

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5956467号
(P5956467)

(45) 発行日 平成28年7月27日 (2016. 7. 27)

(24) 登録日 平成28年6月24日 (2016. 6. 24)

| | |
|---------------------------|----------------|
| (51) Int. Cl. | F I |
| A 6 1 K 35/745 (2015. 01) | A 6 1 K 35/745 |
| A 6 1 P 1/00 (2006. 01) | A 6 1 P 1/00 |
| A 6 1 P 1/12 (2006. 01) | A 6 1 P 1/12 |
| A 6 1 P 37/06 (2006. 01) | A 6 1 P 37/06 |
| A 6 1 K 9/48 (2006. 01) | A 6 1 K 9/48 |

請求項の数 11 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-550895 (P2013-550895)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月27日 (2012. 1. 27)
 (65) 公表番号 特表2014-505065 (P2014-505065A)
 (43) 公表日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/051369
 (87) 国際公開番号 W02012/104226
 (87) 国際公開日 平成24年8月9日 (2012. 8. 9)
 審査請求日 平成27年1月6日 (2015. 1. 6)
 (31) 優先権主張番号 11000744. 0
 (32) 優先日 平成23年1月31日 (2011. 1. 31)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

微生物の受託番号 DSMZ DSM 24514

(73) 特許権者 515230279
 ドクター フィッシャー ゲズントハイツ
 プロドクテ ゲーエムペーハー
 ドイツ連邦共和国、 8 2 1 6 6 グレー
 フェルフィング、アーエム ハーグ 1 4
 (74) 代理人 100102532
 弁理士 好宮 幹夫
 (72) 発明者 グッリエルメッティ シモーネ
 イタリア共和国、イー 2 0 1 2 2 ミラノ
 、ヴィア フェスタ デル ペルドーノ
 7、ウニヴェルシタ デッリ ストゥディ
 ディ ミラノ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 消化器疾患への適用のためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 の菌株を含むものであり、過敏性腸症候群の治療に使用するためのものであることを特徴とするプロバイオティクス製剤。

【請求項 2】

前記受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 の菌株を含むものであり、腹痛、鼓脹、便秘、消化不良、緊急の、減少した便通の回数、増加した便通の回数、排便が不完全である感覚、又はそれらの組み合わせの軽減、予防及び / 又は治療に使用するためのものであることを特徴とする請求項 1 に記載のプロバイオティクス製剤。

【請求項 3】

前記受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 の菌株を含むものであり、少なくともイヌリン及び / 又はフルクトオリゴ糖を含んでもよいものであることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項 4】

前記受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 の菌株を含むものであり、少なくとも 1 つの薬理学上許容可能な化合物、少なくとも 1 つの経口摂取可能なキャリア、少なくとも 1 つのアジュバント、少な

10

20

くとも1つの細菌成分、少なくとも1つの原体、又は少なくとも1つの生体化合物を含むものであることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれか1項に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項5】

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、前記少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物が、ビタミン、ビタミンB類、ミネラル、カルシウム、マグネシウム、微量元素、糖質、ラクトース、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、マンニトール、マルトース、デキストリン、ソルビトール、フルクトースからなるグループから選択されるものであり、

10

及び/又は前記生体化合物が、蛋白質、ペプチド、特にグルタミン/グルタミン酸が豊富である蛋白質、特にグルタミン/グルタミン酸が豊富であるペプチド、脂質から選択されるものであることを特徴とする請求項4に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項6】

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、前記経口摂取可能なキャリアがカプセル、錠剤、粉末又は食品であることを特徴とする請求項4又は請求項5に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項7】

20

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、前記食品が乳製品、酸性乳、ヨーグルト、冷凍ヨーグルト、粉乳、濃縮乳、チーズスプレッド、ドレッシング又は飲料であることを特徴とする請求項6に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項8】

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、前記菌株が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたりに 10^1 cfuより多く存在することを特徴とする請求項6又は請求項7に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項9】

30

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、前記菌株が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 cfu以上存在することを特徴とする請求項6又は請求項7に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【請求項10】

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、患者1人に1日に投与する前記菌株の量が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^1 cfu以上であることを特徴とする請求項6乃至請求項9のいずれか1項に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

40

【請求項11】

前記受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の菌株を含むものであり、患者1人に1日に投与する前記菌株の量が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 cfu以上であることを特徴とする請求項6乃至請求項10のいずれか1項に記載の使用のためのプロバイオティクス製剤。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

50

【0001】

今日、消化管の機能障害及び／又は消化器系の望ましくない炎症反応と関連する疾患は罹患率が高い一般的な疾患である。そのいずれのグループに属する疾患も、腹痛、不快感、膨満、鼓脹、下痢、便秘、消化不良、緊急の便意及び／又は減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚及び／又はそれらの組み合わせによって特徴づけられ、したがって罹患した人の総合的な生活状態を著しく下げることにつながる。特に、過敏性腸症候群（IBS）については効果的な治療方法がまだない（Brenner and Chey、2009年）。IBSのためのいくつかの薬剤は、有害事象のために回収又は制限された。さらに、現在の治療は主に1つの症状を標的としており、総合的にIBSを軽減したり、生活の質（QoL）を改善したりすることはできない。

10

【0002】

IBSや炎症性腸疾患など、消化管の機能障害と関連する疾患は、（i）腸内微生物叢の不均衡（Kassinen et al.、2007年）及び／又は（ii）消化管内の腸管バリアの機能不全（Marshall et al.、2004年）を伴うと広く考えられている。このことによって、消化管内でビフィドバクテリウム属（Bifidobacteria）などのプロバイオティックな細菌が減少すると考えられている。さらに、腸管バリアの機能不全は、病原性通性嫌気性菌の粘膜への望ましくない進入を起こし、消化器系の炎症反応に結果的につながりうると考えられている。最近の研究では、この炎症によって腸の疼痛、運動及び機能不全などの典型的なIBSの症状が惹起されることが示唆されている。

20

【0003】

腸内微生物叢の不均衡は、主に、ビフィドバクテリウム属などヒト由来の非病原性微生物の数が減少し、一方でエンテロバクテリウム属など病原性通性嫌気性の微生物の数が増加することを特徴とする（Jian-Min et al.、2004年）。この不均衡は、ガス状の化合物及び短鎖脂肪酸の生成の増加、運動不全、鼓脹及び影響を受ける人の疼痛につながると考えられている。したがって、腸内微生物叢を均衡状態に戻すためにプロバイオティックな細菌が注目された。プロバイオティックな細菌は、競合的阻害による免疫機能への有益な効果を有すると推定され、腸内微生物の均衡を改善することによって被投与者に有益な影響を与える可能性がある。ヒト由来、非病原性のプロバイオティックな細菌を含む「プロバイオティクス」とは、一定数を経口摂取した場合に本来の基本的な栄養を超える健康への影響を示す、生きた微生物を含む食品および薬物、と定義されている。特にラクトバチルス属及び連鎖球菌属の多様な微生物の混合物が、伝統的に、発酵乳製品又は薬物の中で健康増進のために使用されてきた。

30

【0004】

この問題については多くの研究がなされてきたが、腸内微生物叢の不均衡はコインの一面のみであることから、単にプロバイオティクスを消化管に届けることのみに注目した治療法のほとんどが、消化管の機能障害の患者のすべての症状を緩和することはできなかったのは驚くべきことではない。例えば、IBSはRome III基準によって診断されるが、この診断基準は基本的に次の通りである。腹痛又は腹部不快感が最近3ヶ月の中の1ヶ月につき少なくとも3日を占め、下記の条件の少なくとも2つを伴う、少なくとも6ヶ月以上前に発現した症状を示す。

40

（a）症状が排便により軽減する。

（b）症状の発現が排便頻度の変化を伴う。

（c）症状の発現が便性状の変化を伴う。

また、IBSはしばしば鼓脹又は膨満、便秘及び／又は下痢である排便困難を伴う。これらの症状とともに、患者は社会的及び個人的な役割を損ない、生活の質が低減することによって苦しむ可能性がある。疼痛／不快感、鼓脹／膨満、便意の急迫などの症状の大部分が取り除かれたとしても、患者の健康状態に関連する総合的な生活の質（QoL）を改善するのは非常に望まれることである。今日提供されている、プロバイオティクス及び他のものを含む治療法は、いずれも疼痛／不快感、鼓脹／膨満及び消化不良などの症状をQo

50

Lと同時に改善することができない。

【0005】

この点については、消化管の機能障害が発達するにあたって2番目に重要な面を考慮せねばならず、これは、透過性の亢進を特徴とする消化管内の腸管バリアの機能不全に関係している。この点についての1つの非常に普及している説は、腸及び全身の免疫システムの両方の動揺によって、腸内微生物叢が不均衡である場合には支配的となる可能性のある病原性微生物がバリアを通過し、粘膜を透過して炎症反応を起こすというものである。この仮説にもとづき、炎症反応の治療及び予防、並びにその消化管への影響に注目した研究がいくつかなされた。例えばEP1141235には、IL-8レベルを減少させ(Whorwell et al., 2006年)、IL-10/IL-12比を正常化させる(O'Mahony et al., 2005年)ことによって投与された者の体内で抗炎症反応を誘導する強い能力を示した、栄養サプリメント及び薬剤に適用するためのビフィドバクテリウム・ロングム・インファンティス(B.インファンティス)UCC35624株が記載されている。この能力が、IBS及び炎症性腸疾患の症状に対するビフィドバクテリウム・ロングム・インファンティスUCC35624株の効果の主な理由である可能性があると言われている。しかし、異なる情報源では、B.インファンティスの効果を直接抗炎症性に帰することができるのか疑問が呈されている。さらに、ラクトバチルス・サリバリウスも*in vitro*及びマウスモデルにおいてB.インファンティスに匹敵する強い抗炎症効果を示すが、IBS及びその症状を軽減することに明らかな効果は示していない。

10

20

【0006】

最も重要なことは、プロバイオティクスの効能は高度に菌株特異的であり、一定の菌株のみがIBS及びその症状を改善することができる可能性があるということである。今日までに、いくつかの研究によって、IBSなど消化管の機能障害に関連する疾患の症状に対するプロバイオティクスの効果が研究されている(O'Mahony et al., 2005年、Kajander et al., 2005年、Williams et al., 2008年、Guyonnet et al., 2007年)。しかし、明らかな利益を示すことができたのはわずかの研究のみであった。さらに、どのプロバイオティックな菌株も、過敏性腸症候群の症状を明らかに緩和する効果と同時に生活の質の改善を示すことはできなかった。これらの結果は、プロバイオティクスの効能が高度に菌株特異的であるという事実に戻ることができる。1つのプロバイオティックな菌株の特性は、別の菌株に移すことができないことが広く認知されている(Brenner and Chey, 2009年)。したがって、単一のプロバイオティックな菌株の効能及び効果を予測することはできず、単一の菌株の効能について試験を行い証明することの重要性が強調されることが認められるべきである。このため、実験部においてその方法を記載する。

30

【0007】

従来、プロバイオティクスについての研究で、IBSのような疾患において、上述の症状(疼痛/膨満/鼓脹/緊急の便意/消化不良)の低減と同時に患者の生活の質の向上を示すことができた例はない。したがって、腸内微生物叢を均衡状態に戻し、さらに腸管壁の機能を回復することを考慮に入れた、消化管の機能障害の患者の疼痛/不快感、膨満/鼓脹、緊急の便意及び消化不良などの症状及び総合的な生活の質を改善するための治療には重大な需要が存在する。

40

【発明の概要】

【0008】

したがって、本発明は、上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5の接着指数を有する、食品中及び/又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥム(*Bifidobacterium bifidum*)(B.ビフィドゥム(*B. bifidum*))の菌株又はその変異体若しくは多様体を提供する。また、腹痛/不快感、膨満/鼓脹、緊急の便意及び/又は消化不良など、消化器病、特にIBSの症状の明らかな改善と、さ

50

らに同時に患者の生活の質の明らかな向上につながる、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体を提供する。さらに、プロバイオティクス製剤並びに菌株及びプロバイオティクス製剤の使用についても提供する。上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5の接着指数を有するビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体や、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体など本発明の菌株によって疼痛／不快感、膨満／鼓脹、緊急の便意及び／又は消化不良など単一の症状の改善と同時にQoLの改善を伴って、総合的にIBSが軽減されることは予期せぬ結果であった。なぜなら、先行技術においてプロバイオティクスの効果性は高度に菌株特異的であることが知られ、認められているように、1つのビフィドバクテリウム菌株の中で近い関係にあるもの同士ですら通常は匹敵する特性をもたず、消化器病に対して不活性であることもあるからである(Brenner and Chey、2009年)。1つの説に固執する意図なく、発明者らは、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム菌株、特にビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の並外れた、予期せぬ有効性は、消化管内の腸管バリアを介して病原性の細菌が通過すること及びそれらが粘膜を透過することを予防する能力によると考える。腸管バリアの機能不全は、病原性の微生物がそこを通して粘膜に入ることができるような「穴」又は腸管壁の弱い部分によると推定し、発明者らは、非病原性細胞が腸管壁に接着することによってバリアの透過性が減少し、「穴を塞ぐ」作用で腸管壁を改善すると考える。このように、本発明の菌株及びプロバイオティクス製剤は、粘膜の炎症反応を予防するだけでなく、腸内微生物叢を均衡状態に戻すため、腸内細菌叢及び健康に対する二重の有益な効果を有する。さらに、ウォッシュアウト期、すなわち治療終了後の期間であり、例えば本発明の菌株、その変異体若しくは多様体、又は本発明の菌株、その変異体若しくは多様体を含むプロバイオティクス製剤を被験者又は患者にもう投与しない期間を通じて症状又は疾患自体の軽減が保たれていることが非常に重要である。下記で詳細に説明し、さらに実施例及び図面部でも示すように、本発明の菌株、その変異体又は多様体の場合、本発明の菌株、その変異体、又は多様体の有益な効果は、全体的なIBSの症状、腹痛／不快感、膨満／鼓脹及び消化不良について、ウォッシュアウト期を通じて保たれている。

【0009】

したがって、本発明は、上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5の接着指数を有する、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体を提供する。この菌株は、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体であることが好ましい。また、本発明は、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体を提供する。この菌株、変異体又は多様体は特に、消化管の機能障害、消化器系の望ましくない炎症反応、腸内微生物叢の不均衡、消化管内のビフィドバクテリウム属の減少及び／又は消化管内の腸管バリアの機能不全に関連する疾患の予防及び／又は治療において食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用すること、及び／又は腹痛、不快感、膨満、鼓脹、緊急の便意、消化不良、及び／又は減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚、全体的なIBSの症状及び／又はそれらの組み合わせの患者の苦痛を軽減、予防及び／又は治療するために使用すること、又は患者の生活の質を改善することを目的とするものである。腹痛、不快感、膨満、消化不良、鼓脹、緊急の便意及び

／又は減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚、全体的なIBSの症状及び／又はそれらの組み合わせの患者の苦痛の軽減、予防及び／又は治療において食品中及び／又は薬剤として使用するプロバイオティックとしての、菌株、変異体又は多様体の有用性は、下記でさらに説明するように、臨床研究において一般的に使用される7ポイントリッカートスケールを用いて評価することができる。患者の生活の質（QoL）は、本発明の技術分野において、臨床研究において、またQoLを測定する認められた基準について通常の知識を有する人には一般的である、標準のSF-12調査票を用いて評価することができる。さらに、全体的なIBSの症状である腹痛／不快感、膨満／鼓脹については、下記で詳細に説明し、実施例及び図面部でも示すように、本発明の菌株、変異体又は多様体の有益な効果はウォッシュアウト期を通じて保たれている。

10

【0010】

1つの実施態様では、疾患は過敏性便通、クローン病又は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、回腸囊炎又は感染性大腸炎、消化器癌、関節リウマチなどの全身疾患、望ましくない炎症反応による自己免疫障害、クロストリジウム・ディフィシル関連下痢、抗生物質関連下痢、ロタウイルス関連下痢又は感染性下痢などの望ましくない炎症反応による下痢疾患及びそれらの組み合わせからなるグループから選択され、好ましくは、疾患は過敏性便通である。

【0011】

1つの実施態様では、本発明の菌株、変異体又は多様体は、遺伝子的に操作された変異体又は自然に発生した多様体である。別の実施態様では、菌株、変異体又は多様体の細胞は生細胞又は不活化細胞である。不活化細胞については製品の調製がより単純で、細胞を簡単に薬剤に導入することができ、生細胞の場合よりも貯蔵条件の制限がずっと少ない。細胞は熱処理によって又は変化させたpHにさらすことによって又は圧力を作用させることによって殺すことができる。しかし、生細胞は本発明に記載された疾患又は症状の患者の腸管システムの中で生息することができ、したがってそのような疾患又は症状の患者の苦痛を軽減、予防及び／又は治療する高い効能を有する。

20

【0012】

本発明はさらに、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体など、上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5の接着指数を有する、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体を含むプロバイオティクス製剤を提供する。好ましくは、プロバイオティクス製剤は、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのものである。

30

【0013】

好ましい実施態様では、プロバイオティクス製剤が少なくとも1つのプレバイオティクスを含む。好ましくは、プレバイオティクスはイヌリンまたはフルクトオリゴ糖である。

【0014】

上記のいずれの実施態様においても、プロバイオティクス製剤は、少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物、経口摂取可能なキャリア、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物及び／又は蛋白質及び／又はペプチド、特にグルタミン／グルタミン酸が豊富である蛋白質及び／又はペプチド、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル及び／又は微量元素を含み、少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物は、ビタミンB類など1つ以上のビタミン、カルシウム又はマグネシウムなど1つ以上のミネラル、ラクトース、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、マンニトール、マルトース、デキストリン、ソルビトール、フルクトースなど1つ以上の糖質及びそれらの混合物からなるグループから選択されてもよい。好ましくは、経口摂取可能なキャリアはカプセル、錠剤、粉末又は食品であり、この食品は乳製品、酸性乳、ヨーグルト、冷凍ヨーグルト、発酵ヨーグルト飲料や飲用ヨーグルトなどのヨーグルト製品、チーズ、発酵クリーム、牛乳ベースのデザート、発酵乳又は人乳近似乳、粉乳、濃縮乳、チーズブレッド、ドレッシング、飲料及びその

40

50

他のものであってもよい。

【0015】

1つの実施態様では、プロバイオティクス製剤は蛋白質及び/又はペプチド、特にグルタミン/グルタミン酸が豊富である蛋白質及び/又はペプチド、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル及び/又は微量元素を含む。

【0016】

上記のいずれの実施態様においても、プロバイオティクス製剤中で、菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたりに 10^1 cfuより多く存在し、1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 コロニー形成単位(cfu)以上であってもよく、好ましくは菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^7 cfuより多く存在し、より好ましくは菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^8 cfuより多く存在し、さらに好ましくは菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^9 cfu又は 10^{10} cfuより多く存在する。「粉末の1単位」とは、 10^1 cfuより多く、任意により 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 コロニー形成単位(cfu)以上、好ましくは 10^7 cfuより多く、より好ましくは 10^8 cfuより多く、さらに好ましくは 10^9 cfu又は 10^{10} cfuより多くを含む粉末の量を示す。したがって、粉末の1単位は患者1人に対する1日の標準投与量を含む量を表すが、1日の投与量は下記のように複数の理由によって複数の方法で増量または減量してもよい。粉末の1単位の、重量による通常の量は、容易に経口摂取可能でありかつ消化可能であるべきであり、mgから数グラムの幅で変化し、例えば5g、10g、15gまたはそれ以上である。粉末の1単位は、さらに、本発明で言及するすべての食品及び当業者によって適切であると考えられる他の食品と混合することができる。したがって、粉末の重量による量あたりのcfuの量は、容易に経口摂取可能でありかつ消化可能であると考えられる量の粉末中の1日の標準投与量よりもずっと多いことがある。この場合、粉末は上記のようにプロバイオティクス製剤に含まれてもよい他の成分によって希釈されなければならない。「食品の1単位」又は「食品」は、概して経口摂取可能なキャリアとして使用される特定の食品の標準の又は通常の量と考えられている、重量又は体積による通常の量を示す。この通常の量は、食べたり飲んだりする消費分、包装単位又は同等のものとして提示される。したがって、「経口摂取可能なキャリアの1単位」は、1錠剤、1カプセル、座薬又は同等のもの、粉末の1単位又は経口摂取可能なキャリアとして使用される特定の食品の標準の又は通常の量と考えられている、重量又は体積による通常の量であり、食べたり飲んだりする消費分、包装単位又は同等のものとして提示される通常の量を示す食品の1単位を示す。

【0017】

上記のいずれの実施態様においても、患者1人に1日に投与するプロバイオティクス製剤中の菌株、変異体又は多様体の量は1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^1 cfu以上であり、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 cfu以上であってもよく、好ましくは 10^7 cfu以上であり、より好ましくは 10^8 cfu以上であり、さらに好ましくは 10^9 cfu又は 10^{10} cfu以上である。

【0018】

上記のどの実施態様によるプロバイオティクス製剤も有用であり、消化管の機能障害、消化器系の望ましくない炎症反応、消化管内のビフィドバクテリウム属の減少及び/又は消化管内の腸管バリアの機能不全に関連する疾患の予防及び/又は治療において食品中及び/又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用すること、及び/又は腹痛、不快感、膨満、鼓脹、消化不良、緊急の便意及び/又は減少した及び/又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚、全体的なIBSの症状及び/又はそれらの組み合わせの患者の苦痛を軽減、予防及び/又は治療するために使用することを目的として提供される。疾患は、過敏性便通、クローン病又は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、回腸囊炎又は感染性大腸炎、消化器癌、関節リウマチなどの全身疾患、望ましくない炎症

10

20

30

40

50

反応による自己免疫障害、クロストリジウム・ディフィシル関連下痢、抗生物質関連下痢、ロタウイルス関連下痢又は感染性下痢などの望ましくない炎症反応による下痢疾患及びそれらの組み合わせからなるグループから選択されてもよい。好ましくは、疾患は過敏性便通である。

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、消化管の機能障害、消化器系の望ましくない炎症反応、消化管内のビフィドバクテリウム属の減少及び／又は消化管内の腸管バリアの機能不全に関連する疾患の予防及び／又は治療における食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして、及び／又は腹痛、不快感、膨満、鼓脹、消化不良、緊急の及び／又は減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚及び／又はそれらの組み合わせの患者の苦痛を軽減、予防及び／又は治療するための本発明の菌株、変異体又は多様体及び本発明のプロバイオティクス製剤の使用を提供する。疾患は、過敏性便通、クローン病又は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、回腸囊炎又は感染性大腸炎、消化器癌、関節リウマチなどの全身疾患、望ましくない炎症反応による自己免疫障害、クロストリジウム・ディフィシル関連下痢、抗生物質関連下痢、ロタウイルス関連下痢又は感染性下痢などの望ましくない炎症反応による下痢疾患及びそれらの組み合わせからなるグループから選択されてもよい。

【 0 0 2 0 】

また、少なくとも下記工程 a) - d) を含む本発明のプロバイオティクス製剤の製造方法が提供される。

a) 蛋白質に富んだ液体増殖培地中で、本発明の菌株又は変異体若しくは多様体、好ましくは上皮細胞単層 1 mm^2 につき少なくとも約 10 細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも 1 . 5 の接着指数を有する菌株又はその変異体若しくは多様体、又は受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 又はその変異体若しくは多様体を発酵及び／又は増殖させる工程。

b) 遠心、安定化、冷凍乾燥、摩砕及び篩分によって細胞を回収する工程。

c) 所望により細胞を、プレバイオティクス、薬理学的上許容可能な化合物、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物、蛋白質及び／又はペプチド又は他のものからなるグループの 1 つ以上の構成要素と混合／混和する工程。

d) 工程 b) の細胞又は工程 c) の混合物を経口摂取可能なキャリアに導入する工程。

【 0 0 2 1 】

受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 又はその変異体若しくは多様体などの上皮細胞単層 1 mm^2 につき少なくとも約 10 細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも 1 . 5 の接着指数を有する、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体と、食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 又はその変異体若しくは多様体（いずれの菌株も、本発明の「菌株」又は「細胞」として言及される）は、グラム陽性であり、非運動性で、しばしば分枝している嫌気性の細菌であり、通常は消化管及び腔に存在するビフィドバクテリウム属に属する細菌である。通常、健康な幼児及び成人の糞便から単離することができる。菌株に言及するとき、その菌株の細胞をも意味している。ビフィドバクテリウム属はすでに、消化を補助し、アレルギーの発生率をより低くすることと関連し、また腫瘍の成長を何らかの形で予防する役割を担う可能性がある」と説明されている。ビフィドバクテリウム属は、放線菌門、ビフィドバクテリウム科に属する。ビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 は、イタリア、ミラノのミラノ大学、D i S T A M の産業用微生物培養コレクションから手に入れることができ、2011年1月26日に受託番号 D S M 2 4 5 1 4 のもとで D S M Z (ドイツ、ブラウンシュヴァイクの D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o o r g a n i s m e n u n d Z e

10

20

30

40

50

20

30

50

、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体を、消化管の疾患又は消化管の機能障害、消化器系の望ましくない炎症反応、腸内微生物叢の不均衡、消化管内のビフィドバクテリウム属の減少、及び／又は消化管内の腸管バリアの機能不全に関連する疾患など本発明に記載する疾患、又は腹痛、不快感、膨満、鼓脹、消化不良、緊急の便意及び／又は減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚、及び／又はそれらの組み合わせ及び低減した生活の質などの症状を患者、人間、ヒト又は動物が有するため、治療の目的で経口摂取する被験者。したがって、患者（＝人間）は、上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5の接着指数を有するビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体、又はビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体を用いる治療などの、新しい治療を必要としている。患者、人間又は被験者は、上記の疾患又は症状のいずれも有しない人間であってもよい。

【0023】

本発明における「接着性の菌株」とは、ヒト結腸細胞に対して接着する特性を有し、ヒト又は動物の腸管壁細胞に結合することが可能であり、これによって腸管バリアの透過性を減少させ、「穴を塞ぐ」作用で腸管壁を改善するビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である。この特性についてビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体に試験を行う簡単な方法が、実施例部に示されている。この点について、上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10、好ましくは約20、より好ましくは約30、さらに好ましくは約40、最も好ましくは約50又は55細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも2.5、さらに好ましくは少なくとも3の接着指数を有するビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体が、接着性の菌株又はその変異体若しくは多様体であると考えられる。

【0024】

本発明のプロバイオティクス製剤は食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのものであり、上皮細胞単層1mm²につき少なくとも約10、好ましくは約20、より好ましくは約30、さらに好ましくは約40、最も好ましくは約50又は55細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも2.5、さらに好ましくは少なくとも3の接着指数を有するビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又は接着性の菌株、又はその変異体若しくは多様体を含む。又は、本発明のプロバイオティクス製剤は食品中及び／又は薬剤としてのプロバイオティクスとして使用するためのものであり、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体を含む。本発明のプロバイオティクス製剤は、医薬製剤とも考えることができる。「食品」とは、原則として、ヒトと、好ましくは動物によっても経口摂取可能であり消化可能である、あらゆる形の物質又は素材を示す。概してこれは身体に栄養的サポートを提供するため、及び／又は喜びのために食べたり飲んだりできる物質又は素材を含む。ヒトの場合、この物質は植物、微生物、又は動物由来であってもよい。本発明の場合、食品とは、特に、少なくとも本発明の菌株である微生物と、本発明においてプロバイオティクス製剤に含まれてもよいものとして言及される他の物質、例えば少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物、経口摂取可能なキャリア、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物及び／又は蛋白質及び／又はペプチド、特にグルタミン／グルタミン酸が豊富である蛋白質及び／又はペプチド、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル及び／又は微量元素を含み、少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物はビタミンB類など1つ以上のビタミン、カルシ

ウム又はマグネシウムなど1つ以上のミネラル、ラクトース、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、マンニトール、マルトース、デキストリン、ソルビトール、フルクトースなど1つ以上の糖質及びそれらの混合物からなるグループから選択されるものである。「薬剤」とは、一般的には健康な状態ではなく疾患であると考えられる状態にあるヒト又は患者にのみ投与されるため、概して食品であるとは考えられていない。しかしながら、鬱の患者の場合でのように、身体に栄養的サポート及び／又は喜びを薬剤が提供することもできる。概して薬剤及び治療用品はより厳格な規制及び認可プロセスに従う。この認可プロセスは、本発明の菌株、変異体又は多様体の主な投与方法及び適用方法であると理解されている食品の場合には不要である。上記のとおり、本発明における「プロバイオティクス」は非病原性、ヒト由来のプロバイオティックな細菌を含み、一定数を経口摂取した場合に本来の基本的な栄養を超える健康への影響を示す生きた微生物を含む食品および医学的サプリメントとして定義されている。多様な微生物、特にラクトバチルス属及びレンサ球菌属の微生物の混合物が、伝統的に、発酵乳製品中で健康増進のために使用されてきた。本発明のプロバイオティクスは、少なくとも本発明の接着性のビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体又は多様体、又は本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム M I M B b 7 5 又はその変異体若しくは多様体を含む。しかし、本発明のプロバイオティクス製剤には、細菌成分として、有用なプロバイオティクスであると考えられる他種の別の菌株、細胞、変異体又は多様体が存在してもよい。これらは例えばラクトバチルス属、ビフィドバクテリウム属、サッカロミセス属、レンサ球菌属のプロバイオティックな菌株又はそれらの混合物である。このように「細菌成分」とは、上記のように、例えば生体分子、多糖類、脂質、又は細菌由来若しくは細菌による発酵あるいは発現で生成される他の物質など、化合物に使用されてもよい、プロバイオティックな菌株の生きた又は不活性化された菌株又は細胞を示す。どのような菌種の死物質でも細菌成分として理解されてよい。

【0025】

本発明のプロバイオティクス製剤は、少なくとも1つのプレバイオティクス又は2つ、3つ、4つ又はそれ以上の異なるプレバイオティクスの組み合わせを含んでもよい。本発明における「プレバイオティクス」は、本発明の菌株に対する栄養として、それらを冷凍乾燥状態から解凍したのち生存可能で健康な状態に保つ役割を果たす。微生物細胞1gあたり、すなわち菌株1gあたり、概して2 - 5、好ましくは2 . 5 gまで、より好ましくは少なくとも2 . 5 g、さらに好ましくは少なくとも3 g、最も好ましくは少なくとも4 gのプレバイオティクスが必要である。一般的に、一定の糖類などヒトが消化不可能な食品原料がプレバイオティクスとして用いられる。プレバイオティクスの例には、好ましくはオリゴ糖、イヌリン、フルクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、シャゼンシ、オリゴフルクトース、イソマルトオリゴ糖、キシロオリゴ糖、ソイオリゴ糖、マルトデキストリン、グルコオリゴ糖、マンナンオリゴ糖、アラビノガラクトン、アラビンキシラン、ラクトスクロース、グルコナンナン、ラクツロース、ポリデキストロース、オリゴデキストラン、ゲンチオリゴ糖、ペクチンオリゴ糖、キサンタンガム、アラビアガム、ヘミセルロース、難消化性デンプン及びその誘導体、及びそれらの混合物及び／又は組み合わせである糖類がある。

【0026】

本発明のプロバイオティクス製剤は、少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物、少なくとも1つの経口摂取可能なキャリア、少なくとも1つのアジュバント、少なくとも1つの細菌成分、少なくとも1つの原体、少なくとも1つの生体化合物及び／又は少なくとも1つの蛋白質及び／又はペプチド、特にグルタミン／グルタミン酸が豊富である蛋白質及び／又はペプチド、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル及び／又は微量元素を含んでもよい。

【0027】

「薬理学上許容可能な化合物」とは、ヒト及び動物の生理学及び生体における高い耐用性を特徴とし、薬理学上不活性であるか又は受容者の生理機能に有害な影響がない、薬剤

10

20

30

40

50

化合物又は製剤中に許容可能な液体、固体、又は気体の化学的化合物又は生体化合物を示す。少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上の異なる薬理学上許容可能な化合物が本発明のプロバイオティクス製剤中に異なる量で存在してもよい。その量は、製造者によって、使用されるビフィドバクテリウム・ビフィドゥム菌株に特異的な必要性に応じて、また特定の適用方法、投与方法又は投薬の予定に応じて調整することができる。薬理学上許容可能な化合物の例は、プレバイオティクス、糖類、脂質、ビタミン、ミネラル、微量元素、アミノ酸、核酸、マルトデキストリン、イヌリン、ラクトース、グルコース、スクロース、マルトース、デキストリン、デキストロース、フルクトース、ソルビトール、フルクトオリゴ糖、マンニトール、コーンスターチ、結晶セルロース、アラビアガム、リン酸カルシウム、アルギン酸、ケイ酸カルシウム、微小結晶セルロース、セルロース、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム、ゼラチン、好ましくはウシゼラチン、シロップ、アミノサリチル酸、スルファサラジン、5 - アミノサリチル酸、4 - アミノサリチル酸、ベンザラジン、二塩化水素化物塩、オルサラジン、バルサラジド、ビスマスサブサリチル酸、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルヒドロキシベンゼン酸エステル、プロピルヒドロキシベンゼン酸エステル、タルク、ステアリン酸マグネシウム、不活性重合体、水及び鉱物油、ヨウ素、マグネシウム、アスパラギン酸 - アスコルビン酸マグネシウム複合体、マグネシウムアミノ酸キレート、亜鉛、亜鉛アミノ酸キレート、セレン、セレンアミノ酸複合体、銅、銅アミノ酸キレート、マンガン、マンガンアミノ酸キレート、クロム、クロムポリニコチネート、モリブデン、モリブデンアミノ酸キレート、カリウム、アスパラギン酸 - アスコルビン酸カリウム複合体、コリン、重酒石酸コリン、イノシトール、パナジウム、硫酸パナジル、ボロン、アスパラギン酸 - クエン酸ボロン、柑橘類ピオフラビノイド、変性セルロースガム、ケイ酸、植物性ステアリン、二酸化チタン、ステアリン酸マグネシウムを含み、好ましくは、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又はそれ以上の薬理学上許容可能な化合物が、ビタミンB類など1つ以上のビタミン、マグネシウム及びカルシウムなど1つ以上のミネラル、1つ以上の糖質、好ましくはウシゼラチンであるゼラチン、マンニトール、デキストリン、フルクトース、ソルビトール、プレバイオティクス、マルトース、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、鉄、ラクトース及びそれらの混合物からなるグループから選択されたものである。さらに、プロバイオティクス製剤は、当業者に既知の薬理学上許容可能な充填剤、結合剤、潤滑剤、湿潤剤、崩壊剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、甘味剤及び調味剤を含むことができる。

【0028】

本発明のプロバイオティクス製剤及び菌株又はその変異体若しくは多様体は、患者への投与後、菌株又は細胞が急速に、連続的に、又は緩徐に放出されるように形成されてもよい。本発明のプロバイオティクス製剤に含まれてもよいビタミンの例は、ビタミンA（例えばレチノール、レチナール、ベータカロチンを含むカロチノイド）、ビタミンB₁（チアミン）、ビタミンB₂（リボフラビン）、ビタミンB₃（例えばナイアシン、ナイアシンアミド、ニコチンアミド）、ビタミンB₅（パントテン酸）、ビタミンB₆（例えばピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサル）、ビタミンB₇（ビオチン）、ビタミンB₉（例えば葉酸、フォリン酸）、ビタミンB₁₂（例えばシアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン）、ビタミンC（アスコルビン酸）、ビタミンD（例えばエルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール）、ビタミンE（例えばトコフェロール、トコトリエノール）、ビタミンK（例えばフィロキノン、メナキノン）などの水溶性及び非水溶性ビタミンであり、好ましくは本発明のプロバイオティクス製剤にビタミンB群、例えばビタミンB₁（チアミン）、ビタミンB₂（リボフラビン）、ビタミンB₃（例えばナイアシン、ナイアシンアミド、ニコチンアミド）、ビタミンB₅（パントテン酸）、ビタミンB₆（例えばピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサル）、ビタミンB₇（ビオチン）、ビタミンB₉（例えば葉酸、フォリン酸）、ビタミンB₁₂（例えばシアノコバラミン、ヒドロキシコバラミン、メチルコバラミン）及びそれらの混合物が含まれる。本発明のプロバイオティクス製剤に含まれるミネラルの例はマグネシウム、カル

シウム、亜鉛、セレン、鉄、銅、マンガン、クロム、モリブデン、カリウム、バナジウム、ボロン、チタンであり、好ましくはマグネシウム及び／又はカルシウムが存在する。「微量元素」とは、好ましくはヒトの生体である生体の成長、発達及び／又は生理機能にとって非常に少ない量のみ必要であるような化学元素である。「糖類」とは、炭素、水素、酸素のみからなり、水素対酸素の原子比が2：1である実験式 $C_m(H_2O)_n$ を有する有機化合物である。「脂質」とは、長い疎水性の炭水化物部を有するために、少なくとも部分的に非水溶性である生体化合物である。脂質は生体システムの中では細胞膜の非常に重要な部分である。

【0029】

本発明における「経口摂取可能なキャリア」とは、本発明のプロバイオティクス製剤、菌株又はその変異体若しくは多様体の、被験者又は患者に対する適用に用いられ、本発明のプロバイオティクス製剤、菌株及びその変異体若しくは多様体の経口摂取を助ける。本発明において用いられる「乳製品」という用語の意味には、動物及び／又は植物由来の乳を含む媒質が含まれる。動物由来の乳には、牛、羊、ヤギ及びバウファローの乳が含まれる。植物由来の乳としては、本発明に従って利用することができる植物由来の発酵可能なあらゆる物質、特に大豆、米又は穀物由来の物質を挙げることができる。経口摂取可能なキャリアとして利用可能なのはカプセル、錠剤、粉末、顆粒、トローチ、カシェ剤、エリキシル剤、乳化剤、溶液、シロップ、懸濁剤、柔らかいゼラチンカプセル及び堅いゼラチンカプセル、坐薬、無菌包装された粉末又は食品からなるグループから選択されるものであり、食品は乳製品、酸性乳、ヨーグルト、冷凍ヨーグルト、発酵ヨーグルト飲料や飲

10

20

【0030】

「原体」は、患者に対して薬理的に耐容性を有する一方、薬理的に活性を有する化学的化合物又は生体化合物、例えばピサコジル、ロペラミド、アミノサリチル酸、スルファサラジン、5 - アミノサリチル酸、4 - アミノサリチル酸、ベンザラジン、二塩化水素化物塩、オルサラジン、バルサラジド、ピスマスサブサリチル酸又はそれらの混合物などを指す。この化合物は、本発明のプロバイオティクス製剤、菌株又はその変異体若しくは多様体の有益な効果を直接的あるいは間接的に促進するいかなる化合物であってもよい。直接的とは、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体自体が保護され、その成長又は腸管バリアへの接着が補助されることを意味する。間接的とは、消化管の機能障害、消化器系の望ましくない炎症反応、腸内微生物叢の不均衡、消化管内のビフィドバクテリウム属の減少及び／又は消化管内の腸管バリアの機能不全に関連する疾患の予防及び／又は治療、又は腹痛、不快感、膨満、鼓脹、消化不良、緊急の便意及び／又は減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚及び／又はそれらの組み合わせの患者の苦痛を軽減、予防及び／又は治療すること、又は患者の生活の質を改善することに有用であると知られている追加の物質又は化合物、すなわち原体が、単独で又は他の原体との組み合わせでプロバイオティクス製剤に加えられ、含まれてもよいことを意味する。特に、原体は、過敏性便通、クローン病又は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患、過敏性腸症候群、回腸囊炎又は感染性大腸炎、消化器癌、関節リウマチなどの全身疾患、望ましくない炎症反応による自己免疫障害、クロストリジウム・ディフィシル関連下痢、抗生物質関連下痢、ロタウイルス関連下痢又は感染性下痢などの望ましくない炎症反応による下痢疾患及びそれらの組み合わせなどの消化器疾患を治療するための既知の薬剤であるものがプロバイオティクス製剤に含まれてもよい。このような原体の、当業者に知られた例は、ロートリスト（ドイツ、2010年）又は他のどのような薬剤登録簿においても見ることができる。「生体化合物」とは、糖質、アミノ酸、脂質、核酸、

30

40

50

蛋白質、ペプチド、細胞隔室、リン脂質、ポリエーテル、植物性、動物性、又は微生物性の化合物など、どのような生体化合物であってもよい。「蛋白質」、「ペプチド」又は「ポリペプチド」はそれらの一般的な意味に従って理解されるもので、蛋白性アミノ酸又は非蛋白性アミノ酸の直線的な構成物であり、蛋白質は1つ以上のサブユニットと、ビタミン、ミネラルなどの触媒相当物質を含んでもよい。

【0031】

「コロニー形成単位」(c f u)は、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体の生菌細胞の計測単位である。本発明のプロバイオティクス製剤は、菌株、その変異体又は多様体を1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたりに 10^1 c f uより多く含み、1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 コロニー形成単位(c f u)以上含んでもよく、好ましくは菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^7 c f uより多く存在し、より好ましくは菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^8 c f uより多く存在し、さらに好ましくは菌株、変異体又は多様体が1カプセル又は1錠剤又は粉末の1単位又は1食品あたり 10^9 c f uより多く存在する。プロバイオティクス製剤中の、患者1人に1日に投与する菌株、変異体又は多様体の量は 10^1 c f u以上であり、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 c f u以上であってもよく、好ましくは 10^7 c f u以上であり、より好ましくは 10^8 c f u以上であり、さらに好ましくは 10^9 c f u以上又は 10^{10} c f u以上である。1日の投与量は患者の生理的状态に応じて、すなわち症状が重篤である場合、増量してもよい。投与量は、1日の量を2倍、3倍、又は複数倍にするように増量することができる。反対に、例えば不耐性の場合又は薬物を追加する場合に2等分又は2分、3分、4分して減量することができる。又は上記の1日の投与量を毎日ではなく、2日又は3日に1度、又は1週間に1度投与して減量することもできる。菌株、その変異体又は多様体又はプロバイオティクス製剤は、その人間又は患者が都合がよいと考えるとき、例えば朝、正午、午後又は夕方などのいつ服用してもよく、好ましくは、服用時間は起床後など朝、又は就寝前など夕方である。菌株、その変異体又は多様体又はプロバイオティクス製剤が含む経口摂取可能なキャリアが食品であれば、投与はその経口摂取可能なキャリア、すなわち食品の特性に応じて行われる。菌株、その変異体又は多様体又はプロバイオティクス製剤が含む経口摂取可能なキャリアがカプセル、錠剤又はそれに類似した経口摂取可能なキャリアである場合には、飲料又は水、好ましくは水を伴って経口的に投与される。

【0032】

概して、本発明のプロバイオティクス製剤及び菌株の投与は、プロバイオティクス、食品又は薬剤の特定の形態に応じて行われる。従って通常は、本発明のプロバイオティクス及び菌株は経口的、好ましくは非経口的に、又は直腸を通じて投与される。

【0033】

本発明のプロバイオティクス製剤を製造する方法は、少なくとも下記の工程を含む。

a) 蛋白質に富んだ液体増殖培地中で、上皮細胞単層 1 mm^2 につき少なくとも約 10^8 細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも1.5の接着指数を有するビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体、又はビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株又はその変異体若しくは多様体である受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75又はその変異体若しくは多様体を発酵及び/又は増殖させる工程。

b) 遠心、安定化、冷凍乾燥、摩砕及び篩分によって上記菌株の細胞を回収する工程。

c) 所望により細胞を、プレバイオティクス、薬理学上許容可能な化合物、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物、蛋白質及び/又はペプチドからなるグループの1つ以上の構成要素と混合/混和する工程。

d) 工程b)の細胞又は工程c)の混合物を経口摂取可能なキャリアに導入する工程。

【0034】

まず、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株、変異体又は多様体の発酵及び増殖は、“Probiotics and Health Claims” Wolfgang Kneifel、Seppo Salminen、John Wiley & Sons、第1版(2011年1月7日)に記載されているように、当業者に知られた通常的手段及び方法によって行うことができることに留意すべきである。

【0035】

概して、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株、変異体又は多様体を増殖させる及び/又は発酵するための培地は、少なくとも水、デキストロース、酵母エキス及びミネラルを含む。本発明の菌株及びその変異体若しくは多様体を増殖させる及び/又は発酵するために使用される標準培地はMRS液体培地(アメリカ合衆国、ミシガン州、デトロイト、Difco)に0.05%L-システイン塩酸塩を補ったもの(cMRS)である。当業者は、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株などの細菌を増殖させ、発酵及び前培養するために他の培地を使用することもできるという事実を十分に認識している。所望により、工程a)に先だって菌株又はその変異体若しくは多様体が振蕩フラスコ中で前培養される。このために、上記の標準培地少なくとも200ml、好ましくは少なくとも300ml、より好ましくは少なくとも400ml、さらに好ましくは少なくとも500ml、最も好ましくは少なくとも600mlに、菌株又はその変異体若しくは多様体の少なくとも1つの細胞を播種する。この前培養では、一般的に、37、220rpmで嫌氣的に一晩増殖させる。

【0036】

前培養は、続いて少なくとも500l、好ましくは少なくとも600l、より好ましくは少なくとも700l、さらに好ましくは少なくとも800l、最も好ましくは少なくとも1000lの容量を有する前発酵槽中でより高度な発酵の播種を行うために、完全に又は部分的に使用することができる。前発酵槽中での本発明の菌株、変異体及び多様体を発酵した後、その菌株、多様体及び変異体を含む細胞培養物は、少なくとも5000l、好ましくは少なくとも7500l、より好ましくは少なくとも10,000l、さらに好ましくは少なくとも15,000l、最も好ましくは少なくとも20,000lの容量を有する主発酵槽に、少なくとも部分的に移される。前発酵槽及び主発酵槽では、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム菌株、その変異体又は多様体を発酵及び増殖させるために上記の標準培地が使用される。本発明の菌株、変異体及び多様体の栄養としての役割を果たす培地中の糖類が枯渇した後、発酵及び細胞増殖が停止し、細胞が回収される。一般的に、枯渇後の細胞密度は少なくとも 10^1 cfuであり、任意により 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 細胞/ml以上、好ましくは少なくとも 10^7 細胞/ml、より好ましくは少なくとも 10^8 細胞/ml、さらに好ましくは少なくとも 10^9 細胞/ml又は少なくとも 10^{10} 細胞/mlである。当業者は、標準的な乾燥方法及びあらかじめ重量測定したガラス管の重量測定を用いた乾燥重量としての生物量決定方法、又は(日本、Hitachi U-1100などの)分光光度計を用いた吸収578nmでの光学濃度の測定による細胞密度又は生物量を決定する方法を知っている。

【0037】

前発酵槽及び主発酵槽は、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥムの菌株、菌株の変異体及び/又は多様体を培養、発酵、増殖させる及び/又は処理するのに適した標準的なバイオリアクターから派生させることができる。標準的なバイオリアクターの提供者は、例えばApplikon Biotechnology B.V.(オランダ、スケーダム)、Infors(スイス、ボットミンゲン)、Bioengineering(スイス、ヴァルト)及びSartorius Stedim Biotech GmbH(ドイツ、ゲッティンゲン)である。前発酵及び主発酵の両方がバッチモードで行われる。これは発酵中に培地又は他の構成物が補充されることがないということを意味する。

【0038】

主発酵後、GEA Westfalia Separator Group GmbH(ドイツ、エルデ)ほかによって提供されるような、約2000-15,000l/時の

運転状態時許容量を有するディスク遠心器又は分離器などを使用した遠心によって細胞が回収される。続いて、当業者によく知られた標準の適用及び手段を用いて細胞が安定化、冷凍乾燥、摩砕及び篩分される。冷凍乾燥によって、500 l から1000 l、好ましくは600 l から800 l の体積を有し、約100 kg から200 kg、好ましくは150 kg までの重量を有する濃縮物が得られる。

【0039】

のちに、細胞は所望によりプレバイオティクス及び/又は以下のものからなるグループの1つ以上の構成要素と混合される。薬理学上許容可能な化合物、経口摂取可能なキャリア、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物及び/又は蛋白質及び/又はペプチド及び/又はそれらの混合物、特にグルタミン/グルタミン酸が豊富である蛋白質及び/又はペプチド、脂質、糖質、ミネラル及び/又は微量元素。上記の少なくとも1つの薬理学上許容可能な化合物は、ビタミンB類など1つ以上のビタミン、カルシウム又はマグネシウムなど1つ以上のミネラル、ラクトース、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、マンニトール、マルトース、デキストリン、ソルビトール、フルクトースなど1つ以上の糖質及びそれらの異なる量での混合物からなるグループから選択されたものであってもよい。

【0040】

本発明のプロバイオティクス製剤を得るために、全体として15 - 40 g、好ましくは18 - 35 g、より好ましくは20 - 30 g、さらに好ましくは22 - 28 g、最も好ましくは25 gの本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体と、50 - 100 g、好ましくは60 - 90 g、より好ましくは65 - 85 g、さらに好ましくは70 - 80 g、最も好ましくは75 gの、細胞、菌株、その変異体又は多様体の栄養としてのプレバイオティクス、糖質、薬理学上許容可能な化合物又はそれらの混合物からなるグループの1つ以上の構成要素を混合し、所望により30 - 70 g、好ましくは35 - 65 g、より好ましくは40 - 60 g、さらに好ましくは45 - 55 g、最も好ましくは50 gの薬理学上許容可能な化合物、経口摂取可能なキャリア、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物及び/又は蛋白質及び/又はペプチド、特にグルタミン/グルタミン酸が豊富である蛋白質及び/又はペプチド、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル、微量元素及び/又はそれらの混合物からなるグループの1つ以上の構成要素を、プロバイオティクス製剤の注入性を改善するために混合する。15 - 40 g、好ましくは18 - 35 g、より好ましくは20 - 30 g、さらに好ましくは22 - 28 g、最も好ましくは25 gの本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体を、50 - 100 g、好ましくは60 - 90 g、より好ましくは65 - 85 g、さらに好ましくは70 - 80 g、最も好ましくは75 gの糖質、糖質混合物、プレバイオティクス又はそれらの混合物と混合し、そして所望により30 - 70 g、好ましくは35 - 65 g、より好ましくは40 - 60 g、さらに好ましくは45 - 55 g、最も好ましくは50 gの薬理学上許容可能な化合物、糖質、ビタミン、ミネラル、微量元素及び/又はそれらの混合物からなるグループの1つ以上の構成要素と混合することが好ましい。より好ましいのは、15 - 40 g、好ましくは18 - 35 g、より好ましくは20 - 30 g、さらに好ましくは22 - 28 g、最も好ましくは25 gの本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体を50 - 100 g、好ましくは60 - 90 g、より好ましくは65 - 85 g、さらに好ましくは70 - 80 g、最も好ましくは75 gの糖質、イヌリン、フルクトオリゴ糖又はそれらの混合物と混合し、そして所望により30 - 70 g、好ましくは35 - 65 g、より好ましくは40 - 60 g、さらに好ましくは45 - 55 g、最も好ましくは50 gのビタミンB類などのビタミン、カルシウム又はマグネシウムなど1つ以上のミネラル、ラクトース、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、マンニトール、フルクトオリゴ糖、マンニット、マルトース、デキストリン、ソルビトール、フルクトースなど1つ以上の糖質及びそれらの混合物からなるグループの1つ以上の構成要素と混合することである。さらに好ましいのは、25 gの本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体を、75 gの

10

20

30

40

50

、糖質、プレバイオティクス、マルトデキストリン、イヌリン、デキストロース、マンニトール、マルトース、デキストリン、ソルビトール、フルクトース及びそれらの混合物からなるグループから選択された1つの構成要素と混合し、そして50gのセルロース、薬理学上許容可能な化合物、経口摂取可能なキャリア、アジュバント、細菌成分、原体、生体化合物及び/又は蛋白質及び/又はペプチド、特にグルタミン/グルタミン酸が豊富である蛋白質及び/又はペプチド、脂質、糖質、ビタミン、ミネラル、微量元素及びそれらの混合物からなるグループから選択された1つの構成要素と混合することである。最も好ましいのは、25gの本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体を、75gのマルトデキストリンと混合し、50gのセルロースと混合することである。菌株の発酵及び/又は増殖、回収、安定化、冷凍乾燥、摩砕及び篩分後の、本発明の細胞、菌株、その変異体又は多様体と構成要素の混合/混和は、当業者に知られている標準的な技術、適用及び方法によって行われてもよく、好ましくはカラムブレンダーが使用される。構成要素の比が上記の比と一致する限り、当然、混合/混和に使用する装置の容量に応じて、より多い又は少ない量を混合/混和に使用してもよい。典型的な比は、例えば菌株25%、プレバイオティクス又は糖質又はマルトデキストリン75%、セルロースなどの薬理学上許容可能な化合物50%である。

【0041】

例えば、50 - 300mg、好ましくは75 - 250mg、より好ましくは100 - 200mg、さらに好ましくは120 - 175mg、最も好ましくは150mgの、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体、又は上記の混合物、又は本発明のプロバイオティクス製剤を、経口摂取可能なキャリアの1単位、例えばカプセル、錠剤、トローチ、カシェ剤、エリキシール剤、乳化剤、溶液、シロップ、懸濁剤、柔らかいゼラチンカプセル及び堅いゼラチンカプセル、坐薬、無菌包装された粉末又は食品、例えば乳製品、酸性乳、ヨーグルト、冷凍ヨーグルト、発酵ヨーグルト飲料や飲用ヨーグルトなどのヨーグルト製品、チーズ、発酵クリーム、牛乳ベースのデザート、発酵乳又は人乳近似乳、粉乳、濃縮乳、チーズスプレッド、ドレッシング、飲料及びその他のものに導入する。50mg、好ましくは75mg、より好ましくは100mg、さらに好ましくは120mg、そして最も好ましくは150mgの本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体、又は上記の混合物を、カプセル、錠剤、トローチ、カシェ剤、柔らかいゼラチンカプセル及び堅いゼラチンカプセル、坐薬、より好ましくはカプセル、柔らかいゼラチンカプセル及び堅いゼラチンカプセルに導入することが好ましい。従って、経口摂取可能なキャリアの1単位、すなわちカプセル、錠剤、粉末、顆粒、トローチ、カシェ剤、エリキシール剤、乳化剤、溶液、シロップ、懸濁剤、柔らかいゼラチンカプセル及び堅いゼラチンカプセル、坐薬、無菌包装された粉末又は食品、例えば乳製品、酸性乳、ヨーグルト、冷凍ヨーグルト、発酵ヨーグルトや飲用ヨーグルトなどのヨーグルト製品、チーズ、発酵クリーム、牛乳ベースのデザート、発酵乳又は人乳近似乳、粉乳、濃縮乳、チーズスプレッド、ドレッシング、及び/又は飲料への導入後には、 10^1 cfuより多く、任意により 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 cfu以上、好ましくは 10^7 cfuより多く、より好ましくは 10^8 cfuより多く、さらに好ましくは 10^9 cfu又は 10^{10} cfuより多くを含む。どのような場合にも、重量による量はcfuの濃度に応じて、カプセル、錠剤、粉末、顆粒、トローチ、カシェ剤、エリキシール剤、乳化剤、溶液、シロップ、懸濁剤、柔らかいゼラチンカプセル及び堅いゼラチンカプセル、坐薬、無菌包装された粉末又は食品などの最終的な製品中の、本発明のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、その変異体又は多様体の量が 10^1 cfuより多く、任意により 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 cfu以上、好ましくは 10^7 cfuより多く、より好ましくは 10^8 cfuより多く、さらに好ましくは 10^9 cfu又は 10^{10} cfuより多くなるように調節することができる。cfuの量が 10^1 cfuより少ない場合、任意により 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 cfu、 10^7 cfu、 10^8 cfu、 10^9 cfu以上、又は 10^{10} より少ない場合にも、患者が経口摂取可能なキャリアを1単位より多く摂ることによ

10

20

30

40

50

て前述の c f u の量に適應することができる。

【 0 0 4 2 】

1つの実施態様の例では、25mgの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75細胞、すなわち少なくとも 10^9 c f uの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75、75mgのマルトデキストリン及び50mgのセルロースが、好ましくはウシゼラチンカプセルである1つのゼラチンカプセルに導入される。好ましくは、受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75細胞25mgを含む上記のカプセルが、少なくとも 10^9 c f uの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75、75mgのマルトデキストリン及び50mgのセルロースを含み、1日1回投与される。経口摂取可能なキャリアは、一般に、質の水準が高く、栄養補助食品の衛生基準を満たし、様々な製造者から得られるものであるべきである。カプセル、例えばウシゼラチンカプセルは、例えばCapsugel（ベルギー、ボルネム）から得ることができる。

10

【 0 0 4 3 】

別の好ましい実施態様では、好ましくは少なくとも 10^9 c f uの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75を含む、25mgの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75の細胞及び2gのマルトデキストリンを混合し、粉末の1単位と考える。好ましくは、上記の、25mgの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75細胞を含む粉末の1単位、すなわち少なくとも 10^9 c f uの受託番号DSM24514のもとで寄託されているビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75が1日1回投与される。

20

【 0 0 4 4 】

人間又は患者によって選択された特定の経口摂取可能なキャリアとは独立に、患者に投与されるプロバイオティクス製剤中のビフィドバクテリウム・ビフィドゥム細胞、菌株、変異体又は多様体の1日の量は、 10^1 c f u以上、任意により 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 c f u以上、好ましくは 10^7 c f u以上、より好ましくは 10^8 c f u以上、さらに好ましくは 10^9 c f u又は 10^{10} c f u以上である。これに代わる服用量は上記で議論されている。

30

【 0 0 4 5 】

本発明は、上記の、詳細において異なってもよい実施態様に限定されるものではない。

【実施例】

【 0 0 4 6 】

1. 細菌培養条件

概して、ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75などビフィドバクテリウム属は、決まった手順として、MRS液体培地（アメリカ合衆国、ミシガン州、デトロイト、Difco）に0.05% L-システイン塩酸塩を補ったもの（cMRS）の中で嫌氣的に、37℃で、一晚増殖させた。

40

【 0 0 4 7 】

2. ビフィドバクテリウム・ビフィドゥムMIMBb75のヒト腸管上皮細胞培養株Caco-2に対する接着特性試験

2.1 Caco-2細胞に対する細菌接着

この試験は、特定のビフィドバクテリウム属の菌株がヒトの結腸細胞に対する接着特性を有するかどうか、従って、本発明において接着性の菌株として理解できるかどうかを試験するために行うことができる。ヒト結腸腺癌Caco-2細胞（ATCC HTB-37）を、3cmペトリ皿中、顕微鏡用カバーガラス上で、10%（体積/体積）熱不活化（56℃で30分間）ウシ胎児血清、100 U ml⁻¹ ペニシリン、100 mg・ml⁻¹

50

¹ ストレプトマイシン、0.1 mM 非必須アミノ酸及び 2 mM L-グルタミンを補ったダルベッコ変法イーグル培地の中で手順通り増殖させ、37、95% 空気及び 5% 二酸化炭素の環境で、ウォータージャケットインキュベーターの中でインキュベートした。この試験には、生体内から得たどのような上皮細胞でも適しており、これはヒト消化管由来の上皮細胞を含みながらこれに限定されるものではないが、Caco-2 細胞又はその誘導体が最も好ましく、ATCC 及び ECACC 等の培養コレクションバンクから商業的に入手可能である。培地は週に 2 回交換した。接着アッセイには、合流後 15 日の細胞（完全に分化させた細胞）が用いられた。細菌細胞を加える前に、細胞の単層をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH 7.3）で 2 回注意深く洗浄した。一晚増殖させた培養物の細菌細胞濃度は、DAPI（4', 6'-ジアミジノ-2-フェニリンドール）染色後、顕微鏡的に決定した。PBS（pH 7.3）に再懸濁した各菌株約 2×10^8 細胞を完全に分化した Caco-2 細胞の単層と共にインキュベートした。嫌氣的条件中、37 で 1 時間経過したのち、結合していない細菌を取り除くためにすべての単層を PBS で 3 回洗浄した。次に細胞を 3 ml のメタノールで固定し、室温で 8 分間インキュベートした。メタノールを取り除いた後、細胞を 3 ml のギムザ染色液（1:20）（イタリア、ミラノ、Carlo Erba）で染色し、室温で 30 分間放置した。次に、洗浄液が無色になるまでウェルを洗浄し、インキュベーター中で 1 時間乾燥した。顕微鏡用カバーガラスをペトリ皿から取り除き、顕微鏡的に（倍率 100 倍）、油浸を用いて観察した。ランダムに選択した 20 の視野で接着した細菌の数を計測し、平均した。統計的に有意な差があるかどうかには、スチューデントの独立 t 検定を行った。

【0048】

ビフィドバクテリウム・ビフィドゥム MIMBb75 は、この菌株の細胞のかなり大部分が Caco-2 単層に接着したままであり、接着が単なる非特異的な物理的取り込みでないことの根拠を提供したように、ヒト結腸細胞 Caco-2 に対する高い接着性を有することがわかった。具体的には、上皮細胞単層 1 mm^2 に対して 55 細菌細胞が接着し、3,874 の接着指数（細菌細胞 / Caco-2 細胞 100 個）（ $P < 0.026$ ）を示す結果となった。この点については、上皮細胞単層 1 mm^2 につき少なくとも 10 細菌細胞の接着を示す、又は少なくとも 1.5 の接着指数を有するビフィドバクテリウム属の菌株は接着性の菌株であると考えられる。

【0049】

2.2 細菌細胞壁抽出物の調製

0.2 l の液体培養物から遠心によって細菌細胞を回収し、細胞を破砕するためにフレンチプレス（12,000 l b / in²、 $\sim 2,142 \text{ kg} / \text{cm}^2$ ）の改変された使用を伴う Mattarelli et al.（1993 年）に記載されている方法によって処理した。

【0050】

3. 過敏性腸症候群を有する患者におけるビフィドバクテリウム・ビフィドゥム MIMBb75 の効果を評価するための二重盲検ランダム化プラセボコントロール研究

3.1 概要

122 人の患者が、プラセボ（ $N = 62$ ）又はビフィドバクテリウム・ビフィドゥム MIMBb75（ $N = 60$ ）（「ビフィドバクテリウム群」とも呼ぶ）を投与される群にランダム化された。被験者は、 $1 \times 10^9 \text{ cfu}$ / カプセル又はプラセボを 1 日 1 回、4 週間服用した。IBS の重篤度及び個別の IBS 症状を、7 ポイントリッカートスケールで毎日記録した。

【0051】

3.2 研究対象集団

患者は、研究責任者から採用され、また広告によって募集された。栄養学上の研究プロトコルは、バイエルン州医師会の倫理委員会に提示された。18 歳から 68 歳の、軽度から中程度の IBS（Rome III 基準）を有する、臨床的に目立たない被験者が考慮され算入された。炎症性の器質的な消化器疾患、全身疾患、癌、自己免疫疾患、糖尿病、既

知の乳糖不耐症又は免疫不全、虫垂切除術を除く既知の腹部手術歴を有する、50歳より年上である場合過去五年間に疾患のないS字結腸鏡検査又は結腸鏡検査を受けていない、甲状腺機能亢進症と診断された、研究開始前少なくとも3ヶ月に抗精神病薬又は全身的副腎皮質ステロイドの使用があった、重大な精神科疾患、セリアック病又は妊娠している個人は除外された。

【0052】

3.3 研究デザイン

この研究は、前向き、多中心、ランダム化、二重盲検、プラセボコントロール、二群の栄養学的研究として行われた。研究全体を通じて、患者は自分の全体的なIBSの症状と個別のIBSの症状を、患者日記を用いて毎日記録した。さらに、患者は通院の外来で全体的なIBSの症状並びに個別のIBSの症状（外来2-4）及び生活の質（外来3及び4）について質問された。外来は、スクリーニング時、2週間後（ならし期）、6週間後（治療の終了）及び8週間後（ウォッシュアウト期の終了）に行われた（図1）。

10

【0053】

患者が書面によるインフォームドコンセントを出した後、1日目（外来1）に、完全な病歴聴取及び身体診察を含むスクリーニング検査を受けた。中央検査室での、妊娠検査を含む分析のために血液検体が採取された。スクリーニング外来時に、患者は研究期間を通じて自分の食習慣及び生活習慣を維持するよう指示された。また患者日記が配布された。

【0054】

2回目の外来（15日目）では、日記の精査が行われた。ならし期の2週目に、軽度から中程度の疼痛がある日が少なくとも2日あり、すべての算入条件を満たし、除外条件のいずれにも当てはまらなかった患者をランダムにB・ビフィドゥムMIMBb75又はプラセボを投与される1:1の群に分けた。治療はコンピューターによって生成されたブロックサイズ4のブロックランダム化リストに従って割り当てられた。ブロックサイズは研究者に対して開示されなかった。介入期の間、患者は、プロバイオティクス製剤を含む1カプセル又は全く同じ外見のプラセボを、4週間、毎日服用した。割り当ては患者及び病院スタッフの双方に対して隠された。

20

【0055】

治療の終了期（外来3、43日目）に、コンプライアンスを確認するために未使用の研究用製品及び空の包装を研究者が回収した。日記が回収され、精査された。

30

【0056】

栄養補助なしのウォッシュアウト期後（訪問4、57日目）に完全な身体診察が行われ、血液検体が採取された。非常時の薬剤としてピサコジル及びロペラミドが許可された。研究用製品の効能に影響を与えうる他のプロバイオティクス及び薬剤は許可されなかった。

【0057】

3.4 プロバイオティクスの調製

栄養補助剤は、適正製造基準（GMP）条件下で調製された。B・ビフィドゥムMIMBb75は蛋白質が豊富な液体増殖培地中で増殖させ、遠心によって回収し、安定化させ、冷凍乾燥し、摩砕し、篩分した。乾燥粉末状の細菌は薬理学上許容可能な化合物と混合され、 1×10^9 cfuのカプセルに充填した。プラセボカプセルは全く同じ外見であり、マルトデキストリンを含んでいた。

40

【0058】

3.5 エンドポイントの定義

前向きに定義された第1の効果の変数は、7ポイントリッカートスケールを用いた被験者のIBS症状の全体的な評価であった。患者は毎日「あなたのIBSの症状（例えば腹痛/不快感、膨満/鼓脹、消化不良、緊急の便意、排便の習慣）を全体的に考えると、この24時間でどのくらいあなたはこれらの症状に影響されましたか。」という質問に答えるように言われた。可能な答えは0（全くない）から、1（非常に軽い）、2（軽い）、3（中程度）、4（強い）、5（非常に強い）、6（耐えられない）にわたった。

50

【 0 0 5 9 】

第2の効果の変数は、同じ7ポイントリッカートスケールで記録したIBSの個別の症状、例えば「腹痛／不快感」、「膨満／鼓脹」、「消化不良」及び「緊急の便通」などを含むものであった。個別の症状のスコアは、3つの個別の症状のスコアの相加平均として合成症状スコアに加法的に組み入れられた。さらに、減少した及び／又は増加した便通の回数、排便が不完全である感覚及び他の薬剤の服用が日記に毎日記録された。

【 0 0 6 0 】

治療の終了時に、そして研究の終了時に再度、医師から患者に効果の全体的な評価及び耐容性の評価に関する質問を行った。効果は次の質問で評価された。「あなたが、4週間の治療の間、あなたの全体的な生活状態、腹部不快感／腹痛や変化した排便の習慣といった症状についてどう感じたかを考えてください。研究用の薬剤を服用する前に普段感じていたのと比べて、最近4週間の症状の軽減をどう評価しますか。」可能な答えは「完全に軽減された(1)、かなり軽減された(2)、少し軽減された(3)、不変(4)又は悪化した(5)」であった。「完全に軽減された」及び「かなり軽減された」が「十分な軽減」と定義された。健康関連の生活の質は、SF-12調査票を用いて、治療の開始前と治療の終了後に評価された。

【 0 0 6 1 】

研究の全体にわたって有害事象が記録され、耐容性の全体的な評価については外来3及び4で質問された。スクリーニング外来時及び研究の終了時に臨床検査値及びバイタルサインが調べられた。

【 0 0 6 2 】

3.6 統計学的方法

3.6.1 標本サイズ推定

主観的包括的アセスメント(SGA)が、7ポイントリッカートスケール上で少なくとも20%減少したことは、適切な治療の効果であると考えられた。公開されたデータ(Whorwell, 2006年)に基づいて、B.ピフィドゥムMIMBb75とプラセボの間のIBS症状のSGAにおいて、7ポイントリッカートスケール上で0.6ポイントの差が予測された(例えばプラセボグループで3.0、ピフィドバクテリウム群で2.4)。同じデータを用いて標準偏差は1.0と推定された。これらの仮定に基づいて、両側の有意水準が $\alpha = 0.05$ であり、 $1 - \beta = 0.8$ の検出力のウィルコクソン-マン-ホイットニー検定で、各グループにつき47人の患者という標本サイズが必要であった。ランダム化後の脱落率が推定15-20%であることを考慮し、ランダム化される患者は110人を予定され、研究開始前にありうる辞退分を補うために、132人の患者が採用された。

【 0 0 6 3 】

3.6.2 統計学的解析

本研究の第1の目的は、ピフィドバクテリア群で、治療の終了時に全体的なIBSの症状のSGAをプラセボ群に対して有意に減少させることであった。各被験者についてSGAはベースライン、治療期間中及びウォッシュアウト期間中で相加平均として計算された。ベースラインの値に生じる差を補正するため、4週間の治療期間の平均スコアから、ならし期(1-2週目)の間の平均スコアを引いたものとして計算されたベースラインからの変化が、1次目標の基準として定められた。研究センターによって階層化されたノンパラメトリックなファン・エルターレン検定が治療群の比較に用いられた。 $P < 0.05$ が統計的に有意であると考えられた。

【 0 0 6 4 】

1次解析は、ランダム化に成功したすべての患者が含まれるintent-to-treat集団に基づいて行われた。欠けているベースライン後の値は、1次目標の基準のためのベースラインの値に帰せられ、これらの患者は非反応者として評価された。補助的な目的で、追加のプロトコル群分析が行われた。

【 0 0 6 5 】

2次目標の基準の記述的な分析は、入手可能なデータに基づいて行われた。治療の差は、連続的な変数にノンパラメトリックなウィルコキソン検定を行うか、2値変数にフィッシャー検定を行うことで検定した。すべてのpの値は両側のものである。

【0066】

第2の効果の変数は、治療の間の症状緩和の50%ルールに基づく反応を含んでいた（治療期間中、4週間のうち少なくとも2週間での改善であり、改善はベースラインから少なくとも1ポイントの減少として定義された）。すべての統計学的分析は、アメリカ合衆国、ノースキャロライナ州、ケーリー、SAS Institute Inc.によるウィンドウズのためのSASバージョン9.1.3を用いて行われた。

【0067】

10

3.7 結果

3.7.1 被験者

研究に合計132人の患者が含まれ、122人の患者がプラセボ（N=62）又はB.ピフィドゥムMIMBb75（N=60）のいずれかを投与されるようにうまくランダム化された。すべてのランダム化された患者がintent-to-treat（ITT）解析が行われた（N=122）。1人のランダム化後外来のなかった患者が有害事象の解析から除外された。合計103人（49プラセボ、54真薬）がプロトコル群として解析された（図2）。

【0068】

3.7.2 ベースライン特性

20

ベースライン特性としては、2群の間に有意差は存在しなかった。21.5%は下痢優位型IBS、19.8%が便秘優位型IBS、58.7%が両型として分類され、ビフィドバクテリウム群とプラセボ群で有意差が存在しなかった。

【0069】

人口統計は治療群間で均衡がとれており、67%の女性の患者を含み、平均体重が71kgで、対応するBMIは24であった。患者はプラセボ群で平均41歳であり、ビフィドバクテリウム群で平均37歳であった（表1）。

【表 1】

| | プラセボ | 真薬 | |
|---------------------------|---------------|---------------|----|
| | N (%) 又は平均±SD | N (%) 又は平均±SD | |
| N=122 (62+60) | | | |
| 年齢 | 40.98±12.80 | 36.65±12.42 | |
| 女性 | 41 (66.1) | 41 (68.3) | 5 |
| 身長 (cm) | 169.50±8.75 | 170.78±9.47 | 10 |
| 体重 (kg) | 70.79±15.54 | 70.45±16.02 | |
| BMI | 24.60±5.19 | 24.02±4.45 | |
| IBSタイプ (N=122 (61+60)) | | | |
| 下痢優位型 | 12 (19.4) | 14 (23.3) | 10 |
| 便秘優位型 | 15 (24.2) | 9 (15.0) | 20 |
| 両型 | 34 (54.8) | 37 (61.7) | |

Intent to treat (ITT) 集団の人口統計特性

SD - 標準偏差、BMI - 体重指数

【0070】

3.7.3 被験者のIBS症状についての主観的包括的アセスメント (SGA)

第1のエンドポイントは主観的包括的アセスメント日記上でIBS症状のSGAが減少することであった。7ポイントリッカートスケールを使用した上で、プラセボ群の-0.16ポイント[95%信頼区間(CI):-0.32; 0.00](ならし期の2.79から治療期の2.63)と比較して、B.ピフィドゥムMIMBb75は全体的なIBS症状を-0.88ポイントと有意に改善した[95%CI:-1.07; -0.69](ならし期の2.95から治療期の2.07)($p < 0.0001$)。週単位でのSGAの評価では、治療期の2週目から研究の終了時まで毎週、ピフィドバクテリウム群の患者について有意に有益な影響が示された(図3)。

【0071】

3.7.4 第2のエンドポイント

第2のエンドポイントは、7ポイントリッカートスケール上での個別のIBS症状、例えば「疼痛/不快感」、「膨満/鼓脹」、「消化不良」、「緊急の便意」、「減少した及び/又は増加した便通の回数」及び「排便が不完全である感覚」の変化を含んでいた。

疼痛/不快感については、治療期間中、プラセボ群の-0.18ポイント[95%CI:-0.35; -0.01]に対してB.ピフィドゥムMIMBb75は-0.82ポイント[95%CI:-1.01; -0.63]($p < 0.0001$)、膨満/鼓脹についてはプラセボ群の-0.21ポイント[95%CI:-0.37; -0.05]に対してB.ピフィドゥムMIMBb75は-0.92ポイント[95%CI:-1.15; -0.69]($p < 0.0001$)と有意な低減を示した。この低減はウォッシュアウト期を通じて維持された。緊急の便意は、プラセボ群の-0.21ポイント[95%CI:-0.35; -0.07]に対して-0.67ポイント[95%CI:-0.86; -0.48]($p < 0.0001$)と治療期間中には有意に低減されたが、ウォッシュアウト期中は続かなかった。排便の頻度及び排便が不完全である感覚については影響を検出することが

できなかった（図4）。

【0072】

週単位での個別のIBS症状、疼痛／不快感及び膨満／鼓脹の評価では、プラセボ群と比較して、治療期の2週目から研究の終了時まで毎週、ビフィドバクテリウム群の患者について有意に有益な効果が示された。ビフィドバクテリウム群とプラセボ群での緊急の便意についての有意差は4週目と6週目の間で示された（図5及び6）。

【0073】

消化不良は、外来での調査票の「便通満足度」の項目によって測定された。便通満足度は、治療後、プラセボ群での3.69から6.47の変化に対し、ビフィドバクテリウム群で3.89から2.44に低減した（ $p = 0.0002$ ）。低減はウォッシュアウトフェーズを通じて維持された（プラセボ群の3.47に対してビフィドバクテリウム群での2.33、 $p < 0.0001$ ）。

【0074】

3.7.5 合成スコア

個別のIBS症状（疼痛／不快感、膨満／鼓脹、緊急の便意）について合成スコアが計算された。ならし期には、スコアは両グループで類似していた。ビフィドバクテリウム群の患者は、B.ビフィドゥムMIMBb75の服用によって、プラセボ群に対して有意に有益な影響を受けていた（ビフィドバクテリウム群で-0.80、プラセボ群で-0.20； $p < 0.0001$ ）。この改善はウォッシュアウト期を通じて保たれていた（ビフィドバクテリウム群で-0.85；プラセボ群で-0.31； $p < 0.0001$ ）。

【0075】

3.7.6 治療反応者

総合的な反応者は、第1のパラメーター（IBS症状のSGA）について、リッカートスケール上少なくとも1ポイント、4週間の治療期間のうち少なくとも2週で（50%ルール）、週間平均スコアが改善している患者として定義された。腹痛の反応者は、同じ50%ルールを用いて「疼痛／不快感」の解析について少なくとも平均1ポイント改善しているものとして定義された。総合的な反応者の割合は、ビフィドバクテリウム群で56.7%であり、プラセボ群で21.0%のみであった（ $p = 0.0001$ ）。治療群間での差は、「疼痛／不快感」の症状のみを考慮したときには少し少なく、ビフィドバクテリウム群で反応者の割合が48.3%であり、プラセボ群で24.2%のみであった（ $p = 0.008$ ）（図7）。

【0076】

3.7.7 外来での全体的な効果

総合的な効果の評価としては、プラセボ群と比較してビフィドバクテリウム群で有意に改善していた。治療の終了時には、ビフィドバクテリウム群の患者の43.3%が十分な軽減を達成していたが、プラセボ群では8.1%のみであった（ $p < 0.0001$ ）。研究の終了時には、ビフィドバクテリウム群で46.7%、プラセボ群で11.3%の患者の十分な軽減が報告された（ $p < 0.0001$ ；図8）。

【0077】

3.7.8 健康関連の生活の質

SF-12総計スコアの評価では、ビフィドバクテリウム群において有意な生活の質の改善が示された。身体的な健康の総計スコアは、ベースラインと比較してビフィドバクテリウム群では3.99改善し、プラセボ群では1.08しか改善しなかった（ $p = 0.0185$ ）。精神的な健康の総計スコアは、ベースラインと比較してビフィドバクテリウム群で5.78改善し、プラセボ群でわずか1.58しか改善しなかった（ $p = 0.0083$ ）。

【0078】

3.7.9 有害事象

研究用製品との関連が疑われる有害事象の報告は36件のみであり、その13件がプラセボ群、23件が治療群であったが、B.ビフィドゥムMIMBb75対プラセボで副作

10

20

30

40

50

用の特性に有意な差は見いだされなかった。

【0079】

3.7.10 要約

B. ビフィドゥム MIMB b75 は、IBS 症状の主観的包括的アセスメント (SGA) をプラセボ群の -0.16 ポイントのみ [95% 信頼区間 (CI) : -0.32 ; 0.00] と比較して、-0.88 ポイントと有意に減少させた [95% CI : -1.07 ; -0.69] ($p < 0.0001$)。B. ビフィドゥム MIMB b75 はさらに個別の IBS 症状、疼痛 / 不快感、膨満 / 鼓脹、消化不良及び緊急の便意を有意に改善した。SF-12 総計スコアの評価では、ビフィドバクテリウム群内で有意に生活の質が向上したことが示された。さらに、ビフィドバクテリウム群の患者の 46.7% で十分な軽減が報告され、プラセボ群の患者では十分な軽減を報告したのは 11.3% のみであった ($p < 0.0001$)。総合的な反応者の割合はビフィドバクテリウム群で 56.7% であり、プラセボ群で 21.0% のみであった ($p = 0.0001$)。B. ビフィドゥム MIMB b75 は耐容性に優れており、有害事象はプラセボと異なるものではなかった。

【0080】

3.8 結論

B. ビフィドゥム MIMB b75 は全体的な IBS を効果的に軽減し、個別の IBS 症状も改善する。IBS に対する B. ビフィドゥム MIMB b75 の高い効果性と、良い副作用特性を考慮すると、B. ビフィドゥム MIMB b75 は IBS 治療の有望な候補である。

【0081】

このランダム化、二重盲検、プラセボコントロール研究は、B. ビフィドゥム MIMB b75 が IBS の治療において有益な効果を有するというを示す。本研究では、B. ビフィドゥム MIMB b75 は全体的な IBS 及びその関連症状、例えば疼痛 / 不快感及び鼓脹を、プラセボと比較して有意に改善した。さらに、B. ビフィドゥム MIMB b75 は生活の質も有意に改善した。これらの有益な影響は、服用なしのウォッシュアウト期を通じて維持された。総合的な反応者の割合は、プラセボ群の患者の 21.0% のみと比較して、ビフィドバクテリウム群で 56.7% と優勢であった ($p = 0.0001$)。研究の終了時には、ビフィドバクテリウム群の患者の 46.7% で、プラセボ群の患者では 11.3% のみで十分な軽減が報告された ($p < 0.0001$)。

【0082】

今日までに、数個の研究が IBS 及びその症状へのビフィドバクテリウム属の影響を検討している。しかしながら、有意な有益な影響を示すことができたものはわずかであった。さらに、発明者たちの知識によると、過敏性腸症候群の有意な軽減と、生活の質の改善を同時に示すことができるプロバイオティックな菌株はなかった。いくつかの研究は、標本サイズの小ささ及びランダム化における間違いによって効果を示すことができなかった可能性はあるが、複数の異なるプロバイオティックな菌株は、繰り返し、IBS の有意な改善を示さなかった。近年、Brenner et al. (2009 年) が IBS の治療におけるプロバイオティクスの効果性、安全性及び耐容性の評価を対象としたランダム化コントロール試験 (RCT) のシステマティックレビューを出版した。合計 16 の RCT が解析に含められた。これらの中で、例外的に 1 つのビフィドバクテリウム属の菌株が 2 つの適切にデザインされた研究において IBS 症状の改善に対して効果を示した。この発見は、プロバイオティクスの効果性は高度に菌株特異的であり、わずかの菌株のみが IBS において効果を示すことができるという事実に戻ることができる。

【0083】

結論として、B. ビフィドゥム MIMB b75 は全体的な IBS とその IBS 症状を改善するとともに、良い副作用特性を有している。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図 1】研究の概略図である。

【図2】研究フローの線図である。

【図3】週単位での、全体的なIBSの症状（SGAによる。0 - 6スケールによって記録）に対するプラセボとB. ビフィドゥムMIMb75の効果の比較である。ビフィドバクテリウム群対プラセボで、全体的なIBS症状の有意な改善を示している。

【図4】IBS症状の減少の、ベースラインから治療期の平均スコア変化での比較（B. ビフィドゥムMIMb75対プラセボ）を示す図である。

【図5】週単位での、疼痛／不快感（0 - 6リッカートスケールによって記録）に対するプラセボとB. ビフィドゥムMIMb75の効果の比較を示す図である。ビフィドバクテリウム群対プラセボで有意な改善を示している。

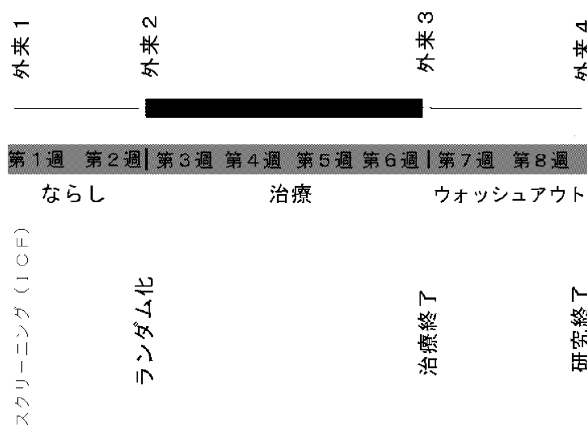
【図6】週単位での、膨満／鼓脹（0 - 6スケールによって記録）に対するプラセボとB. ビフィドゥムMIMb75の効果の比較を示す図である。ビフィドバクテリウム群対プラセボで有意な改善を示している。

【図7】治療期間中の総合的な反応者を示す図である（ITT）。

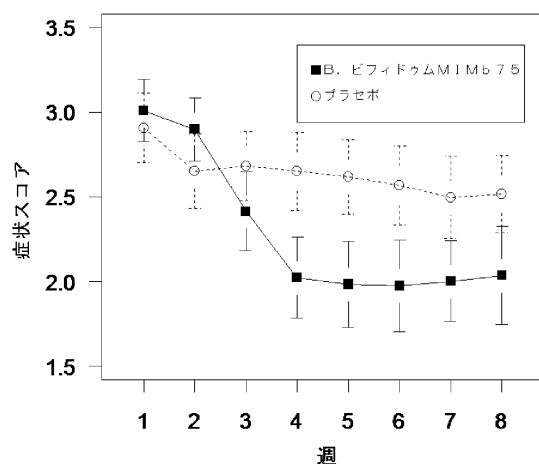
【図8】治療後の十分な軽減を示す図である（ITT）。

10

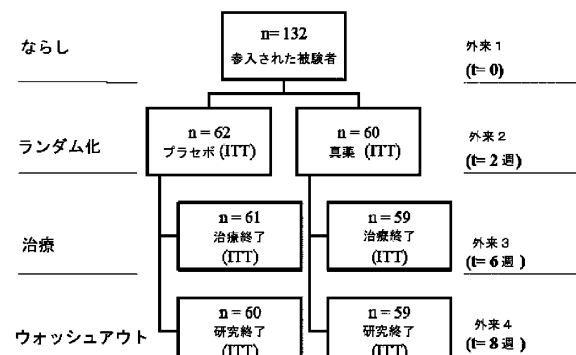
【図1】



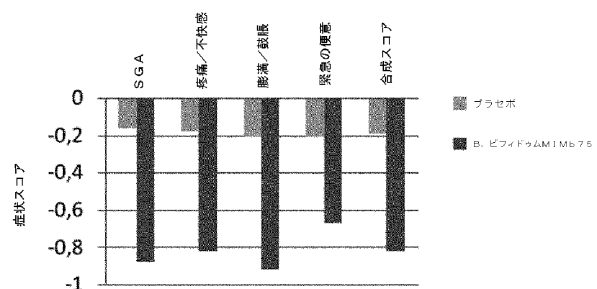
【図3】



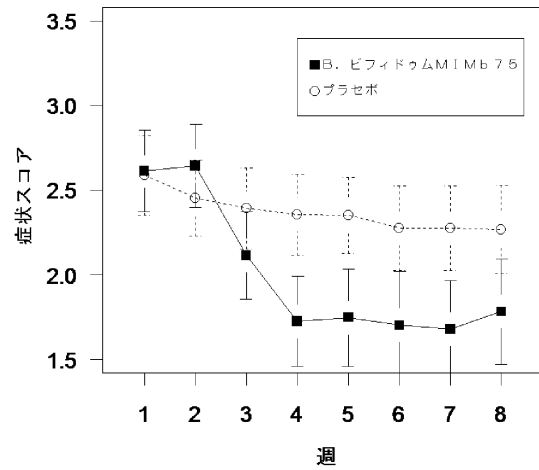
【図2】



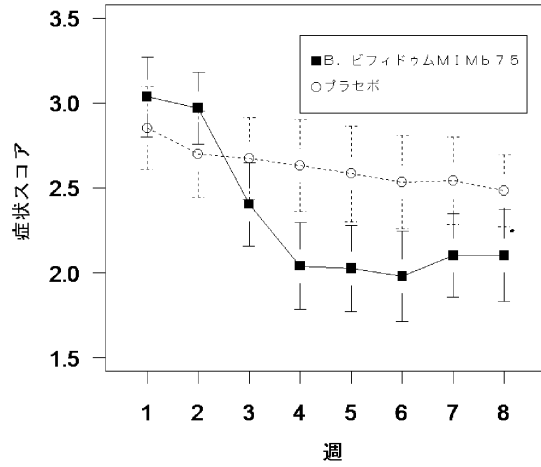
【図4】



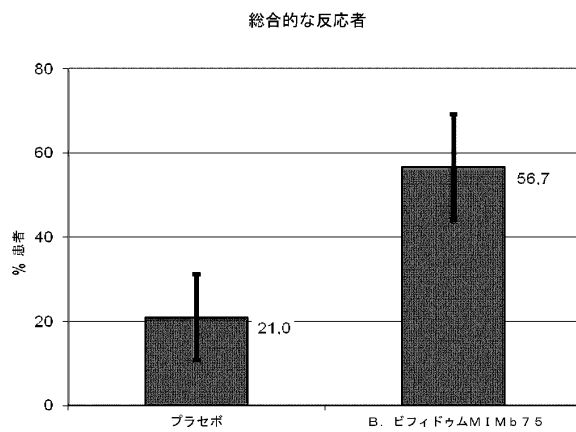
【図 5】



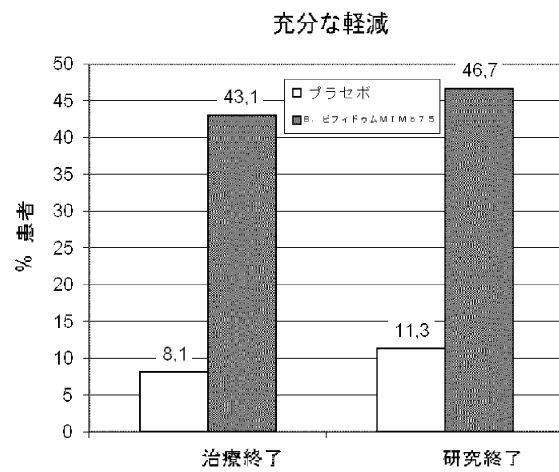
【図 6】



【図 7】



【図 8】



フロントページの続き

| | | |
|-------------|------------------|----------------|
| (51)Int.Cl. | | F I |
| A 6 1 K | 9/20 (2006.01) | A 6 1 K 9/20 |
| A 6 1 K | 9/14 (2006.01) | A 6 1 K 9/14 |
| A 2 3 L | 33/135 (2016.01) | A 2 3 L 33/135 |

(72)発明者 モーラ ディエゴ
 イタリア共和国、イ - 2 0 1 2 2 ミラノ、ヴィア フェスタ デル ペルドーノ 7、ユニヴェ
 ルシタ デッリ ストゥディ ディ ミラノ

審査官 田村 直寛

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 0 4 9 8 1 (J P , A)
 特表 2 0 0 8 - 5 4 1 7 5 7 (J P , A)
 Appl Environ Microbiol. 2008 Aug; 74(15): 4695-4702
 Curr Microbiol. 2009 Aug;59(2):167-72
 Gut and liver, (2009 Jun) Vol. 3, No. 2, pp. 101-7
 Progresso Medico, (1987) Vol. 43, No. 8, pp. 383-390
 Alimentary pharmacology & therapeutics, (2009 Jan) Vol. 29, No. 1, pp.97-103

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 A 6 1 K 3 5 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)