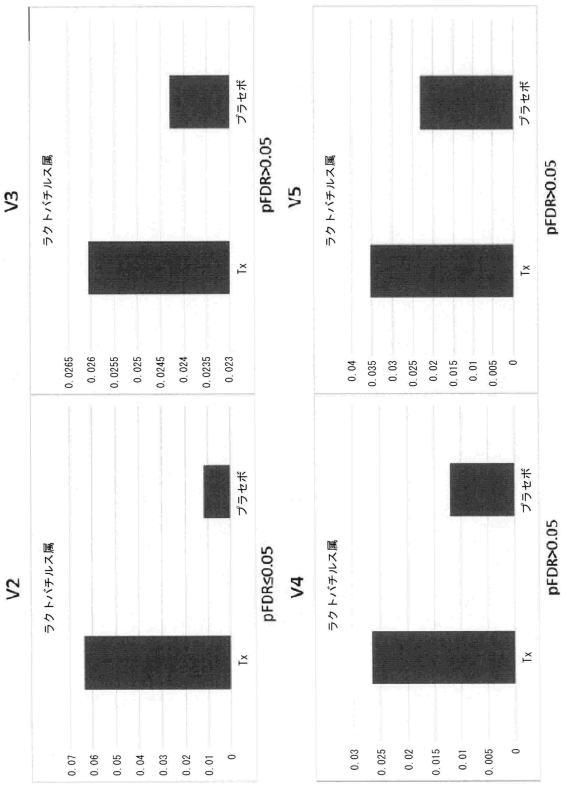
【図８Ｂ】



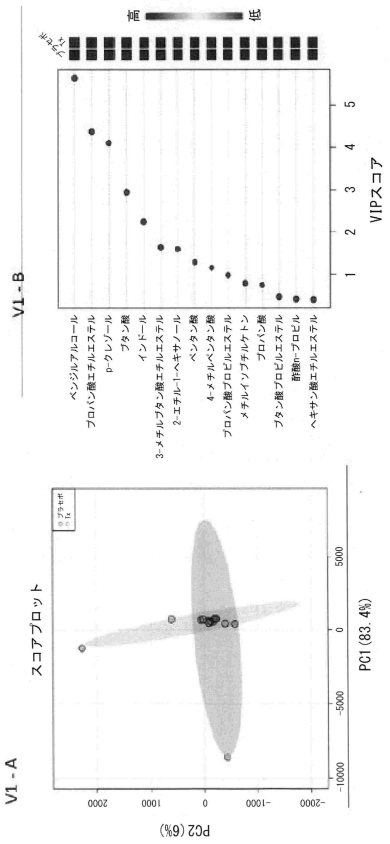
【図８Ｃ】



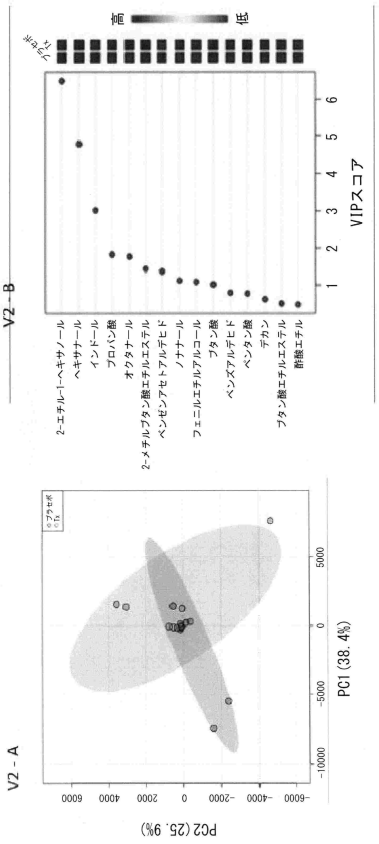
【図８Ｄ】



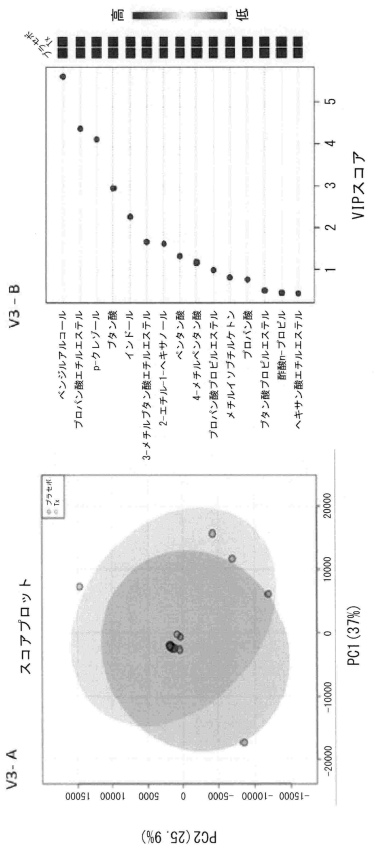
【図９Ａ】



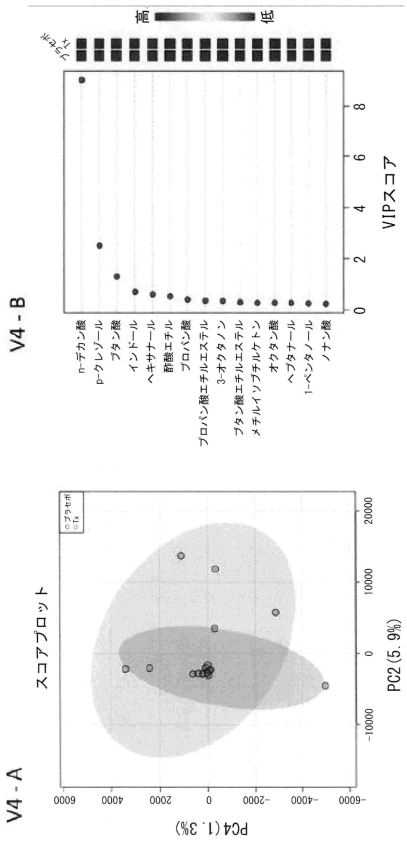
【図９Ｂ】



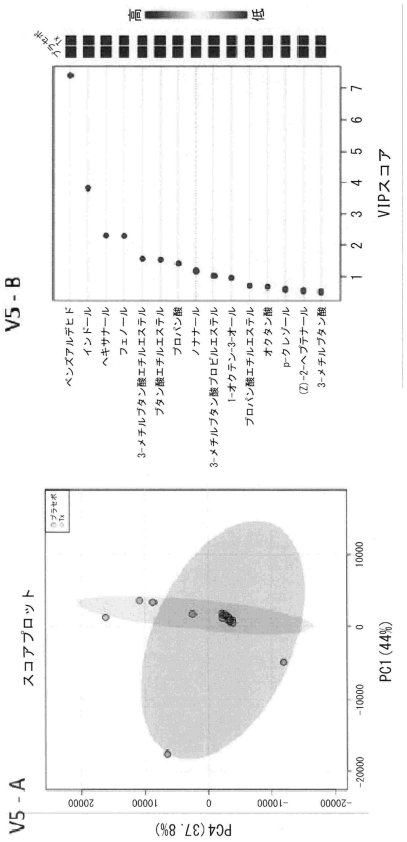
【図９Ｃ】



【図９Ｄ】



【図９Ｅ】



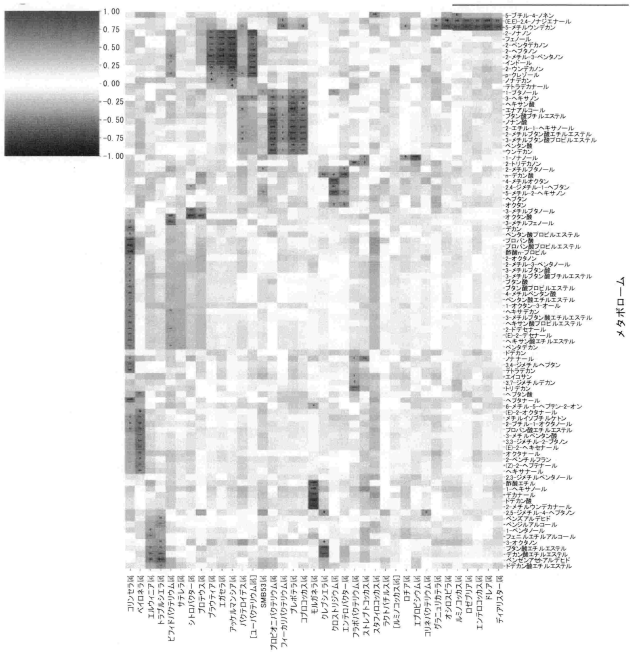
【図１０Ａ】



【図１０Ｂ】



【図１０Ｃ】



【手続補正書】
【提出日】令和4年11月15日(2022.11.15)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
炎症性及び／又は機能性の消化管障害を有する被験体の治療、予防及び／又は治癒方法に使用するための菌株であって、前記障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎、敗血症、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、主に便秘（prevalent constipation）を伴う又は便秘型腸（constipated bowel）のＩＢＳ、主に下痢（prevalent diarrhoea）を伴う又は下痢型腸（diarrhoeic bowel）のＩＢＳ、交代型腸（alternating bowel）のＩＢＳ、未分類のＩＢＳ、慢性炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病及び潰瘍性直腸結腸炎を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、
・前記菌株が、ラクトバチルス・パラカゼイ（Lactobacillus paracasei）種に属し、ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、
・前記被験体が、生後４週間以内の新生児被験体である、
菌株。
【請求項２】
前記被験体の月齢が、１か月から１２か月以下である、請求項１記載の使用のための菌株。
【請求項３】
前記株が、生存可能な菌株（viable strain of bacteria）又は前記菌株の誘導体であり、後者が、間欠滅菌した（tyndallized）菌株、超音波処理した菌株、放射線、好ましくは、ガンマ放射線による不活性化菌株、溶解した菌株又は細菌ホモジネート、前記菌株抽出物又は壁画分を含むか、あるいはそれらからなる群より選択され、好ましくは、間欠滅菌した菌株である、請求項１又は２記載の使用のための菌株。
【請求項４】
前記障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎、敗血症、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、主に便秘を伴う又は便秘型腸のＩＢＳ、主に下痢を伴う又は下痢型腸のＩＢＳ、交代型腸のＩＢＳ、未分類のＩＢＳ、慢性炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病、潰瘍性直腸結腸炎を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用のための菌株。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための混合物Ｍであって、
ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択されるラクトバチルス・パラカゼイ種に属する菌株、並びに
食品グレード又は医薬品グレードの少なくとも１つの添加物及び／又は賦形剤
を含むか、あるいはそれらからなる、混合物Ｍ。
【請求項６】
請求項５記載の使用のための混合物Ｍであって、
ラクトバチルス・パラカゼイＤＧ（登録商標）ＣＮＣＭ　Ｉ－１５７２、ラクトバチルス・パラカゼイＬＰＣ－Ｓ０１　ＤＳＭ　２６７６０及びそれらの混合物を含むか、ある

いはそれらからなる群より選択されるラクトバチルス・パラカゼイ種に属する菌株、並びに
・ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＢｂＩＢＳ０１ ＤＳＭ ３３２３１、
・ビフィドバクテリウム・ブレーベＢｂＩＢＳ０２ ＤＳＭ ３３２３２、
・ビフィドバクテリウム・アニマリス・亜種・ラクティス（Bifidobacterium animalis subsp. lactis）ＢｌＩＢＳ０１ ＤＳＭ ３３２３３、
・ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）ＬｐＩＢＳ０１ ＤＳＭ ３３２３４、
・ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）ＢｂｆＩＢＳ０１ ＤＳＭ ３２７０８、及び
それらの混合物
を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される少なくとも１つのさらなる菌株
を含むか、あるいはそれらからなる、混合物Ｍ。

【請求項７】
請求項５又は６のいずれか一項に記載の使用のための混合物Ｍであって、
・ビタミンＡ群、Ｂ群、Ｃ群、Ｄ群、Ｅ群及び／又はＫ群から少なくとも１つのビタミン、好ましくは、ビタミンＢ群及び／又はビタミンＤ群、
・グルタチオン、レスベラトロール及びｔｒａｎｓ－レスベラトロールなどのポリフェノール、コエンザイムＱ１０、アスタキサンチン、リコペンを含むか、あるいはそれらからなる群より選択される１又は複数の抗酸化物質、
・ボタニカル（植物粗加工物、botanicals）又はその抽出物を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される、好ましくは、バレリアン、パッションフラワー、レモンバーム、セイヨウサンザシ及びカモミールから選択される、腸弛緩作用を有する１又は複数の植物物質、
・ミネラル又はその塩、例えば、亜鉛、セレン、マグネシウム、カリウム、
・オメガ９を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される１又は複数の一不飽和脂肪酸、並びに／あるいは多不飽和脂肪酸、オメガ３及びオメガ６、
・１又は複数の免疫賦活物質、下痢止め物質及び／又は栄養素、
・好ましくは、イヌリン、フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）、キシロオリゴ糖（xylitol-oligosaccharide）（ＸＯＳ）、グアーガム、ラクトフェリン及びそれらの混合物からなる群（ＩＩ）より選択される少なくとも１つのプレバイオティック、より好ましくは、イヌリン、
並びにそれらの混合物
を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される少なくとも１つのさらなる活性成分をさらに含む、混合物Ｍ。

【請求項８】
前記障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用のための菌株。

【請求項９】
前記障害が、新生児仙痛、腸仙痛、慢性腸炎又は早産新生児の慢性腸炎、壊死性腸炎を含むか、あるいはそれらからなる群より選択される、請求項５～７のいずれか一項に記載の使用のための混合物Ｍ。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/056538

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/745 A61P1/04
ADD.

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)
A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/053642 A1 (SOFAR SPA [IT]) 25 March 2021 (2021-03-25) cited in the application *cf. abstract, page 4, 2nd para., page 5, paras. 2 and 3, page 15, lines 4-25, claims 1, 9 and 10*	1-7
X,P	WO 2021/240398 A1 (SOFAR SPA [IT]) 2 December 2021 (2021-12-02) *cf. abstract, page 2, lines 11-13, page 5, line 17 bridging with line 16 at page 6, page 13, lines 5-23, page 22, section B.1.2, claims 1, 6 and 9*	1-7

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
31 August 2022	15/09/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Stoltner, Anton

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2022/056538

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/053636 A1 (SOFAR SPA [IT]) 25 March 2021 (2021-03-25) *cf. abstract, page 1, 2nd para., page 3, 2nd para., in particular the fourth para. at page 4, page 15, 2nd para., claims 1, 10 and 12*	1-7
Y	WO 2021/090228 A1 (SOFAR SPA [IT]) 14 May 2021 (2021-05-14) cited in the application *cf. abstract, page 1, first para., page 4, para. 4, page 9, 2nd para. from the foot, claims 1, 7 and 12*	1-7

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2022/056538

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021053642 A1	25-03-2021	AU 2020350216 A1	31-03-2022
		BR 112022004527 A2	07-06-2022
		CA 3154981 A1	25-03-2021
		CN 114728029 A	08-07-2022
		EP 4031158 A1	27-07-2022
		IL 291463 A	01-05-2022
		WO 2021053642 A1	25-03-2021
WO 2021240398 A1	02-12-2021	NONE	
WO 2021053636 A1	25-03-2021	AU 2020347961 A1	31-03-2022
		BR 112022004432 A2	31-05-2022
		CA 3154976 A1	25-03-2021
		CN 114728027 A	08-07-2022
		EP 4031157 A1	27-07-2022
		IL 291445 A	01-05-2022
		WO 2021053636 A1	25-03-2021
WO 2021090228 A1	14-05-2021	CA 3160295 A1	14-05-2021
		CO 2022006972 A2	19-08-2022
		EP 4054610 A1	14-09-2022
		IT 201900020422 A1	05-05-2021
		WO 2021090228 A1	14-05-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,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
ヴィア ラガッツィ デル ’９９， ５， アルファシグマ ソシエタ ペル アチオニ内

Ｆターム（参考） 4C087 AA01 AA02 BC56 CA09 MA52 NA14 ZA66 ZC51