

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年1月16日(16.01.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/013239 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 1/20 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61K 35/741 (2015.01) C12N 1/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/027371

(22) 国際出願日: 2019年7月10日(10.07.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2018-131052 2018年7月10日(10.07.2018) JP

(71) 出願人: 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目
1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 福田 真嗣(FUKUDA, Shinji); 〒9970035
山形県鶴岡市馬場町 1 4 番 1 号 慶應義塾大
学先端生命科学研究室内 Yamagata (JP). 竹
内 奈穂(TAKEUCHI, Nao); 〒9970035 山形県
鶴岡市馬場町 1 4 番 1 号 慶應義塾大学先
端生命科学研究室内 Yamagata (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人酒井国際特許
事務所(SAKAI INTERNATIONAL PATENT
OFFICE); 〒1000013 東京都千代田区霞が
関 3 丁目 8 番 1 号 虎の門三井ビル
ディング Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,
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).

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関
する申立て(規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則5.2(a))

(54) Title: INTESTINAL BACTERIA HAVING PROLIFERATIVE CAPACITY IN RESPONSE TO D-PSICOSE

(54) 発明の名称: D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌

(57) Abstract: The present invention provides a novel drug or food product that produces a desired effect. More specifically, the present invention provides: intestinal bacteria having proliferative capacity in response to D-psicose; a drug or a food product that comprises the intestinal bacteria having proliferative capacity in response to D-psicose; a biological function-improving agent that comprises the intestinal bacteria having proliferative capacity in response to D-psicose; an intestinal bacteria culturing method that comprises culturing the intestinal bacteria in a culture medium containing D-psicose; a biological function-improving agent screening method involving the use of the intestinal bacteria having proliferative capacity in response to D-psicose; and the like.

(57) 要約: 本発明は、所望の作用を発揮することができる新規な医薬や食品を提供する。より具体的には、本発明は、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌; D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、医薬または食品; D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、生体機能改善剤; D-プシコースを含有する培地中で腸内細菌を培養することを含む、腸内細菌の培養方法; D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を用いる、生体機能改善剤のスクリーニング方法などを提供する。

WO 2020/013239 A1

明 細 書

発明の名称：D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌

技術分野

[0001] 人工甘味料は多くの飲料に含まれ、ゼロカロリーなどのフレーズから消費者は健康効果を期待している。しかし、人工甘味料は腸内細菌叢の組成と機能を変化させ耐糖能異常を引き起こす可能性が示唆されるなど、その安全性や効果が懸念されている（非特許文献1）。したがって、人工甘味料に代わる機能的な甘味料が求められている。

[0002] 希少糖の一つであるD-プシコース（別名 D-アルロース）は、スクロースの7割程度の甘味を持ちながらもカロリー量はゼロに近く、耐糖能の改善や抗肥満効果等の生体機能の改善作用をもたらすことなどが報告されている（非特許文献2、3）。また、D-プシコースは一部が吸収されずに消化管を通過し大腸に到達することが報告されている（非特許文献4、5）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapiro G, Thaïs CA, Mazza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature. 2014; 514 (7521) : 181-6.

非特許文献2：Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, et al. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. Nat Commun. 2

018;9(1):113.

非特許文献3: Hossain A, Yamaguchi F, Hirose K, Matsunaga T, Sui L, Hirata Y, et al. Rare sugar D-psicose prevents progression and development of diabetes in T2DM model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. Drug Des Devel Ther. 2015;9:525-35.

非特許文献4: Matsuo T, Tanaka T, Hashiguchi M, Izumori K, Suzuki H. Metabolic effects of D-psicose in rats: Studies on faecal and urinary excretion and caecal fermentation. Asia Pac J Clin Nutr. 2003;12(2):225-31.

非特許文献5: Iida T, Hayashi N, Yamada T, Yoshikawa Y, Miyazato S, Kishimoto Y, et al. Failure of d-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans. Metabolism. 2010;59(2):206-14.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、所望の作用を発揮することができる新規な医薬や食品を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、鋭意検討した結果、腸内に存在する特定の細菌がD-ブシコースによる生体機能の改善作用を担い得ることなどを見出し、本発明を完成するに至った。

[0006] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌。

〔2〕 アトポビアセア (*Atopobiaceae*) 科に属する腸内細菌である、〔1〕の腸内細菌。

〔3〕 配列番号1の塩基配列に対して90%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する、〔1〕または〔2〕の腸内細菌。

〔4〕 前記腸内細菌が、D-ブシコースを投与された哺乳動物の糞便から回収される腸内細菌である、〔1〕～〔3〕のいずれかの腸内細菌。

〔5〕 アトポビアセア (*Atopobiaceae*) 科に属する腸内細菌が、アトポビアセア・パルブルム (*Atopobium parvulum*) である、〔2〕の腸内細菌。

〔6〕 D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、医薬または食品。

〔7〕 D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、生体機能改善剤。

〔8〕 生体機能改善剤が代謝障害の予防または治療剤である、〔7〕の剤。

〔9〕 生体機能改善剤が抗肥満剤である、〔7〕または〔8〕の剤。

〔10〕 生体機能改善剤が抗糖尿病剤である、〔7〕または〔8〕の剤。

〔11〕 生体機能改善剤が経口用組成物または経直腸投与用組成物である、〔7〕～〔10〕のいずれかの剤。

〔12〕 D-ブシコースを含有する培地中で腸内細菌を培養することを含む、腸内細菌の培養方法。

〔13〕 D-ブシコースを含有する培地。

〔14〕 D-ブシコース、および腸内細菌を含有する腸内細菌培養物。

〔15〕 以下を含む、生体機能改善作用を有する物質のスクリーニング方法

:

(1) 被験物質を、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌に接触させること；

(2) D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を評価すること；および

(3) D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質を、生体機能改善作用を有する物質として選択すること。

発明の効果

[0007] 本発明の腸内細菌は、例えば、医薬または食品として、あるいは生体機能改善剤（例、抗肥満剤、抗糖尿病剤）として有用である。

本発明の培養方法は、例えば、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌の増殖または維持に有用である。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、D-プシコース様の生体機能改善作用を有する新規医薬または食品の開発、ならびに既存の作用に加え、D-プシコース様の生体機能改善作用をさらに有する複合的な作用を発揮できる医薬または食品の開発のために有用である。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、動物実験のスケジュールを示す図である。8週齢（0 week）の雄性C57BL/6Jマウス（計4群， $n=7$ ）に、それぞれ高脂肪食および水道水（Control）またはD-プシコース（D-psicose）含有水、またはそれらに加えて抗生物質を摂取させた（Control+Abx，D-psicose+Abx）。実験期間中は毎週、マウスの体重、摂水量、摂食量を測定し、糞便を採取した。解析には0および5週目のサンプルを用いた。9週目には、空腹時血糖値の測定を行った。11週後には、マウスを解剖した。

[図2]図2は、D-プシコース摂取による体重増加の抑制、および抗生物質処理による抑制効果の減少を示す図である。飼育開始（8週齢）から5週目（13週齢）における、体重の増加の平均（g）を示した（ $n=7$ ）。エラー

バーには標準偏差 (SD) を用いた。Control (white) : 高脂肪食+水道水、D-psicose (black) : 高脂肪食+5.0% D-psicose、Abx- : 抗生物質処理なし、Abx+ : 抗生物質処理あり。抗生物質は0.1% アンピシリンナトリウム、0.1% ネオマイシン硫酸塩、0.05% バンコマイシン塩酸塩。有意差検定は、スチューデントのt検定を用いて行った。P値が0.05以下の場合を有意とし、*で図示した。

[図3]図3は、D-プシコース摂取による空腹時血糖の上昇の抑制、および抗生物質処理による抑制効果の減少を示す図である。飼育開始から9週目における、15時間の絶食時の血糖値 (mg/dl) を示した (n=7)。エラーバーには標準偏差 (SD) を用いた。Control (white) : 高脂肪食+水道水、D-psicose (black) : 高脂肪食+5.0% D-psicose、Abx- : 抗生物質処理なし、Abx+ : 抗生物質処理あり。抗生物質は0.1% アンピシリンナトリウム、0.1% ネオマイシン硫酸塩、0.05% バンコマイシン塩酸塩。有意差検定は、スチューデントのt検定を用いて行った。P値が0.05以下の場合を有意とし、*で図示した。

[図4]図4は、D-プシコース摂取によるAtopobium属菌の増加を示す図である。飼育開始から5週目における糞便サンプル中のAtopobium属菌の相対存在量を示した。相対存在量は、全体のリード数におけるAtopobium属菌が占める割合として算出した。Control (white) : 高脂肪食+水道水、D-psicose (black) : 高脂肪食+5.0% D-psicose。有意差検定は、マンホイットニーのU検定を用いて行った。P値が0.05以下の場合を有意とし、 $P < 0.001$: ***と図示した。

[図5]図5は、今回見出された腸内細菌OTU (operational taxonomic unit) の16S rRNA遺伝子の塩基配列 (配列番号1) を示す図である。2度の動物試験において (合計n=12)、本塩基

配列と同一のOTUが検出された。

[図6]図6は、*Atopobium parvulum*定着による体重増加の抑制を示す図である。飼育開始（8週齢）から9週間における、体重の平均（g）を示した（ $n=5$ ）。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。GF（白・丸）：無菌マウス，*B. thetaiotaomicron*（黒・三角）：*Bacteroides thetaiotaomicron*（JCM 5827）定着マウス，*A. parvulum*（黒・丸）：*Atopobium parvulum*（JCM 10300）定着マウス。二元配置分散分析（two-way ANOVA）で $P<0.05$ の有意差が認められた場合，Tukey法による多重比較検定を行った。 $P<0.001$ を***で図示した。

[図7]図7は、*Atopobium parvulum*定着による精巣上体脂肪組織量の抑制を示す図である。飼育開始（8週齢）から9週間における、精巣上体脂肪組織の重量の平均（g）を示した（ $n=5$ ）。エラーバーは標準偏差（SD）を示す。GF（白）：無菌マウス，*B. thetaiotaomicron*（グレー）：*Bacteroides thetaiotaomicron*（JCM 5827）定着マウス，*A. parvulum*（黒）：*Atopobium parvulum*（JCM 10300）定着マウス。二元配置分散分析（two-way ANOVA）で $P<0.05$ の有意差が認められた場合，Tukey法による多重比較検定を行った。 $P<0.01$ を**で図示した。

発明を実施するための形態

[0009] 1. D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌

本発明は、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を提供する。

[0010] D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌とは、D-ブシコースを摂取した哺乳動物の腸内において、D-ブシコースの摂取に伴い有意に数が増加する腸内細菌をいう。

[0011] 本発明の腸内細菌は、アトポビアセア（*Atopobiaceae*）科に

属する腸内細菌であり得る。アトポビアセア (*Atopobiaceae*) 科に属する腸内細菌としては、例えば、アトポビウム (*Atopobium*) 属細菌〔例、アトポビウム・パルブルム (*Atopobium parvulum*)〕、オルセネラ属 (*Orsenella*) 細菌〔例、オルセネラ・ウムボナタ (*Orsenella umbonata*)〕が知られている。

[0012] 本発明の腸内細菌はまた、配列番号 1 の塩基配列に対して 90%以上の同一性を有する塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有することにより特徴付けることができる。好ましくは、塩基配列の同一性は、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上または 100%であってもよいが、好ましくは 97%以上、98%以上、99%以上または 100%である。OTU (例、16S rRNA 遺伝子の塩基配列) が 97%以上の同一性を示す場合、OTU は進化的に同一の菌種から構成されるといわれている。したがって、配列番号 1 の塩基配列に対して 97%以上の同一性を有する塩基配列を含む 16S rRNA 遺伝子を有する腸内細菌は、同一の菌種であると考えることができる。

[0013] ポリヌクレオチド (遺伝子) の同一性%の算出は、アルゴリズム *blastn* により行うことができる。より具体的には、ポリヌクレオチドの同一性%の算定は、NCBI において提供されているアルゴリズム *blastn* において、デフォルト設定の *Scoring Parameters* (*Match/Mismatch Scores* = 1, -2; *Gap Costs* = *Linear*) を用いて行うことができる。

[0014] 本発明の腸内細菌はさらに、生体機能改善作用を示すことができる。本発明の腸内細菌が示す生体機能改善作用は、D-ブシコースの生体機能改善作用と同様である。D-ブシコースの生体機能改善作用としては、例えば、代謝障害の予防または治療作用 (例、抗肥満作用、グルコース耐性の促進作用)、抗動脈硬化作用が挙げられる。したがって、本発明の腸内細菌は、この

ような作用からも特徴付けることができる。

[0015] 本発明の腸内細菌は、例えば、哺乳動物の糞便から得ることができる。哺乳動物としては、例えば、霊長類（例、ヒト、サル）、齧歯類（例、マウス、ラット、モルモット、ウサギ）、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタが挙げられる。哺乳動物としては、霊長類または齧歯類が好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。臨床応用のし易さの観点からは、ヒトがさらにより好ましい。本発明の腸内細菌は、このような哺乳動物の腸内に存在する細菌であるということができる。哺乳動物の糞便からの腸内細菌の回収方法は、周知である〔例、(i) Fukuda S et al., J Vet Med Sci., 2002 Nov; 64 (11) : 987-92、(ii) Fukuda S et al., J Gen Appl Microbiol., 2005 Apr; 51 (2) : 105-13、(iii) Sasaki D et al., Sci Rep., 2018 Jan 11; 8 (1) : 435〕。

[0016] また、本発明の腸内細菌を効率的に入手する観点からは、本発明の腸内細菌は、例えば、D-ブシコースを摂取（または投与）した哺乳動物の糞便から得ることができる。D-ブシコースの摂取量は、本発明の腸内細菌を増殖させることができる量（換言すれば、D-ブシコースの作用を発揮することができる量）である限り特に限定されず、対象となる哺乳動物種、摂取頻度および摂取期間などの因子によって変動し得るが、一日あたりの摂取量として、例えば0.05～100g/kg（体重）であり、好ましくは0.1～50g/kg（体重）であり、より好ましくは0.2～50g/kg（体重）である。

[0017] 2. D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、医薬または食品、および生体機能改善剤

本発明は、医薬または食品、および生体機能改善剤（以下、必要に応じて、本発明の製品と称する）を提供する。本発明の製品は、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む。

[0018] 本発明の製品に含まれる、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数は、摂取した哺乳動物に有益な作用をもたらし得る限り、特に限定されない。D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌は元々腸内に存在していた細菌であるので、たとえ哺乳動物の摂取量が少量であったとしても、腸内環境や個人差等の因子にもよるが、腸内で定着し増殖することができ、その作用を発揮することができる。したがって、本発明の製品に含まれる、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌は、少量でもその作用を発揮することができる。しかし、腸内への定着可能性の向上や速やかな作用の発現等の観点からは、本発明の製品に含まれる、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌は、一定量以上であることが好ましい。D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌について、1回単位あたりの摂取数は、例えば $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^9$ 細胞/kg（体重）であり、好ましくは $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^8$ 細胞/kg（体重）であり、より好ましくは $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/kg（体重）である。本発明の製品では、このような数の腸内細菌を、1個または複数個（例、2～6個）の固形物（例、カプセル、錠剤）に含有することができる。

[0019] 本発明の製品は、組成物の形態で提供されてもよい。D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む本発明の組成物は、さらにD-プシコースを含んでいてもよい。

[0020] 例えば、本発明の製品は、医薬組成物の形態で提供される場合、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌に加えて、医薬上許容され得る担体を含んでいてもよい。医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム-グリコールスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウ

ム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。本発明の医薬はまた、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌に加えて、他の生体機能改善剤を含んでもよい。このような生体機能改善剤としては、代謝障害の予防または治療剤（例、抗肥満剤、グルコース耐性の促進作用剤）、抗動脈硬化剤が挙げられる。

[0021] 本発明の製品が食品組成物の形態で提供される場合、D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌は、食品に添加された形態で提供されてもよく、あるいは、サプリメントのように主成分として用いられてもよい。食品としては、例えば、液状物（例、飲料、アルコール類）、半固形物（例、ヨーグルト、ゼリー）、固形物（例、スナック、チョコレート）が挙げられる。

[0022] 本発明の製品はまた、経口用組成物または経直腸投与用組成物であってもよい。経口用組成物としては、例えば、カプセル剤、錠剤、散剤、液剤が挙げられる。経直腸投与用組成物としては、例えば、液体製剤が挙げられる。経口用組成物は、好ましくは、腸への送達性に優れるように処方されてもよい。したがって、経口用組成物は、好ましくは、腸溶性の形態（例、腸陽性カプセル）において提供することができる。

[0023] 好ましくは、本発明の製品は、代謝障害の予防または治療剤である。D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌が有効に作用し得る代謝障害としては、例えば、肥満、糖尿病、動脈硬化、心不全が挙げられる。したがって、本発明の生体機能改善剤は、例えば、抗肥満剤、抗糖尿病剤、抗動脈硬化

剤、抗心不全剤として有用である。

[0024] 3. 腸内細菌の培養方法

本発明は、腸内細菌の培養方法を提供する。本発明の培養方法は、D-ブシコースを含有する培地中で腸内細菌を培養することを含む。

[0025] 腸内細菌としては、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含むものが好ましい。D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌は、他の腸内細菌との混合物の形態において、または他の腸内細菌との非混合物の形態において、培養することができる。例えば、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌が他の腸内細菌との混合物の形態において培養される場合、このような混合物は、哺乳動物の糞便から上述のとおり回収することにより入手することができる。

[0026] 本発明の培養方法は、D-ブシコースを含有することを除き、腸内細菌の培養に用いられる一般的な培地と同様の培地を用いて、腸内細菌の一般的な培養条件下で行うことができる。本発明の培養方法に用いられるD-ブシコースの濃度は、例えば0.01～10% (w/v) であり、好ましくは0.05～5% (w/v) であり、より好ましくは0.1～1% (w/v) である。腸内細菌の一般的な培地および培養条件は、周知である（例、(i) Fukuda S. et al., J Vet Med Sci., 2002 Nov; 64 (11): 987-92、(ii) Fukuda S. et al., J Gen Appl Microbiol., 2005 Apr; 51 (2): 105-13、(iii) Fukuda S. et al., Sci Rep., 2018 Jan 11; 8 (1): 435）。

[0027] 例えば、培地は、炭素源、窒素源、有機微量栄養源、ビタミン、無機イオン等の成分を含むことができる。炭素源としては、例えば、単糖類（例、グルコース）、二糖類、オリゴ糖類、多糖類等の炭水化物；ショ糖を加水分解した転化糖；グリセロール；メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸塩、一酸化炭素、二酸化炭素等の炭素数が1の化合物；コーン油、パーム油、大豆油

等のオイル；酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸；コハク酸、乳酸などの有機酸；動物油脂；動物オイル；飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸；脂質；リン脂質；グリセロ脂質；モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド等のグリセリン脂肪酸エステル；微生物性タンパク質、植物性タンパク質等のポリペプチド；加水分解されたバイオマス炭素源等の再生可能な炭素源；酵母エキス；馬血清；糞便抽出物；肉エキス；野菜エキス；胃内容物抽出物；又はこれらを組み合わせたものが挙げられる。窒素源としては、例えば、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水が挙げられる。有機微量栄養源としては、例えば、Ｌ－ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。ビタミンとしては、例えば、ビタミンＢ１、Ｂ２、Ｂ３、Ｂ６、Ｂ１２、Ｃ、Ｋ１が挙げられる。無機イオンとしては、例えば、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオンが挙げられる。

[0028] 培養条件について説明すると、例えば、培地における腸内細菌密度は、例えば $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$ 細胞／ｍＬであり、好ましくは $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞／ｍＬであり、より好ましくは $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 細胞／ｍＬである。培養温度は、例えば $30 \sim 40^\circ\text{C}$ である。培養期間は、例えば１～７日である。嫌氣的培養条件または好氣的培養条件のいずれも利用することができるが、嫌氣的培養条件が好ましい。嫌氣的培養条件下の酸素濃度は、例えば０～５％、好ましくは０～３％、より好ましくは０～２％、さらにより好ましくは０～１％である。

[0029] 本発明の培養方法は、例えば、Ｄ－ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌の増殖または維持に有用である。

[0030] 本発明はまた、本発明の培養方法に好適に用いることができる培地を提供する。本発明の培地は、Ｄ－ブシコースを含有する培地である。Ｄ－ブシコースの濃度は、上述したとおりである。また、このような培養培地がＤ－ブシコースの他に含んでいてもよい成分については、上述の培地の成分と同様

である。

[0031] 本発明はさらに、本発明の培養方法に好適に用いることができる、または本発明の培養方法により得られる腸内細菌培養物を提供する。本発明の腸内細菌培養物は、D-ブシコース、および腸内細菌を含有する。D-ブシコースの濃度は、上述したものと同様である。腸内細菌の密度は、培地における上述の腸内細菌密度と同様である。本発明の腸内細菌培養物がD-ブシコース、および腸内細菌の他に含んでいてもよい成分については、上述の培地の成分と同様である。

[0032] 4. 生体機能改善作用を有する物質のスクリーニング方法

本発明は、生体機能改善作用を有する物質のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、以下を含む：

- (1) 被験物質を、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌に接触させること；
- (2) D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を評価すること；および
- (3) D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質を、生体機能改善作用を有する物質として選択すること。

[0033] 工程(1)では、被験物質は、公知物質および新規物質を含む任意の物質である。このような被験物質としては、例えば、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、核酸（例、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）、糖質（例、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖）、脂質（例、飽和または不飽和の直鎖、分岐鎖および／または環を含む脂肪酸）、アミノ酸、蛋白質（例、オリゴペプチド、ポリペプチド、抗体またはその断片）、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

[0034] 被験物質とD-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌との接触は、インビトロ方法またはインビボ方法等の任意の様式で行うことができる。

[0035] 例えば、インビトロ方法における被験物質とD-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌との接触は、被験物質を含有する培地中におけるD-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌の培養により達成することができる。培地中の被験物質の濃度は、適宜調整することができる。例えば、効力が強い生体機能改善剤のスクリーニングが特に所望される場合、培地中の被験物質の濃度は、低濃度（例、 $1\text{ nM} \sim 10\text{ }\mu\text{M}$ ）に設定することができる。あるいは、特に効力が強い生体機能改善剤のスクリーニングが所望されない場合には、培地中の被験物質の濃度は、より高濃度（例、 $100\text{ nM} \sim 10\text{ mM}$ ）に設定されてもよい。培地中の腸内細菌の密度は、適宜設定することができる（例、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mL）。腸内細菌の培養培地および培養条件は、本発明の培養方法において上述したものと同様にして行うことができる。

[0036] また、インビボ方法における被験物質とD-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌との接触は、被験物質の哺乳動物への投与により達成することができる。被験物質の哺乳動物への投与により、哺乳動物の腸内において被験物質がD-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌と接触するためである。投与されるべき被験物質の量は、適宜調整することができる。例えば、効力が強い生体機能改善剤のスクリーニングが特に所望される場合、投与されるべき被験物質の量は、低量（例、 $0.05 \sim 10\text{ g/kg}$ ）に設定することができる。あるいは、特に効力が強い生体機能改善剤のスクリーニングが所望されない場合には、投与されるべき被験物質の量は、より高量（例、 $10 \sim 100\text{ g/kg}$ ）に設定されてもよい。哺乳動物としては、上述したものをを用いることができるが、霊長類または齧歯類が好ましく、ヒトまたはマウスがより好ましい。臨床応用のし易さの観点からは、ヒトがさらにより好ましい。

[0037] 工程（2）では、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数が評価される。このような腸内細菌数の評価は、例えば、腸内細菌数を直接カウントすることにより、または腸内細菌数を反映する別の指標を測定することにより

より、行うことができる。別の指標としては、このような腸内細菌に特異的なマーカー（例、16S rRNA遺伝子、またはそれが産生する特異的な物質）を利用することができる。例えば、16S rRNA遺伝子量を定量的PCR等の定量方法で解析することにより、このような腸内細菌数を評価することができる。

[0038] 工程（3）では、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質が、生体機能改善作用を有する物質として選択される。選択された被験物質は、D-ブシコース様の生体機能改善作用を示すことができる。このような生体機能改善作用としては、上述の生体機能改善剤について述べたものと同様である。

[0039] 特定の実施形態は、本発明のスクリーニング方法は、以下を含むインビトロ方法であってもよい：

（1）被験物質を、培地中において、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌に接触させること；

（2）D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を評価すること；および

（3）D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質を、生体機能改善作用を有する物質として選択すること。

[0040] 別の特定の実施形態は、本発明のスクリーニング方法は、以下を含むインビボ方法であってもよい：

（1）被験物質を投与された哺乳動物の糞便中に含まれるD-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を評価すること；および

（2）D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質を、生体機能改善作用を有する物質として選択すること。

[0041] さらに別の特定の実施形態は、本発明のスクリーニング方法は、以下を含むインビボ方法であってもよい：

（1'）被験物質を哺乳動物（例、非ヒト哺乳動物）に投与すること；

（2'）被験物質を投与された哺乳動物の糞便を回収すること；

(3') 糞便中に含まれるD-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を評価すること；および

(4') D-プシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質を、生体機能改善作用を有する物質として選択すること。

[0042] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、D-プシコース様の生体機能改善作用を有する新規医薬または食品の開発、ならびに既存の作用に加え、D-プシコース様の生体機能改善作用をさらに有する複合的な作用を発揮できる医薬または食品の開発のために有用である。

実施例

[0043] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0044] 実施例1：D-プシコース応答性増殖能を有する特異な腸内細菌の発見

(1) 実験手法

(a) 動物実験

6週齢の雄性C57BL/6Jマウス（日本クレア）を28匹用意し、通常食であるCE-2（日本クレア）と水道水を2週間摂取させ順化したのち、7匹ずつ4群（(i) 水道水投与群、(ii) D-プシコース水投与群、(iii) 水道水および抗生物質投与群、(iv) D-プシコース水および抗生物質投与群）に分け、8週齢で実験を開始した。エサは、全ての群において高脂肪食であるHFD32（日本クレア）を自由摂取させた。飲水は、水道水投与群は実験室の水道水とし、D-プシコース水投与群は実験室の水道水にD-プシコース（松谷化学工業）を5.0%（w/v）添加したものをを用いた。抗生物質投与群には、0.1%（w/v）アンピシリンナトリウム、0.1%（w/v）ネオマイシン硫酸塩、0.05%（w/v）バンコマイシン塩酸塩（いずれも和光純薬）を飲水に混合して投与した。実験期間中は毎週、マウスの体重、摂水量、摂食量を測定し、糞便を採取した。抗生物質の効果により腸内細菌を除去できていることを確認するため、抗生物質投与群から採取した糞便をPBSに懸濁してGAM培地（ニッスイ）

に塗布し、アネロパックを使用した嫌気条件において37℃で一晩静置し、培地上にコロニーが観察されないことを確認した。このことから、抗生物質の効果により腸内細菌を除去できていたと考えられる。実験開始から9週目（17週齢）において、糖尿病の指標となる空腹時血糖値の測定を行った。15時間の絶食後、尾の側面にシリンジ用のニードル（テルモ）で傷をつけ、血糖値測定器（ニプロ スタットストリップXP3）を用いて血糖値を測定した。実験開始から11週間後（19週齢）には、マウスを解剖した。動物実験の概要を図示した（図1）。

[0045] (b) DNA抽出

糞便サンプルを24時間以上凍結乾燥し、4個のφ3mmジルコニアビーズ（TOMY）を2mL破砕チューブに加え、Shake master Neo（バイオメディカルサイエンス）を用いて1500rpm、10分間の条件で破砕した。そこから10mgの糞便サンプルを計り取り、φ0.1mmジルコニアビーズ（TOMY）をおよそ100mg、400μLの1% SDSと400μLのフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）を加え、Shake master Neoを用いて、1500rpm、5分間の条件で攪拌した後に、17,800×g、5分間、室温の条件で遠心分離を行った。上清に再びフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）を加え、Micro mixer E-36（TAITEC）を用いて1分間攪拌した後に、17,800×g、5分間、室温の条件で遠心分離を行った。上清に40μLの3M sodium acetateと800μLの100% EtOHを加えた後に、-80℃で1時間静置した。17,800×g、10分間、4℃の条件で遠心分離した後に、EtOHを除き500μLの70% EtOHを加えた。再度17,800×g、10分間、4℃の条件で遠心分離した後に、Micro Vac（トミー精工）を用いて乾燥させ、TE10を100μL加えて攪拌した。そのうち80μLのDNA溶液にRnase（10mg/ml）を1μL加え、37℃の条件でオーバーナイトインキュベートした。そ

の後、 $120\mu\text{L}$ のPure Water、 $200\mu\text{L}$ のフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコールを加え、Micro mixer E-36で1分間攪拌し、 $17,800\times g$ 、5分間、室温の条件で遠心分離を行った。上清に $20\mu\text{L}$ の3M sodium acetate (pH5.2)と $400\mu\text{L}$ の100% EtOHを加えて氷上で15分静置した後に、 $17,800\times g$ 、10分間、 4°C の条件で遠心分離を行った。上清を除いた後に70% EtOHを $500\mu\text{L}$ 加え、 $17,800\times g$ 、10分間、 4°C の条件で遠心分離を2度行い、上清を除いた後に $50\mu\text{L}$ の1×TE Bufferを加え、Micro mixer E-36を用いて1分間攪拌し、DNAを溶解した。

[0046] (c) ユニバーサルプライマーを用いたPCRおよびPCR産物の精製、濃度定量

$10\text{ ng}/\mu\text{L}$ に希釈したDNA溶液サンプル $1\mu\text{L}$ をテンプレートとして、細菌の16S rRNA遺伝子のV1領域からV2領域を特異的に増幅するユニバーサルプライマー27F mod: $5' - \text{AGRGTTTGTATYMTGGCTCAG} - 3'$ (配列番号2) および338R: $5' - \text{TGCTGCCCTCCCGTAGGAGT} - 3'$ (配列番号3) を用いてPCRを行った。初期変性反応を 98°C で1分間、その後 98°C を10秒間、 55°C を15秒間、 68°C を30秒間の3ステップを20回繰り返し、最終伸張反応を 68°C で3分間行った。ポリメラーゼはTks Gflex DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いた。その後、PCR産物 $45\mu\text{L}$ に対して $81\mu\text{L}$ のAgencourt AMPure XP (ベックマン・コールター) を加えて精製を行い、Picogreen (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) を用いてDNA濃度を測定した。

[0047] (d) インデックスPCRおよびPCR産物の精製、濃度定量、およびシーケンス

(3) の結果からPCR産物のモル濃度を算出した。インデックスPCRで用いるテンプレートの濃度が 1 nM になるよう、各サンプルを希釈した。

MiSeq (Illumina) でのシーケンスに必要なアダプター配列およびインデックス配列を付加するため、インデックスPCRを行った。プライマーは、5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-NNNNNNNNN-TATGGTAATTGTAGRGTTTGTATYMTGGCTCAG-3' (配列番号4) および5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-NNNNNNNNN-AGTCAGTCAGCCTGCTGCCTCCC GTAGGAGT-3' (配列番号5) を用いた。なお、Nで記載した塩基配列がインデックス配列であり、サンプルごとに異なる配列を用いた。インデックスPCR条件は初期変性反応を98℃で1分間、その後98℃を10秒間、55℃を15秒間、68℃を30秒間の3ステップを8回繰り返し、最終伸張反応を68℃で3分間行った。ポリメラーゼはTks Gflex DNA Polymeraseを用いた。その後、PCR産物50μLに対して90μLのAgencourt AMPure XPを加えて精製を行い、Picogreenを用いてDNA濃度を測定した。この結果から、各サンプルを4nMに希釈した。その後、前処理行程を終えたサンプルを等量ずつ混合し、MiSeq (Illumina) の標準プロトコルに従いシーケンスを実施した。

[0048] (e) データ解析

まず、ペアエンドでシーケンスされた塩基配列をFLASH (version 1.2.11) によってアセンブルした。平均Q-valueが25以下の塩基配列は解析の対象から除外した。得られたデータは、Quantitative Insights into Microbial Ecology (Qiime) (version 1.9.1) を用いて解析した。その塩基配列のうち、相同性が97%以上でOperational Taxonomic Units (OTUs) を作成しRibosomal Database Project (RDP) のデータベースおよびNCBIのデータベース (16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)) と比較し、各O

TUの近縁種を推定した。

[0049] (f) 統計

統計解析は統計ソフトウェアのR (version 3.4.1) を用いた。まず、データが正規分布に従うことを確かめた後、2群間に等分散性が仮定できる場合にはスチューデントのt検定、できない場合にはウェルチのt検定を行った。正規分布に従わない場合には、マンホイットニーのU検定（ウィルコクソンの順位和検定）を行った。いずれもP値が0.05以下の場合に有意とした。

[0050] (2) 結果

体重測定の結果から、高脂肪食の摂取による体重増加がD-プシコースによって有意に抑制されることを明らかにした。3種混合の抗生物質を用いて腸内細菌を全て除去した2群においては、D-プシコースによる体重増加の抑制が見られなかった（図2）。また、糖尿病の指標となる空腹時血糖値の結果でも同様に、高脂肪食の摂取によって増加した血糖値が、D-プシコースの摂取によって有意に低下することが明らかになった。抗生物質を用いた群では、体重の結果と同様に有意差が見られなかった（図3）。以上から、D-プシコースの抗肥満効果は腸内細菌を介してもたらされている可能性が示唆された。さらに、次世代シーケンサーであるMiSeqを用いて糞便サンプル中の腸内細菌叢を解析した結果、D-プシコースの摂取によって今回見出された腸内細菌が有意に増加することが認められた（図4）。

[0051] 今回見出された腸内細菌は、OTUとして16S rRNA遺伝子の塩基配列（配列番号1）を有していた。そこで、この塩基配列をNCBIのblastnにより、「16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)」データベースを対象として解析したところ、最も類似性が高い細菌種はAtopobium parvulumであった（同一性：89%）。また、Olsenella umbonataも同スコアであった（同一性：89%）。Olsenella属菌は、Atopobium属菌と同じ科に属する近縁種であり、ま

た、*Atopobium*属菌および*Oseneilla*属菌はいずれも*Atopobiaceae*科に属する腸内細菌である。本解析手法においては一般的に97%以上の同一性をもって「同種」と判断するが、今回見出された腸内細菌はいずれも同一性が最高で89%であった。このことは、今回の研究で得られた腸内細菌種が*Atopobiaceae*科に属する未登録の腸内細菌種である可能性を示唆する。

[0052] 実施例2：D-ブシコース応答性増殖能を有する特異な腸内細菌の培養

D-ブシコース応答性増殖能を有する特異な腸内細菌を含む腸内細菌群を、参考文献（Fukuda S., J Vet Med Sci., 2002 Nov; 64 (11) : 987-92）にしたがい、D-ブシコース投与マウス（実施例1）の糞便から回収した。回収した腸内細菌群を、D-ブシコース含有培地中において嫌気的条件（酸素濃度：0%）下で37℃、2日間培養した。培養開始時の培地における腸内細菌密度は約 1×10^6 細胞/mLであった。培地中のD-ブシコースの濃度は、0.3%（w/v）であった。D-ブシコース以外の培地成分としては、Fukuda S. et al., J Gen Appl Microbiol. 2005 Apr; 51 (2) : 105-13に記載される培地の基礎成分、およびOkawara S. et al., J Nutr. 2005 Dec; 135 (12) : 2878-83に記載される短鎖脂肪酸およびビタミンを用いた（pH7.0）。

その結果、配列番号1の塩基配列を利用したメタゲノム解析により、D-ブシコース応答性増殖能を有する特異な腸内細菌の存在が確認された。

したがって、D-ブシコース含有培地において、D-ブシコース応答性増殖能を有する特異な腸内細菌を培養できることが示された。

[0053] 実施例3：D-ブシコース応答性増殖能を有する特異な腸内細菌の培養

(1) 概要

実施例1、2の結果から、希少糖摂取による体重増加の抑制、及び*Atopobium*属近縁菌の特徴的な増加が見出されている。そこで、無菌マウ

スに *Atopobium* 属近縁菌を経口投与し定着させたノトバイオートマウスを作製することにより、D-プシコース投与試験で特徴的に増加した腸内細菌による抗肥満効果の詳細な検討を試みた。

[0054] (2) 手法

(a) 菌液

本試験では、D-プシコース投与で増加した腸内細菌に近縁である *Atopobium parvulum* (JCM10300) を用いた。また、比較対照群として無投与群と *Bacteroides thetaiotaomicron* (JCM5827) 投与群を用いた。GAM液体培地10 mLを用いて、*Bacteroides thetaiotaomicron* は1日、*Atopobium parvulum* は2日、嫌気条件下で培養した。

[0055] (b) 動物試験

8週齢の雄性C57BL/6J系統・無菌マウスを5匹ずつ3群に分けた〔(i) 無菌群, (ii) *Bacteroides thetaiotaomicron* 定着群, (iii) *Atopobium parvulum* 定着群〕。直前に用意した菌液を200 μ Lずつ経口投与した。全ての群において、エサは γ 線滅菌された高脂肪食であるD12492（リサーチダイエツト社：60 kcal%脂肪含有量、ラード使用、（高脂肪食 High Fat Diet））、飲水は滅菌した水道水を自由摂取させた。実験期間中は毎週、マウスの体重、摂水量、摂食量を測定し、糞便サンプルを採取した。菌液投与3、5、7、14、21日後には、糞便サンプルをGAMプレート培地で培養し、菌が定着したことを確認した。試験開始9週後（17週齢）には、イソフルラン麻酔下で解剖した。

[0056] (c) 統計

統計解析は統計ソフトウェアのR (version 3.4.1) を用いた。二元配置分散分析 (two-way ANOVA) で $P < 0.05$ の有意差が認められた場合、Tukey法による多重比較検定を行った。

[0057] (3) 結果

体重測定の結果から、高脂肪食の摂取による体重増加量は、無菌群や *Bacteroidetes thetaiotaomicron* 定着マウスと比較して、*Atopobium parvulum* 定着マウスで有意に抑制されることが明らかとなった（図6）。また、解剖時の精巣上体脂肪組織の重量においても、同様の傾向が認められた（図7）。このことから、プシコース摂取によって腸内で増加する *Atopobium* 属近縁菌が、抗肥満効果を有することが明らかとなった。

請求の範囲

- [請求項1] D－ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌。
- [請求項2] アトポビアセア (*A t o p o b i a c e a e*) 科に属する腸内細菌である、請求項1記載の腸内細菌。
- [請求項3] 配列番号1の塩基配列に対して90%以上の同一性を有する塩基配列を含む16S rRNA遺伝子を有する、請求項1または2記載の腸内細菌。
- [請求項4] 前記腸内細菌が、D－ブシコースを投与された哺乳動物の糞便から回収される腸内細菌である、請求項1～3のいずれか一項記載の腸内細菌。
- [請求項5] アトポビアセア (*A t o p o b i a c e a e*) 科に属する腸内細菌が、アトポビアセア・パルブラム (*A t o p o b i u m p a r v u l u m*) である、請求項2記載の腸内細菌。
- [請求項6] D－ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、医薬または食品。
- [請求項7] D－ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌を含む、生体機能改善剤。
- [請求項8] 生体機能改善剤が代謝障害の予防または治療剤である、請求項7記載の剤。
- [請求項9] 生体機能改善剤が抗肥満剤である、請求項7または8記載の剤。
- [請求項10] 生体機能改善剤が抗糖尿病剤である、請求項7または8記載の剤。
- [請求項11] 生体機能改善剤が経口用組成物または経直腸投与用組成物である、請求項7～10のいずれか一項記載の剤。
- [請求項12] D－ブシコースを含有する培地中で腸内細菌を培養することを含む、腸内細菌の培養方法。
- [請求項13] D－ブシコースを含有する培地。
- [請求項14] D－ブシコース、および腸内細菌を含有する腸内細菌培養物。
- [請求項15] 以下を含む、生体機能改善作用を有する物質のスクリーニング方法

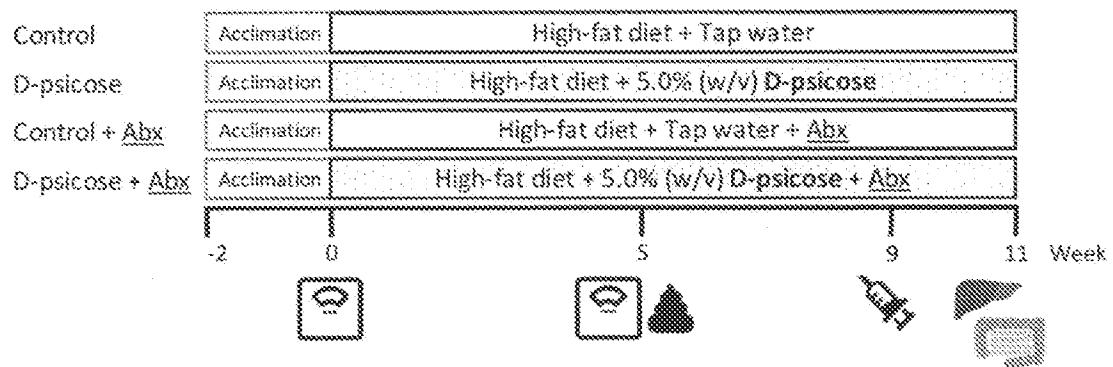
:

(1) 被験物質を、D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌に接触させること；

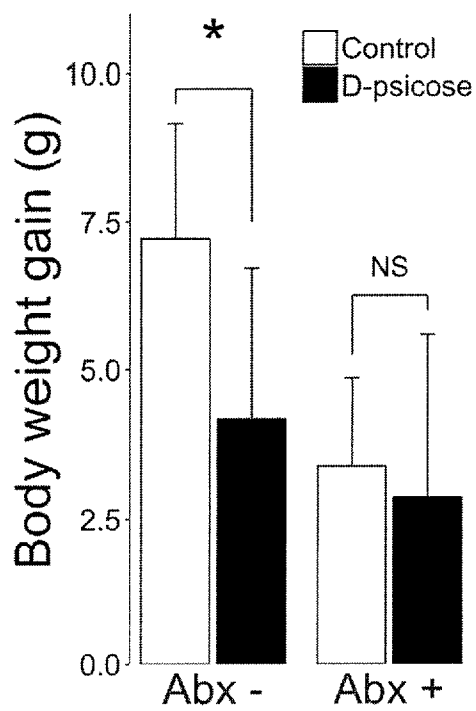
(2) D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を評価すること；および

(3) D-ブシコース応答性増殖能を有する腸内細菌数を増加させる被験物質を、生体機能改善作用を有する物質として選択すること。

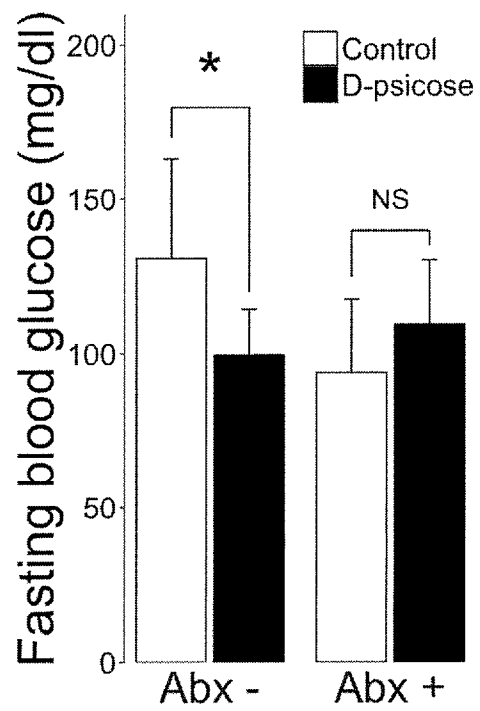
[図1]



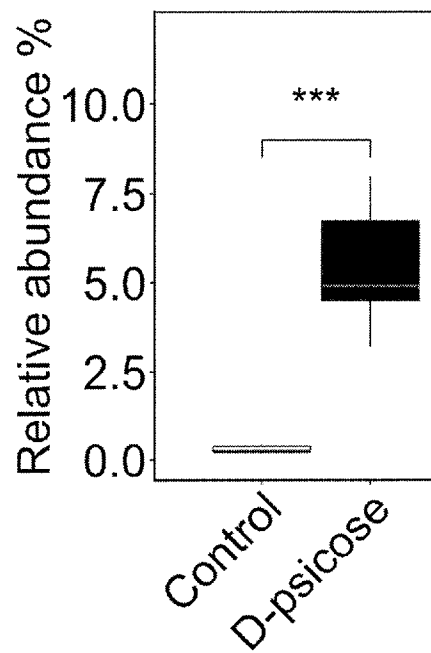
[図2]



[図3]



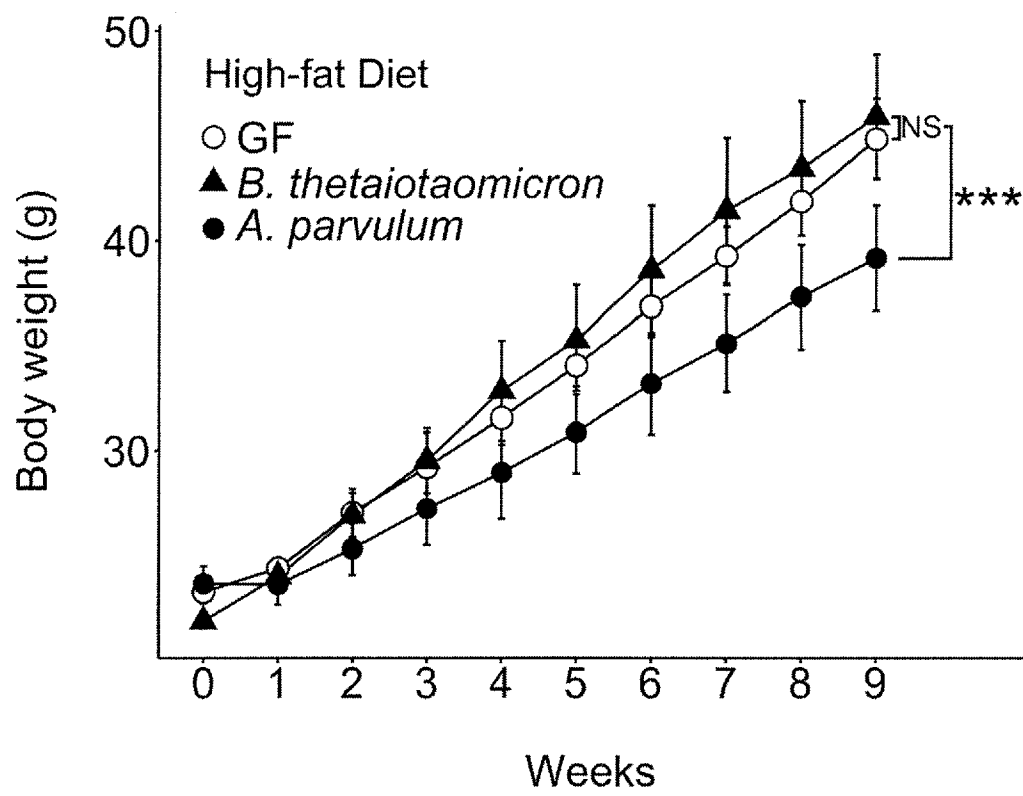
[図4]



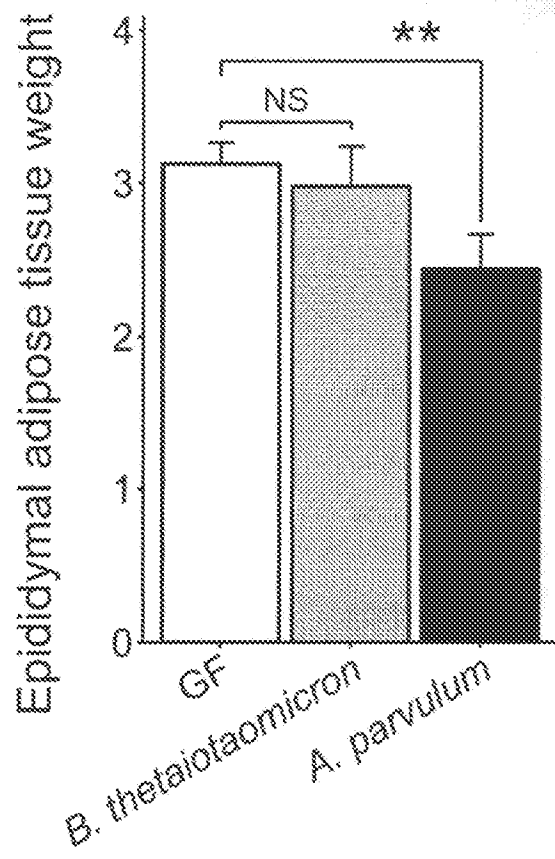
[図5]

GATGAACGCTGGGGGGGCGCTAACACATGCAAGTCGAACGAGAAGCACTCTTGGAGGTGTGGATAGTGGGAAAGGCTGAGTAACACGTGGGCAACC
TGCCCTCTCATCGGGATAGCCTGGGAAACGGGGATAATACCGGATACTCCAACGCTTTGCATGGAAGCGTTGGGAAAGCTCTGGGGAGAGGGATG
GGCCCGGGGCTGTTAGCTAGTTGGCGGGTAAAGGCCAACAAGGCTTCTATGGGTAGCCGGTTGAGAGACGACCGCCAGATTGGGACTGAGACAC
GGCCAG (配列番号1)

[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/027371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N1/20(2006.01)i, A23L33/135(2016.01)i, A61K35/741(2015.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12Q1/02(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)

Int.Cl. C12N1/20, A23L33/135, A61K35/741, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/10, C12N1/00, C12Q1/02

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/GeneSeq, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$	JP 2015-500802 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 08 January 2015, claims, examples, paragraphs [0018], [0021], [0023] & US 2014/0329286 A1 & US 2014/0329286 A1, paragraphs [0016], [0021], [0023] & EP 2787071 A1	$\frac{1-5, 12-15}{6-11}$
$\frac{X}{Y}$	WO 2017/029245 A1 (PFEIFER AND LANGEN GMBH AND CO. KG) 23 February 2017, claims (Family: none)	$\frac{1-5}{6-11}$

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 30.07.2019	Date of mailing of the international search report 13.08.2019
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/JP2019/027371

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u>	US 2018/0169153 A1 (EVELO BIOSCIENCES, INC.) 21 June 2018, claims, paragraph [0295], table 1 & WO 2016/086206 A1	<u>14</u> 6-11
<u>X</u> <u>Y</u>	WO 2012/077038 A1 (DEGAMA BARRIER LTD.) 14 June 2012, claims & US 2013/0323362 A1 & EP 2648528 A1	<u>14</u> 6-11
Y	JP 2008-514582 A (MULTIGERM UK ENTERPRISES LTD.) 08 May 2008, claims & US 2011/0158949 A1, claims & WO 2006/035218 A1 & EP 1794283 A1	6-11
A	Database Genbank [online], Accession No.JX013092, < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX013092.1 >, 27 June 2012 uploaded, [retrieved 30 July 2019], BUTION, M. L. et al., Definition: Uncultured bacterium clone o18_PL15_1015D11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1-15
P, X	竹内奈穂ほか, [1P-0099]希少糖摂取による腸内細菌叢変化は抗肥満効果をもたらす, 第41回日本分子生物学会年会, 09 November 2018, (TAKEUCHI, Nao et al., [1P-0099]Rare sugar, D-psicose suppresses high-fat diet-induced obesity through gut microbiota alteration, The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan)	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/20(2006.01)i, A23L33/135(2016.01)i, A61K35/741(2015.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, C12N1/00(2006.01)i, C12Q1/02(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 (IPC))

Int.Cl. C12N1/20, A23L33/135, A61K35/741, A61P3/00, A61P3/04, A61P3/10, C12N1/00, C12Q1/02

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019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)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed

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 Y	JP 2015-500802 A (シージェイ チェルジェダン コーポレイション) 2015.01.08, 特許請求の範囲、実施例、[0018]、[0021]、[0023] & US 2014/0329286 A1 & US 2014/0329286 A1, [0016], [0021], [0023] & EP 2787071 A1	<u>1-5, 12-15</u> 6-11
X Y	WO 2017/029245 A1 (PFEIFER AND LANGEN GMBH AND CO. KG) 2017.02.23, Claims (ファミリーなし)	<u>1-5</u> 6-11

☒ 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

30.07.2019

国際調査報告の発送日

13.08.2019

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
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)

林 康子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

1195

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 Y	US 2018/0169153 A1 (EVELO BIOSCIENCES, INC.) 2018.06.21, Claims, [0295], Table 1 & WO 2016/086206 A1	<u>14</u> 6-11
X Y	WO 2012/077038 A1 (DEGAMA BARRIER LTD.) 2012.06.14, Claims & US 2013/0323362 A1& EP 2648528 A1	<u>14</u> 6-11
Y	JP 2008-514582 A (マルティジェーム ユーケイ エンタープライズィズ リ ミテッド) 2008.05.08, 特許請求の範囲 & US 2011/0158949 A1, Claims & WO 2006/035218 A1& EP 1794283 A1	6-11
A	Database Genbank[online], Accession No. JX013092, < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JX013092.1 >, 27-JUN-2012 uploaded, [retrieved 30 JULY 2019], BUTION, M.L., et al., Definition: Uncultured bacterium clone o18_PL15_1015D11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1-15
P, X	竹内奈穂ほか, [1P-0099]希少糖摂取による腸内細菌叢変化は抗肥満効果をも たらず, 第41回日本分子生物学会年会, 2018.11.09	1-15