

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 4 月 6 日(06.04.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/057535 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 35/745 (2015.01) A61K 31/702 (2006.01)
A23K 10/16 (2016.01) A61K 35/74 (2015.01)
A23L 33/125 (2016.01) A61P 3/02 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/078758

(22) 国際出願日: 2016 年 9 月 29 日(29.09.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2015-193409 2015 年 9 月 30 日(30.09.2015) JP

(71) 出願人: 雪印メグミルク株式会社(MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD.) [JP/JP]; 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号 Hokkaido (JP).

(72) 発明者: 新井 利信(ARAI, Toshinobu); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号 雪印

メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP). 關 敬弘 (SEKI, Takahiro); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号 雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP). 瀬戸 泰幸(SETO, Yasuyuki); 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号 雪印メグミルク株式会社内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所 (MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目 7 番 7 号 Tokyo (JP).

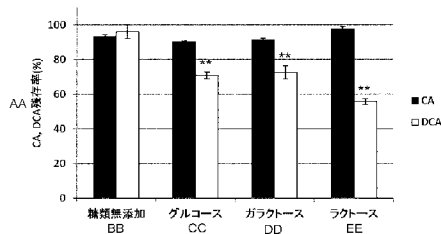
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: DEOXYCHOLIC ACID REDUCTION AGENT

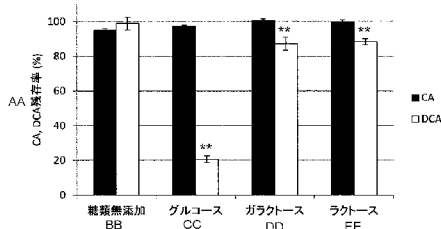
(54) 発明の名称: デオキシコール酸低減剤

A. SBT 2928



T-test: **, p<0.01, N=3, vs 糖類無添加 BB

B. SBT 2908



T-test: **, p<0.01, N=3, vs 糖類無添加 BB

AA Survival rate
BB No added sugar
CC Glucose
DD Galactose
EE Lactose
FF T-test

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of: from among bifidobacteria, discovering bacteria exhibiting the quality of suppressing an increase in deoxycholic acid, which is a secondary bile acid, without reducing cholic acid, which is a primary bile acid, and the quality of reducing already present deoxycholic acid; and providing a deoxycholic acid reduction agent having said lactic acid bacteria as an active ingredient thereof. The present invention provides a deoxycholic acid reduction agent having a bifidobacterium cell and/or a culture thereof as an active ingredient. Bacteria belonging to Bifidobacterium longum or to Bifidobacterium pseudolongum are preferable as the bifidobacteria. The present invention further provides a nutritional composition, a food/beverage, or an animal food that contains the deoxycholic acid reduction agent.

(57) 要約: ビフィズス菌のなかから一次胆汁酸であるコール酸を減少させずに二次胆汁酸であるデオキシコール酸の増加を抑制する性質、及び、既に存在するデオキシコール酸を減少させる性質を有する菌を見出し、当該乳酸菌を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を提供することを本発明の課題とした。本発明は、ビフィズス菌菌体及び/又はその培養物を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を提供する。ビフィズス菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム又はビフィドバクテリウム・シュエドロンガムに属する菌が好ましい。さらに本発明は、前記デオキシコール酸低減剤を含有する栄養組成物、飲食品又は飼料も提供する。



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

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：デオキシコール酸低減剤

技術分野

[0001] 本発明はビフィズス菌を有効成分とするデオキシコール酸低減剤に関する。詳しくは、ビフィズス菌菌体またはその培養物並びに糖質を有効成分とするデオキシコール酸低減剤に関する。

背景技術

[0002] 胆汁酸は胆汁の主成分であり、主な役割は、消化管内でミセルの形成を促進し、食物脂肪をより吸収しやすくするというものである。

胆汁酸は、一次胆汁酸と二次胆汁酸からなる。一次胆汁酸は肝臓においてコレステロールから作られ、主に胆汁酸結合タンパクと細胞小胞系とを介して肝細胞から胆道系に分泌される。一次胆汁酸にはコール酸（以下、単にCAということがある）、ケノデオキシコール酸などがある。一次胆汁酸は正常ではグリシンまたはタウリンと抱合した状態で胆汁中に存在する。腸内に入ったこれら胆汁酸の一部は、腸内細菌によってグリシンやタウリンが離される（脱抱合）。脱抱合されたコール酸はデオキシコール酸（以下、単にDCAということがある）へ、ケノデオキシコール酸はリトコール酸へと更に変換される。一次胆汁酸から変換されたこれらを二次胆汁酸と呼ぶ（非特許文献1）。

[0003] ところで、二次胆汁酸であるデオキシコール酸には大腸がん促進作用が報告されており（非特許文献2）、近年日本において大腸がんが増加している理由として、食生活の欧米化による脂質摂取量の増加と、それに伴う腸内胆汁酸量の増加との関連を指摘する文献もある（非特許文献3）。

[0004] さらにまた、デオキシコール酸について次のような報告もある（非特許文献4）。すなわち、マウスを用いた実験により、肥満になるとコール酸をもとにデオキシコール酸を合成する腸内細菌が著しく増加していること、デオキシコール酸産生菌を抗生物質投与により死滅させると細胞老化を起こした

肝星細胞の数が減少し、肝がんの発症率も著しく低下すること、その際に人工的に合成したデオキシコール酸を同時に投与すると抗生物質による肝がん発症率の低下が認められなくなることを明らかにしている。そして、同様のメカニズムがヒトの肥満に伴う肝がん発症に関与していること、デオキシコール酸産生菌の増殖を抑制することが肝がんの予防につながる可能性について示唆している。

[0005] 化合物を利用した二次胆汁酸の低減については、特許文献 1、2 が知られている。

特許文献 1 には、フマル酸などの電子受容体が、一次胆汁酸の酸化代謝を促進し、特定の腸内細菌によって行われる一次胆汁酸への還元的代謝を抑制できることが記載されている。

特許文献 2 には、カフェ酸やカテキンなどのポリフェノールを摂取したラットの糞便中のデオキシコール酸が低下していることから、これらに二次胆汁酸低下作用があることが記載されている。

[0006] また、ビフィズス菌による二次胆汁酸の低減については、特許文献 3 が知られている。

特許文献 3 には、グルコースを駆動力としてビフィズス菌菌体内に一次胆汁酸であるコール酸を取り込んで菌体外にはコール酸を排出しないという性質を有するビフィズス菌を利用する方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開 2011-184311 号公報

特許文献2：特開 2009-227609 号公報

特許文献3：特開 2001-097870 号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：シンプル生化学、南江堂、p 32-33、1998 年

非特許文献2：H. Bernsteinら、Mutat. Res.、第589巻、第47～65頁、2005年

非特許文献3：公益社団法人日本生物工学会ホームページ 「研究部会 乳酸菌・腸内細菌工学研究部会講演会（2010/05/14） プログラム要旨集」 URL http://www.sbj.or.jp/division/division_ferment_lab_sympo_20100514.html

非特許文献4：独立行政法人科学技術振興機構（JST）ホームページ 「公益財団法人がん研究会 独立行政法人 科学技術振興機構（JST）平成25年6月27日 共同発表」 タイトル：肥満に伴う腸内細菌の変化が肝がんの発症を促進する URL <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130627-2/>

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] フマル酸を用いた特許文献1に記載の方法では、一次胆汁酸から二次胆汁酸への変換は抑えられるため、二次胆汁酸の増加を抑えつつも有用な一次胆汁酸を減少させない点においては優れている。しかし、すでに存在している二次胆汁酸の低減効果については不明である。

また、乳酸菌菌体を用いた特許文献3の方法では、一次胆汁酸のコール酸を菌体内に取り込むことで、二次胆汁酸であるデオキシコール酸の産生を減らすことが期待されている。ただし、この方法ではコール酸の重要な機能である、消化管内でミセルの形成を促進し、食物脂肪をより吸収しやすくするという、生体内に必要な機能が制限されてしまう恐れがある。また、すでに存在しているデオキシコール酸を低減できるかどうかは不明である。なお、特許文献2は、二次胆汁酸を抑制するものではあるが、ポリフェノールを有効成分とするものである。

そこで、本発明は、ビフィズス菌のなかから一次胆汁酸であるコール酸を減少させずに二次胆汁酸であるデオキシコール酸の増加を抑制する性質、及び、既に存在するデオキシコール酸を減少させる性質を有する菌を見出し、当該ビフィズス菌を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を提供することを本発明の課題とした。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、ビフィズス菌と

特定の糖質存在下で一次胆汁酸であるコール酸を減少させることなく、二次胆汁酸であるデオキシコール酸の増加を抑制する性質、および／又はすでに存在するデオキシコール酸を減少させる性質を有することを見出し本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の構成を有する。

< 1 >

ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質を有効成分とするデオキシコール酸低減剤。

< 2 >

コール酸低減作用を有さない< 1 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 3 >

ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum) に属する菌である< 1 >または< 2 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 4 >

糖質がグルコース、ガラクトース、ラクトース、ラフィノース及びラクチュロースからなる群から選ばれる 1 以上である< 3 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 5 >

糖質がビフィズス菌菌体に対して 0.13 重量%以上含まれている< 4 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 6 >

ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・シュードロンガム (Bifidobacterium pseudolongum) に属する菌である< 1 >または< 2 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 7 >

糖質がグルコース、ガラクトース、ラクトース、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース及びラクチュロースからなる群から選ばれる 1 以上である< 6 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 8 >

糖質がビフィズス菌菌体に対して0.13重量%以上含まれている< 7 >に記載のデオキシコール酸低減剤。

< 9 >

< 1 >～< 8 >のいずれかに記載の剤を含有するデオキシコール酸低減用栄養組成物、飲食品又は飼料。

< 10 >

ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を、対象に投与するデオキシコール酸低減剤の使用法。

< 11 >

デオキシコール酸低減剤の製造における、ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質の使用。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、ビフィズス菌菌体及び／又はビフィズス菌培養物並びに糖質を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を提供することができる。本発明のビフィズス菌菌体及び／又は培養物は特定の糖質存在下で、消化管内で重要な役割を果たすコール酸を低減することなく、デオキシコール酸を特異的に低減する作用を有することから、従来のコール酸を低減することによって副次的にデオキシコール酸を低減するビフィズス菌に比べて、有用性が高い。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ビフィズス菌菌体による反応液中のCAもしくはDCAの残存率および、糖質添加（グルコース、ガラクトース、ラクトース）による影響を示すグラフである。A. ビフィドバクテリウム・ロンガム、B. ビフィドバクテリウム・シュードロンガム

[図2]ビフィズス菌菌体による反応液中のDCAの残存率および、オリゴ糖（ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース、ラクツロース）添加による影響を示すグラフである。

A. ビフィドバクテリウム・ロンガム、B. ビフィドバクテリウム・シュールドロンガム

[図3]ビフィズス菌菌体による反応液中のD C Aの残存率および、糖質（グルコース、ラクトース）添加濃度（0～0.65%）による影響を示すグラフである。A. ビフィドバクテリウム・ロンガム、B. ビフィドバクテリウム・シュールドロンガム

[図4]ビフィズス菌菌体による反応液中のC AもしくはD C Aの残存率の経時変化（0～22時間）を示すグラフある。A. ビフィドバクテリウム・ロンガム、B. ビフィドバクテリウム・シュールドロンガム

[図5]ビフィズス菌培養物による反応液中のC AもしくはD C Aの残存率および、糖質添加（グルコース、ガラクトース、ラクトース）による影響を示すグラフである。A. ビフィドバクテリウム・ロンガム、B. ビフィドバクテリウム・シュールドロンガム

[図6]ビフィズス菌培養物による反応液中のD C Aの残存率および、オリゴ糖（ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース、ラクツロース）添加による影響を示すグラフである。A. ビフィドバクテリウム・ロンガム、B. ビフィドバクテリウム・シュールドロンガム

発明を実施するための形態

[0013] 本発明のデオキシコール低減剤は、ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質を有効成分とする。

ビフィズス菌としては、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス (Bifidobacterium adolescentis)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (Bifidobacterium infantis)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (Bifidobacterium animalis)、ビフィドバクテリウム・シュールドロンガム (Bifidobacterium pseudolongum) 等が

挙げられる。

このうちでもビフィドバクテリウム・ロンガム及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムが好ましい。

ビフィドバクテリウム・ロンガムとしては、SBT2928 (FERM P-10657)、基準株JCM1217が挙げられ、ビフィドバクテリウム・シュードロンガムとしては、SBT2908 (FERM P-10138)、基準株ATCC25526が挙げられるが、本発明のDCA低減効果を有するビフィズス菌であれば特に限定されるものではない。

本発明のビフィズス菌は、常法に従って培養することができる。培地には、乳培地又は乳成分を含む培地、これを含まない半合成培地など種々の培地を用いることができる。このような培地としては、還元脱脂乳培地などを例示することができる。

得られた培養物から遠心分離などの集菌手段によって分離された菌体をそのまま本発明の有効成分として用いることができる。濃縮、乾燥、凍結乾燥などした菌体を用いることもできるし、加熱乾燥などにより死菌体にしてもよい。

菌体として純粋に分離されたものだけでなく、培養物、懸濁物、その他の菌体含有物や、菌体を酵素や物理的手段を用いて処理した細胞質や細胞壁成分も用いることができる。

培養物などの形態としては、合成培地であるGAM培地 (DIFCO社製)、還元脱脂乳培地など一般的にビフィズス菌の培養に用いられる培地を用いた培養物だけでなく、チーズ、発酵乳、乳製品乳酸菌飲料などの乳製品などを例示することができるが特に限定されるものではない。

さらに、得られた培養物から遠心分離、濾過操作などの方法を用いて、乳タンパク質沈殿や菌体成分を除去することによって調製した培養上清なども用いることができる。固形分が少ない上清であるため、飲食品などへの適用範囲が広がる。例えば、還元脱脂乳培養物を5,000rpm、10分間遠心分離することにより培養上清を調製することができる。

[0014] 本発明のデオキシコール低減剤にビフィズス菌菌体及び／又はその培養物とともに含まれる糖質としては、当該ビフィズス菌と共存させることでD C A低減作用を発揮させるような糖質であればよく、グルコース、ガラクトース、ラクトースのほかガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース、ラクツロースなどのオリゴ糖が挙げられる。また、これらの糖質は菌体培養物から持込まれたものでもよいし、後から添加されたものであってもよく、その両者の組み合わせであってもよい。

例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガムと、グルコース、ガラクトース、ラクトース、ラフィノース又はラクチュロースのうちいずれか1つ以上との組合せ、並びにビフィドバクテリウム・シュードロンガムと、グルコース、ガラクトース、ラクトース、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース及びラクチュロース糖のうちいずれか1つ以上と組み合わせることでD C A低減作用が発揮されるので好ましい。

糖質の添加量は、一緒に用いられるビフィズス菌のD C A低減効果が増強されるような量であればよく、菌体重量に対して0.13重量%以上が好ましく、0.26重量%以上がより好ましく、0.6重量%以上がもっとも好ましい。

[0015] 本発明におけるD C A低減作用とは、D C Aの量を減少させる作用である。本発明のD C A低減剤は、D C A低減作用の他に、さらにC Aについては、その低減作用を有さないかあるいは少なくともD C Aの低減作用よりも小さいことを特徴としている。すなわち、本発明のD C A低減剤は、有用なC Aを極力低減させることなくD C Aを低減させることを特徴としている。

[0016] 本発明のデオキシコール低減剤の製剤化に際しては製剤上許可されている賦型剤、安定剤、矯味剤などを適宜混合して濃縮、凍結乾燥するほか、加熱乾燥して死菌体にしてもよい。これらの乾燥物、濃縮物、ペースト状物も含有される。また、ビフィズス菌のD C A低減作用を妨げない範囲で、賦型剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、懸濁剤、コーティング剤、その他

の任意の薬剤を混合して製剤化することもできる。剤形としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、粉剤、シロップ剤などが可能であり、これらを経口的に投与することが望ましい。

[0017] 本発明のD C A低減剤はどのような飲食品に配合しても良く、飲食品の製造工程中に原料に添加しても良い。飲食品の例としては、チーズ、発酵乳、乳製品乳酸菌飲料、乳酸菌飲料、バター、マーガリンなどの乳製品、乳飲料、果汁飲料、清涼飲料などの飲料、ゼリー、キャンディー、プリン、マヨネーズなどの卵加工品、バターケーキなどの菓子・パン類、さらには、各種粉乳の他、乳幼児食品、栄養組成物などを挙げることができるが特に限定されるものではない。

[0018] 本発明のD C A低減剤は、これを有効成分とするがん予防薬として利用することができる。

さらに、本発明のD C A低減剤を飼料に配合することができる。前記飲食品と同様にどのような飼料に配合しても良く、飼料の製造工程中に原料に添加しても良い。

[0019] ビフィズス菌の菌体又は培養物を配合して、D C A低減剤あるいは、D C A低減用飲食品、栄養組成物、飼料などの素材又はそれら素材の加工品に配合させて使用する場合、ビフィズス菌の菌体または培養物の配合割合は特に限定されず、製造の容易性や好ましい一日投与量にあわせて適宜調節すればよい。投与対象者の症状、年齢などを考慮してそれぞれ個別に決定されるが、通常成人の場合、ビフィズス菌の菌体培養物を10～200g、あるいは菌体自体を0.1～5,000mg摂取できるように配合量などを調整すればよい。このようにして摂取することにより所望の効果を発揮することができる。

以下、本発明を実施例をもとにさらに詳細に説明するが、本発明に係る実施例に限定して解釈されるものではない。

[0020] [試験例1] D C A低減菌のスクリーニング

各種のビフィズス菌について、D C Aを含む培地で一定期間培養し、D C

Aの低減作用があるビフィズス菌を選別した。

1. 試験方法

(1) 供試菌

ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・カテニュラタム (*Bifidobacterium catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテニュラタム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*Bifidobacterium infantis*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、種未同定のビフィドバクテリウム属の菌、合計110株のビフィズス菌を供試菌とした。

[0021] (2) スクリーニング方法

上記(1)の各供試菌をGAM(1%グルコース添加)培地に植菌し、37℃にて16時間静置培養を行った。培養菌体を遠心分離(1,912×g, 4℃, 15min)し、上清を廃棄した。菌体はリン酸緩衝液(100mMリン酸カリウム緩衝液 pH7.0、1mM MgSO₄含有)に再懸濁した。スクリーニング用の反応条件として下記2条件(A)及び(B)を用意し、反応は37℃にて一昼夜行った。

条件(A)：菌体懸濁液に1mMデオキシコール酸(DCA)を混合

条件(B)：菌体懸濁液に1mMデオキシコール酸(DCA)と0.13重量%のグルコースを混合

[0022] (3) 薄層クロマトグラフィー(TLC)によるDCA低減効果の確認

反応液を遠心分離(20,400×g, 4℃, 5min)し、得られた上清を回収した。TLC(シリカゲル60、Merck)上に反応液を5μLスポットして乾燥し、酢酸エチル：シクロヘキサン：酢酸=69：21：9の組成を持つ溶媒にて展開した後、乾燥した。10%モリブドリン酸-エタ

ノール溶液（東京化成）に表面を浸漬させた。再度、TLC表面を乾燥した後、加熱することによりDCAに由来するスポットを検出する。TLCにおける1 mM DCA標準化合物を添加して展開されたスポットと各反応液のスポットを比較し、DCAに由来するスポットの減少が認められれば、反応後の上清中に含まれるDCAが低減されたと判断することができる。

[0023] 2. 試験結果

TLCにおけるスポットの目視観察の結果、グルコースを添加した条件Bのビフィドバクテリウム・アドレッセンティス（ATCC 15703等）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（SBT 2928、FERM P-10657等）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（JCM 1217等）、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム（SBT 2908、FERM P-10138等）を中心にDCAに由来するスポットの減少が認められた。

スクリーニング結果ならびに各菌株の保有する胃酸耐性、生残性を考慮し（データは示していない）、有用なDCA低減菌としてビフィドバクテリウム・ロンガム SBT 2928（FERM P-10657）およびビフィドバクテリウム・シュードロンガム SBT 2908（FERM P-10138）を選抜し、以下の実施例に用いた。

なお、FERM P-10657、FERM P-10138は、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託されている。ATCC 15703はAmerican Type Culture Collectionから入手可能である。JCM 1217は独立行政法人理化学研究所から入手可能である。

実施例 1

[0024] （ビフィズス菌菌体溶液の調製）

ビフィズス菌菌体の調整

供試ビフィズス菌として、ビフィドバクテリウム・ロンガム SBT 2928（以下、SBT 2928とも言う）及びビフィドバクテリウム・シュードロンガム SBT 2908（以下、SBT 2908とも言う）を使用した。ビフィズス菌はGAM（1%グルコース添加）液体培地にて37℃、16時間

静置培養した。菌体を遠心回収後（ $10,000\times g$ ， 4°C ， 15min ）、リン酸緩衝液（ 100mM リン酸カリウム緩衝液 $\text{pH}7$ ，含 $1\text{mM MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）で3回洗浄した。得られた洗浄菌体をリン酸緩衝液に再懸濁し、 $\text{O.D.}_{600}=4.5$ に調整した。

[0025] [試験例2] ビフィズス菌菌体によるDCA低減効果の検証（1）

実施例1で得られたビフィドバクテリウムロンガム及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムについてDCAおよびCAの低減効果並びに当該効果に及ぼす各糖質添加の影響について検証した。

1. 試験方法

CAおよびDCAの低減における糖質の効果

組成として、終濃度で実施例1の菌体懸濁液（ $\text{O.D.}_{600}=4$ ）、基質（ 1mM ）、糖質（ 0.65% ）を含む反応液を調製し、 37°C で18時間静置した。基質にはCAおよびDCAを使用した。糖質にはグルコース、ガラクトース又はラクトースを使用した。反応液は回収後、速やかに冷却して遠心分離（ $20,400\times g$ ， 4°C ， 10min ）し、上清を回収した。反応液中のCAおよびDCAは総胆汁酸テストワコー（和光純薬）を用いて、添付文書のプロトコールに従って定量し、添加した初期濃度を $100(\%)$ として残存率（ $\%$ ）を算出した。

[0026] 2. 試験結果

各種条件における反応液中のCA及びDCAの残存率を図1に示す。ビフィドバクテリウム・ロンガム及びビフィドバクテリウム・シュードロンガム菌体には、CAについては糖質の有無に関わらず低減効果は認められなかった。

一方、DCAについてはグルコース、ガラクトース又はラクトースの何れを添加しても低減効果が認められた。なお、ビフィドバクテリウム・ロンガム及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムの基準株の菌体についても同様の試験結果が得られることを確認した（結果図示せず）。

以上の結果より、ビフィドバクテリウム・ロンガム又はビフィドバクテリ

ウム・シュードロンガム菌体と糖類の組合せにより、C Aを低減せずにD C Aを低減させることが出来ることが分かった。過去の研究報告においてビフィズス菌による糖質を駆動力としたC Aの低減効果については報告されていたが（特許文献3）、C AではなくD C A特異的な低減効果を確認したのは本願が初めてである。

[0027] [試験例3] ビフィズス菌菌体によるD C A低減に及ぼすオリゴ糖添加の影響

実施例1で得られたビフィズス菌菌体についてD C A低減効果に及ぼすオリゴ糖添加の影響について検証した。

1. 試験方法

供試ビフィズス菌として、ビフィドバクテリウム・ロンガムS B T 2 9 2 8及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムS B T 2 9 0 8を使用した。基質はD C Aのみとし、糖質をグルコース、ラクトースに加えて、オリゴ糖を使用した以外は試験1と同様の試験方法によりD C Aの低減効果を試験した。オリゴ糖として、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース、ラクツロースを使用した。

[0028] 2. 試験結果

各種条件における反応液中のD C Aの残存率を図2に示した。図2よりオリゴ糖においても添加効果が認められた。ビフィドバクテリウム・ロンガムではラフィノース、ラクチュロース、ビフィドバクテリウム・シュードロンガムではイソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖を利用した際に低減効果が大きかった。

[0029] [試験例4] ビフィズス菌菌体によるD C A低減効果に及ぼす糖質濃度の影響

実施例1で得られたビフィズス菌菌体について、D C A低減効果に及ぼす糖質濃度の影響について検証した。

1. 試験方法

基質はD C Aのみとし、糖質はグルコースとラクトースを使用し、糖質の濃度を0, 0.03, 0.07, 0.13, 0.26, 0.65%として試

験を行った。その他の条件は試験例2の試験方法により行った。

[0030] 2. 試験結果

各種条件における反応液中のDCAの残存率を図3に示した。両供試菌とも糖質濃度が0.26%以上において顕著なDCA低減効果が認められた。特にビフィドバクテリウム・シュードロンガムではグルコースを0.65%添加した場合にDCAは残存率が30%未満であり70%以上低減したことになる。

[0031] [試験例5] ビフィズス菌菌体によるDCA低減効果の検証(2)

実施例1で得られたビフィズス菌菌体について、DCA及びCAの低減の経時変化について検証した。

1. 試験方法

糖質としてビフィドバクテリウム・ロンガムではラクトース、ビフィドバクテリウム・シュードロンガムではグルコースをそれぞれ0.65%添加し、試験例2と同様に試験した。反応液中のCAおよびDCAを0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 14, 16, 18, 20, 22時間において定量した。

[0032] 2. 試験結果

各種条件における反応液中のCAもしくはDCAの残存率を図4に示す。両供試菌において、CA濃度がほぼ一定に保たれている一方で、DCAは顕著に低減されていた。DCAの低減においてフィドバクテリウム・ロンガムでは反応20時間、ビフィドバクテリウム・シュードロンガムでは反応16時間位で低減効果が平衡に達していた。

以上のように、今回取得した両菌株は体内で重要な働きをするCAを低減させることなく、DCAのみを低減可能であることが示された。

実施例 2

[0033] ビフィズス菌菌体培養物の調整

ビフィドバクテリウム・ロンガムSBT2928及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムSBT2908をGAM(1% Glc添加)培地に

て培養した。対数増殖期にある各培養液を、0.5%酵母エキス、0.1%アスコルビン酸ナトリウム、0.04%システインを添加した11.55%還元脱脂乳（115℃、20分間滅菌）に1%接種し、個々マザーカルチャーを作成した。これをヨーグルトミックス（10%の還元脱脂乳を添加し、100℃にて10分間加熱したもの）に各3%添加して調製した。発酵は37℃で行い、乳酸酸度0.85に到達した時点で冷却し、発酵を終了させ、発酵乳を調製した。得られた発酵乳を凍結乾燥してビフィドバクテリウム・ロンガムSBT2928及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムSBT2908菌体培養物の粉末を得た。得られた菌体培養物をリン酸緩衝液に再懸濁し、 1×10^9 cells/mlに調整した。

[0034] [試験例6] ビフィズス菌培養物によるDCA低減効果の検証

実施例2で得られたビフィズス菌の菌体培養物についてDCAおよびCAの低減効果並びに当該効果に及ぼす各糖質添加の影響について検証した。

1. 試験方法

CAおよびDCAの低減における糖質の効果

実施例2で得られたビフィドバクテリウム・ロンガムSBT2928及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムSBT2908の菌体培養物を用い、試験例2と同様に試験して反応液中のCAおよびDCAを定量した。

2. 試験結果

各種条件における反応液中のCAもしくはDCAの残存率を図5に示す。ビフィドバクテリウム・ロンガム及びビフィドバクテリウム・シュードロンガム菌体培養物には、CAについては糖質の有無に関わらず低減効果は認められなかった。

一方、DCAについてはガラクトース及びラクトースの何れを添加しても低減効果が認められた。なお、ビフィドバクテリウム・ロンガム及びビフィドバクテリウム・シュードロンガムの基準株の菌体培養物についても同様の試験結果が得られることを確認した（結果図示せず）。

以上の結果より、ビフィドバクテリウム・ロンガム又はビフィドバクテリ

ウム・シュードロンガム菌体培養物と糖類の組合せにより、C Aを低減せずにD C Aを低減させることが出来ることが分かった。

[0035] [試験例 7] ビフィズス菌菌体によるD C A低減に及ぼすオリゴ糖添加の影響

実施例 2 で得られたビフィズス菌菌体についてD C Aの低減効果に及ぼすオリゴ糖添加の影響について検証した。

1. 試験方法

実施例 2 で得られたビフィドバクテリウム・ロンガム S B T 2 9 2 8 及びビフィドバクテリウム・シュードロンガム S B T 2 9 0 8 の菌体培養物を用い、試験例 3 と同様に試験して反応液中のD C Aを定量した。

[0036] 2. 試験結果

各種条件における反応液中のD C Aの残存率を図 6 に示した。図 6 よりオリゴ糖においても添加効果が認められた。ビフィドバクテリウム・ロンガムではラフィノース、ラクチュロース、ビフィドバクテリウム・シュードロンガムではイソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖を利用した際に低減効果が大きかった。

実施例 3

[0037] (ビフィズス菌菌体の調製)

ビフィドバクテリウム・ロンガム S B T 2 9 2 8 又はビフィドバクテリウム・シュードロンガム S B T 2 9 0 8 をそれぞれG A M (1 % G l c 添加) 培地に植菌し、3 7 °C にて1 6 時間静置培養を行った。液体培養物を、それぞれ4 °C、7 0 0 0 r p m で1 5 分間遠心分離した後、滅菌水による洗浄と遠心分離を3 回繰り返して行い、洗浄菌体を得た。その後、凍結乾燥することによりビフィドバクテリウム・ロンガム S B T 2 9 2 8 又はビフィドバクテリウム・シュードロンガム S B T 2 9 0 8 粉末をそれぞれ得た。

実施例 4

[0038] (錠剤の製造)

実施例 3 にて調製した菌体粉末 1 部に脱脂粉乳 4 部を混合し、この混合粉末を打錠機により 1 g ずつ常法により打錠して、本発明のビフィドバクテリ

ウム・ロンガム S B T 2 9 2 8 又はビフィドバクテリウム・シュードロンガム S B T 2 9 0 8 の菌体 2 0 0 m g を含む錠剤をそれぞれ調製した。

実施例 5

[0039] (散剤の製造)

ビフィドバクテリウム・ロンガム S B T 2 9 2 8 を G A M 液体培地 (D i f f c o 社) 5 L に摂取後、3 7 °C、1 8 時間静置培養を行った。培養終了後、7 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心分離を行い、培養液の 1 / 5 0 量の濃縮菌体を得た。次いで、この濃縮菌体を、脱脂粉乳 1 0 重量%、グルタミン酸ソーダ 1 重量%を含む分散媒と同量混合し、p H 7 に調整後、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を 6 0 メッシュのふるいで整粒化し、凍結乾燥菌末を製造した。第 1 3 改正日本薬局方解説書製剤総則「散剤」の規定に準拠し、この凍結乾燥菌末 1 g にラクトース (日局) 4 0 0 g、バレイショデンプン (日局) 6 0 0 g を加えて均一に混合し、散剤を得た。

実施例 6

[0040] (カプセル剤の製造)

表 1 に示した配合により原料を混合し、造粒により顆粒状とした後、空カプセルに 1 0 m g ずつ充填して、カプセル剤を製造した。

[0041] [表1]

	含有量 (重量%)
S B T 2 9 0 8 株粉末 (実施例 3)	2 0 . 0
ラクトース	2 4 . 5
可溶性デンプン	5 5 . 0
ステアリン酸マグネシウム	0 . 5

実施例 7

[0042] (スティック状健康食品の製造)

実施例 3 で得られたビフィドバクテリウム・ロンガム S B T 2 9 2 8 の粉末 3 0 g に、ビタミン C とクエン酸の等量混合物 4 0 g、グラニュー糖 1 0 0 g、コーンスターチと乳糖の等量混合物 6 0 g を加えて混合した。混合物

をスティック状袋に詰め、スティック健康食品を製造した。

実施例 8

[0043] (飲料の製造)

表 2 に示した配合により原料を混合し、容器に充填した後、加熱殺菌して、果汁飲料を製造した。

[0044] [表2]

	含有量 (重量%)
S B T 2 9 2 8 (実施例 3)	2. 5
砂糖	7. 5
クエン酸	0. 6
リンゴ果汁	1 0. 0
水	7 9. 4

産業上の利用可能性

[0045] 本発明によれば、ビフィズス菌菌体及び／又は乳酸菌培養物を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を提供することができる。また、当該デオキシコール酸低減剤を含む栄養組成物、飲食品又は飼料を摂取することにより、肝がんや大腸がんの予防になりうる。

受託番号

[0046] F E R M P - 1 0 6 5 7

F E R M P - 1 0 1 3 8

[寄託生物材料への言及]

(1) ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum) S B T 2 9 2 8

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6)

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

平成元年4月13日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

F E R M P - 1 0 6 5 7

(2) ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (Bifidobacterium pseudol
ongum) S B T 2 9 0 8

イ 当該生物材料を寄託した寄託機関の名称及び住所

独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

ロ イの寄託機関に生物材料を寄託した日付

昭和63年7月20日(1988年7月20日)(原寄託日)

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

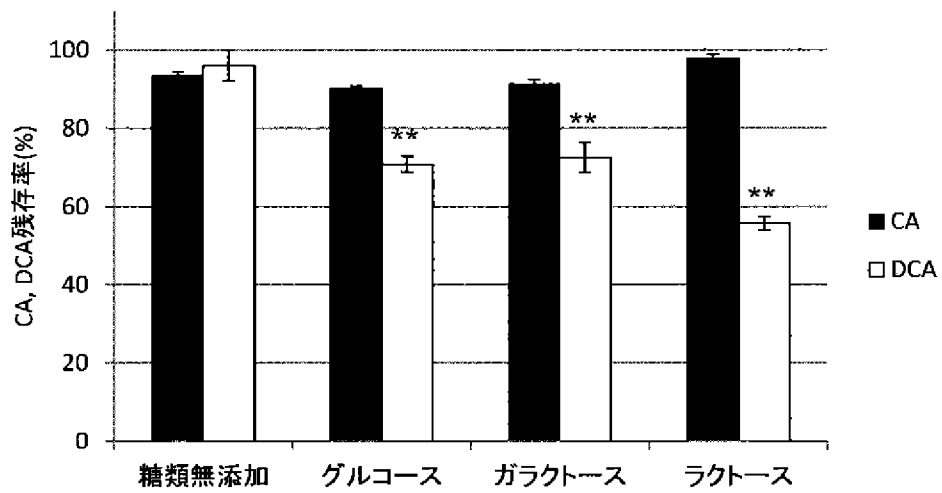
F E R M P - 1 0 1 3 8

請求の範囲

- [請求項1] ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質を有効成分とするデオキシコール酸低減剤。
- [請求項2] コール酸低減作用を有さない請求項1に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項3] ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum) に属する菌である請求項1または2に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項4] 糖質がグルコース、ガラクトース、ラクトース、ラフィノース及びラクチュロースからなる群から選ばれる1以上である請求項3に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項5] 糖質がビフィズス菌菌体に対して0.13重量%以上含まれている請求項4に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項6] ビフィズス菌がビフィドバクテリウム・シュードロンガム (Bifidobacterium pseudolongum) に属する菌である請求項1または2に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項7] 糖質がグルコース、ガラクトース、ラクトース、イソマルトオリゴ糖、ゲンチオオリゴ糖、ラフィノース及びラクチュロースからなる群から選ばれる1以上である請求項6に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項8] 糖質がビフィズス菌菌体に対して0.13重量%以上含まれている請求項7に記載のデオキシコール酸低減剤。
- [請求項9] 請求項1～8のいずれかに記載の剤を含有するデオキシコール酸低減用栄養組成物、飲食品又は飼料。
- [請求項10] ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質を有効成分とするデオキシコール酸低減剤を、対象に投与するデオキシコール酸低減剤の使用方法。
- [請求項11] デオキシコール酸低減剤の製造における、ビフィズス菌菌体及び／又はその培養物並びに糖質の使用。

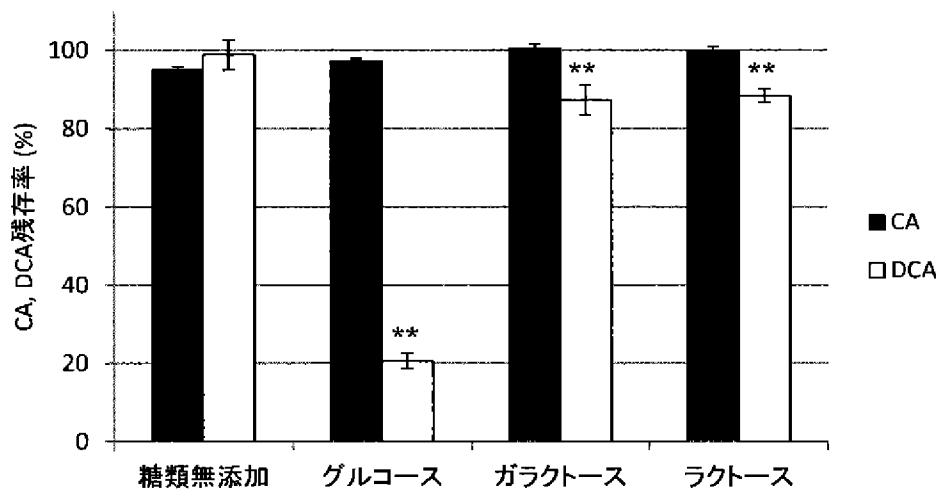
[図1]

A. SBT 2928



T-test: **, p<0.01. N=3. vs 糖類無添加

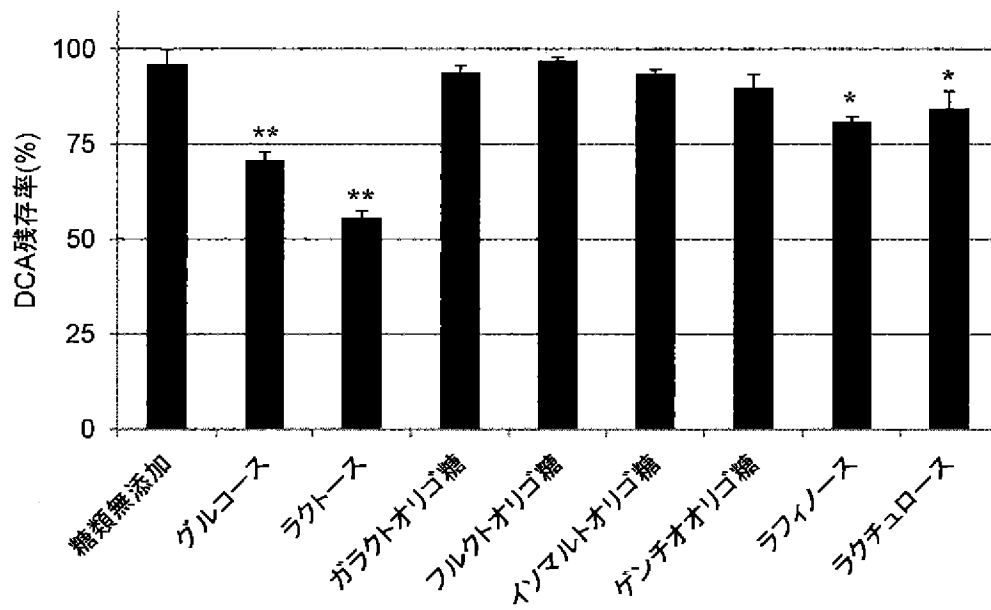
B. SBT 2908



T-test: **, p<0.01. N=3. vs 糖類無添加

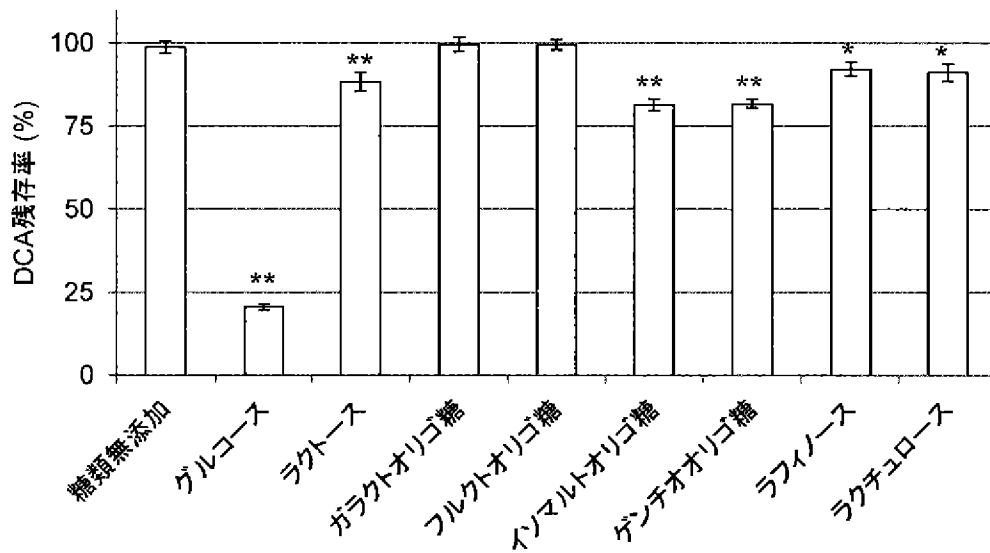
[図2]

A. SBT2928



T-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

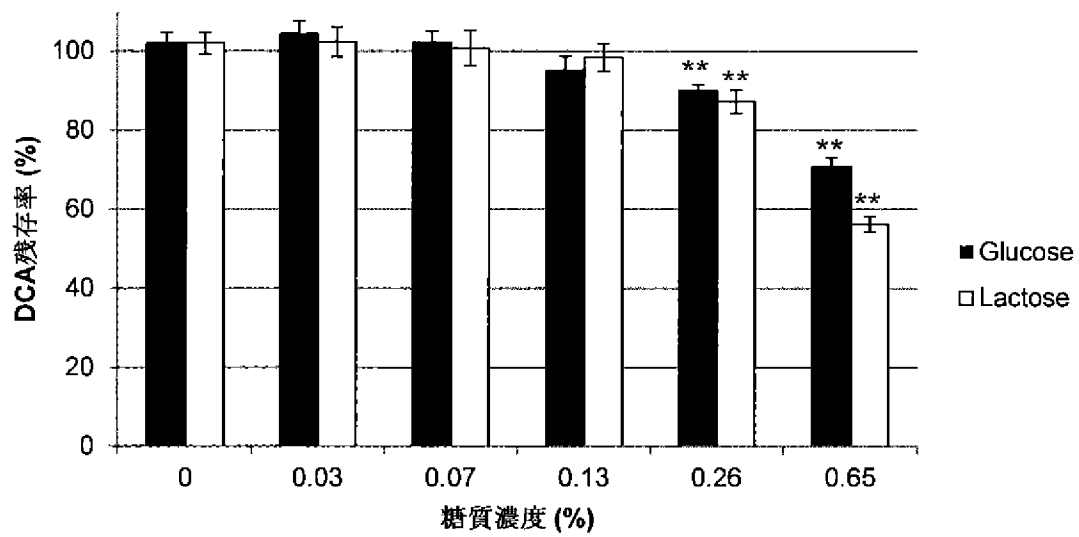
B. SBT2908



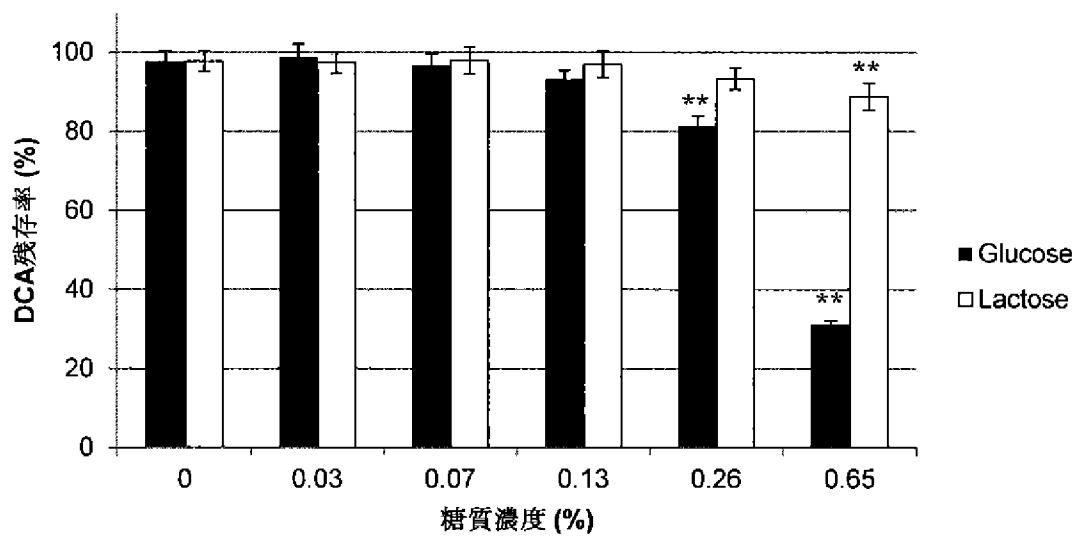
T-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

[図3]

A. SBT 2928

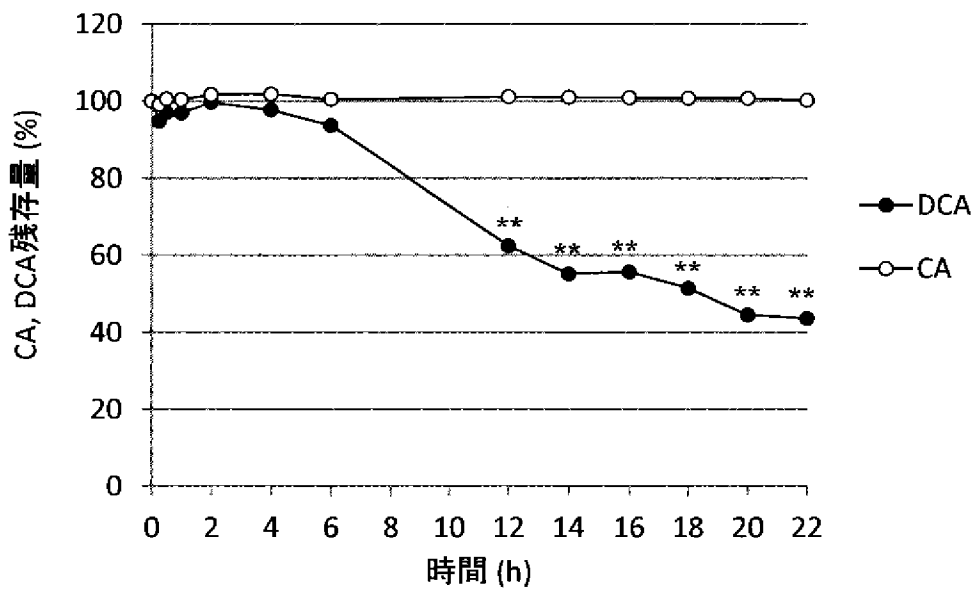
T-test: **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

B. SBT 2908

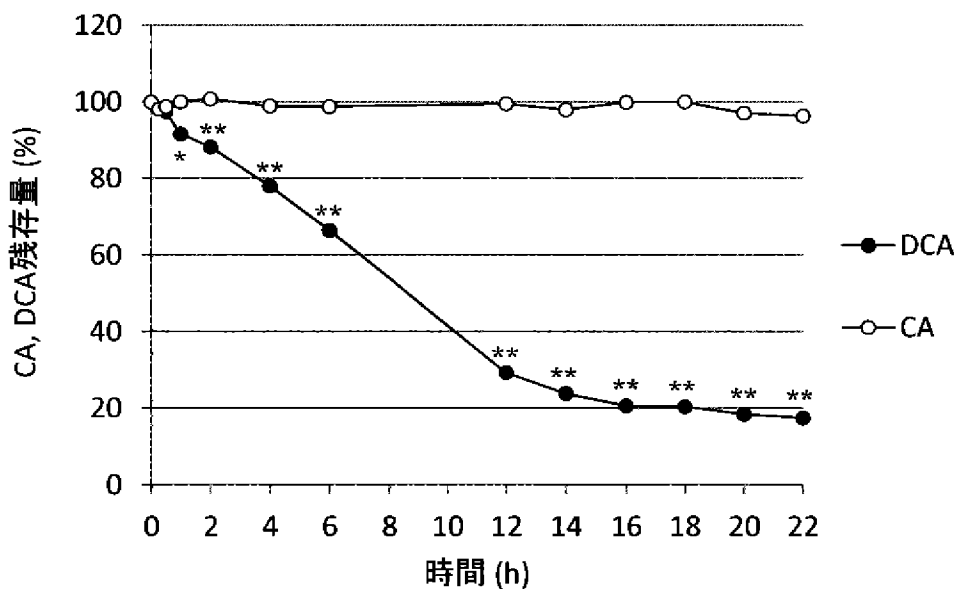
T-test: **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

[図4]

A. SBT 2 9 2 8

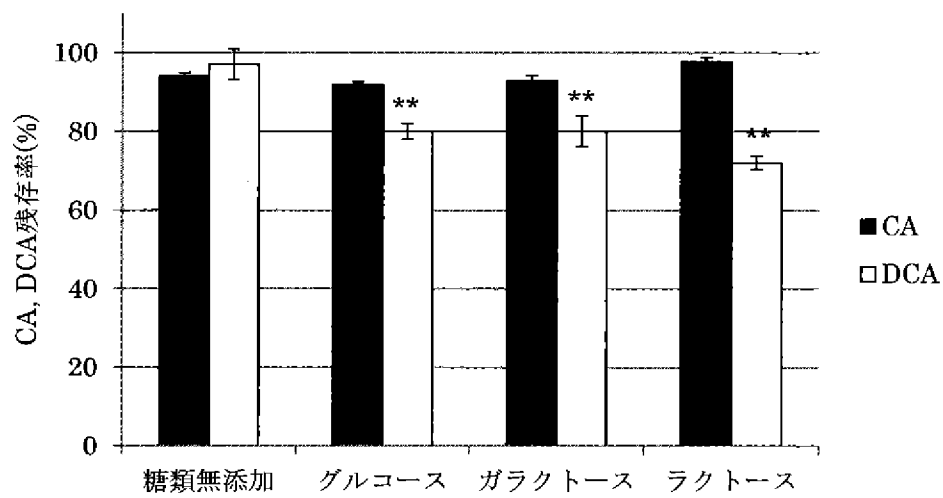
T-test: **, $p < 0.01$. N=3. vs 初期濃度 (反応 0 時間)

B. SBT 2 9 0 8

T-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. N=3. vs 初期濃度 (反応 0 時間)

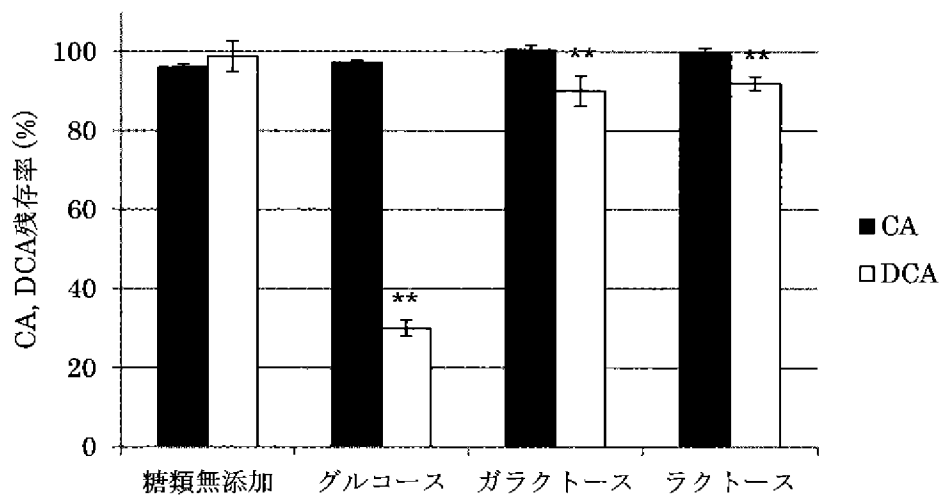
[図5]

A. SBT2928



Ttest: **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

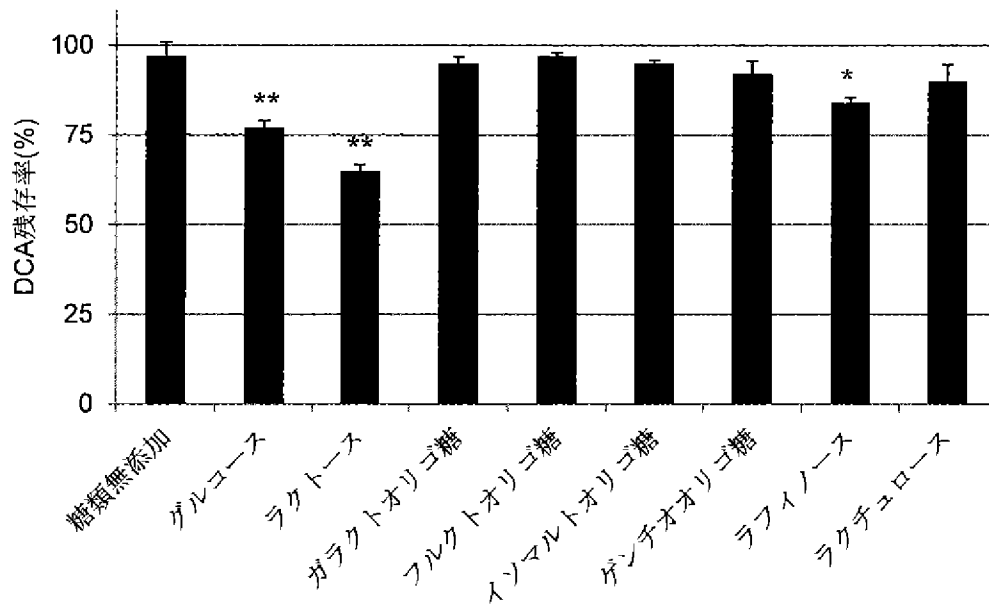
B. SBT2908



Ttest: **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

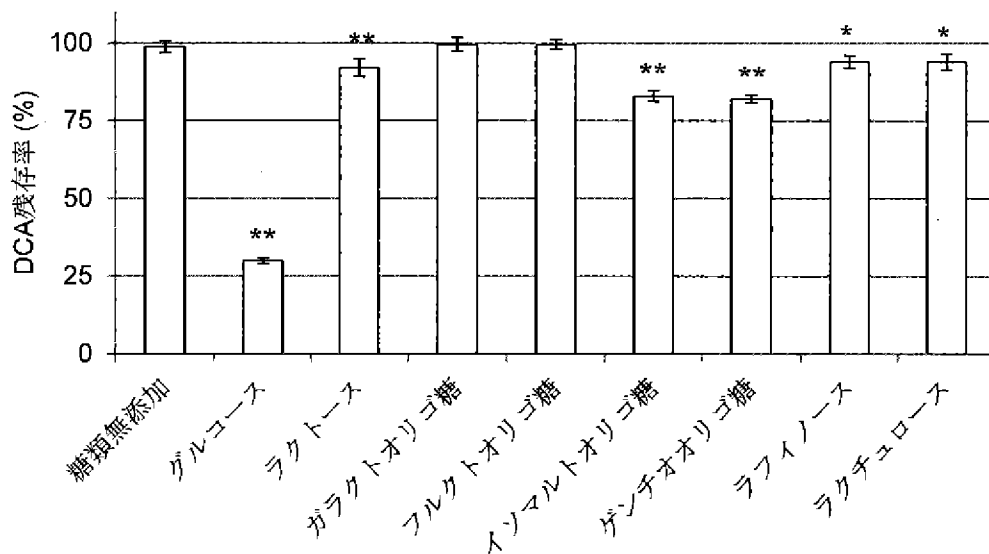
[図6]

A. SBT 2928



T-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

B. SBT 2908



T-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. N=3. vs 糖類無添加

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078758

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K35/745(2015.01)i, A23K10/16(2016.01)i, A23L33/125(2016.01)i, A23L33/135(2016.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61K31/702(2006.01)i, A61K35/74(2015.01)i, A61P3/02(2006.01)i, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K35/745, A23K10/16, A23L33/125, A23L33/135, A61K31/7004, A61K31/7016, A61K31/702, A61K35/74, A61P3/02, A61P35/00, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/013559 A1 (Hokkaido Technology Licensing Office Co., Ltd.), 20 February 2003 (20.02.2003), claims; page 1, 1st paragraph; page 5, 1st paragraph; page 6, 3rd paragraph; examples & US 2004/0208859 A1 claims; paragraphs [0001], [0032], [0037]; examples & EP 1421945 A1 & KR 10-2004-0030955 A	1-11
X	JP 2001-97870 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 10 April 2001 (10.04.2001), claims; paragraphs [0005], [0007], [0010], [0014]; examples (Family: none)	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 November 2016 (15.11.16)

Date of mailing of the international search report
29 November 2016 (29.11.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078758

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Toshinobu ARAI et al., "Bifidobacterium longum SBT2928 Oyobi Bifidobacterium pseudolongum SBT2908 no in vivo ni Okeru Deoxycholic acid Teigen Tokusei no Hyoka", Journal of Japan Society for Lactic Acid Bacteria, 26 June 2016 (26.06.2016), vol.27, no.2, page 134, ISSN 1343-327X, Ippan Koen 16-1-17	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078758

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/745(2015.01)i, A23K10/16(2016.01)i, A23L33/125(2016.01)i, A23L33/135(2016.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61K31/702(2006.01)i, A61K35/74(2015.01)i, A61P3/02(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K35/745, A23K10/16, A23L33/125, A23L33/135, A61K31/7004, A61K31/7016, A61K31/702, A61K35/74, A61P3/02, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 03/013559 A1 (北海道ティー・エル・オー株式会社) 2003.02.20, 特許請求の範囲、第1頁第1段落目、第5頁第1段落目、第6頁第3段落目、実施例、等 & US 2004/0208859 A1, Claims, [0001], [0032], [0037], Examples & EP 1421945 A1 & KR 10-2004-0030955 A	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 1 1 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

2 9 . 1 1 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 基章

4 U

4 1 4 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2001-97870 A (雪印乳業株式会社) 2001.04.10, 特許請求の範囲、段落0005、0007、0010、 0014、実施例、等 (ファミリーなし)	1-11
P, X	新井利信, 外2名, Bifidobacterium longum SBT2928 および Bifidobacterium pseudolongum SBT2908 の in vivo におけるデオキ シコール酸低減特性の評価, 日本乳酸菌学会誌, 2016.06.26, 第27 巻, 第2号, p.134, ISSN 1343-327X, 一般講演 16-1-17	1-11