(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-517546
(P2024-517546A)
(43)公表日　令和6年4月23日(2024.4.23)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ２３Ｌ	*33/135 (2016.01)*	Ａ２３Ｌ	33/135	４Ｂ０１８
Ａ６１Ｋ	*9/19 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	9/19	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ	*3/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/00	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ	*19/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/00	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ	*1/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00	４Ｃ０８７

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全52頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-555342(P2023-555342)
(86)(22)出願日　令和4年3月11日(2022.3.11)
(85)翻訳文提出日　令和5年9月7日(2023.9.7)
(86)国際出願番号　PCT/SE2022/050245
(87)国際公開番号　WO2022/191767
(87)国際公開日　令和4年9月15日(2022.9.15)
(31)優先権主張番号　21162450.7
(32)優先日　令和3年3月12日(2021.3.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(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　312014878
バイオガイア エイビー
スウェーデン王国 １１２ ２７ ストックホルム、 クングスブロプラン ３
(74)代理人　110000855
弁理士法人浅村特許事務所
(72)発明者　ルース、ステファン
スウェーデン王国、ウプサラ、ベストゲターレサン ５７
(72)発明者　オルカハダ、マリー ノエル
フランス共和国、エシュネベ、リュ ドゥラ ピエール、１６８
(72)発明者　ボネ、ニコラス
フランス共和国、ナンジー、ルート ドゥシェ デボワ １３８
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　最終製剤中のＧＯＳプレコンディショニングＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）及びＧＯＳ

(57)【要約】
本発明は、本明細書において、培養中にＧＯＳによってＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）をプレコンディショニングすることによって哺乳動物におけるプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率及び活性を増強すること、並びに組成物中にさらに添加されたＧＯＳと一緒に投与した場合のそのようなプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の驚くほど高いシンバイオティック効果に一般に関する。したがって、本発明は、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養及び製造し、そのようなプレコンディショニングされた株を追加量のＧＯＳと組み合わせて含有する生成物を調製する方法を含む。さらに詳細には、本発明は、ＧＯＳを含む培地中で細菌を増殖させ、最終生成物中のさらなるＧＯＳとともにプレコンディショニングされた細菌を投与する工程によって得られる、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物に関する。本発明者らは、そのような方

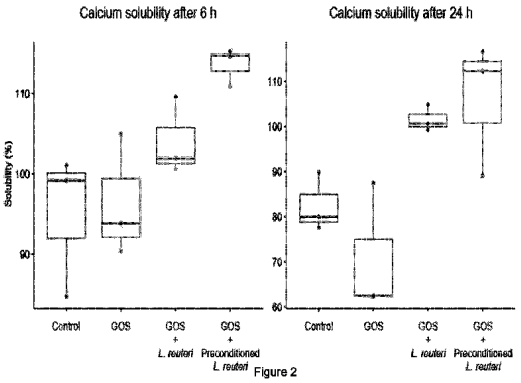


Figure 2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
プロバイオティック組成物を調製する方法であって、
ａ）ａｉ）ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の存在下で増殖培地中でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養し、それによって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングすることと、
ａｉｉ）増殖培地からプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を採取することと
によって、プロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングする工程、及び
ｂ）工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株にＧＯＳを添加して、プロバイオティック組成物を調製する工程
を含む、上記方法。
【請求項２】
ＧＯＳが、工程ａｉ）では、増殖培地中の少なくとも０．２重量％、好ましくは少なくとも０．５重量％、及びさらに好ましくは少なくとも０．７５重量％のＧＯＳの量で増殖培地に添加される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＧＯＳが、工程ａｉ）では、増殖培地中の最大８重量％のＧＯＳ、好ましくは最大７重量％のＧＯＳ、さらに好ましくは最大６重量％のＧＯＳ、及びさらになお好ましくは最大５重量％のＧＯＳ、例えば、最大４重量％のＧＯＳ、又は最大３重量％のＧＯＳの量で増殖培地に添加される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
ＧＯＳが、工程ａｉ）では、増殖培地中の０．２重量％～８重量％の範囲、好ましくは０．５重量％～７重量％の範囲、さらに好ましくは０．７５重量％～６重量％の範囲、及びさらになお好ましくは０．７５重量％～５重量％のＧＯＳの範囲で選択される量で増殖培地に添加される、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
工程ｂ）が、工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に、ＧＯＳを少なくとも１ｇ、好ましくは少なくとも２ｇ、及びさらに好ましくは少なくとも３ｇの量で添加することを含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
工程ｂ）が、工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に、ＧＯＳを２から１２ｇまでの間、好ましくは２から１０ｇまでの間、及びさらに好ましくは３から８ｇまでの間、例えば、３から７ｇまでの間で選択される量で添加することを含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
工程ａｉ）の増殖培地に、及び／又は工程ｂ）のプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に添加されたＧＯＳが、３～８の重合度（ＤＰ）を有する、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株が、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３３

、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９からなる群から選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株が、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９からなる群から選択され、並びにさらに好ましくは、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９】

ａｉｉｉ）工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を洗浄すること

をさらに含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１０】

ａｉｖ）工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、又は工程ａｉｉｉ）から得られた洗浄されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を乾燥させること

をさらに含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１１】

ａｉｖ）プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を乾燥させることが、工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、又は工程ａｉｉｉ）から得られた洗浄されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を噴霧乾燥又は凍結乾燥させることを含む、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

プロバイオティック組成物であって、

ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の存在下で増殖培地中でＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養することによって調製されたプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、

ＧＯＳの有効量と

を含む上記組成物。

【請求項１３】

プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を10^{3}ｃｆｕ～10^{12}ｃｆｕの量、好ましくは10^{4}ｃｆｕ～10^{11}ｃｆｕの量、及びさらに好ましくは10^{5}ｃｆｕ～10^{10}ｃｆｕの量、例えば、10^{6}ｃｆｕ～10^{9}ｃｆｕの量で含む、請求項１２に記載のプロバイオティック組成物。

【請求項１４】

ＧＯＳを少なくとも１ｇ、好ましくは少なくとも２ｇ、及びさらに好ましくは少なくとも３ｇの量で含む、請求項１２又は１３に記載のプロバイオティック組成物。

【請求項１５】

２から１２ｇまでの間、好ましくは２から１０ｇまでの間、及びさらに好ましくは３から８ｇまでの間、例えば、３から７ｇまでの間で選択される量でＧＯＳを含む、請求項１４に記載のプロバイオティック組成物。

【請求項１６】

粉末、錠剤、カプセル、油剤、エマルジョン、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）及び油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）からなる群から選択される形態である、請求項１２～１５のいずれか一項に記載のプロバイオティック組成物。

【請求項１７】

栄養組成物、医薬製剤、栄養補助食品、機能性食品、機能性飲料製品からなる群から選択される投与可能な形態である、請求項１２～１６のいずれか一項に記載のプロバイオティック組成物。

【請求項１８】

Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株が、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３３、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９からなる群から選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株が、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９からなる群から選択され、並びにさらに好ましくは、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８である、請求項１２～１７のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項１９】

凍結乾燥されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、

ＧＯＳの有効量と

を含む、請求項１２～１８のいずれか一項に記載のプロバイオティック組成物。

【請求項２０】

請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、請求項１２～１８のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項２１】

健康な対象の消化管内の好ましくはＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を改善するか又は増加させるための、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量を補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量を含むプロバイオティック組成物の非治療的使用であって、プロバイオティック組成物が、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができるか、又は請求項１２～２０のいずれか

一項に記載のプロバイオティック組成物である、上記非治療的使用。
【請求項２２】
プロバイオティック効果の改善又は増加が、
・健康な対象の腸管内のミネラルのバイオアクセシビリティの増加、好ましくはミネラル溶解度及び／もしくはミネラル吸収の増加であり、ここで、ミネラルが、好ましくはカルシウム及び／もしくは鉄であり、並びに／又は
・健康な対象の腸管内の健康な微生物叢の促進であり、並びに／又は
・結腸内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率の促進、したがって、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に関連する健康上の便益の促進であり、並びに／又は
・腸内微生物叢の代謝活性の増加、好ましくは、健康な対象の腸管内の乳酸／酢酸産生の増加であり、並びに／又は
・健康な対象の骨形成及び／もしくは骨ミネラル化の増加、及び／もしくは骨芽細胞の成熟及び／もしくは活性の増加である、請求項２１に記載の非治療的使用。
【請求項２３】
医薬品として使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含むプロバイオティック組成物。
【請求項２４】
それを必要とする対象のミネラル欠乏の予防及び／又は治療に使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含むプロバイオティック組成物。
【請求項２５】
対象が、ミネラル欠乏を発症するリスクがあるか、又はミネラル欠乏に罹患しており、
かつミネラルが、カルシウム及び／又は鉄である、
請求項２４に記載の使用のためのプロバイオティック組成物。
【請求項２６】
プロバイオティック組成物が、鉄欠乏、好ましくは鉄欠乏性貧血の予防及び／又は治療に使用するためのものである、請求項２５に記載の使用のためのプロバイオティック組成物。
【請求項２７】
消化機能障害の予防及び／又は治療に使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含むプロバイオティック組成物。
【請求項２８】
ディスバイオシスの予防及び／又は治療に使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含むプロバイオティック組成物。
【請求項２９】
骨喪失の予防及び／又は治療に使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量

とを含むプロバイオティック組成物。
【請求項３０】
小児の骨又は歯の成長及び／又は発達の促進に使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含むプロバイオティック組成物。
【請求項３１】
感染、好ましくは腸感染の予防及び／又は治療に使用するための、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、又は請求項１２～２０のいずれか一項に記載の、プレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含むプロバイオティック組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、本明細書において、培養中にガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）によってＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）をプレコンディショニングすることによって哺乳動物におけるプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率及び活性を増強すること、並びに組成物中にさらに添加されたＧＯＳと一緒に投与した場合のそのようなプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の驚くほど高いシンバイオティック（ｓｙｎｂｉｏｔｉｃ）効果又は相乗効果に一般に関する。したがって、本発明は、プロバイオティック組成物を調製する方法、及びＧＯＳによってプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と付加的なＧＯＳとを含むプロバイオティック組成物、並びにその使用を含む。本発明者らは、そのような方法及び組成物が、消化管内で驚くほど高くかつ予想外のシンバイオティック有益効果を達成することを見出した。組成物はまた、鉄及びカルシウムの溶解度の増加を誘導する。
【背景技術】
【０００２】
プロバイオティクスは、「適切な量で投与すると、宿主に健康上の便益を与える生きた微生物」と定義される。これは、世界中で広く受け入れられている科学的定義である（例えば、Ｈｉｌｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１４；Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇａｓｔｒｏ．＆Ｈｅｐａｔｈｏｌｏｇｙ，１１：５０６－５１４を参照）。プロバイオティック製品（通常、栄養補助食品又は食品である）は、個体が経験している様々な病態又は症状に推奨され得る。乳酸桿菌（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｉ）などの乳酸産生細菌は、様々な種類の食品、例えば、ヨーグルト中でプロバイオティクスとして一般的に使用されている。有害微生物の増殖及びコロニー形成は、そのような乳酸産生細菌によって、腸系内でのそれら自体のコロニー形成によって、利用可能な栄養素の競合によって、並びに／又は特定の物質、例えば、腸のｐＨを低下させる過酸化水素、バクテリオシン、及び／もしくは乳酸及び酢酸を含む有機酸の産生によって予防され得る。宿主と腸内微生物との間の相互作用が宿主の健康及び福利にとって重要であることは十分に確立されている。腸内微生物叢は、宿主に栄養素を提供するが、免疫応答、及び宿主の免疫系の調節及び発達、並びに炎症の軽減、及びアレルギー応答の予防にも関与し得る代謝産物を生成する。
【０００３】
プレバイオティクスは、細菌及び真菌などの有益な微生物の増殖又は活性をそれらの増殖及び／又は活性を選択的に刺激することによって誘導する化合物である。プレバイオティクスは、健康上の便益を与えるそのような宿主微生物によって選択的に利用される基質である（例えば、Ｇｉｂｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１７；Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇａｓｔｒｏ．＆Ｈｅｐａｔｈｏｌｏｇｙ，１４：４９１－５０２を参照）。したがって、消化管内で

は、プレバイオティクスは、腸内マイクロバイオームの組成を変化させることができる。食餌性プレバイオティクスは、典型的には、消化されずに消化管の上部を通過し、大腸に定着する有利な細菌の基質として作用することによって、それらの増殖又は活性を刺激する非消化性（例えば、ｈｔｔｐｓ：／／ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ｄｉｅｔａｒｙ＿ｆｉｂｅｒを参照）繊維化合物である。プレバイオティクスとしての機能を決定するために、様々な化合物が試験されている。フラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）及びトランスガラクトオリゴ糖（ＴＯＳ）は、最も一般的なプレバイオティクスである。このように、特定のプレバイオティクスを摂取すると、ヒトの健康に関連する微生物の集団を増加させることによって免疫機能を改善することができ、動物及びヒトの試験では、プレバイオティクスが有害細菌の集団を減少させることができることが示されている。したがって、プレバイオティクスは、対象の腸内の天然微生物叢によって、又はプレバイオティクスと同時に摂取されたプロバイオティック細菌によって発酵された場合に健康上の便益を提供する成分である。

【０００４】

特定の種類のプレバイオティクスとプロバイオティクスとを組み合わせると、特定の相乗効果が生じることが一般に知られている。特に、プレバイオティックＧＯＳとラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）及びビフィズス菌（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａ）などのプロバイオティック微生物とを組み合わせた効果が実証されている（例えば、ＹＵＴＡＫＡ ＫＡＮＡＭＯＲＩ，ＭＤ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｇｅｓｔｉｖｅ Ｄｉｓｅａｓｅｓ ａｎｄ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｖｏｌ．４６，Ｎｏ．９（Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２００１），ｐｐ．２０１０－２０１６（（Ｃ）２００１）を参照）。プレバイオティクスとプロバイオティクスとの間のシンバイオティック（ｓｙｎｂｉｏｔｉｃ）効果は、対象の消化（ＧＩ）管内のプロバイオティックによるプレバイオティックの消費に起因することが実証されている。

【０００５】

プロバイオティック乳酸産生細菌の製造手順は、典型的には標準化されており、糖、例えばグルコース、フルクトース、スクロース、ラクトース又はデキストロースなどの炭水化物源を含む増殖培地中で細菌を発酵させる工程を伴う。発酵後、プロバイオティック細菌は、通常、保護及び凍結又は凍結乾燥され、最終製品に包装される。

【０００６】

プロバイオティック乳酸菌の摂取は、インビボで様々な効果を有する。そのような重要な効果の１つは、そのようなプロバイオティック乳酸菌の存在によって顕著に影響を受け得る、必須ミネラルのバイオアクセシビリティである。体内のミネラルの含有量は、食物摂取からのそれらの供給に主に依存し、それらは消化管内で主に吸収されるが、食物摂取によるミネラルの単なる供給は、十分なミネラルのバイオアクセシビリティを必ずしももたらさない。ミネラルのバイオアクセシビリティに影響を及ぼす主な要因は、食物中のミネラルの含有量、食物中及び消化管内のミネラル間の相乗的及び拮抗的相互作用、食物中の錯化化合物又はキレート化合物の存在、並びに生物の健康状態及びその年齢である。また、腸内微生物叢、プロバイオティクス及びプレバイオティクスは、ミネラルのバイオアクセシビリティに顕著に影響を及ぼし、それによって、そのようなミネラルの吸収を増加又は減少させることができる。

【０００７】

特定の要件は種間で異なるが、ミネラルはすべての生物種にとって不可欠である。ミネラルは、ヒト生物では多数の重要な機能を有し、例えば、とりわけ、鉄及びカルシウムを含む。ミネラル欠乏、すなわち、典型的には、摂取するミネラルが推奨されるＲＤＡ量未満であることによる体内の低量又は準最適量のそのようなミネラルは、疾患につながる可能性があり、ミネラル過剰になる可能性がある。したがって、最適な健康のために正しい比率で正しい量のミネラルを得ることが極めて重要である。ほとんどの自然食は、これらのミネラルを適切なバランスで提供するが、健康を維持するのに十分ではない状況がある。

【０００８】
近年の試験は、微生物叢とミネラルとの相互作用に関する新しい情報をもたらし、カルシウム及び鉄の代謝に対する腸内細菌の影響に主に関するものであった。老年人口、並びに閉経後の女性、及び男性間の骨粗鬆症の有病率の増加を考えると、カルシウム代謝、したがって、骨代謝及びその改善に関する新しいデータは、この分野の発展にとって重要である。対照的に、鉄と腸内微生物叢との間の有害な相互作用に関する研究の結果は、鉄補充に関する新しい勧告を作成するために、このミネラルのバイオアクセシビリティに関してさらに試験することが極めて必要とされていることを示している。
【０００９】
また、プロバイオティック細菌の経口投与に伴う一般的な問題は、それらが消化管内のそれらの予定された位置に不十分な量で到達すること、及び／又はそれらがそれらの効果をもたらす腸管のこれらの位置ではプロバイオティック細菌の活性が不十分であることである。したがって、消化管内のプロバイオティック細菌の生存率、生存能及び生着は、プロバイオティック製品を製造する者にとって重大な課題である。結果として、プロバイオティック細菌の投与量を増加させなければならず、及び／又は所望のプロバイオティック効果を得るためにはさらに頻繁な投与が必要である。これはさらに、プロバイオティック細菌が所望の効果を十分に提供しない場合、不必要なコスト、望ましくない摂取頻度、及びおそらく健康上の便益の低下を伴う問題につながる。したがって、投与量を増加させることなくプロバイオティック効果を改善することが望ましい。
【発明の概要】
【００１０】
本発明の目的は、乳酸桿菌（ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｉ）などのプロバイオティック微生物の生存率及びプロバイオティック効果を、そのようなプロバイオティクスをそれを必要とする対象又は患者に投与する際に改善するさらに効率的な手段、方法及び治療法を提供することである。さらに、それを必要とする対象又は患者のミネラル欠乏、特に、例えば、鉄及び／又はカルシウムから選択されるミネラルのミネラル欠乏を予防及び／又は治療することが特定の目的である。
【００１１】
これらの目的は、以下に対処されるように本発明によって解決される。
【００１２】
本発明は、以下及び独立請求項に定義されている。本発明のさらなる実施形態は、本明細書及び従属請求項に定義されている。
【００１３】
第１の態様では、本発明は、プロバイオティック組成物を調製する方法を提供する。方法は、以下の工程を含む：
ａ）ａｉ）ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の存在下で増殖培地中でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養し、それによって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングすることと、
ａｉｉ）増殖培地からプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を採取することと
によって、プロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）（Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ））株をプレコンディショニングする工程、
ｂ）工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株にＧＯＳを添加して、プロバイオティック組成物を調製する工程。
【００１４】
本発明の方法によって調製されたプロバイオティック組成物は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と、補充又は添加されたＧＯＳとを含む。

【００１５】
本発明の方法の工程ａｉ）では、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプレコンディショニングは、ＧＯＳの存在下で増殖培地中でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養（ｃｕｌｔｉｖａｔｉｎｇ）又は培養（ｃｕｌｔｕｒｉｎｇ）し、それによって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングすることによって行われる。ＧＯＳの存在下でのプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の形成をもたらす。
【００１６】
第２の態様によれば、本発明は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、さらにＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物を提供する。プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、ＧＯＳの存在下で増殖培地中でＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養することによって調製されている。
【００１７】
第３の態様では、本発明は、ＧＯＳの有効量を補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量を含む本発明のプロバイオティック組成物の非治療的使用を提供し、プロバイオティック組成物は、例えば、健康な対象の消化管内でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を増加させるか又は増強するために、本発明の方法によって得ることができるか、又は本明細書に記載される通りである。プロバイオティック効果の増加は、例えば、健康な対象の腸管内のミネラルのバイオアクセシビリティの増加、健康な対象の腸管内の健康な微生物叢の促進、結腸内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の生存率の促進、したがって、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に関連する健康上の便益の促進、健康な対象の腸内微生物叢の代謝活性の増加、並びに／又は骨形成及び／もしくは骨ミネラル化の増加、並びに／又は骨芽細胞の成熟及び／もしくは活性の増加に現れ得る。
【００１８】
第４の態様によれば、本発明は、医薬品として使用するための、本発明の方法によって得ることができる、又は本明細書に記載される、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物を提供する。
【００１９】
さらなる態様によれば、本発明は、それを必要とする対象のミネラル欠乏、消化機能障害、ディスバイオシス、骨喪失の予防及び／もしくは治療に使用するための、又は小児の骨もしくは歯の成長及び／もしくは発達の促進に使用するための、本発明の方法によって得ることができる、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物を提供する。
【００２０】
さらなる好ましい実施形態は、本明細書中以下及び従属請求項に記載されている。
【図面の簡単な説明】
【００２１】
【図１】微生物叢代謝に対するプロバイオティック株の影響、及びプロバイオティック株の生着を評価するために使用されるｓｈｏｒｔ ＳＨＩＭＥ結腸インビトロモデルを示す。
【図２】結腸内で６時間及び２４時間の時点で測定されたカルシウム溶解度を示す。図２に見られるように、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、ＧＯＳの存在下で６時間及び２４時間の両方の時点で結腸内のカルシウム溶解度を増強する。これは、ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングさ

れたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を、それを必要とする対象のカルシウム吸収を促進するために使用することができることを示唆している。
【図３】４８時間の時点での結腸内の鉄溶解度（バイオアクセシビリティ）の改善を示す。ＧＯＳ及びプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、結腸内の鉄溶解度（バイオアクセシビリティ）を増強することから、ＧＯＳとプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）との組合せが、それを必要とする対象において鉄吸収を促進し得ることが示唆される。
【図４Ａ】４８時間のインキュベーション後の結腸内のＧＯＳの存在下又は非存在下でのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ１７９３８及びストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＮＣＣ２４９６の生存率、特に、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）生存率に対するＧＯＳの正の効果と、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）生存率に対するＧＯＳの負の効果とを示す。
【図４Ｂ】プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ１７９３８の生存率が、ＧＯＳの存在下では、プレコンディショニングされていないＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株よりも良好であることを示す。
【図５】乳酸産生（４８時間のレベルと６時間のレベルとの差）を示す。ＧＯＳは、単独で、結腸内の乳酸産生の劇的な増加を誘導する。ＧＯＳに加えてＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を添加すると、乳酸産生がさらに増強される。ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、結腸内の乳酸産生をＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）（プレコンディショニングされていない）よりもさらに増強し、微生物叢の代謝活性の全体的な増加を示す。乳酸産生細菌は、ＧＯＳ及びプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を４８時間にわたって添加すると、結腸内でさらに活性になる。
【図６】結腸内のｐＨ低下（４８時間と６時間との差）（右パネル）、及び酢酸産生（４８時間と６時間との差）（左パネル）を示す。ＧＯＳは、単独で、ｐＨ低下及びさらに高い酢酸産生を誘導する。結腸内のＧＯＳの上に添加されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、ｐＨ及び酢酸産生に対する効果をさらに増幅し、これは、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）がＧＯＳに添加された場合にｐＨがさらに低下することを意味する。ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、結腸内でさらに強いｐＨ低下を誘導する。また、ＧＯＳ単独及びＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）と比較して、プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、及びＧＯＳの存在下では、さらに高レベルの酢酸が産生される。ｐＨは、酸産生のマーカーである。乳酸及び酢酸の両方が、ＧＯＳの存在下でプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）によって強力に誘導される。
【図７】アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）活性を測定する、７日目の骨芽細胞の初期分化を示す。結果は、ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプレコンディショニングが骨芽細胞内でＡＬＰ活性の増加をもたらしたことを示しており、プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株＋ＧＯＳが骨芽細胞分化を刺激することができることを示唆している。
【図８】分化した骨芽細胞によって合成されるミネラルマトリックスのマーカーであるアリザリンレッド吸収を示す。結果は、２１日目の時点で、アリザリンレッドレベルが、ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株（プレコンディショニングなし）と比較して、ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株によって増強されることを示す。これは、プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株＋ＧＯＳが骨ミネラル化を刺激することができることを示唆している。
【図９】４日目の時点での細胞移動度の尺度であるＭＣ３Ｔ３遊走速度を示す。結果は、ＧＯＳ単独、又はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株（プレコンディショニングなし）と組み合わせたＧＯＳと比較して、ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテ

リ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）によって細胞遊走がさらに有意に減少することを示す。これは、骨芽細胞分化を刺激するためのプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株＋ＧＯＳの優位性を示唆している。

【図１０】４日目の時点での初期骨芽細胞分化のマーカーであるＭＣ３Ｔ３　Ａｔｆ４遺伝子発現を示す。結果は、ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）条件又はＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）条件からの両ＳＣＦＡブレンドが、対照条件と対比して、Ａｔｆ４のｍＲＮＡ発現を有意に増加させたことを示す。

【図１１】４日目の時点での骨芽細胞ミネラル化のマーカーであるＭＣ３Ｔ３　Ｏｃｎ遺伝子発現を示す。結果は、それぞれのＳＣＦＡブレンドを介して、ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）（プレコンディショニングなし）と対比して、骨芽細胞ミネラル化を刺激するプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）＋ＧＯＳの優位性を示している。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

本発明は、本明細書において、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を製造する際の発酵中に特定の基質成分を使用し、最終的なプロバイオティック組成物を生成するためのプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株とさらに添加されるガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）との組合せの驚くほど高いシンバイオティック効果又は相乗効果をさらにもたらす、哺乳動物においてラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を増強する方法を提供する。したがって、本発明の発明者らは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養中のＧＯＳの使用、いわゆるＧＯＳによる「プレコンディショニング」、及び最終的なプロバイオティック組成物を生成するための追加的又は補充的なＧＯＳの添加を含む方法を開発した。この方法は、驚くべきことに、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の予想外に高いプロバイオティック効果、特にプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率の顕著な増加、骨形成及び／又は骨ミネラル化の増加、微生物叢の代謝活性の増加、例えば、本明細書に記載のプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を投与した際の対象又は患者の消化管内のミネラルのミネラル溶解度、アクセシビリティ及び／又は吸収の増加によるミネラルのバイオアクセシビリティの増加をもたらす。この有益で予想外の高い効果は、それを必要とする対象もしくは患者に、又はパーツキットの形態で、プレバイオティックとしての付加的なＧＯＳと（ＧＯＳによって）プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株とを１つの組成物中で併用投与することによって特に生じる。

【００２３】

したがって、本発明は、とりわけ、消化管内のミネラルのバイオアクセシビリティ、ひいてはミネラル吸収も増加させるプロバイオティック組成物及び使用を提供することを目的とする。詳細には、そのような溶液は、例えば、ミネラル取込みの増加を必要とする対象に投与される最終生成物を生成するためにさらに添加されたＧＯＳと組み合わせた、ＧＯＳによってプレコンディショニングされたラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物である。ミネラル溶解度、アクセシビリティ及び吸収の増加は、消化管、例えば、十二指腸、空腸、回腸及び／又は結腸内で起こる。

【００２４】

本発明はまた、プロバイオティック組成物を生成するために、さらに添加されたＧＯＳと組み合わせたそのようなプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の組合せによって、消化管内のミネラル溶解度及びバイオアクセシビリティ並びにミネラル吸収の増加も達成することができるように、プロバイオティック組成物中のＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ

．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物を調製する方法を提供することを目的とする。

【００２５】

したがって、本発明の目的は、プロバイオティック組成物中の付加的なＧＯＳと組み合わせたそのようなプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物を調製する方法、並びにとりわけ、哺乳動物の消化管内のミネラル溶解度、アクセシビリティ及び／又は吸収を増加させるための、ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の非治療的及び治療的使用に関する。

【００２６】

（ＧＯＳによって）プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）と付加的なＧＯＳとの併用投与によって得られる改善された非治療的効果及び治療効果は、プロバイオティックス及びプレバイオティクス、例えば、ＧＯＳの投与量及び／もしくは投与頻度を減少させること、又は求められる健康効果を得るために必要とされる同じ用量の従来のプロバイオティクス及び／もしくはプレバイオティクスの有益効果を増加させることを可能にする。

【００２７】

上記を考慮して、以下が開示される。

【００２８】

プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）細菌と付加的なＧＯＳとを含む組成物を調製する方法

第１の態様によれば、本発明は、プロバイオティック組成物を調製する方法を提供する。方法は、以下の工程を含む：

ａ）ａｉ）ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の存在下で増殖培地中でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養（ｃｕｌｔｉｖａｔｉｎｇ）又は培養（ｃｕｌｔｕｒｉｎｇ）し、それによって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングすることと、

ａｉｉ）増殖培地からプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を採取することと

によって、プロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングする工程、及び

ｂ）工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株にＧＯＳを添加して、典型的にプロバイオティック組成物と呼ばれる組成物を調製する工程。

【００２９】

本発明の方法に従って調製された組成物は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と、付加的なＧＯＳとを含む。したがって、方法の工程ｂ）は、工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含み、ＧＯＳを組成物に添加する組成物を調製する。

【００３０】

本発明の方法の工程ａｉ）では、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプレコンディショニングは、ＧＯＳの存在下で増殖培地中でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養し、それによって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングすることによって行われる。本発明の文脈では、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）細菌の「プレコンディショニング」という用語は、ＧＯＳとともに、すなわち、ＧＯＳの存在下で、プロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株を増殖させること、例えば、培養（ｃｕｌｔｉｖａｔｉｎｇ）すること、培養（ｃｕｌｔｕｒｉｎｇ）すること、又は発酵させることを意味する。本発明の文脈で

は、用語「培養（ｃｕｌｔｉｖａｔｉｏｎ）」、「培養する（ｃｕｌｔｕｒｉｎｇ）」及び「発酵」は、区別なく使用される。ＧＯＳの存在下でのプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の形成をもたらす。

【００３１】

次いで、工程ａｉｉ）では、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を増殖培地から採取する。用語「プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）」は、ＧＯＳによるプレコンディショニング工程を含む本発明の方法によって産生されたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、又はプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の細菌を指す。

【００３２】

さらに、本発明の方法の工程ｂ）では、組成物は、工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を組み合わせ、ＧＯＳをさらに添加して、最終的なプロバイオティック組成物を調製又は生成することによって形成される。

【００３３】

本発明全体を通して使用されるＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、一般に、任意のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、さらに好ましくは、任意の市販のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり得る。これに関連して、用語「Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株」及び「Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）細菌」は、同義的に使用され得る。これにより、過去数十年の間にＤＮＡ分析ツールがさらに洗練され、科学者が多くの新たな細菌種を発見することが可能になっただけでなく、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属の下に歴史的にグループ化された種が多様すぎて命名法の慣習に適合しなかったことを認識することが可能になったことに留意されたい。したがって、プロバイオティック群を正確かつ体系化した状態に保つために、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属は、２３の新規の属を含む２５の異なる属に分けられた。その結果、近年多くのプロバイオティクスに新たな属名が付与されている。したがって、ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）（Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ））の代替的な属名は、リモシラクトバチルス・ロイテリ（Ｌｉｍｏｓｉｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）である。再分類プロセスは極めて近年のものであったため、本出願では、明確にするために、かつての属命名法、すなわち、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）を使用する。ただし、改訂された属命名法及び代替名は、利用可能な再分類ツールを使用すれば誰でも容易に得ることができるはずである。

【００３４】

組成物中に提供される目下好ましい細菌は、好ましくは本明細書で言及されるように、少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、又は複数、すなわち、少なくとも２つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の細菌である。

【００３５】

本発明の好ましい実施形態では、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３３、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３

６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９からなる群から選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株である。

【００３６】

代替的又は追加的に、本明細書で使用されるＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５又はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９から選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株から提供され得る。

【００３７】

目下好ましいＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８である。

【００３８】

代替的又は追加的に、本明細書で使用されるＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５又はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９から選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株から提供され得る。

【００３９】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８は、ブダペスト条約に従って、２００６年１月３０日にＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ（Ｍａｓｃｈｅｒｏｄｅｒ　Ｗｅｇ　１ｂ，Ｄ－３８１２４　Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に寄託された。

【００４０】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１は、ブダペスト条約に従って、２０１３年４月１８日にＬｅｉｂｎｉｚ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔ　ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ（Ｉｎｈｏｆｆｅｎｓｔｒ．７Ｂ，Ｄ－３８１２４　Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に寄託された。

【００４１】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、ＤＳＭ　３２８４７、ＤＳＭ　３２８４８及びＤＳＭ　３２８４９は、ブダペスト条約に従って、２０１８年7月４日にＬｅｉｂｎｉｚ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔ　ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ　ｕｎｄ　Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ　ＧｍｂＨ（Ｉｎｈｏｆｆｅｎｓｔｒ．７Ｂ，Ｄ－３８１２４　Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に寄託された。

【００４２】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５は、ブダペスト条約に従って、２０１７年３月２１日にＬｅｉｂｎｉｚ　Ｉｎ

ｓｔｉｔｕｔｅ ＤＳＭＺ－Ｇｅｒｍａｎ ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（Ｉｎｈｏｆｆｅｎｓｔｒ．７Ｂ，Ｄ－３８１２４ Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に寄託された。

【００４３】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３２、ＤＳＭ ３３６３３、ＤＳＭ ３３６３４及びＤＳＭ ３３６３５は、ブダペスト条約に従って、２０２０年９月９日にＬｅｉｂｎｉｚ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ（Ｉｎｈｏｆｆｅｎｓｔｒ．７Ｂ，Ｄ－３８１２４ Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に寄託された。

【００４４】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３１及びＤＳＭ ３２２３２は、ブダペスト条約に従って、２０１５年１２月１１日にＬｅｉｂｎｉｚ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ ＤＳＭＺ－Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ（Ｉｎｈｏｆｆｅｎｓｔｒ．７Ｂ，Ｄ－３８１２４ Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に寄託された。

【００４５】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９は、ブダペスト条約に従って、２００３年６月２５日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１１０－２２０９，Ｕ．Ｓ．）に寄託された。

【００４６】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５は、ブダペスト条約に従って、２００４年１２月２１日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１１０－２２０９，Ｕ．Ｓ．）に寄託された。

【００４７】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９は、ブダペスト条約に従って、２００２年９月１１日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１１０－２２０９，Ｕ．Ｓ．）に寄託された。

【００４８】

ラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６１２７は、ブダペスト条約に従って、２００４年７月２２日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１１０－２２０９，Ｕ．Ｓ．）に寄託された。

【００４９】

本明細書で使用される用語「ＧＯＳ」は、「ガラクトオリゴ糖」を意味する。ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）は、本明細書で使用される場合、典型的には、還元末端にガラクトース又はグルコースを有するβ結合ガラクトース部分からなる。そのようなＧＯＳは、β－（１→２）、β－（１→３）、β－（１→４）又はβ－（１→６）結合ガラクトース部分を含有し、３～８ガラクトース単位の重合度（ＤＰ）を有し得る。したがって、ＧＯＳという用語は、好ましくは少なくとも３つのガラクトース単位を含むオリゴ糖、さらに好ましくは少なくとも４つのガラクトース単位を含む、好ましくは３～８ガラクトース単位の重合度（ＤＰ）を有するオリゴ糖と呼ばれる。オリゴ糖は、一部の哺乳動物、例えば、ウ

シ及びヒトの乳中に天然に存在する。ＧＯＳは、市販されており、β－ガラクトシダーゼのトランス－ガラクトシダーゼ活性によるラクトースからの生合成プロセスを介して合成され得る。生合成手順では、ＧＯＳ形成は、高濃度のラクトース又はラクツロース、不完全なラクトース代謝回転、低い水分活性、及びトランスガラクトシル化を優先する酵素の使用によって通常促進される。そのようなプロセスから得られるＧＯＳの結合型は、生合成に使用される酵素に特異的である。

【００５０】

プロバイオティック細菌を増殖させるためのＧＯＳ源として本明細書で有利に使用され得る炭水化物の混合物の１つの特定の種類は、ＧＯＳと牛乳オリゴ糖との混合物である。特に、ＧＯＳと３’－シアリルラクトース（３’－ＳＬ）及び／又は６’－シアリルラクトース（６’－ＳＬ）との混合物が好ましく使用される。実際、そのような混合物は、ヒトの乳に類似するいくつかのオリゴ糖を含有し、これは、本発明の組成物が乳児用調製粉乳として、又は乳児用栄養補給剤として使用される場合に特に有利である。そのような有利な効果は、例えば、Ｓｉｍｅｏｎｉ ｅｔ ａｌ．；“Ｇｕｔ ｍｉｃｒｏｂｉｏｔａ ａｎａｌｙｓｉｓ ｒｅｖｅａｌｓ ａ ｍａｒｋｅｄ ｓｈｉｆｔ ｔｏ ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉａ ｂｙ ａ ｓｔａｒｔｅｒ ｉｎｆａｎｔ ｆｏｒｍｕｌａ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ａ ｓｙｎｂｉｏｔｉｃ ｏｆ ｂｏｖｉｎｅ ｍｉｌｋ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｏｌｉｇｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅｓ ａｎｄ Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｎｉｍａｌｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ ＣＮＣＭ Ｉ－３４４６”；Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ，２０１６，１８（７）：２１８５－２１９５に記載されている。そのような組成物は、ホエー透過物を濃縮して濃縮ウシ乳オリゴ糖組成物を得、ＧＯＳを添加するか、又はβ－ガラクトシダーゼの作用によるラクトースの加水分解からインサイチュでＧＯＳを生成することから典型的に得ることができる。

【００５１】

プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための本発明の方法の工程ａｉ）で使用されるＧＯＳ源、及びプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む最終組成物をＧＯＳとともに調製するための工程ｂ）でさらに添加されるＧＯＳ源は、本質的に純粋なＧＯＳ（すなわち、少なくとも９０％のＧＯＳを有する成分）の形態で、又はＧＯＳを含む混合物、例えば、炭水化物の混合物の一部として提供され得る。

【００５２】

ＧＯＳによってプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための一態様は、十分な量のＧＯＳが増殖培地中に提供されることである。したがって、一実施形態によれば、ＧＯＳ源は、プロバイオティック組成物を調製するための本発明の方法の工程ａｉ）では、増殖培地中に少なくとも０．２重量％、好ましくは少なくとも０．５重量％、さらになお好ましくは少なくとも０．７５重量％のＧＯＳを提供するような量で増殖培地に典型的に添加される。好ましい実施形態では、ＧＯＳは、増殖培地に基づいて好ましくは計算して（％ｗ／ｗ）、増殖培地中に最大８重量％のＧＯＳ、例えば、約７重量％のＧＯＳ、６重量％のＧＯＳ、又はさらには最大５重量％のＧＯＳ、さらに好ましくは最大４重量％のＧＯＳ、又はさらには最大３重量％のＧＯＳを提供するような量で提供される。これらの上限範囲及び下限範囲の任意の組合せが本明細書に包含される。好ましくは、ＧＯＳは、０．２重量％～８重量％、もしくはさらには０．２重量％～７重量％、もしくは０．２重量％～６重量％の範囲、例えば、０．５重量％～８重量％、もしくはさらには０．５重量％～７重量％、もしくは０．５重量％～６重量％の範囲、又は０．７５重量％～８重量％、もしくはさらには０．７５重量％～７重量％、もしくは０．７５重量％～６重量％の範囲で増殖培地に添加される。好ましくは、ＧＯＳは、増殖培地に基づいて好ましくは計算して、０．２重量％～８重量％の範囲、好ましくは０．５重量％～７重量％の範囲、さらに好ましくは０．７５重量％～６重量％の範囲、最も好ましくは０．７５重量％～５重量％の範囲、例えば、０．７５重量％～３重量％、又は０．７５重量％～４重量％の範囲で増殖培地に添加される。

【００５３】
炭水化物の混合物が、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするためのＧＯＳ源として使用される場合、又はプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をＧＯＳとともに含有する最終組成物を調製する場合、そのような混合物中のＧＯＳの量は、ＧＯＳを含有する混合物の乾燥重量に基づいて好ましくは計算して、少なくとも２０重量％、好ましくは少なくとも３０重量％、さらに好ましくは少なくとも４０重量％、さらになお好ましくは少なくとも４５重量％、最も好ましくは少なくとも４８重量％であることが好ましい。
【００５４】
一実施形態では、ＧＯＳは、工程ａｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のための基質、例えば、発酵基質として使用される。したがって、そのような実施形態では、ＧＯＳは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養又は発酵中の炭素源として使用される。
【００５５】
細菌が発酵中に炭素源としてＧＯＳのみを消費する必要はないが、プレコンディショニング工程中のＧＯＳ源中のＧＯＳの高い割合は、他の炭水化物の消費よりも発酵中の細菌によるＧＯＳの消費を促進し、プレコンディショニング効果の改善をもたらす。二糖（例えば、ラクトース）などのさらに小さな炭水化物も存在し得、プレコンディショニング効果を補助する細菌によって消費され得る。したがって、プレコンディショニング工程ａｉ）中、ＧＯＳ源が、ＧＯＳを含有する混合物の乾燥重量に基づいて好ましくは計算して、最大５５重量％、好ましくは最大５０重量％、さらに好ましくは最大４５重量％、最も好ましくは最大４２重量％の単糖もしくは二糖、及び／又は４０重量％以下、好ましくは３０重量％以下のラクトースを含むことも好ましい。一例として、プレコンディショニング工程中にＧＯＳ源として使用される炭水化物の混合物は、混合物、並びにラクトース、グルコース及び／又はガラクトース、及び任意に３’－ＳＬ及び／又は６’－ＳＬによって形成される残部について上記で定義された量のＧＯＳを含み得る。
【００５６】
一実施形態では、培養培地は、電子受容体、例えば、フルクトース、シトラート、グリセロール及び／又は１，２－プロパンジオールも含む。
【００５７】
特定の実施形態では、培養培地は、例えば、電子受容体として作用するフルクトースも含む。例示的であるが非限定的な例では、培養培地は、培養培地の乾燥重量に基づいて計算して、少なくとも０．２重量％のフルクトース、好ましくは少なくとも０．５重量％のフルクトース、さらに好ましくは少なくとも１重量％のフルクトース、さらになお好ましくは少なくとも１．５重量％のフルクトースを含み得る。これに対応して、例示的であるが非限定的な例では、培養培地は、１６重量％超のフルクトース、好ましくは１４重量％以下のフルクトース、さらに好ましくは１２重量％以下のフルクトース、さらになお好ましくは１０重量％以下のフルクトースを含まないことが好ましい。これらの上限範囲及び下限範囲の任意の組合せが本明細書に包含される。一実施形態では、培養培地は、０．２５：１～５：１の範囲内、好ましくは０．５：１～４：１の範囲内、さらに好ましくは０．７５～２．５：１の範囲内で選択される、電子受容体（例えば、フルクトース）とＧＯＳとの重量％比を含む。特に、電子受容体（例えば、フルクトース）とＧＯＳとの好ましい重量％比は、約１：１～約２：１の範囲内である。
【００５８】
さらなる実施形態によれば、プロバイオティック組成物を調製する方法の工程ａｉ）では、増殖培地へのＧＯＳの添加は、培養工程ａｉ）の任意の時点、例えば、工程ａｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養の開始時に、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養の途中又は終了時に行われ得、添加は、一度に、段階的に、例えば、複数の別個の時点で、又は連続的に行われ得

る。

【００５９】

培養工程ａｉ）は、当業者に周知の方法で行われる。工程ａｉ）における培養は、滅菌標準増殖培地に規定された量の細菌（コロニー形成単位（ｃｆｕ））を接種し、続いて、規定された温度（通常３７℃）及びｐＨ下でインキュベートする工程を含む。これに関連して、滅菌標準増殖培地の接種を開始するための細菌の規定された量（ｃｆｕ）は、当業者によって当技術分野の一般的な知識及び実施に従って決定され得る。当業者が標準増殖培地を用いて同じ株の培養に使用するものと比較して、好ましくは培養条件を変更することなく、上記のＧＯＳを含む増殖培地を用いて好適な収率を得ることができる。

【００６０】

本発明の工程ａｉ）でＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養する／発酵させるための標準増殖培地は、乳酸桿菌（ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｉ）及び乳酸菌（ＬＡＢ）に使用される任意の公知の標準増殖培地、例えば、ＭＲＳ培地、又は任意のさらなる好適な培地であり得る。そのような標準増殖培地は、好ましくは市販されているが、周知の標準的なレシピに従って化合物を添加することによって生成されてもよい。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のための標準増殖培地は、炭水化物、例えば、デキストロース、スクロース、マルトース、フルクトース又はラクトースから選択される単糖、様々な窒素源、例えば、ペプトン、酵母抽出物、牛肉抽出物又はホエータンパク質、ミネラル、主にMn^{2+}及びMg^{2+}、並びに緩衝剤、例えば、ＬＡＢ培地中で一般的に使用される緩衝液である酢酸ナトリウム（CH_3COONa）、クエン酸三ナトリウム（$Na_3C_6H_5O_7$）又はジナトリウムグリセロホスファート（$C_3H_7Na_2O_6P$）を典型的に含有し得る。緩衝活性を有する標準増殖培地に使用されている他の成分には、リン酸二ナトリウム（Na_2HPO_4）、クエン酸アンモニウム（$NH_4C_6H_5O_7$）、リン酸三ナトリウム（Na_3PO_4）、重リン酸カリウム（ｐｏｔａｓｓｉｕｍ　ｂｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ）（KH_2PO_4）、リン酸三マグネシウム$Mg_3(PO_4)_2$、炭酸カルシウム（$CaCO_3$）及びリン酸二カリウム（K_2HPO_4）が含まれ得る。そのような標準増殖培地はまた、レシチン又はＴｗｅｅｎ（登録商標）（例えば、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、８０及び８５）などの広範囲の増殖因子、界面活性剤を含有し得る。培養／発酵は、生成される株に応じて嫌気的又は好気的条件下で行われ得るが、好ましくは嫌気的条件下で行われ得る。また、ｐＨは、特定の株が増殖するのに最良であることが知られている条件に応じて制御されてもされなくてもよい。培養工程の温度及び期間は、株ごとに可変であり、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養の分野の当業者にも周知である。

【００６１】

一実施形態によれば、本発明の方法の工程ａｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養／発酵は、かなりの期間にわたって行われて、ＧＯＳの存在下で、典型的には少なくとも１時間の期間にわたって、好ましくは５～１８時間の期間にわたって、同様に好ましくは７～１４時間、さらに好ましくは１０～１３時間の期間にわたって、さらになお好ましくは約１２時間の期間にわたって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプレコンディショニングを可能にする。

【００６２】

さらに、さらなる実施形態によれば、本発明の方法の工程ａｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養／発酵は、２５～４５℃、好ましくは３０～４０℃の温度、さらになお好ましくは３５～３９℃、例えば、約３７℃の温度で行われる。

【００６３】

さらに、別の実施形態では、本発明の方法の工程ａｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養／発酵は、３．０～７のｐＨで行われる。培養工程ａｉ）中のプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプレコンディショニング中のｐＨは、培養工程ａｉ）を通して制御されないか、又は一定の値に設

定されてもよく、典型的には、培養工程ａｉ）中にモニタリング及び調整される。したがって、特にプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプレコンディショニング中にｐＨが制御されない場合、ｐＨは３．０～７であり得る。あるいは、培養工程ａｉ）中にｐＨが制御される場合、ｐＨは、約５．０～７．０、例えば、約５．０～６．０、約５．５～６．５（例えば、約６．０±０．２）又は約６．０～７．０（例えば、約６．６±０．２）の範囲に調整されてもよく、さらに好ましくは、ｐＨは、約５．５～６．５の範囲に調整されてもよく、さらになお好ましくは、ｐＨは、約６．０±０．４の範囲に調整されてもよく、最も好ましくは、ｐＨは、約６．０±０．２の範囲に調整されてもよく、同様に好ましくは、ｐＨは、約６．０～７．０、同様にさらに好ましくは約６．６±０．４、最も好ましくは６．６±０．２の範囲に調整されてもよい。

【００６４】

本発明の方法の工程ａｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養／発酵の後、それによりプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、工程ａｉｉ）で採取される。増殖培地から細菌細胞を分離することを目的とする採取工程はまた、例えば、細菌を濃縮すること、遠心分離、濾過、膜濾過、デカンテーション、単離、精製など、好ましくはプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を遠心分離又は濃縮することによって、当業者に周知の方法で行われる。典型的には、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の採取は、工程ａｉ）における培養／発酵について上記で定義されたように少なくとも１時間の期間の後に工程ａｉｉ）で行われる。

【００６５】

工程ａｉｉ）でプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を採取した後、採取された細胞は、典型的には（培養／発酵後に）微量の増殖培地を除去するために、さらなる処理の前に任意の工程ａｉｉｉ）で洗浄され得る。洗浄は、生理食塩水、ブライン又は任意のさらなる好適な液体のいずれかを用いて行われ得る。

【００６６】

工程ａｉｉ）に従って増殖培地からプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を採取した直後に、又は任意の洗浄工程ａｉｉｉ）の後に、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、乾燥工程ａｉｖ）に供されてもよい。そのような乾燥工程ａｉｖ）は、当業者に公知の任意の方法、例えば、噴霧乾燥、流動床乾燥、空気対流乾燥、大気乾燥、ローラー乾燥又は凍結乾燥（ｆｒｅｅｚｅ　ｄｒｙｉｎｇ）、凍結乾燥（ｌｙｏｐｈｉｌｉｚｉｎｇ）、さらに好ましくは噴霧乾燥又は凍結乾燥によって行われ得る。噴霧乾燥は、例えば、国際公開第２０１７／００１５９０号に記載されているように、保護剤の存在下で行われてもよい。

【００６７】

任意に、増殖培地から採取した後及び／又はプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を洗浄した後に得られるプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、当業者に公知であるように、使用される乾燥方法及び乾燥させる細菌に応じて適宜、乾燥工程の前に、保護剤（ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ　ａｇｅｎｔ）、例えば、保護剤（ｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）、凍結保護剤、凍結乾燥保護剤（ｌｙｏｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）及び／又は担体とさらに混合されてもよい。そのような保護剤、凍結保護剤、凍結乾燥保護剤及び／又は担体には、グリセロール、脱脂乳、血清アルブミン、ペプトン、酵母抽出物、サッカロース、グルコース、ソルビトール、麦芽エキス、トレハロースなどが典型的に含まれる。市販の保護剤もしくは凍結保護剤には、例えば、Ｕｎｉｐｅｃｔｉｎｅ（商標）ＲＳ　１５０などが含まれるか、又は市販の保護剤もしくは凍結保護剤は、欧州特許第３０１６５１１号明細書、米国特許第２０１４／０００４０８３号明細書、米国特許第２０１６／０２９８０７７号明細書などに記載されている通りである。

【００６８】
代替的又は追加的に、増殖培地からの採取後、洗浄後、又はさらには乾燥後に得られる、すなわち、工程ａｉｉ）、ａｉｉｉ）又はａｉｖ）のいずれかの後に得られるプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、さらなる保存及び／又は使用のために、例えば、一般的なカプセル化剤、例えば、アルギナート、アルギナート／プルラン、デンプン、キサンタン、キサンタンジェランガム混合物、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロース、キトサン、又は任意のさらなる好適なカプセル化材料を使用してプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含有するミクロスフェアを形成することによってカプセル化され得る。カプセル化は、周知であり、当業者によって行われ得る。

【００６９】
さらに、プロバイオティックを調製するための本発明の方法は、工程ａ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株にＧＯＳを添加してプロバイオティック組成物を調製、生成又は形成する工程ｂ）を含む。純粋な、又は先に定義された混合物としてのＧＯＳは、上記で定義された量で適用され得る。

【００７０】
プレバイオティックＧＯＳは、工程ａｉ）における培養後いつでも、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に添加され得る。方法が上述の追加の工程、すなわち、洗浄及び／又は乾燥を含む場合、ＧＯＳは、任意のそのような工程の前、最中及び／又は後に添加され得る。特定の実施形態では、ＧＯＳは、乾燥工程の後に、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に添加される。

【００７１】
ＧＯＳは、方法中に１回又は複数の異なる場合に、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に添加され得る。

【００７２】
好ましい実施形態によれば、ＧＯＳは、本発明の方法の工程ｂ）では、（最終的な）プロバイオティック組成物を調製するために、工程ａ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に、少なくとも１もしくは２ｇ、好ましくは少なくとも３ｇ／、同様に好ましくは２～１２ｇ／、もしくは２～１０ｇ／、２～８ｇ／、もしくは２～７ｇ、さらに好ましくは３～１２ｇ、同様にさらに好ましくは３～１０ｇ、例えば、３～８ｇ、３～７ｇ、３～６ｇ、又は約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２ｇ、もしくはそれによって形成される任意の範囲の量で添加され得る。工程ｂ）で添加される上記量のＧＯＳは、好ましくは１日用量当たりのＧＯＳの量である。したがって、好ましい実施形態では、プロバイオティック組成物は、本明細書にさらに記載される剤形又は投与量単位で提供される。そのような場合、そのような剤形又は投与量単位は、上記量のＧＯＳを好ましくは含む。例えば、プロバイオティック組成物の投与量単位は、少なくとも１ｇのＧＯＳを含む。これは、工程ｂ）が、工程ａｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株にＧＯＳを添加してプロバイオティック組成物の投与量単位を調製することに相当し、この投与量単位が少なくとも１ｇのＧＯＳを含むことを意味する。

【００７３】
プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）細菌とＧＯＳとを含む組成物
第２の態様によれば、本発明は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、さらにＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物を提供し、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、ＧＯＳの存在下で増殖培地中でＬ．ロイテリ（Ｌ．

ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養することによって調製されている。
【００７４】
一実施形態では、プロバイオティック組成物は、本発明の方法に従って調製されており／得られており、すなわち、プロバイオティック組成物を調製するための本発明の方法によって得ることができる。これに関連して、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、ＧＯＳの存在下、例えば、プロバイオティック組成物を調製するための本発明の方法について上記で定義された条件下で培養されたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株である。ＧＯＳの存在下でのプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のそのようなプレコンディショニングは、本発明の第１の態様の下で本明細書に記載の本発明の方法に従って典型的に行われる。既に上記で詳細に開示されているように、ＧＯＳの存在下でのプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養／発酵は、それに応じてプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするのに十分な時間にわたって、例えば、少なくとも１時間の期間にわたって、好ましくは本明細書で定義されるプロセスに従って好ましくは行われる。
【００７５】
プロバイオティック組成物は、採取されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、採取されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に添加又は補充された、すなわち、ＧＯＳサプリメントの形態のＧＯＳの有効量とを含む。
【００７６】
前述のように、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、特に好ましくは、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３３、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９を含む又はそれらからなる群から好ましくは選択され、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９を含む又はそれらからなる群からさらに好ましくは選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、最も好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８である。
【００７７】
一実施形態では、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、特に好ましくは、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９を含む又

はそれらからなる群から好ましくは選択される、上記で定義された少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株である。

【００７８】

一実施形態では、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、特に好ましくは、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５を含む又はそれらからなる群から好ましくは選択される、上記で定義された少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株である。

【００７９】

典型的には、組成物について本明細書で定義される、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の「有効量」は、典型的には10^3ｃｆｕ～10^{12}ｃｆｕの量、典型的には10^4ｃｆｕ～10^{11}ｃｆｕの量、好ましくは10^5ｃｆｕ～10^{10}ｃｆｕ、もしくは10^5ｃｆｕ～10^9ｃｆｕの量、同様に好ましくは10^6ｃｆｕ～10^9ｃｆｕ、10^6ｃｆｕ～10^8ｃｆｕの量、又は10^8ｃｆｕ～10^{10}ｃｆｕの量のプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含み得る。プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の上記量は、好ましくは、１日用量当たりのプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の量である。例えば、プロバイオティック組成物の剤形又は投与量単位は、上記量のプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を好ましくは含む。

【００８０】

好ましい１日用量は、１日用量当たり約10^8総ｃｆｕ、例えば、１日用量当たり10^7～10^9、又は10^8～10^9ｃｆｕである。

【００８１】

さらに、組成物について本明細書で定義される、ＧＯＳの「有効量」は、少なくとも１もしくは２ｇ、好ましくは少なくとも３ｇ、同様に好ましくは２～１２ｇ、もしくは２～１０ｇ、２～８ｇ、もしくは２～７ｇ、例えば、３～１２ｇ、同様にさらに好ましくは３～１０ｇ、例えば、３～８ｇ、３～７ｇ、３～６ｇ、又は約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２ｇ、もしくはそれによって形成される任意の範囲の量のＧＯＳを含み得る。上記量のＧＯＳは、好ましくは１日用量当たりのＧＯＳの量である。例えば、プロバイオティック組成物の剤形又は投与量単位は、上記量のＧＯＳを好ましくは含む。

【００８２】

プロバイオティック組成物は、本明細書で前述の乾燥形態のプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むことができる。そのような場合、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、好ましくは噴霧乾燥形態又は凍結乾燥形態である。したがって、一実施形態では、プロバイオティック組成物は、凍結乾燥されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とを含む。

【００８３】

本明細書で定義されるプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とさらにＧＯＳの有効量とを含む本発明のプロバイオティック組成物は、プロバイオティック細菌が組み込まれ得る任意の種類の組成物、例えば、食品、飲料、動物飼料製品、ヒトもしくは動物用の栄養補給剤、医薬組成物又は化粧品組成物であり得る。さらに好ましくは、本発明のプロバイオティック組成物は、食品、

飲料、医薬製剤、栄養補助食品、栄養組成物又は栄養補給剤、機能性食品（ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｆｏｏｄ　ｐｒｏｄｕｃｔ）、機能性飲料製品、機能性食品（ｎｕｔｒａｃｅｕｔｉｃａｌ）及びこれらの組合せからなる群から好ましくは選択される投与可能な形態で提供され得る。そのような投与可能な形態の例示的な例には、乳製品、乳系製品及びホエータンパク質系飲料が含まれる。

【００８４】

特定の一実施形態によれば、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とＧＯＳの有効量とは、パーツキットの２つの異なる部分に収容され得る。次いで、ＧＯＳの有効量が、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とは異なるパーツキットの部分に添加されるという単なる差を伴って、先に記載されたような方法又は調製が、先に記載されたように行われる。

【００８５】

本発明のプロバイオティック組成物は、固体又は液体であり得る。好ましくは、本発明の組成物は、粉末、小袋、錠剤、カプセルの形態で存在するか、又は油剤、エマルジョン、例えば、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）、油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）などの形態であってよい。粉末形態で存在する場合、本発明の組成物は、最終消費者によって固体（粉末形態など）もしくは半固体形態（例えば、ペーストの形態など）で使用されること、又は代替的に、使用前に液体に再構成されることが意図され得る。

【００８６】

本明細書で定義される食品及び飲料には、栄養及び／又は楽しみを提供するために、ヒトが経口摂取することを意図したあらゆる製品が含まれ得る。「食品」という表現、及び「飲料」という用語は、対象に栄養を与える組成物を通常意味する。この「食品」は、経口的又は腹腔内的に通常摂取されるべきであり、脂質又は脂肪源及びタンパク質源を含むことができる。同様に、「飲料」は、経口的に通常摂取されるべきであり、液体又は半液体であり、脂質又は脂肪源及びタンパク質源を含むことができる。

【００８７】

本明細書で定義される食品及び飲料には、例えば、好ましくはヒトの摂取用、例えば、乳児及び／もしくは幼児用、妊娠中もしくは授乳中の女性、もしくは妊娠を望む女性用、健康状態が悪いために特別な栄養を必要とする個体用、又は高齢者用の栄養組成物が含まれ得る。さらに好ましくは、栄養組成物は、乳児用調製粉乳、乳児用シリアル、フォローアップ調製粉乳（ｆｏｌｌｏｗ－ｕｐ　ｆｏｒｍｕｌａ）又はフォローオン調製粉乳（ｆｏｌｌｏｗ－ｏｎ　ｆｏｒｍｕｌａ）、グローイングアップミルク（ｇｒｏｗｉｎｇ－ｕｐ　ｍｉｌｋ）、機能性乳、乳児食、乳児用シリアル組成物、並びに妊娠中及び授乳中の女性用又は妊娠を望む女性用の乳製品から選択される。食品及び飲料の他の例には、甘味及び風味のあるスナック、粉末飲料、シリアル製品及び乳製品、例えば、乳製品、ホエータンパク質系製品などが含まれる。特定の一実施形態によれば、本発明のプロバイオティック組成物は、乳児用調製粉乳、フォローオン調製粉乳、グローイングアップミルク、又は妊娠中もしくは授乳中の女性用の製品である。さらなる特定の一実施形態では、本発明のプロバイオティック組成物は乳児用調製粉乳であり得る。

【００８８】

本発明のプロバイオティック組成物はまた、動物用食品又は動物用栄養補給剤の形態であり得る。好ましくは、動物は哺乳動物である。動物の例には、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス、魚類、鳥類などが挙げられる。ただし、本発明のプロバイオティック組成物の好ましい使用はヒト用である。

【００８９】

本明細書で使用される「乳児用調製粉乳」という表現は、生後数ヶ月間の乳児による特定の栄養用途を意図し、このカテゴリーの人の栄養要求を単独で満たす食料品を指す（参考文献：Ａｒｔｉｃｌｅ　２（ｃ）ｏｆ　ｔｈｅ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉ

ｏｎ Ｄｉｒｅｃｔｉｖｅ ９１／３２１／ＥＥＣ ２００６／１４１／ＥＣ ｏｆ ２２ Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２００６ ｏｎ ｉｎｆａｎｔ ｆｏｒｍｕｌａｅ ａｎｄ ｆｏｌｌｏｗ－ｏｎ ｆｏｒｍｕｌａｅ；Ｒｅｇ ６０９／２０１３ ａｒｔ ２．１．ｃ ａｎｄ Ｒｅｇ ２０１６／１２７）。また、乳児を対象とし、Ｃｏｄｅｘ Ａｌｉｍｅｎｔａｒｉｕｓ（Ｃｏｄｅｘ ＳＴＡＮ ７２－１９８１）及びＩｎｆａｎｔ Ｓｐｅｃｉａｌｉｔｉｅｓ（Ｆｏｏｄ ｆｏｒ Ｓｐｅｃｉａｌ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｐｕｒｐｏｓｅを含む）に定義されている栄養組成物を指す。「乳児用調製粉乳」という表現は、「スターター乳児用調製粉乳（ｓｔａｒｔｅｒ ｉｎｆａｎｔ ｆｏｒｍｕｌａ）」及び「フォローアップ調製粉乳」又は「フォローオン調製粉乳」の両方を包含し、未熟児に提供される組成物を含む。

【００９０】

「フォローアップ調製粉乳」又は「フォローオン調製粉乳」は、６ヶ月目以降に与えられる乳児栄養組成物である。これは、このカテゴリーの人の漸進的に多様化する食事における主要な液体要素を構成する。

【００９１】

「乳児食」という表現は、生後数年間の乳児又は幼児による特定の栄養用途を意図した食料品を意味する。

【００９２】

本発明の文脈では、用語「乳児」は、１２月齢未満の小児を意味する。また、「幼児（ｙｏｕｎｇ ｃｈｉｌｄ）」という表現は、幼児（ｔｏｄｄｌｅｒ）とも呼ばれる１～３歳の小児を意味する。

【００９３】

「乳児用シリアル組成物」という表現は、生後数年間の乳児又は幼児による特定の栄養用途を意図した食料品を意味する。

【００９４】

栄養補助食品又は栄養補給剤は、上述のように、粉末又は錠剤又はカプセルの形態の液体、例えば、冷蔵液体、油剤、エマルジョン、例えば、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）、油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）などの形態で典型的に存在する。好ましくは、栄養補助食品又は栄養補給剤は、粉末、小袋、錠剤、カプセル又は油剤の形態である。粉末サプリメントは、液体に溶解される、又は食品もしくは飲料に振りかけられるサプリメントを典型的に包含する。そのようなサプリメントは、それを摂取する対象に追加の栄養素及び／又は健康上の便益、並びに本明細書で定義され調製されたプレコンディショニングされたプロバイオティック細菌Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）及びさらにＧＯＳの有効量などの他の有益な成分を提供することが意図される。したがって、本発明によるサプリメントは、上記で定義されたように、ヒト及び動物に栄養素及び／又は健康上の便益を提供するために使用され得る。栄養補助食品又は栄養補給剤には、例えば、任意の種類の食事又は栄養組成物に添加される粉末サプリメントとして、本明細書で定義され調製されたプレコンディショニングされたプロバイオティック細菌Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と、さらにＧＯＳの有効量とが含まれる。

【００９５】

医薬製品には、それを必要とする対象の有害な医学的状態を治療もしくは予防すること、又は良好な健康状態を促進することを意図した粉末、小袋、錠剤又はカプセル製品が含まれる。

【００９６】

化粧品組成物は、身体に対する審美的効果を典型的に意図するものであり、局所使用用であってよいか、又は粉末、小袋、錠剤もしくはカプセルの形態で経口経路によって投与されてもよい。

【００９７】

プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）細菌とＧＯＳとを含む本発明の組成物の用途

本発明は、とりわけ、消化管内のミネラル溶解度及びバイオアクセシビリティ並びにミネラル吸収も増加させる溶液、組成物及び使用を提供することを目的とする。詳細には、そのような溶液は、それを必要とする対象又は患者、例えば、ミネラル取込みの増加を必要とする対象又は患者に投与される、ＧＯＳによってプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量のと、さらにＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物である。ミネラル溶解度、アクセシビリティ及び吸収の増加は、消化管、例えば、十二指腸（小腸の最初の部分）、空腸（小腸の中央部分）、回腸（小腸の最後の部分）及び／又は結腸（大腸）内で起こる。本発明はまた、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と、ＧＯＳの有効量とをさらに含む、すなわち、そのような組合せによって消化管内のミネラル溶解度及びバイオアクセシビリティの増加並びにミネラル吸収の増加も達成することができるようにＧＯＳの有効量を補充されたプロバイオティック組成物を調製する方法を提供することを目的とする。

【００９８】

既に上記で概説されたように、特定の要件は種間で異なるが、ミネラルはすべての生物種にとって不可欠である。ミネラル欠乏は疾患につながる可能性があり、ミネラル過剰になる可能性がある。したがって、最適な健康のためには、正しい比率の正しい量のミネラルが必要である。ほとんどの自然食はミネラルを適切なバランスで提供するが、バランスのとれた食事ではミネラルに関して健康を維持するのに十分でない状況がある。上述のように、ミネラルは、生物では不可欠であり、多数の重要な機能を有する。

【００９９】

例えば、鉄は、酸素及びミオグロビンの輸送を担う。さらに、鉄は、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ及びシトクロムなどの多くの酵素の一部である。鉄は、摂取した食物から鉄を吸収する消化管の一面を覆う細胞によって、十二指腸及び小腸上部にFe^{2+}の形態で一般に吸収される。

【０１００】

カルシウムは、とりわけ重要な骨成分及び酵素活性化因子である別の必須ミネラルである。カルシウムはまた、生体電気インパルスの伝導、血液凝固、筋収縮、炎症及びホルモン分泌に関与する。カルシウムは、活性形態のビタミンＤ（カルシトリオール）の存在下で小腸に一般に吸収される。

【０１０１】

そのようなミネラルのいずれかのミネラル欠乏は、重度の合併症、病態及び疾患をもたらし得る。非治療的及び治療的な以下の使用は、例えば、栄養補給剤もしくは栄養飲料として本発明の組成物を提供することによって、例えば、非治療的に、健康な対象のミネラル欠乏を予防もしくは治療することによって、又は例えば、栄養組成物もしくは栄養飲料として、医薬組成物などとして上記で定義された組成物を投与もしくは供給することによって、それを必要とする対象のミネラル欠乏を予防もしくは治療することによって、そのようなミネラル欠乏に対処することが意図される。

【０１０２】

本発明はまた、ＧＯＳによってプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を追加量のＧＯＳと組み合わせて含むプロバイオティック組成物を使用して、消化管内のミネラル溶解度及びバイオアクセシビリティ並びにミネラル吸収も増加させる方法、溶液、組成物及び使用を提供する。本明細書に記載の用途のいずれも、上記の本発明の組成物、又は本明細書に記載のパーツキットを用いて行われ得る。

【０１０３】

本明細書に示されるように、本発明のプロバイオティック組成物は、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を製造する際の発酵中にＧＯＳを特定の基質成分として使用し、そのようなプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をさらにＧＯＳとともに補充して最終組成物を調製して、

哺乳動物におけるＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を増強することを可能にする。本明細書に開示される方法は、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養中にＧＯＳを使用することによって第１の工程でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングし、その結果、第２の工程でＧＯＳを添加した後、特に本明細書に開示される非治療的及び治療的投与中に、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の特に増加した有益なプロバイオティック効果がインビボで生じる、そのようなプロバイオティック組成物の調製を具体的に提供する。これは、例えば、本明細書に記載されるように、ＧＯＳとともにプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む組成物を投与した際の対象又は患者の消化管内のミネラルのミネラル溶解度、アクセシビリティ及び／又は吸収の増加による、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率の増加、腸内微生物叢の代謝活性の増加、及びミネラルのバイオアクセシビリティの増加に特に関し、これらを可能にする。

【０１０４】

さらに、腸内微生物叢の代謝活性の増加は、例えば、本明細書に記載されるように、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を投与した際の乳酸産生の増加によって明らかになる。酢酸産生の増加とともに観察された乳酸の増加は、特定の腸内細菌（例えば、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）及び乳酸産生細菌）の増大した活性を示し、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の投与により微生物叢が調節された（微生物叢をさらに健康にする）ことを示す。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の生存率の改善、結腸内微生物叢の代謝活性の顕著な増加、及び結腸内のミネラル（鉄及びカルシウム）溶解度の特定の増加は、最終組成物中でＧＯＳをさらに補充されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の併用投与に起因し得る。本発明のプロバイオティック組成物を投与することによってそれを必要とする対象及び／又は患者に与えられるこの組合せは、求められる健康効果を得るために必要なプロバイオティックの投与量及び／又は投与頻度を減少させることを可能にする。

【０１０５】

以下では、これに限定するものではないが、例示的な治療的及び非治療的用途（使用）が列挙される。

【０１０６】

・プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）細菌とＧＯＳとを含む組成物の非治療的使用

第３の態様によれば、本発明は、健康な対象の消化管内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を改善するか、増加させるか又は増強するための、典型的には投与可能な組成物の形態の、本発明の方法によって得ることができる、もしくは本発明の方法によって調製された、又はそうでなければ本明細書に記載される、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物の非治療的使用を提供する。健康な対象の消化管内のＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株によるプロバイオティック効果のそのような改善、増加又は増強は、ＧＯＳを補充された又は補充されない、健康な対象の消化管内の未だプレコンディショニングされていないプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と比較して典型的に決定され得る。

【０１０７】

健康な対象の消化管内の典型的にはプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果の改善、増加又は増強は、とりわけ、限定するものではないが、ミネラルのバイオアクセシビリティの増加、特に、健康な対象の消化管内のミネラルのミネラル溶解度、バイオアクセシビリティ及び／又は吸収の増加に関する。ミネ

ラルのバイオアベイラビリティの増加は、一実施形態では酵素機能の増加をもたらし得る。そのようなミネラルは、好ましくは、本明細書で言及される必須ミネラル、例えば、カルシウム及び／又は鉄である。

【０１０８】

プロバイオティック効果の増加は、例えば、健康な対象の腸管内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）生存率の改善、対象の腸管内の乳酸及び／もしくは酢酸産生の増加、並びに／又は健康な対象の健康な微生物叢の促進に現れ得る。

【０１０９】

したがって、特定の実施形態によれば、本明細書で定義されるプロバイオティック組成物の非治療的使用は、好ましくは、健康な対象の消化管内の好ましくはＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を改善するか又は増加させるためのものである。プロバイオティック効果のそのような改善又は増加は、例えば、以下であり得る

・健康な対象の腸管内のミネラルのバイオアクセシビリティの増加、好ましくはミネラル溶解度及び／もしくはミネラル吸収の増加；並びに／又は

・健康な対象の腸管内の健康な微生物叢の促進；並びに／又は

・腸管（例えば、結腸）内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率の促進、したがって、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に関連する健康上の便益の促進；並びに／又は

・例えば、健康な対象の腸管内の乳酸及び／もしくは酢酸産生の増加の形態の、好ましくはＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の腸内微生物叢の代謝活性の増加；並びに／又は

・健康な対象の骨形成及び／もしくは骨ミネラル化の増加、及び／もしくは骨芽細胞の成熟及び／もしくは活性の増加である。

【０１１０】

必須ミネラルのうち、カルシウムは、生体電気インパルスの伝導、血液凝固、筋収縮、炎症の予防、及びホルモン分泌に関与する。鉄は、多くの身体機能及びプロセスでは重要な因子であり、健康な細胞、皮膚、毛髪及び爪を維持するために必要である。

【０１１１】

好ましくは、健康な対象の消化管内のミネラル溶解度、アクセシビリティ及び／又は吸収を増加させることによる、健康な対象の腸管内のそのようなミネラルのバイオアクセシビリティの増加は、それによって、そのような身体機能及びプロセスのいずれかを増加させることを好ましくは可能にする。これらの態様は、特に、本発明のプロバイオティック組成物が適用され得る非治療的及び美容的な適用に関する。ほとんどのミネラルは身体に完全に吸着されないことから、健康な対象が、主張される非治療的使用によるミネラルの利用可能性の改善から明らかに利益を得ることができることが強調される。特に、健康な対象は、最適化された又は改善された骨の健康、骨形成、歯の状態、歯の成長、筋機能、認知機能、免疫機能、並びに／又は一般的な成長及び発達（特に小児／乳児について）から利益を得ることができる。

【０１１２】

対象の消化管内のミネラルのミネラル溶解度、アクセシビリティ及び／又は吸収に対するそのような効果に加えて、さらなる非治療的使用は、健康な対象の腸管内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の代謝活性及び／もしくはＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率の改善、並びに／又は健康な対象の健康な微生物叢の促進を包含し得る。

【０１１３】

本明細書で使用される、対象の健康な微生物叢とは、対象の微生物叢の組成が対象にとって有利かつ有益であることを意味する。結果として、本発明のプロバイオティック組成物は、対象に対して好ましい微生物叢組成（「健康な微生物叢」）をもたらすことができ、対象に対してさらに好ましい微生物叢組成（「さらに健康な又は一層健康な微生物叢」）をもたらす可能性さえある。

【０１１４】

これに関連して、この非治療的使用の主な対象である健康な対象は、好ましくはそのような身体機能及び身体プロセスに対処するため、又はさらにはそれらを改善するために、運動選手、小児、幼児又は乳児、成人、高齢者、妊娠中の女性、ベジタリアン、授乳中の女性、伴侶動物、ネコ又はイヌ又は鳥類から選択され得る。そのような健康な対象は、本明細書に記載されるようないかなる病態又は疾患にも通常罹患しておらず、特にいかなるミネラル欠乏にも罹患していない。

【０１１５】

プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための本明細書で説明される実施形態のいずれか、及びＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む本明細書で定義されるプロバイオティック組成物の特徴のいずれかは、本発明の第３の態様、すなわち、上記の本発明のプロバイオティック組成物の非治療的使用に準用される。

【０１１６】

これは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングする方法の特徴、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物の調製、並びにプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む組成物に使用される任意の成分及び量及びさらなる特徴に特に関する。プロバイオティック組成物は、上記のような任意の形態で提供され得る。

【０１１７】

これに関連して、例えば、非治療的目的のための本発明のプロバイオティック組成物は、固体もしくは液体であってよく、及び／又は粉末、小袋、錠剤、カプセルの形態で存在するか、もしくは油剤、エマルジョン、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）もしくは油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）の形態であってよいことに留意されたい。

【０１１８】

さらに、非治療的目的のための本発明のプロバイオティック組成物は、栄養組成物、医薬製剤、栄養補助食品、機能性食品、機能性飲料製品及びそれらの組合せ、例えば、乳製品、乳系製品、ホエータンパク質系飲料からなる群から好ましくは選択される投与可能な形態であり得る。

【０１１９】

前述のように、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３３、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３３６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ４６５９を含む又はそれらからなる群から選択され、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２４６５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔ

ｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９を含む又はそれらからなる群から好ましくは選択される、特に好ましい少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、さらに好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８である。

【０１２０】

・医薬品としての、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）細菌とＧＯＳとを含む組成物の使用

第４の態様によれば、本発明はまた、医薬品として使用するための、本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載される、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量を含むプロバイオティック組成物を提供する。

【０１２１】

先と同様に、医薬品としてのそのようなプロバイオティック組成物の効果は、ＧＯＳ、又はプレバイオティクスとプロバイオティクスとの通常の組合せによってプレコンディショニングされていないプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の効果と通常比較して、そのような医薬品を必要とする対象の消化管内のシンバイオティックプレバイオティック効果及びプロバイオティック効果の増加に特に関連する。

【０１２２】

医薬品としての本発明のプロバイオティック組成物の使用に関連する治療効果は、とりわけ、本明細書で言及される疾患、特に、そのような疾患のいずれか、特に治療的用途の文脈において本明細書で明示的に言及される疾患（以下も参照）のリスクがあるか又はそれらに既に罹患している対象に対する適用のいずれかに関連する効果に対処する。

【０１２３】

プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための上記の実施形態のいずれか、及びＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む本明細書で定義されるプロバイオティック組成物の特徴のいずれかは、本発明の第４の態様、すなわち、医薬品としての本発明のプロバイオティック組成物の使用に準用される。

【０１２４】

これは、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物を調製する方法の特徴、並びに上記の任意の形態の本発明のプロバイオティック組成物に使用される任意の成分及び量及びさらなる特徴に特に関する。

【０１２５】

これに関連して、医薬品として使用するための本発明のプロバイオティック組成物は、固体もしくは液体であってよいか、粉末、小袋、錠剤、カプセルの形態で存在してもよいか、又は油剤、エマルジョン、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）もしくは油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）の形態であってよいことが特に好ましい。

【０１２６】

同様に、医薬品として使用するための本発明のプロバイオティック組成物は、栄養組成物、医薬製剤、栄養補助食品、機能性食品、機能性飲料製品及びそれらの組合せ、例えば、乳製品、乳系製品、ホエータンパク質系飲料からなる群から好ましくは選択される投与可能な形態であり得る。

【０１２７】

前述のように、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロ

イテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３３、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９を含む又はそれらからなる群から選択され、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９を含む又はそれらからなる群から好ましくは選択される、特に好ましい少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、さらに好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８である。

【０１２８】

・プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ＲＥＵＴＥＲＩ）細菌とＧＯＳとを含む組成物の治療的使用

第５の態様によれば、本発明は、それを必要とする対象の疾患の予防及び／もしくは治療における使用のための、又はそのような疾患のリスクを低下させるかもしくは阻害するための、本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載される、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量を含むプロバイオティック組成物を提供する。

【０１２９】

本明細書で使用される場合、用語「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」、「治療する（ｔｒｅａｔ）」及び「緩和するため（ｔｏ　ａｌｌｅｖｉａｔｅ）」には、予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）又は予防的（ｐｒｅｖｅｎｔｉｖｅ）処置（標的とされる病理学的状態又は障害の発症を予防する及び／又は遅延させる）、並びに診断された病理学的状態もしくは障害を治癒させる、減速させる、診断された病理学的状態もしくは障害の症状を軽減する、及び／又は診断された病理学的状態もしくは障害の進行を停止させる治療的措置、及び疾患に罹患するリスクがあるか、又は疾患に罹患した疑いがある対象、及び病気の対象、又は疾患もしくは医学的状態に罹患していると診断された対象の治療を含む、治癒的処置、治療的処置又は疾患改変処置が含まれる。該用語は、対象が完全に回復するまで治療されることを必ずしも意味しない。用語「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」及び「治療する（ｔｒｅａｔ）」はまた、疾患に罹患していないが、不健康な状態などの発症の影響を受けやすい可能性がある個体の健康の維持及び／又は促進を指す。用語「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」及び「治療する（ｔｒｅａｔ）」は、例えば、予防的処置の形態で、疾患を発症するリスクを低下させることをさらに含む。用語「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」、「治療する（ｔｒｅａｔ）」及び「緩和するため（ｔｏ　ａｌｌｅｖｉａｔｅ）」はまた、１つ以上の一次予防的措置又は治療的措置の強化又は他の方法での増強を含むことを意図している。用語「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」、「治療する（ｔｒｅａｔ）」及び「緩和するため（ｔｏ　ａｌｌｅｖｉａｔｅ）」は、疾患もしくは病態の食事管理、又は疾患もしくは病態の予防（ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ）もしくは予防（ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ）のための食事管理を含むことをさらに意図している。

【０１３０】

一実施形態によれば、それを必要とする対象の疾患は、ミネラル欠乏に関連し得る。し

たがって、それを必要とする対象はまた、典型的には、ミネラル欠乏を発症するリスクがある対象、又は既にミネラル欠乏に罹患している対象である。そのような対象は、本明細書中上記の任意の対象群であり得る。

【０１３１】

一実施形態では、それを必要とするそのような対象はまた、消化機能障害、微生物叢の障害に罹患するリスクがある対象であり得、並びに／又は消化機能障害、微生物叢の障害、もしくは微生物叢の発達及び／もしくは成長の促進を必要とする病態を有する対象であり得る。

【０１３２】

本発明のこの特定の文脈では、ミネラル欠乏は、カルシウム及び／又は鉄の欠乏に好ましくは関する。それにより、以下に示されるように特定の疾患をもたらし得るのは必ずしも１つのミネラルのみの欠乏ではなく、さらに多くの場合、様々なミネラル、例えば、カルシウム及び／又は鉄から選択される１つ以上のミネラルの組合せの欠如であり、その結果、発生し得る生理学的結果、及び様々な疾患／病態の組合せも重複する。

【０１３３】

前述のように、鉄欠乏は、身体が十分なミネラル鉄を有しない場合に起こる病態である。鉄欠乏は、異常に低いレベルの赤血球、及び鉄欠乏性貧血と呼ばれる病態をもたらすことが多い。その結果、鉄欠乏性貧血は、倦怠及び息切れを引き起こす。鉄はまた、多くの身体機能を維持するのに非常に重要であることが知られており、健康な細胞、皮膚、毛髪及び爪を維持するために必要である。

【０１３４】

以下の人の群は、鉄欠乏性貧血のリスクが最も高く、したがって、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株組成物を投与されるのに適している；月経のある女性、特に月経期が重い場合、妊娠中もしくは授乳中の女性又は最近出産した女性、大きな手術又は身体的外傷を受け、失血した人、セリアック病などの胃腸疾患、潰瘍性大腸炎（ＵＣ）又はクローン病などの炎症性腸疾患（ＩＢＤ）を有する人、消化性潰瘍疾患を有する人、肥満症治療の手技、特に胃バイパス手術を受けた人、ベジタリアン、ビーガン、及び鉄に富んだ食物を含まない食事をしている他の人、１日１６～２４オンスを超える牛乳を飲む小児（牛乳は、鉄をほとんど含有しないだけでなく、鉄の吸収を減少させ、腸内層を刺激して慢性的な失血を引き起こす可能性もある。）、並びに乳児、特に低出生体重であるか又は早産で生まれた乳児、及び／又は母乳又は調製粉乳から十分な鉄を得ていない乳児。一般に、小児は、成長加速現象中に余分な鉄を必要とする。そのような患者群のいずれも、本明細書では治療され得る。

【０１３５】

したがって、一実施形態では、対象の鉄欠乏、好ましくは鉄欠乏性貧血を治療するために使用される、本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載される、本発明のプロバイオティック組成物。

【０１３６】

さらに、慢性鉄欠乏は、骨喪失及び骨粗鬆症の公知の新たな危険因子である。

【０１３７】

カルシウムは、重要な骨成分、及び酵素の活性化因子である別の必須ミネラルである。カルシウムはまた、生体電気インパルスの伝導、血液凝固、筋収縮、炎症及びホルモン分泌に関与する。

【０１３８】

したがって、一実施形態では、本発明は、対象のカルシウム欠乏の予防及び／もしくは治療に使用するための、骨喪失の予防及び／もしくは治療に使用するための、又は骨粗鬆症及び／もしくは骨減少症の治療に使用するための、本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載されるプロバイオティック組成物を提供する。

【０１３９】

さらに、特にカルシウム欠乏を考慮して、筋肉の問題、例えば、痙攣、筋攣縮及び鈍痛

、不眠症、眠気及び極端な疲労を含む疲労、皮膚及び爪の症状、湿疹、乾癬、発赤、かゆみ、皮膚水疱、骨粗鬆症及び骨減少症、有痛性月経前症候群（ｐａｉｎｆｕｌ ｐｒｅｍｅｎｓｔｒｕａｌ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、歯科的問題、うつ病などに関連するさらなる病態及び／又は疾患が予防又は治療され得る。さらに、カルシウム欠乏（低カルシウム血症）はまた、早期乳児期の深刻な問題であり、これにより、上記段階の乳児は特定の標的群になる。これには、新生児の生後２～３日間に起こる新生児低カルシウム血症、及び生後１週間又は数週間に始まる後期低カルシウム血症が含まれる。そのような疾患のいずれも治療され得る。一実施形態によれば、本発明は、それを必要とする対象の認知機能の促進、酸素輸送の促進、免疫機能の促進、及び／又は倦怠もしくは疲労の低減に使用するための、プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む組成物を特に提供する。

【０１４０】

カルシウム欠乏のリスクがある集団、並びにそのような予防及び／又は治療にとって好ましい対象には、妊娠中の女性（特に妊娠後期）、授乳中の女性、閉経後の女性、高齢者、１０代、及び／又は過体重の人が特に含まれる。低マグネシウム血症のリスクがある集団には、糖尿病患者、糖尿病のリスクがある患者、肥満対象及び／又は過体重対象などが特に含まれる。そのような対象及び患者群のいずれも、本明細書では治療され得る。

【０１４１】

一実施形態は、微生物叢の障害、又はディスバイオシスの予防及び／又は治療に使用するための、本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載される、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物に関する。

【０１４２】

本発明のプロバイオティック組成物は、乳酸及び／又は酢酸産生の増加によって観察されるように、さらに健康な微生物叢をもたらす。乳酸及び／又は酢酸の産生のそのような増加は、さらに健康でさらに代謝活性な腸内微生物叢、特にラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）及び乳酸産生細菌を示す。これは、本発明のプロバイオティック組成物を使用して、対象の微生物叢の組成障害、又はディスバイオシスを予防及び／又は治療することができることを意味する。

【０１４３】

ＧＯＳを補充された、本明細書で使用されるプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のさらなる正の効果は、微生物叢の組成の改善、並びに微生物叢における乳酸及び／又は酢酸産生の増加である。乳酸及び／又は酢酸の産生増加は、感染、特に腸感染の予防及び／又は治療に有効である。乳酸及び酢酸は、強力な抗病原性分子である。結腸内のそれらのレベルを増加させると、少なくとも部分的にｐＨを低下させることによって、病原体及び感染に対する保護が増加し得る。したがって、本発明によるプロバイオティック組成物は、一実施形態では、感染、特に腸感染に対する防御を促進し、一般的な免疫機能を促進し得る。

【０１４４】

さらに、治療される対象の腸管内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率及び／又は生着及び／又は生存能の増加は、本明細書で言及される疾患のいずれかの治療に特に正の影響を及ぼし得ると考えられる。

【０１４５】

本明細書における医学的使用はまた、骨喪失の予防及び／又は治療、成長の促進、小児の骨又は歯の発達、それを必要とする対象の歯の成長、筋機能の促進、神経系及び／又は骨又は筋関連状態の機能の促進に関する。

【０１４６】

それを必要とする対象の骨喪失及び／又は骨喪失関連疾患の予防及び／又は治療は、骨形成及び／又は骨ミネラル化及び／又は骨強度を促進することによって、少なくとも部分的に現れる。プロバイオティック組成物はまた、例えば、カルシウム溶解度及び／又はカ

ルシウム吸収を増加させることによって、カルシウムのバイオアクセシビリティを増加させた。プロバイオティック組成物のこれらの効果は、骨喪失及び／又は骨喪失関連疾患の治療では、さらに有益である。

【０１４７】

したがって、一実施形態では、本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載される、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とを含むプロバイオティック組成物は、小児の骨又は歯の成長及び／又は発達の促進に使用され得る。

【０１４８】

追加的又は代替的に、本発明の組成物は、消化機能障害の予防及び／又は治療に使用され得る。そのような病態には、例えば、微生物叢中の（有益な）細菌の量及び／又は機能を減少させる任意の治療又は疾患、例えば、免疫療法、癌治療、抗生物質の投与、感染又は炎症からの下痢に罹患している対象が含まれ得るが、微生物叢の障害に関連する任意のそのようなさらなる病態、又は乳児及び小児に影響を及ぼす微生物叢の発達及び／もしくは成長の促進を必要とする病態も特に関し得る。

【０１４９】

一般に、任意のそのような治療の対象、又はそのような治療を必要とする対象は、哺乳動物又は鳥類であり、好ましくはヒトであり、さらに好ましくは、小児、幼児又は乳児、高齢者、妊娠中の女性、ベジタリアン、授乳中の女性、伴侶動物から選択されるが、ペット、例えば、ネコもしくはイヌからも選択される。

【０１５０】

また、これに関連して、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物を調製するための上記の実施形態のいずれか、及びプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む本明細書で定義される組成物の特徴のいずれかはまた、本発明の第５の態様、すなわち、本明細書で定義される治療のいずれかにおける本発明のプロバイオティック組成物の医学的又は治療的使用に準用される。

【０１５１】

これは、ＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物を調製する方法の特徴、並びにプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む組成物に使用される任意の成分及び量及びさらなる特徴に特に関する。組成物は、上記のような任意の形態で提供され得る。

【０１５２】

これに関連して、本明細書に記載される医学的又は治療的使用のための本発明のプロバイオティック組成物は、固体もしくは液体であってよいか、粉末、小袋、錠剤、カプセルの形態で存在してもよいか、又は油剤、エマルジョン、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）もしくは油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）の形態であってよいことが特に好ましい。

【０１５３】

同様に、本明細書に記載の医学的又は治療的使用のための本発明のプロバイオティック組成物は、栄養組成物、医薬製剤、栄養補助食品、機能性食品、機能性飲料製品及びそれらの組合せ、例えば、乳製品、乳系製品、ホエータンパク質系飲料からなる群から好ましくは選択される投与可能な形態であり得る。

【０１５４】

前述のように、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ １７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ ＰＴＡ ６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４７、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ ３２８４８、Ｌ．ロ

イテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３３、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３４、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３３６３５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２２３２、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６１２７及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９を含む又はそれらからなる群から選択され、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４６、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４８、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２８４９、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　２７１３１、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　３２４６５及びＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９を含む又はそれらからなる群から好ましくは選択される、特に好ましい少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、さらに好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株はＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８である。

【０１５５】

さらなる特定の実施形態によれば、本発明はまた、それを必要とする対象の疾患の治療方法を提供する。そのような疾患及び対象は、好ましくは、本明細書に記載される通りである。治療方法は、本発明のプロバイオティック組成物を対象に投与する工程、すなわち、好ましくはプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための本発明の方法に従って調製された、又は本明細書に記載されるプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とを対象に投与する工程を好ましくは含む。したがって、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、好ましくはプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための本発明の方法に従って、ＧＯＳの存在下で培養されたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株である。投与は、それを必要とする対象の疾患の予防及び／もしくは治療、又はそのような疾患のリスクの減少もしくは阻害を好ましくは可能にする。上記で定義された疾患のいずれも包含される。プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ＧＯＳの有効量とは、本明細書に記載の本発明の組成物の形態で提供され得る。プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための本発明の方法、及び本発明の組成物について上述した特徴のいずれも同様に適用される。

【０１５６】

投与は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とＧＯＳの有効量とを混合物として又は単位投与量で含むプロバイオティック組成物の同時投与を伴い得る。あるいは、投与は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とＧＯＳの有効量との同時投与を伴い得るが、キットの別個の部分として提供される。別の実施形態では、投与は、プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量とＧＯＳの有効量とを別個に投与することを伴う。

【０１５７】

別の特定の実施形態によれば、本発明はまた、それを必要とする対象の疾患を予防及び／又は治療するための医薬品又は医薬組成物を製造又は調製するための、好ましくは本発明の方法によって得ることができる、又はそうでなければ本明細書に記載されるプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の使用

を提供する。そのような疾患及び対象は、好ましくは、本明細書に記載される通りである。使用は、それを必要とする対象の疾患の予防及び／もしくは治療、又はそのような疾患のリスクの減少もしくは阻害を好ましくは可能にする。上記で定義された疾患のいずれも包含される。プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングするための本発明の方法、及び本発明の組成物について上述した特徴のいずれも同様に適用される。

【０１５８】

さらなる態様及び実施形態を以下に提供する。

【０１５９】

プロバイオティック組成物を調製する方法において、以下の工程を含むことを特徴とする方法：

ａ）ｉ）ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の存在下で増殖培地中でプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養し、それによって、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングする工程と、

ｉｉ）任意に、増殖培地からプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を採取する工程と、

に従って、プロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株をプレコンディショニングする工程、及び

ｂ）工程ａ）ｉ）又はａ）ｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含むプロバイオティック組成物を調製し、ＧＯＳをプロバイオティック組成物に添加する工程。

【０１６０】

ＧＯＳが、工程ａ）ｉ）では、好ましくは工程ａ）ｉ）におけるプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の培養の開始時、途中又は終了時の増殖培地に基づいて計算して（％ｗ／ｗ）、増殖培地中の少なくとも０．２重量％、好ましくは少なくとも０．５重量％、さらになお好ましくは少なくとも０．７５重量％のＧＯＳ、好ましくは最大８重量％のＧＯＳ、例えば、最大７重量％のＧＯＳ、最大６重量％のＧＯＳ、又はさらには最大５重量％のＧＯＳ、さらに好ましくは最大４重量％のＧＯＳ、又はさらには最大３％のＧＯＳの量で、例えば、０．２重量％～８重量％、又はさらには０．２重量％～７重量％、又は０．２重量％～６重量％の範囲で、さらに好ましくは０．５重量％～８重量％、又はさらには０．５重量％～７重量％、又は０．５重量％～６重量％の範囲で、さらになお好ましくは０．７５重量％～８重量％、又はさらには０．７５重量％～７重量％、又は０．７５重量％～６重量％の範囲で、最も好ましくは０．７５重量％～７重量％の範囲で、０．７５重量％～６重量％の範囲で、又はさらには０．７５重量％～５重量％の範囲、例えば、０．７５重量％～３重量％、又は０．７５重量％～４重量％の範囲で増殖培地に添加される、上記による方法。

【０１６１】

ＧＯＳが、工程ｂ）では、工程ａ）ｉ）又はａ）ｉｉ）から得られたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に、１日用量当たり少なくとも１もしくは２ｇ、好ましくは１日用量当たり少なくとも３ｇ、同様に好ましくは１日用量当たり２～１２ｇ、もしくは１日用量当たり２～１０ｇ、１日用量当たり２～８ｇ、もしくは１日用量当たり２～７ｇ、さらに好ましくは１日用量当たり３～１２ｇ、同様にさらに好ましくは１日用量当たり３～１０ｇ、例えば、１日用量当たり３～８ｇ、１日用量当たり３～７ｇ、１日用量当たり３～６ｇ、又は１日用量当たり約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２ｇ、もしくはそれによって形成される任意の範囲の量で添加される、上記のいずれかによる方法。

【０１６２】

工程ａ）ｉ）の増殖培地に、及び／又は工程ｂ）で調製されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む組成物に添加されたＧＯＳが、３～８の重合度（ＤＰ）を有する、上記のいずれかによる方法。

【０１６３】
プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株が、ＤＳＭ　１７９３８の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　５２８９の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　６４７５の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、ＤＳＭ　３２８４６の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株、ＤＳＭ　３２８４８の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、ＤＳＭ　３２８４９の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、ＤＳＭ　２７１３１の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、ＤＳＭ　３２４６５の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、及びＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４６５９の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を含む又はそれらからなる群から選択される少なくとも１つのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株又は複数のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株であり、好ましくは、プロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株が、ＤＳＭ　１７９３８の下に寄託されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株である、上記のいずれかによる方法。
【０１６４】
ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の存在下で増殖培地中でＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を培養することによって調製されているプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、さらに、
ＧＯＳの有効量と
を含む組成物であって、
上記のいずれかによる方法に従って好ましくは調製されている組成物。
【０１６５】
プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を10^{3}ｃｆｕ～10^{12}ｃｆｕの量、典型的には１日用量当たり10^{4}ｃｆｕ～10^{11}ｃｆｕの量、好ましくは１日用量当たり10^{5}ｃｆｕ～10^{10}ｃｆｕの量、又は１日用量当たり10^{5}ｃｆｕ～10^{9}ｃｆｕ、同様に好ましくは１日用量当たり10^{6}ｃｆｕ～10^{9}ｃｆｕの量、１日用量当たり10^{6}ｃｆｕ～10^{8}ｃｆｕ、又は１日用量当たり10^{8}ｃｆｕ～10^{10}ｃｆｕの量、さらに好ましくは１日用量当たり約10^{7}ｃｆｕ～10^{9}ｃｆｕ、最も好ましくは１日用量当たり約10^{8}総ｃｆｕ、例えば、１日用量当たり10^{7}～10^{9}ｃｆｕ、又は１日用量当たり10^{8}～10^{9}ｃｆｕの量で含む、上記による組成物。
【０１６６】
１日用量当たり少なくとも１もしくは２ｇ、好ましくは１日用量当たり少なくとも３ｇ、同様に好ましくは１日用量当たり２～１２ｇ、もしくは１日用量当たり２～１０ｇ、１日用量当たり２～８ｇ、もしくは１日用量当たり２～７ｇ、さらに好ましくは１日用量当たり３～１２ｇ、同様にさらに好ましくは１日用量当たり３～１０ｇ、例えば、１日用量当たり３～８ｇ、１日用量当たり３～７ｇ、１日用量当たり３～６ｇ、又は１日用量当たり約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１もしくは１２ｇ、もしくはそれによって形成される任意の範囲の量のＧＯＳを含む、上記のいずれかによる組成物。
【０１６７】
組成物が、固体もしくは液体であり、及び／もしくは粉末、錠剤、カプセルの形態で存在するか、もしくは油剤、エマルジョン、水中油型エマルジョン（ｏ／ｗエマルジョン）もしくは油中水型エマルジョン（ｗ／ｏエマルジョン）の形態であり得、並びに／又は
組成物が、栄養組成物、医薬製剤、栄養補助食品、機能性食品、機能性飲料製品及びそれらの組合せ、例えば、乳製品、乳系製品、ホエータンパク質系飲料からなる群から好ましくは選択される投与可能な形態である、
上記のいずれかによる組成物。
【０１６８】

健康な対象の消化管内の好ましくはＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のプロバイオティック効果を改善するか又は増加させるための、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量を補充されたプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量を含む組成物の非治療的使用であって、組成物が、上記のいずれかに従って調製されるか、又は上記のいずれかによる組成物である非治療的使用。

【０１６９】

プロバイオティック効果の改善又は増加が、

・健康な対象の腸管内のミネラルのバイオアクセシビリティの増加、好ましくはミネラル溶解度及び／もしくはミネラル吸収の増加であり、ここで、ミネラルが、カルシウム及び／もしくは鉄から好ましくは選択され、並びに／又は

・健康な対象の腸管内の健康な微生物叢の促進であり、並びに／又は

・結腸内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の生存率の促進、したがって、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株に関連する健康上の便益の促進であり、並びに／又は

・健康な対象の腸管内の腸内マイクロバイオームの代謝活性の増加、例えば、乳酸／酢酸産生の増加であり、並びに／又は

・健康な対象の腸管内のミネラル溶解度及び／もしくはミネラル吸収の増加による、骨の健康、骨強度、骨形成、歯の状態、歯の成長、筋機能、認知機能、免疫機能及び／もしくは一般的な成長及び発達（特に小児／乳児の場合）の改善である、上記による非治療的使用。

【０１７０】

医薬品として使用するための、上記のいずれかに従って調製された、又は上記のいずれかによるプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含む組成物。

【０１７１】

患者が、好ましくはミネラル欠乏を発症するリスクがあるか、又はミネラル欠乏に罹患している対象であり、ミネラルが、カルシウム及び／又は鉄から任意に選択される、それを必要とする患者のミネラル欠乏の予防及び／又は治療に使用するための、上記のいずれかに従って調製された、又は上記のいずれかによるプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含む組成物。

【０１７２】

組成物が、

それを必要とする患者の鉄欠乏、好ましくは鉄欠乏性貧血の予防及び／もしくは治療に使用するためのものであり、及び／もしくは認知機能を促進し、及び／もしくは酸素輸送を促進し、及び／もしくは免疫機能を促進し、及び／もしくは倦怠もしくは疲労を低減し、並びに／又はそれを必要とする患者のカルシウム欠乏を低減する、上記による使用のための組成物。

【０１７３】

消化機能障害、微生物叢の障害、及び／又は消化機能障害の予防及び／又は治療に使用するためのものである、上記のいずれかによる使用のための組成物。

【０１７４】

微生物叢の障害、又はディスバイオシスの予防及び／又は治療に使用するための、上記のいずれかに従って調製された、又は上記のいずれかによるプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含む組成物。

【０１７５】

骨喪失の予防及び／もしくは治療に使用するための、並びに／又は小児の骨もしくは歯の成長及び発達を促進するための、並びに／又は筋機能を促進するための、並びに／又は

それを必要とする患者の神経系及び／もしくは骨もしくは筋関連状態の機能を促進するための、上記のいずれかに従って調製された、又は上記のいずれかによるプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含む組成物。

【０１７６】

任意に患者の微生物叢における乳酸／酢酸産生の増加を介して、感染、好ましくは腸感染の予防及び／もしくは治療に使用するための、並びに／又は免疫機能を促進するのに使用するための、上記のいずれかに従って調製された、又は上記のいずれかによるプレコンディショニングされたプロバイオティックラクトバチルス・ロイテリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｒｅｕｔｅｒｉ）株の有効量と、ガラクトオリゴ糖（ＧＯＳ）の有効量とを含む組成物。

【０１７７】

本明細書に開示される詳細な説明の様々な態様及び実施形態は、本発明を作製及び使用するための特定の方法を例示するものであり、特許請求の範囲及び詳細な説明を考慮した場合に本発明の範囲を限定しないことを理解されたい。本発明の態様及び実施形態からの特徴は、本発明の同じ又は異なる態様及び実施形態からのさらなる特徴と組み合わせることができることも理解されるであろう。

【０１７８】

この詳細な説明及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。

【０１７９】

記載されるすべての範囲は、上記範囲内に含まれるすべての数、整数又は分数を含むことを意図している。

【実施例】

【０１８０】

例１－ＧＯＳによってＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）をプレコンディショニングする方法

内部産生されたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）凍結スターター培養物（Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８）を使用して、炭素源として４％のウシ乳由来オリゴ糖（ＢＭＯＳ）と電子受容体として４％のフルクトース（乾物換算）とを含有する発酵培地に接種した。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の一晩培養物を使用して、炭素源として６％のＢＭＯＳと電子受容体として６％のフルクトース（乾物換算）とを含有する新鮮な発酵培地に接種した。発酵は、非ｐＨ制御下及び３７℃で行った。プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）細胞を約１０時間の発酵後に遠心分離によって採取し、その後、保護剤と混合し、噴霧乾燥させた。

【０１８１】

ＧＯＳ源として使用したＢＭＯＳ炭水化物混合物は、４８％ＧＯＳ、３０％ラクトース、８％グルコース、３．９％ガラクトース及び＞０．２％３’－ＳＬ＋６’－ＳＬ（ｇ／１００ｇの乾物換算）から構成されていた。

【０１８２】

注入プレーティング（ｐｏｕｒ　ｐｌａｔｉｎｇ）によって、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の細胞数を決定した。要約すると、連続１０倍希釈（ｓｅｒｉａｌ　ｄｅｃｉｍａｌ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ）噴霧乾燥試料をトリプトン塩（Ｏｘｏｉｄ、ＬＰ００４２）溶液中で行った。その後、１００μＬの適切な希釈液をペトリ皿に移し、ＭＲＳ寒天（ＡＥＳ　Ｃｈｅｍｕｎｅｘ，Ｂｒｕｚ，Ｆｒａｎｃｅ）と混合した。分析を２連で行った。次いで、プレートを３７℃の好気的条件で４８時間インキュベートした。１グラム当たりのコロニー形成単位（ｃｆｕ／ｇ）を、それらの算術平均を決定することによって、適切な希釈を用いてプレート上で計数されたコロニーの数から計算した。

【０１８３】

さらに、任意の工程に従って、採取されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）に、高度に精製されたＧＯＳ（＞９３％）を添加した。

【０１８４】

例２－プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）とＧＯＳとを含む小袋の製造

凍結乾燥されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８（以下に記載されるように培養及び凍結乾燥される）、10^8ＣＦＵ／小袋と、ＧＯＳ　１５（ＶＩＶＩＮＡＬ（登録商標）、ＦｒｉｅｓｌａｎｄＣａｍｐｉｎａ　Ｄｏｍｏ，ｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）２０００ｍｇ／小袋とから、組成物を作製する。ＬＡＦベンチ（Ｈｅｔｏ－Ｈｏｌｔｅｎ　Ａ／Ｓ（デンマーク）製、Ｈｏｌｔｅｎ　Ｌａｍｉｎａｉｒ　Ｍｏｄｅｌ　Ｓ－２０１０　１．２）内で乾燥剤（１０ｃｍ×１２ｃｍ、包装材料ＰＥＴ１２／ＰＥ／ＡＬＵ１２／ＰＥ／ＰＥ＋乾燥剤／ＰＥ（Ａｌｃａｎ製）を使用）を用いて、周囲温度で当技術分野で既知のアルミニウムホイルバッグに組成物を充填する。Ｄｅｎｖｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ　ＧｍｂＨ（Ｇｅｒｍａｎｙ）製の天秤ＸＰ－６００を使用して、各バッグに、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）とＧＯＳとを含む２ｇの粉末を添加する。次いで、Ｋｅｔｔｅｎｂａｕｍ　Ｆｏｌｉｅｎｓｃｈｗｅｉｓｓｔｅｃｈｎｉｋ　ＧｍｂＨ＆Ｃｏ．ＫＧ（ドイツ）製のフィルムシーリング装置モードＦ４６０／２を用いて、充填されたアルミニウムホイルバッグをヒートシールする。

【０１８５】

バイオリアクターでの培養

１０ｍｌのＭＲＳ培地（Ｏｘｏｉｄ）に、－７０℃で保存した凍結ストックから１００μｌのＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８を接種する。チューブを３７℃で６時間インキュベートし、その後、５００μｌを使用して５０ｍｌのＭＲＳをチューブに接種する。チューブを３７℃で１６～２０時間インキュベートし、その後、全体積をバイオリアクターへの接種材料として使用する。

【０１８６】

バイオリアクターでの培養条件

作業体積：１Ｌ

培地：３％ＢＭＯＳ＋３％フルクトースを含む産業用ＭＲＳ（ｉＭＲＳ）

通気：通気なし

温度：３７℃

撹拌：２５０ｒｐｍ

ｐＨ：６．００＋／－０．１

培養時間：６～１０時間

【０１８７】

ｉＭＲＳ成分

成分	量（ｇ）
酵母抽出物	１０
酵母ペプトン	１０
クエン酸ナトリウム	２
酢酸ナトリウム	５
K_2HPO_4	２
$MgSO_4$七水和物	０．１
硫酸マンガン七水和物	０．０５
Ｔｗｅｅｎ　８０	１
Ｌ－システイン	０．１

精製水（８００ｍｌ）

【０１８８】

ＮａＯＨを用いてｐＨを６．５に設定し、オートクレーブ（１２１℃、１５分）し、その後、滅菌糖溶液（最終体積１０００ｍｌ）を添加する。培養後、細菌を遠心分離によってペレット化し、５０ｍｌの１０％スクロースに懸濁する。

【０１８９】

凍結乾燥

濃縮した細胞懸濁液を凍結乾燥ガラスバイアル（１ｍｌ／バイアル）に分注し、バイアルをウルトラフリーザー内で－５０℃で２時間凍結した後、Ｌａｂｃｏｎｃｏ　ＦｒｅｅＺｏｎｅ　Ｓｔｏｐｐｅｒｉｎｇ　Ｔｒａｙ　Ｆｒｅｅｚｅ－Ｄｒｙｅｒに移す。凍結乾燥スキームを以下のように設定する：凍結工程：－４０℃で４時間；主乾燥：－３５℃、０．１０２ｍｂａｒで１５分間、－１０℃、０．１０２ｍｂａｒで１２．５時間；二次乾燥：－１０℃、０．０１ｍｂａｒで３０分間、２５℃、０．０１ｍｂａｒで１２時間。プロセスの終了時に、真空下でバイアルに蓋をし、その後の使用までバイアルを－２０℃で保存した。

【０１９０】

例３－付加的なＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を含むプロバイオティック組成物を調製する方法

再構成されたグローイングアップミルク組成物に、１日用量当たり５×10^6ｃｆｕの量のプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）と、１日用量当たり０．５～１２ｇの量のＧＯＳとを添加することによって、年齢層に適合したミネラルを含有する、グローイングアップミルクとも呼ばれる牛乳系幼児飲料を調製した。

【０１９１】

例４－付加的なＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を含む組成物は、結腸内の生存率を増加させ、結腸内のカルシウム及び鉄の溶解度を増加させる

ＳＨＩＭＥ（登録商標）－モデル

この実験では、Ｈｕｍａｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｅｃｏｓｙｓｔｅｍ（ＳＨＩＭＥ（登録商標））の連続シミュレータの単純化されたシミュレーションを使用した。このＳＨＩＭＥ（登録商標）モデルは、科学プロジェクト及び産業プロジェクトの両方に２０年超にわたって広範囲に使用されており、インビボパラメータによって検証されている（例えば、Ｖａｎ　ｄｅｎ　Ａｂｂｅｅｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｒａｂｉｎｏｘｙｌｏ－Ｏｌｉｇｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ｉｎｕｌｉｎ　Ｉｍｐａｃｔ　Ｉｎｔｅｒ－Ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌ　Ｖａｒｉａｔｉｏｎ　ｏｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎ，Ｗｈｉｃｈ　Ｉｍｍｕｎｏｍｏｄｕｌａｔｅｓ　Ｈｕｍａｎ　ｃｅｌｌｓ，Ｊ．Ａｇｒｉｃ．Ｆｏｏｄ　ｃｈｅｍ．２０１８，６６（５）：１１２１－１１３０を参照）。

【０１９２】

一連の本実験のために、単純化されたＳＨＩＭＥ（登録商標）システムとして、上部消化管（上部ＧＩＴ、胃及び小腸）及び結腸状態を模倣する２段階バッチ系を使用した（図１）。これらの試験では、グローイングアップミルクとも呼ばれる、年齢層に適合したミネラルを含有する牛乳系幼児飲料を使用した。

【０１９３】

幼児の小腸内で起こる吸収過程をシミュレートするために、１４ｋＤａのカットオフを有するセルロース膜を使用することによって透析手法を適用した。透析膜内に小腸懸濁液を導入することによって、消化アミノ酸、糖、微量栄養素及びミネラルなどの分子を上部消化管マトリックスから徐々に除去した。

【０１９４】

さらに、幼児の胃内ｐＨをシミュレートするために、１時間のインキュベーション中に５．５から３．０に進む、胃内インキュベーション中の緩やかなｐＨ低下を実施した。また、最初の３０分間の小腸インキュベーション（十二指腸）中、４．５の固定ｐＨを実施

して、利用可能なミネラルを最適に吸収させた。小腸相（空腸＋回腸）の続く１４５分間に、ｐＨ７を導入した。胃及び小腸条件への曝露後のミルクマトリックスを、幼児の糞便試料を含有する結腸区画に移した。

【０１９５】

１２ヶ月齢の乳児ドナーから、新鮮な糞便材料を採取した。糞便懸濁液を調製し、保護剤と混合した。短期結腸インキュベーションの開始時に、試験成分（Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株及びストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）株）を、結腸内に存在する基礎栄養素（例えば、ムチンなどの宿主由来グリカン）を含有する糖枯渇栄養培地に添加した。

【０１９６】

Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株及びＳ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）株を1×10^{9}ＣＦＵ／リアクターで接種した。

【０１９７】

以下のインキュベーションを行った：

・プロバイオティックを用いない対照インキュベーション（上部ＧＩＴ消化ミルクのみ）

・上部ＧＩＴ消化ミルク＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株ＤＳＭ　１７９３８

・上部ＧＩＴ消化ミルク＋Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＮＣＣ２４９６（ｃｕｌｔｕｒｅ　ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｎｅｓｔｌｅ　Ｓ．Ａ．（Ｖｅｖｅｙ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ））

・上部ＧＩＴ消化ミルク＋ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株ＤＳＭ　１７９３８

・上部ＧＩＴ消化ミルク＋ＧＯＳ＋Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＮＣＣ２４９６

【０１９８】

高度に精製されたＧＯＳ（純度＞９３％）を４ｇ　ＧＯＳ／消化ミルク１Ｌの当量で使用して、大腸に到達するＧＯＳ構造をシミュレートした。

【０１９９】

内部産生されたＳ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）凍結スターター培養物を使用して、炭素源として３％デキストロースと、窒素源として２．５％酵母抽出物と、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０とを含有する発酵培地に接種した。Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）の３７℃での一晩培養物を使用して、炭素源として４％デキストロースと、窒素源として２．５％酵母抽出物と、０．１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０とを含有する新鮮な発酵培地に接種した。発酵を４０℃で、ＮａＯＨ３０％を添加して５．８に維持したｐＨ制御下で行った。

【０２００】

別個の実験では、糞便試料を含有する結腸培地に試験成分（Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ））を添加した。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の発酵培地中のＢＭＯＳをデキストロース（８％）に置き換えた（参照＝プレコンディショニングなし）。次いで、同じ発酵条件を適用した（発酵時間１０時間、ｐＨ制御なし、３７℃）。

【０２０１】

Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株及びプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を1×10^{9}ＣＦＵ／リアクターで接種した。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）をＭＲＳ培地上にプレーティングすることによって定量し、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）をラクトースを補充したＭ１７培地上にプレーティングした。両株を３７℃で４８時間インキュベートした後、細胞を計数した。次いで、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）粉末及びＳ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）粉末の量を計算して、1×10^{9}ＣＦＵ／結腸リアクターを標的とした。

【０２０２】
以下のインキュベーションを行った：
・プロバイオティックを用いない対照インキュベーション（消化ミルクのみ）
・上部ＧＩＴ消化ミルク＋ＧＯＳ
・上部ＧＩＴ消化ミルク＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株ＤＳＭ　１７９３８
・上部ＧＩＴ消化ミルク＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８
・上部ＧＩＴ消化ミルク＋ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株ＤＳＭ　１７９３８
・上部ＧＩＴ消化ミルク＋ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）ＤＳＭ　１７９３８
【０２０３】
結腸インキュベーションを、３７℃で、振盪（９０ｒｐｍ）条件下で４８時間行った。生物学的変動を説明するために、全実験を３連で行った。
【０２０４】
ミネラル（カルシウム及び鉄）の分析
Ｇｈｅｎｔ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂｅｌｇｉｕｍ）の専門研究室によってカルシウム及び鉄の分析を行った。試料を誘導結合プラズマ発光分光（ＩＣＰ－ＯＥＳ）によって測定した。結腸区画内のミネラル分析のための試料を０時間後、６時間後、２４時間後及び４８時間後に採取した。４８時間の時点の前に結腸透析を行い、バイオアクセス可能なミネラル画分、及び不溶性ミネラル画分の値を得た。０時間、６時間及び２４時間の時点で採取した試料を遠心分離し、分析前に濾過した。遠心分離前に総カルシウムを測定した。遠心分離及び濾過後の画分（ペレットを除く）中の可溶性カルシウムを測定した。
【０２０５】
結果を図２及び図３に示す。
【０２０６】
図２に見られるように、ＧＯＳ単独は、カルシウム溶解度にほとんど又は全く影響を及ぼさない。ＧＯＳと組み合わせたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、６時間及び２４時間の両時点でカルシウムの溶解度を増強する。プレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は、ＧＯＳの存在下で６時間及び２４時間の両方の時点で結腸内のカルシウム溶解度をさらに増強する。これは、ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株を、それを必要とする対象のカルシウム吸収を促進するために使用することができることを示唆している。
【０２０７】
図３に見られるように、ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株は結腸内の鉄溶解度（バイオアクセシビリティ）を増強することから、ＧＯＳとプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）との組合せが、それを必要とする対象において鉄吸収を促進し得ることが示唆される。
【０２０８】
微生物群組成
乳酸桿菌（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｉ）及び連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ）を選択的に計数するために、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）を行った。ｑＰＣＲを０時間の時点で、及び結腸インキュベーションの４８時間後に行った。
【０２０９】
結果を図４Ａ及び図４Ｂに示す。
【０２１０】
図４Ａは、結腸内のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の生存率がＧＯＳの存在によって増強されることを示す。対照的に、Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌ

ｕｓ）の生存率は、結腸内のＧＯＳの存在によって損なわれる。これは、両株がＧＯＳの存在下で発酵培地中及び制御された条件下で増殖することができたとしても、それらの株が結腸内のような極めて競合的な環境にある場合には異なる挙動をすることを意味する。腸内、特に結腸内には、多様な細菌が存在する。細菌は、結腸環境で生存するために食物を巡って争う。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、効率的にＧＯＳを消費し、良好な生存率をもたらすことができる。Ｓ．サーモフィルス（Ｓ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）の方が、ＧＯＳを消費する能力を有するにもかかわらず、競合的な細菌環境では悪戦苦闘するようである。

【０２１１】

図４Ｂは、ＧＯＳの存在下での結腸内のプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の生存率を示す。Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）（プレコンディショニングなし）は、ＧＯＳの存在下で結腸内で十分に生存する。プレコンディショニングは、結腸内の４８時間の時点での比較的高い細胞数によって見られるように、Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の生存率を改善する。

【０２１２】

微生物代謝活性

本発明の方法に従って調製されたプレコンディショニングされたプロバイオティックＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の微生物活性を評価するために、インキュベーション開始後０時間、６時間及び４８時間の期間にわたって、ｐＨ、短鎖脂肪酸及びラクタート値をモニタリングした：

・ｐＨ：実験中の酸性化度は、細菌代謝（発酵）の強度の尺度である。インキュベーション開始の０時間後、６時間後及び４８時間後にインキュベーションのｐＨを決定し、したがって、発酵速度の大まかな指標を得た。

・短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）は、微生物炭水化物代謝（この場合はアセタート）の評価であり、正常なＧＩ微生物叢の典型的な発酵パターンと比較され得る。インキュベーションの０時間、６時間及び４８時間後に、ＳＣＦＡ分析用の試料を分析した。

・ラクタート：腸は、ラクタート産生細菌及びラクタート消費細菌の両方を有する。ラクタートは、乳酸菌によって産生され、環境のｐＨを低下させ、抗微生物剤としても作用する。ラクタートはまた、他の微生物によってアセタート、ブチラート及びプロピオナートに迅速に変換され得る。インキュベーションの０時間、６時間及び４８時間後に、Ｓラクタート分析用の試料を分析した。

【０２１３】

結果を図５及び図６に示す。

【０２１４】

図５は、乳酸産生（４８時間のレベルと６時間のレベルとの差）を示す。ＧＯＳは、単独で、結腸内で強力な乳酸産生を誘導する。ＧＯＳと組み合わせてＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を加えると、結腸内の乳酸の産生がさらに増強される。プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を結腸内でＧＯＳと組み合わせて添加した場合、乳酸の最も高い産生が測定され、微生物叢の代謝活性の全体的な増加が示された。乳酸産生細菌は、ＧＯＳ及びプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を４８時間にわたって添加すると、結腸内でさらに活性になる。

【０２１５】

図６は、結腸内のｐＨ低下（４８時間と６時間との差）（右パネル）、及び酢酸産生（４８時間と６時間との差）（左パネル）を示す。ＧＯＳと組み合わせたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、結腸内でさらに強いｐＨ低下を誘導する。また、プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）、及びＧＯＳの存在下では、さらに高レベルの酢酸が産生される。ｐＨは、酸産生のマーカーである。乳酸及び酢酸の両方が、ＧＯＳの存在下でプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）によって強力に誘導される。

【０２１６】

例５－付加的なＧＯＳを補充されたプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）を含む組成物は、骨パラメータに対して正の効果を示す
マウス前骨芽細胞モデル：ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１を使用して、インビトロ骨実験を行った（骨芽細胞は骨形成細胞である）。骨細胞を様々な条件に曝露した（下記を参照）。これらの条件を、遠心分離及び濾過による４８時間の結腸インキュベーション後に調製した後、ＤＭＥＭ培地中の骨細胞培養物に１％で添加した。
条件：
上部ＧＩ消化ミルク（対照）
上部ＧＩ消化ミルク＋ＧＯＳ（ＧＯＳ）
上部ＧＩ消化ミルク＋ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株（ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ））
上部ＧＩ消化ミルク＋ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株（ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ））

【０２１７】
読出し：
アルカリホスファターゼ（ＡＬＰ）活性（酵素活性）。ＡＬＰは、骨芽細胞が成熟した際に骨芽細胞によって発現される酵素であり、骨芽細胞（骨形成細胞）の分化の指標である。

【０２１８】
アリザリンレッド吸収は、骨芽細胞ミネラル化の指標である。

【０２１９】
ＭＣ３Ｔ３細胞遊走の指標としてのスクラッチアッセイ
図７に見られるように、ＧＯＳ又はＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株のみと比較してＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の優位性を伴う骨芽細胞増殖に対する正の効果が観察された。骨芽細胞分化に対する影響は、骨形成速度、したがって成長速度に対する正の影響と関連する。

【０２２０】
図８に示すように、ミネラル化（後期骨芽細胞活性）は、ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株の方が高い（ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）株と対比して）。ミネラル化が高くなれば、骨強度が増加され得る。

【０２２１】
図９に示すように、ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）は、他のすべての条件と対比して細胞遊走を有意に減少させた。これは、図７に示すように、ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）に曝露された場合の細胞の分化の増加と一致する。

【０２２２】
マウス前骨芽細胞モデル：ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１を使用して、インビトロ実験を行った（骨芽細胞は骨形成細胞である）。細胞を様々な条件に曝露した：
４８時間の結腸インキュベーション後のＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）試料あり及びなし（プレコンディショニングあり及びなし）の、ＧＯＳを補充された上部ＧＩＴ消化ミルクを採取し、短鎖脂肪酸（ＳＣＦＡ）、例えば、ブチラート、プロピオナート及びアセタートのレベルを測定した。

【０２２３】
ＤＭＥＭ中の純粋なＳＣＦＡのブレンドでは、１／１０００で、表の対応する条件に細胞を曝露した。条件を以下の表に列挙する。

【表１】

条件	アセタート（mM）	プロピオナート（mM）	ブチラート（mM）
SCFA（対照）	22．98	12．25	3．63
SCFA（GOS）	46．05	14．20	3．85
SCFA（GOS＋通常のL．ロイテリ（L．reuteri））	51．89	13．42	3．78
SCFA（GOS＋プレコンディショニングされたL．ロイテリ（L．reuteri））	56．60	17．41	4．56

【０２２４】

遺伝子発現の読出し：４日目の時点での活性化転写因子４（Ａｔｆ４）及びオステオカルシン（Ｏｃｎ）。Ａｔｆ４は骨芽細胞分化の初期マーカーであり、Ｏｃｎは骨芽細胞ミネラル化のマーカーである。

【０２２５】

図１０に示すように、ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）条件又はＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）条件からの両ＳＣＦＡブレンドは、対照条件と対比して、Ａｔｆ４遺伝子発現を有意に増加させた。これは、初期骨芽細胞分化の刺激を示している。

【０２２６】

図１１に示すように、ＧＯＳ＋プレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）条件からのＳＣＦＡブレンドのみが、対照条件と対比してＯｃｎ遺伝子発現を有意に増加させた。これは、ＧＯＳ＋Ｌ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）（プレコンディショニングなし）と比較して、骨芽細胞ミネラル化を刺激するプレコンディショニングされたＬ．ロイテリ（Ｌ．ｒｅｕｔｅｒｉ）の優位性を示している。

【０２２７】

上記の実施形態は、本発明のいくつかの例示的な例として理解されるべきである。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく、実施形態に様々な修正、組合せ、及び変更を加えることができることを理解するであろう。特に、異なる実施形態における異なる部分の解決策は、技術的に可能な場合、他の構成で組み合わせることができる。ただし、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定義される。

【図面】

【図１】

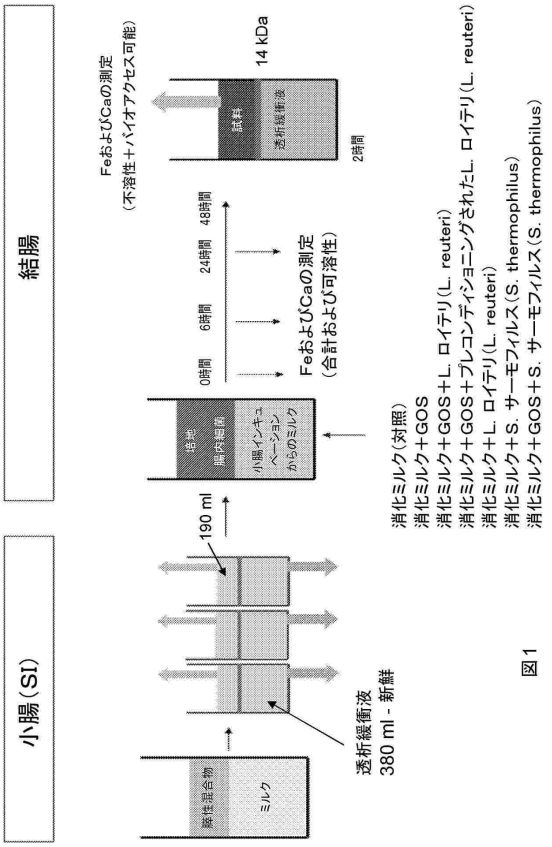


図1

【図２】

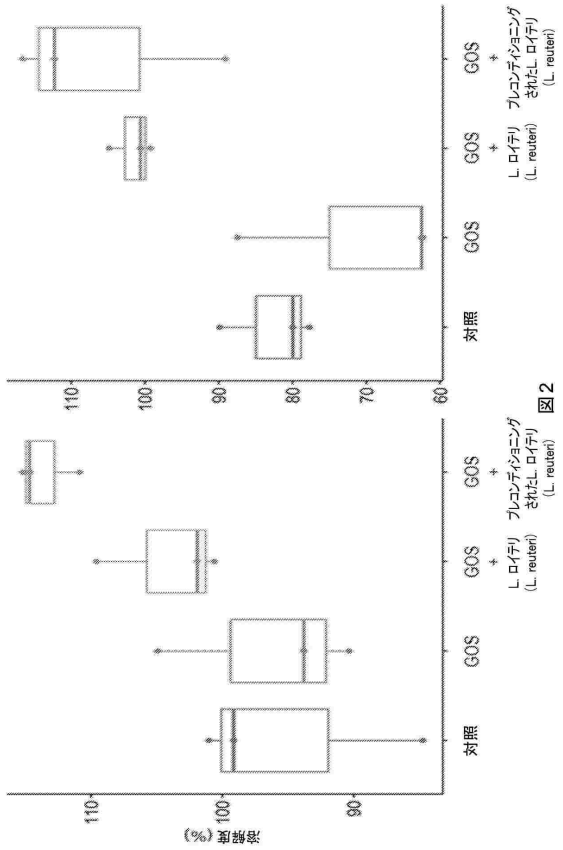


図2

【図３】

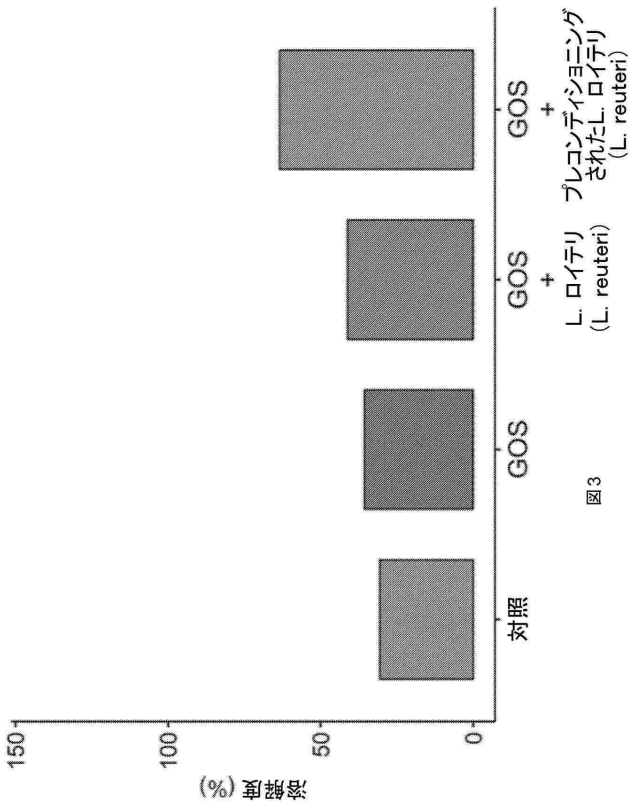


図3

【図４Ａ】

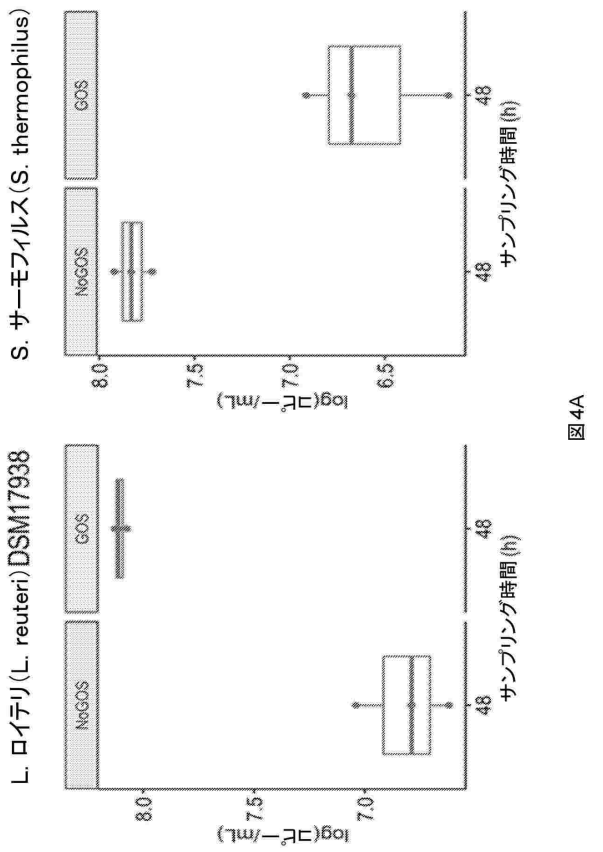


図4A

【図４Ｂ】

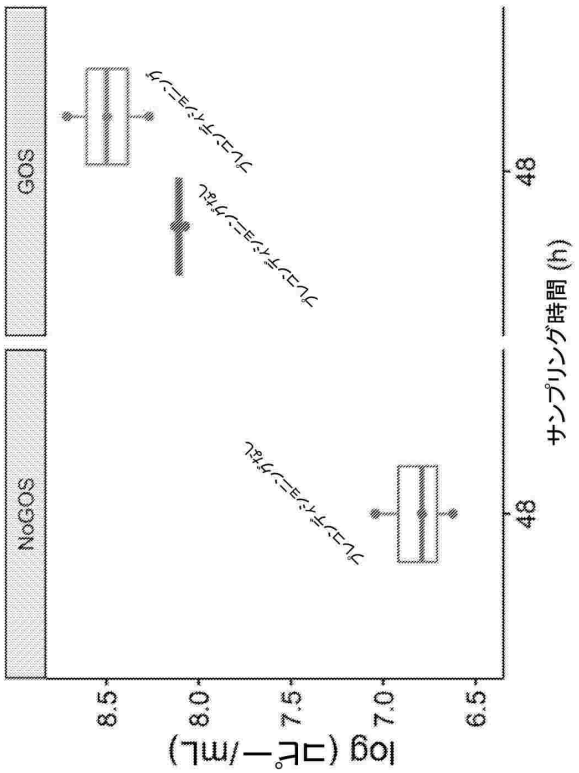


図4B

【図５】

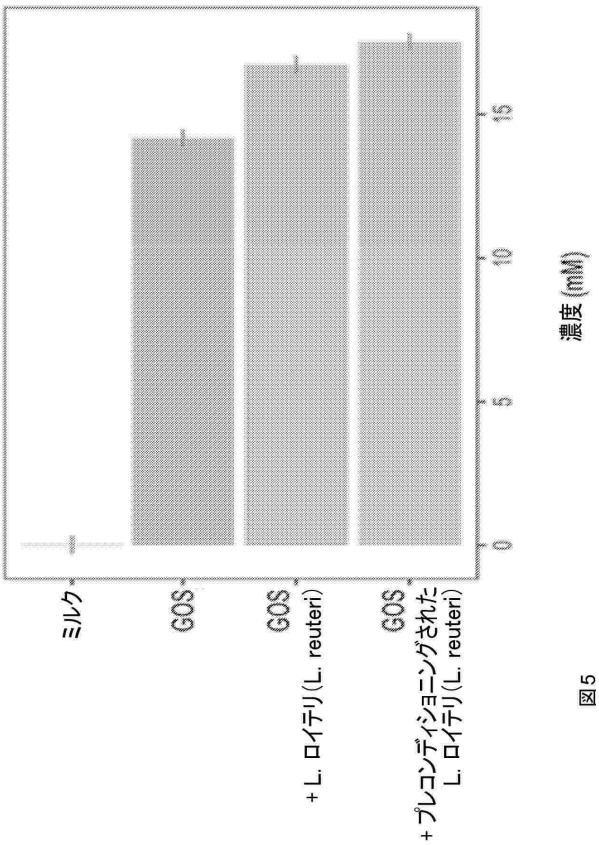


図5

【図６】

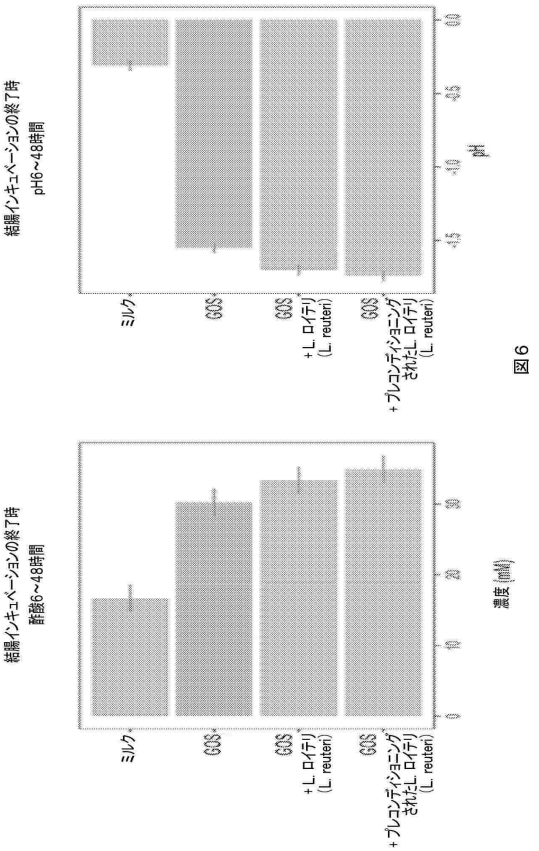


図6

【図７】

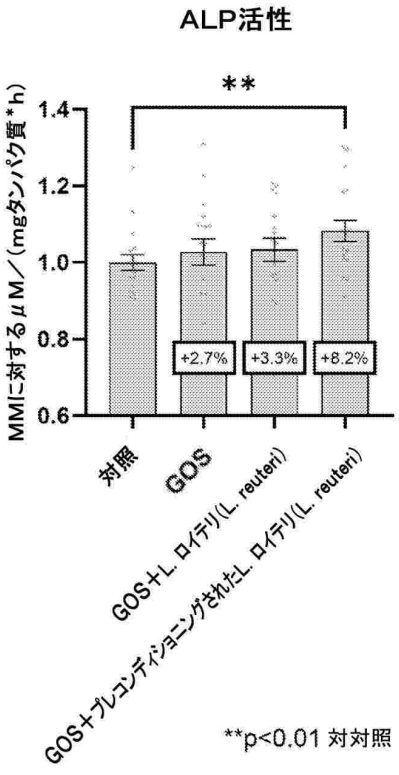


図7

【図８】

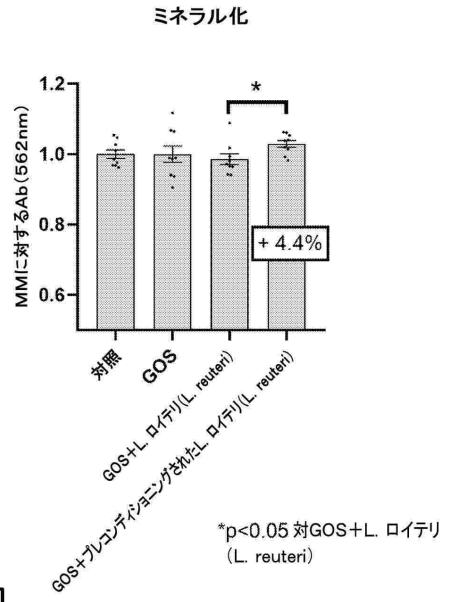


図8

【図９】

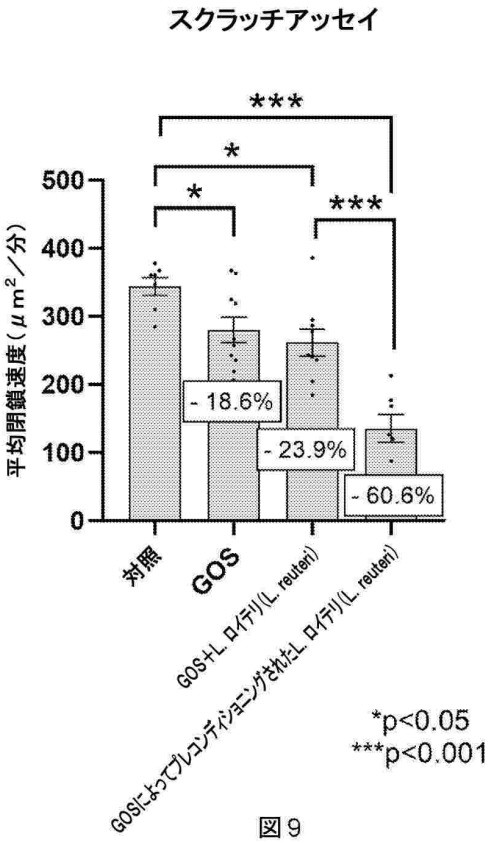


図9

【図１０】

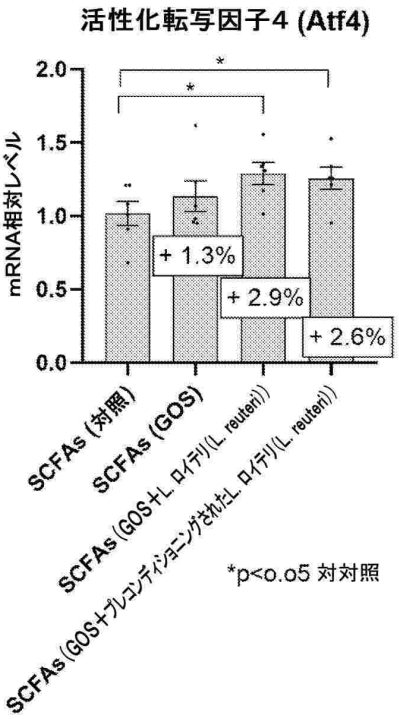


図10

【図１１】

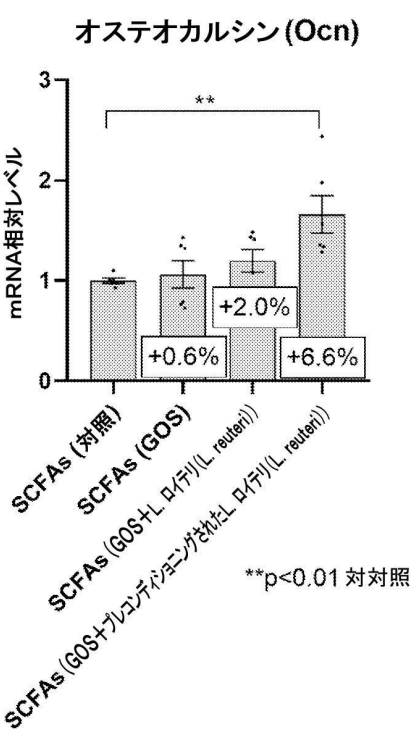


図11

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/SE2022/050245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23L33/135 A23L33/125
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)
A23L

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/025637 A1 (NESTEC SA [CH]) 7 February 2019 (2019-02-07) page 13, line 6 - line 13 page 16, line 24 - line 32; claims 1-23 page 15, line 21 - line 29 page 17, line 5 - line 8 page 17, line 33 - page 18, line 9	1-31
A	WO 2015/067949 A1 (OPTIBIOTIX LTD [GB]) 14 May 2015 (2015-05-14) page 16, line 8 - page 18, line 7	1-31
A	WO 2012/115588 A1 (BIOGAIA AB [SE]; ROOS STEFAN [SE]) 30 August 2012 (2012-08-30)	1

-/--

[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
30 May 2022	22/06/2022

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	Smalt, Rolf

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/SE2022/050245

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D. WATSON ET AL: "Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 114, no. 4, 11 January 2013 (2013-01-11), pages 1132-1146, XP055619391, GB ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/jam.12105 -----	1
A	WANG JING ET AL: "Relative fermentation of oligosaccharides from human milk and plants by gut microbes", EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 243, no. 1, 20 June 2016 (2016-06-20) , pages 133-146, XP036127102, ISSN: 1438-2377, DOI: 10.1007/S00217-016-2730-0 [retrieved on 2016-06-20] -----	1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/SE2022/050245

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019025637 A1	07-02-2019	AU 2018310705 A1	28-11-2019
		BR 112019027088 A2	07-07-2020
		CL 2019003595 A1	04-05-2020
		CN 111372477 A	03-07-2020
		EP 3661371 A1	10-06-2020
		PH 12019550231 A1	20-07-2020
		US 2021121507 A1	29-04-2021
		WO 2019025637 A1	07-02-2019
WO 2015067949 A1	14-05-2015	AU 2014345344 A1	02-06-2016
		AU 2018208701 A1	16-08-2018
		CA 2929815 A1	14-05-2015
		CA 3028210 A1	14-05-2015
		EP 3065572 A1	14-09-2016
		EP 3892116 A1	13-10-2021
		JP 6890972 B2	18-06-2021
		JP 2016537410 A	01-12-2016
		JP 2019206528 A	05-12-2019
		US 2016263144 A1	15-09-2016
		US 2018177817 A1	28-06-2018
		WO 2015067949 A1	14-05-2015
WO 2012115588 A1	30-08-2012	AU 2012221154 A1	18-07-2013
		BR 112013020695 A2	25-10-2016
		CA 2828072 A1	30-08-2012
		CN 103402377 A	20-11-2013
		EP 2677886 A1	01-01-2014
		JP 2014513058 A	29-05-2014
		KR 20130140812 A	24-12-2013
		NZ 613318 A	30-10-2015
		RU 2013142920 A	27-03-2015
		SG 191355 A1	30-08-2013
		WO 2012115588 A1	30-08-2012
		ZA 201304704 B	25-09-2014

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P 7/06 (2006.01)		A61P	7/06		
A61P 31/04 (2006.01)		A61P	31/04		
A61K 31/702 (2006.01)		A61K	31/702		
A61K 35/747 (2015.01)		A61K	35/747		
C12N 1/20 (2006.01)		C12N	1/20	A	
A23L 33/125 (2016.01)		A23L	33/125		

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,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,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

(72)発明者 サバティエ、マガリ
スイス連邦、ローザンヌ、ルート ドゥー ジョラ ６５
(72)発明者 ブールキ、ベルトラン
スイス連邦、ベルン、シェーンブルクシュトラーセ、１９
(72)発明者 プリウルト、ゲノレ エリアーヌ マリー
スイス連邦、ベルン、ローゼンウェグ １７
(72)発明者 デ ブライン、フロラック
ベルギー王国、ローザンヌ、シュマン ドゥ トレイブラン ４

Ｆターム（参考） 4B018 MD31 MD86 ME05 ME09 ME11 MF03 MF06 MF13
4B065 AA30X BB17 BC13 BD10 BD11 BD37 CA41 CA44
4C076 AA30 BB01 CC14 CC16 CC21 CC31 CC40 FF01 FF68
4C086 AA01 AA02 EA01 MA01 MA02 MA04 MA44 MA52 NA14 ZA55 ZA66 ZA96 ZB35 ZC21
4C087 AA01 AA02 AA03 BC56 MA44 MA52 NA14 ZA55 ZA66 ZA96 ZB35 ZC21

【要約の続き】
法が、消化管内でプロバイオティック細菌の驚くほど高くかつ予想外のシンバイオティック有益効果を誘導することを見出した。プロバイオティック組成物はまた、カルシウム及び鉄の溶解度の増加を誘導する。