

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年6月4日 (04.06.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/069219 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 1/20 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/073108
- (22) 国際出願日: 2007年11月29日 (29.11.2007)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治乳業株式会社 (MEIJI DAIRIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1368908 東京都江東区新砂 1丁目2番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 坪井 洋 (TSUBOI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 540 明治乳業株式会社 研究本部 Kanagawa (JP). 金子 紀子 (KANEKO, Noriko) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 540 明治乳業株式会社 研究本部 Kanagawa (JP). 佐藤 秋菜 (SATO, Akina) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 540 明治乳業株式会社 研究本部 Kanagawa (JP). 土屋 義信 (TSUCHIYA, Yoshinobu) [JP/JP]; 〒2500862 神奈川県小田原市成田 540 明治乳業株式会社 研究本部 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6階 Ibaraki (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:  
— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(54) Title: LACTIC ACID BACTERIA HAVING ACTION OF LOWERING BLOOD URIC ACID LEVEL

(54) 発明の名称: 血中尿酸値低減作用を有する乳酸菌

(57) Abstract: Various lactic acid bacteria were cultured in the presence of a purine body and the consumed amount of the purine body, the produced amount of degradation products of the purine body were measured, and a plurality of lactic acid bacteria which had a remarkable degradation ability of purine body were selected. Any of the lactic acid bacteria which were judged to have a high degradation ability of purine body by the selection was orally administered to rats raised with a purine body-containing feed, the general status of the rats and the blood uric acid level in the rats were determined, and the effect of administration of lactic acid bacteria on the serum uric acid level was studied. As a result, lactic acid bacteria: *Lactobacillus gasseri* OLL2959 and *Lactobacillus oris* OLL2779 which significantly reduce an increase of the serum uric acid level were found.

(57) 要約: プリン体存在下で各種乳酸菌を培養し、該プリン体の消費量および該プリン体分解物の生産量を測定し、プリン体分解能の顕著な複数の乳酸菌を選抜した。上記選抜によってプリン体分解能が高いと判断された乳酸菌を、プリン体含有飼料で飼育したラットに経口投与し、当該ラットの一般状態および血清尿酸値を測定し、乳酸菌投与による血清尿酸値への影響を検討した。その結果、血清尿酸値の上昇を有意に抑える乳酸菌: *Lactobacillus gasseri* OLL2959および *Lactobacillus oris* OLL2779を見出した。

WO 2009/069219 A1

## 明 細 書

### 血中尿酸値低減作用を有する乳酸菌

#### 技術分野

[0001] 本発明は、血中尿酸値低減作用を有する乳酸菌およびその利用方法に関し、また、乳酸菌を含む高尿酸血症の予防および／または治療用の食品または医薬品に関する。

#### 背景技術

[0002] 高尿酸血症は、環境要因(生活習慣)や遺伝的要因により、尿酸排泄低下や尿酸産生過剰がおこり、血中の尿酸が過剰になった状態である。高尿酸血症は自覚症状がない場合もあるが、痛風、腎機能障害、尿路結石、動脈硬化症といった深刻な合併症を引き起こす。高尿酸血症の代表的合併症である痛風は、激痛を伴う急性関節炎が主症状として現れる。過去には、痛風は「帝王の病気」と呼ばれており、肉や魚、アルコールなどを頻繁に多く摂取する層の「ぜいたく病」であったが、近年では、食生活の変化によって年々増加傾向にある。現在の日本における痛風の患者数は30～40万人、高尿酸血症の患者数は推定600万人といわれており、高尿酸血症の予防および治療への関心が高まっている。

[0003] 高尿酸血症の予防および治療は、食事療法、運動療法、医薬品およびこれらの組み合わせで血中の尿酸値をコントロールすることによって行われる。特に、摂取カロリー制限は高尿酸血症の予防および治療方法として最も選択される方法の一つであるが、厳しいカロリー制限を継続することは必ずしも容易ではない。このような状況を改善する方法として、プリン体を分解する乳酸菌、酵母などの微生物を経口的に(例えば医薬品、飲食品として)摂取させて、腸管内で食事から摂取されたプリン体を分解し、その体内への吸収を減少させ、血清尿酸値を低減させる方法が提案されている(特許文献1、非特許文献1)。乳酸菌は古くから食品や医薬品として利用されており、人体への安全性も高いため、乳酸菌摂取は副作用の懸念の低い、高尿酸血症を予防・治療するための有効な方法となり得る。また、上述の通り、高尿酸血症の予防および治療法の第一選択は食事療法であり、尿酸値のコントロールを可能とする乳酸

菌を食品として摂取できれば、極めて現実的かつ有力な新規な高尿酸血症の予防および／または治療法となり得る。しかしながら、上記文献で報告された、プリン体分解能を有する乳酸菌：Lactobacillus fermentum、Lactobacillus pentosusはガス生産能を有しており、飲食品や医薬品への応用という観点からは必ずしも適当な菌種とはいえない。

特許文献1：WO2004/112809

非特許文献1：日本農芸化学会ホームページ 日本農芸化学会年次大会講演発表データベース ([http://isbba.bioweb.ne.jp/jsbba\\_db/index.html](http://isbba.bioweb.ne.jp/jsbba_db/index.html)) 「日本農芸化学会 2004.03.30 一般講演、池永武、久米村恵 他：食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす乳酸菌の影響」

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は上記状況を鑑みてなされたものであり、本発明が解決しようとする課題は、飲食品や医薬品用途に適した、高尿酸血症の予防および／または治療の可能な乳酸菌を提供することであり、また同時に、上記乳酸菌を用いた高尿酸血症の予防および／または治療用組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0005] 上記課題を解決すべく、本発明者らは鋭意努力を重ねた。まず、イノシンおよびグアノシン存在下で各種乳酸菌を培養し、上記ヌクレオシドの消費量および分解物(ヒポキサンチン、グアニン)の生産量を測定し、ヌクレオシド分解能の顕著な複数の乳酸菌を選抜した。上記選抜によってヌクレオシド分解能が高いと判断された乳酸菌を、プリン体含有飼料で飼育したラットに経口投与し、当該ラットの一般状態および血清尿酸値を測定し、乳酸菌の投与による血清尿酸値への影響を観察した。その結果、血清尿酸値の上昇を有意に抑える乳酸菌：Lactobacillus oris OLL2779およびLactobacillus gasseri OLL2959を見出した。さらに本発明者らは、上記乳酸菌を用いてヨーグルトを調製し、上記乳酸菌がヨーグルトを含む食品の加工用として適していることを確認した。本発明の乳酸菌は、血清尿酸値の上昇を抑制するため、高尿酸血症や痛風の予防および／または治療用の医薬品として有効に利用できる。また、本発

明の乳酸菌は、その血清尿酸値の上昇抑制効果が経口投与による実験で確認されており、さらに実際の食品加工に適していることも確認されているため、食品として利用できる点で有用性が著しく高い。すなわち、本発明は高尿酸血症の予防および／または治療の可能な乳酸菌およびその利用に関し、具体的には、以下の発明を提供するものである。

- (1) プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、Lactobacillus 属乳酸菌、
- (2) Lactobacillus gasseriである、上記(1)記載の乳酸菌。
- (3) プリン体分解能を有する、Lactobacillus oris乳酸菌、
- (4) Lactobacillus gasseri OLL2959 (受託番号:NITE BP-224)である、上記(2)記載のLactobacillus 属乳酸菌、
- (5) Lactobacillus oris OLL2779 (受託番号:NITE BP-223)である、上記(3)記載のLactobacillus 属乳酸菌、
- (6) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、血中尿酸値上昇抑制用の飲食品、
- (7) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、血中尿酸値上昇抑制用の医薬品、
- (8) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、高尿酸血症の予防および／または治療用の医薬品、
- (9) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、高尿酸血症の予防および／または治療用の飲食品、
- (10) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を投与することを特徴とする、食品から摂取するプリン体量を抑制する方法、
- (11) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を投与することを特徴とする、血中尿酸値上昇を抑制する方法、
- (12) 飲食品の原料または中間製品を上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物に接触させる工程を含む、プリン体量が低減化された飲食品の製造方法、

(13) 上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を投与することを特徴とする、高尿酸血症、痛風、腎機能障害、尿路結石、および動脈硬化症からなる群のいずれか1以上の疾患または症状を治療および／または予防する方法、

(14) 投与対象における血中尿酸値上昇抑制用の飲食品および／または医薬品を製造するための、上記(1)から(5)のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物の使用。

#### 図面の簡単な説明

[0006] [図1]プリン体(イノシン)存在下で各種乳酸菌を培養したときの、各乳酸菌のプリン体分解能を示す図である。プリン体分解率が高いと認められた菌株(星印)を、モデル動物実験対象とした。

[図2]プリン体(グアノシン)存在下で各種乳酸菌を培養したときの、各乳酸菌のプリン体分解能を示す図である。プリン体分解率が高いと認められた菌株(星印)を、モデル動物実験対象とした。

[図3]L. fermentumおよびL. brevis乳酸菌のプリン体分解能を、(ヒポキサンチン量+グアニン量)/5-ブロモウラシル量で評価した図である。

[図4]プリン体分解能の高い乳酸菌(L. fermentum、L. brevis)を食事性高尿酸血症モデル動物に経口投与し、血清尿酸値を測定した結果を示す図である。

[図5]プリン体分解能の高い乳酸菌(L. oris、L. gasseri)を食事性高尿酸血症モデル動物に経口投与し、血清尿酸値を測定した結果を示す図である。L. oris OLL2779株投与群(第7群)は投与開始後2日目および5日目において、L. gasseri OLL2959株(第9群)は投与開始後5日目において、血清尿酸値上昇の有意な抑制が観察された(図中の#)。

#### 発明を実施するための最良の形態

[0007] 本発明は、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、Lactobacillus 属乳酸菌に関するものである。本発明は、プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しないLactobacillus 属乳酸菌(以下において、「本発明のLactobacillus 属乳酸菌」とも称する)が本発明者らによって初めて見出されたことに基づくものである。

- [0008] *Lactobacillus* 属は、乳酸菌の代表的な属の一つで、80種以上の種を含む。*Lactobacillus*属に含まれる種の例として、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *burgalicus*、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*、*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus crispatus*、*Lactobacillus amylovorus*、*Lactobacillus gallinarum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus oris*、*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus brevis*を挙げることができる。本発明の*Lactobacillus* 属乳酸菌はプリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、*Lactobacillus* 属乳酸菌である限りいずれの種であってもよいが、好ましくは、*Lactobacillus gasseri*である。
- [0009] プリン体は、核酸を構成する成分であり、プリンde novo合成、サルベージ回路、食餌中の核タンパク質等によって生体に供給され、不要なプリン体は肝臓において代謝されて排出される。尿酸は、ヒト、高等霊長類、鳥類、爬虫類等におけるプリン体の最終代謝産物である。
- [0010] 本明細書においてプリン体とは、プリン骨格を有する化合物である。プリン体の代表例として、プリンヌクレオチド(アデニル酸、デオキシアデニル酸、グアニル酸、デオキシグアニル酸)、プリンヌクレオシド(アデノシン、デオキシアデノシン、グアノシン、デオキシグアノシン)、プリン塩基(アデニン、グアニン)、プリン塩基を含むオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドを挙げることができる。プリン塩基は、核酸を構成する他、ATP、GTP、cAMP、cGMP、補酵素A、FAD、NAD等の多様な生体成分を構成する。本明細書においては、プリン骨格を有する限り、このような生体成分も全てプリン体に含まれる。
- [0011] 生体内におけるプリン体は、尿酸に代謝される。プリン体が尿酸まで至る代謝経路は広く知られている。AMPは5'-ヌクレオチダーゼによってアデノシンとなり、アデノシンはイノシンを経てヒポキサンチンとなる。GMPは、5'-ヌクレオチダーゼによってグアノシンとなった後、グアニンとなる。ヒポキサンチンはキサンチンオキシダーゼによって、またグアニンはグアニンデアミナーゼによって、いずれもキサンチンに代謝され、さらにキサンチンはキサンチンオキシダーゼによって尿酸となる。

- [0012] 本発明においてプリン体分解能とは、少なくとも一つのプリン体を分解する能力をいい、分解産物がプリン骨格を有するかどうかは問わない。すなわち、あるプリン体を分解してプリン骨格を有さない化合物にする能力も、あるプリン体を分解して別のプリン体(プリン骨格を有する化合物)にする能力も、本発明におけるプリン体分解能に含まれる。
- [0013] 本発明のLactobacillus属乳酸菌は、公知方法によって分離することができる。例えば、ヒト等の哺乳類の糞便から菌を培養し、培養した菌の形状、生理学的特徴等からLactobacillus属を分離し、プリン体分解能およびガス生産能の有無を検出し、プリン体分解能を有し、かつガス生産能を有しないLactobacillus属を選別することで単離可能である。プリン体分解能の検出およびガス生産能の検出は公知方法によって可能であり、一例を示せば、本実施例の方法により可能である。
- [0014] 本発明のLactobacillus属乳酸菌を培養するには、一般的に乳酸桿菌の培養に適した培地であれば良く、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フルクトース、トレハロース、スクロース、マンノース、セロビオース等の炭素源、肉エキス、ペプトン、イーストエキス、カゼイン、ホエータンパク質等の窒素源、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、硫酸マンガン等の無機栄養素を含む培地を用いることができる。好適な例の一つとして、Lactobacilli MRS Broth (Difco)を挙げることができる。培養条件は、腸内乳酸菌が生育し得る条件であれば、特に制限はないが、好ましい条件としては、例えば、pH5.0-pH8.0、温度20°C-45°Cであり、より好ましい条件としては、嫌気性、pH5.0-pH7.0、温度30°C-40°Cである。
- [0015] 本発明者らは、後述するとおり、本発明のLactobacillus属乳酸菌をモデル動物に経口投与し、該乳酸菌に血中尿酸値の上昇を抑制する効果があることを確認した。したがって、本発明のLactobacillus属乳酸菌は、血中尿酸値の上昇抑制のために、または高尿酸血症の予防および/または治療のために利用することができる。さらに本発明のLactobacillus属乳酸菌のプリン体分解能を利用して、プリン体量が低減化された食品を製造することも可能と考えられる。
- [0016] 本発明の「プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、Lactobacillus属乳酸菌」の具体例として、受託番号:NITE BP-224で特定されるLactobacillus gasseri OLL295

9を挙げることができる。本発明者らは、多数の乳酸菌についてプリン体分解能およびガス生産能の有無を検討し、*Lactobacillus gasseri* OLL2959と名付けた*Lactobacillus*属乳酸菌が、プリン体分解能を有し、ガス生産能を有しないことを具体的に見出した。さらにin vivo実験によって、*Lactobacillus gasseri* OLL2959が血中の尿酸値上昇を有意に抑制することを突き止めた。本発明者らは、上記菌株を、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託した。以下に、寄託を特定する内容を記載する。

(イ) 寄託機関: 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(所在地: 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 郵便番号292-0818)

(ロ) 原寄託日: 2006年3月31日

国内寄託からブタペスト条約に基づく寄託への移管日: 2007年11月21日

(ハ) 受託番号:

*Lactobacillus gasseri* OLL 2959株(受託番号NITE BP-224)

[0017] また、本発明は、プリン体分解能を有する、*Lactobacillus oris*乳酸菌に関するものである。本発明は、プリン体分解能を有し、*Lactobacillus oris* 乳酸菌(以下において、「本発明の*Lactobacillus oris*乳酸菌」とも称する)が本発明者らによって初めて見出されたことに基づくものである。

[0018] 本発明の*Lactobacillus oris*乳酸菌は、本発明の*Lactobacillus*属乳酸菌の分離・培養について上記の通り説明した方法と同様の方法によって、分離・培養できる。また、本発明の*Lactobacillus oris*乳酸菌も、血中尿酸値の上昇抑制のために、または高尿酸血症の予防および/または治療のために利用することができる。

[0019] 本発明の「プリン体分解能を有する、*Lactobacillus oris*乳酸菌」の具体例として、受託番号:NITE BP-223で特定される*Lactobacillus oris* OLL2779を挙げることができる。本発明者らは、多数の乳酸菌の中から、プリン体分解能を有する乳酸菌として、*Lactobacillus oris* OLL2779を見出し、さらに、in vivo実験によって、*Lactobacillus oris* OLL2779が血中の尿酸値上昇を有意に抑制することを突き止めた。本発明者らは、上記菌株を、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託した。以下に、寄託を特定する内容を記載する。



(イ) 寄託機関: 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター

(所在地: 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 郵便番号292-0818)

(ロ) 原寄託日: 2006年3月31日

国内寄託からブタペスト条約に基づく寄託への移管日: 2007年11月21日

(ハ) 受託番号:

Lactobacillus oris OLL 2779株 (受託番号NITE BP-223)

[0020] 本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌は、血中尿酸値上昇抑制用の飲食品または医薬品、高尿酸値血症の予防および/または治療用の医薬品または飲食品の製造に用いることができる。

[0021] 本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌を用いて作る飲食品は、カテゴリーや種類に制限はなく、機能性食品、特定保健用食品、健康食品、介護用食品でも良く、また、菓子、乳酸菌飲料、チーズやヨーグルト等の乳製品、調味料等であっても良い。飲食品の形状についても制限はなく、固形、液状、流動食状、ゼリー状、タブレット状、顆粒状、カプセル状など、通常流通し得るあらゆる飲食品形状をとることができる。上記飲食品の製造は、当業者の常法によって行うことができる。上記飲食品の製造においては、乳酸菌生育を妨げない限り、糖質、タンパク質、脂質、食物繊維、ビタミン類、生体必須微量元素(硫酸マンガン、硫酸亜鉛、塩化マグネシウム、炭酸カリウム、等)、香料やその他の配合物を添加することもできる。

[0022] 本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌、これらの該乳酸菌含有物および/またはその処理物(例えば、培養物、濃縮物、ペースト化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物、液状物、希釈物、破砕物)は、上記の通り乳製品・発酵乳を含む一般飲食品に加工できる他、ヨーグルトやチーズ等の乳製品・発酵乳の製造用スターターとして利用することも可能である。スターターとする場合は、本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌の生息・増殖に支障がない限り、また、乳製品製造に支障がない限り、他の微生物が混合されていても良い。例えば、ヨーグルト用乳酸菌として主要な菌種であるLactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus、Streptococcus thermophilus、Lacto

bacillus acidophilus等と混合しても良く、その他、一般にヨーグルト用やチーズ用として用いられる菌種と混合してスターターとすることができる。上記スターターによる乳製品、発酵乳の製造は、常法に従って行うことができる。例えば、加温・混合・均質化・殺菌処理後に冷却した乳または乳製品に、上記スターターを混合し、発酵・冷却することにより、プレーンヨーグルトを製造することができる。

[0023] 本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができるが、好ましい投与方法は、経口投与である。経口投与製剤としては、周知の各種剤型とすることができ、例えば、顆粒剤、散剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、トローチ剤等の剤型とすることができる。また、当業者に周知の方法で腸溶性製剤とすることにより、胃酸の効果を受けることなく、本発明のLactobacillus属乳酸菌をより効率的に腸まで運ぶことも可能である。

[0024] 本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌を用いて製造された医薬品および飲食品は、飲食品中の同菌の作用によって、血中尿酸値上昇抑制効果や高尿酸値血症の予防および／または治療効果を発揮するものと期待できる。

[0025] また本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌のプリン体分解能を利用して、プリン体量が低減化された飲食品を製造することも可能である。本発明のプリン体量が低減化された飲食品の製造方法は、本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌を飲食品の原料または中間製品に接触させる工程を含む。この工程により、該原料または中間製品に含まれるプリン体の量を効率よく低減させることが可能となる。上記工程は、本発明のLactobacillus属乳酸菌および本発明のLactobacillus oris乳酸菌が生存可能な条件で行なわれることが好ましい。本発明の製造方法は、上記工程のほか、粉碎工程、混合工程、乾燥工程、殺菌および充填工程など、目的とする飲食品の通常の製造工程を含むことができる。本発明の方法によって製造される飲食品は、そのカテゴリーや種類に制限はなく、例えば機能性食品、特定保健用食品、健康食品、介護用食品でも良く、さら

に一般の食品、例えば嗜好品に分類される食品であってもよいが、プリン体摂取量の制限が必要な疾患または症状の患者あるいは、上記疾患または症状予備軍の日常的または補助的飲食品として特に有用である。本発明の方法は、プリン体摂取量の制限が必要な、またはプリン体摂取量の抑制を希望する人々が本来はプリン体量が多い食品を摂取し、その栄養素や風味を享受することを可能にする。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

## 実施例

[0026] 以下、本発明を実施例に基づき、より具体的に説明する。もともと本発明は、下記実施例に限定されるものではない。尚、実施例中、菌株名にJCMと記載された菌株は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターの微生物材料開発室から入手した基準株、菌株名にATCCと記載された菌株は、American Type Culture Collectionから入手した基準株、菌株名にMEPと記載された菌株は明治乳業株式会社保有菌株である。

[0027] [実施例1] 乳酸菌の尿酸低減作用に関するin vitroの実験方法

各種乳酸菌について、プリン体分解能の有無を以下の方法によって検討した。

各種の乳酸菌(菌体)をDifco Lactobacilli MRS Broth (BD製)培地を用いて、酸素吸着剤「アネロパック」(三菱ガス(株)製)と共に密閉容器に入れ、温度37°Cにて一晚嫌気培養した。培養後の菌体懸濁液を回転数3000rpm、温度4°Cにて10分間遠心分離して菌体を沈殿回収(集菌)した。

この菌体から $1 \times 10^9$  CFU/mLの菌体懸濁液を0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液で調製した。

各種の菌体懸濁液を調製した後に、イノシンとグアノシンをそれぞれが1.25mMになるように各種の菌体懸濁液に加えた。これらの菌体懸濁液を37°Cの恒温槽へ入れ、水平回転数140rpmにて30分間あるいは2時間振とう培養した。

振とう培養後の菌体懸濁液(反応液)について、ヌクレオシドの消費量と、ヌクレオシドの分解物である塩基(ヒポキサンチンとグアニン)の生成量を、5-ブロモウラシルを内部標準としてHPLCにて測定した。移動相Aの780  $\mu$ Lに、反応液200  $\mu$ L、内部標

準として5-ブロモウラシル(1.6 mg/mL) 20  $\mu$  Lを加えて混合した。この混合液をフィルター(孔径0.45  $\mu$  m)で濾過した後に、透過液50  $\mu$  LをHPLCに注入した。HPLCの具体的な操作条件は以下の通りである。

- [0028] HPLC : Waters alliance 2690  
 カラム : CAPCELL PAK C<sub>18</sub> SG120、粒子径 5  $\mu$  m、カラムサイズ 4.6×250 mm(資生堂)  
 移動相 : A : 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1% メタノール)  
 B : 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1% メタノール) / メタノール (75:25)  
 グラジエントA/B (min) : 100/0(0) – 100/0(10) –  
 20/80(20) – 20/80(25) – 100/0(26) – 100/0(40)  
 検出器 : フォトダイオードアレイ(Waters 996) 検出波長 254nm  
 流速 : 1 mL/min  
 カラム温度 : 常温

結果を図1～3に示す。各化合物の定量は、HPLCチャートのピーク面積値に基づき行った。更に図1及び図2の分解率は下式に従い算出した。

分解率 = 100 - (イノシンあるいはグアノシン量 / ブランクにおけるイノシンあるいはグアノシン量) × 100

また、図3の算出方法は以下の通りである。

(ヒポキサンチン量 + グアニン量) / 5-ブロモウラシル量

図1～3の結果から、ヌクレオシド分解能の顕著であると判断される乳酸菌を選抜した。

[0029] [実施例2] 乳酸菌の尿酸低減作用に関するin vivoの実験方法

先行文献(非特許文献1)に記載された方法に従い、食事性高尿酸血症モデル動物を作製し、該動物の血清尿酸値に及ぼす微生物(乳酸菌)の影響を検討した。上記方法は具体的には、オキソニン酸カリウムを2.5重量%とRNAを1.0重量%で含む混餌を調製して、ラットに摂取させ、摂取後からの血中尿酸値を陰性群や対照群と比較する方法である。本方法のモデル動物は、尿酸生成の阻害薬であるアロプリノールを経口投与した際に、該モデル動物の血中尿酸値が有意に抑制されることが明らかと

なっている(食品機能研究ニュース(第14号)、2005年3月9日発行、(株)メルシヤン クリントック環境検査センター、[http://www.m-cleantec.com/gizyutu/news\\_0503.html](http://www.m-cleantec.com/gizyutu/news_0503.html))。このことは、高尿酸血症に対する食品の有効性を評価する系として上記方法が有用であることを示している。

[0030] [2-1 材料および実験手順]

[微生物]

上記in vitro試験でヌクレオシド分解能が高いと判断された、*Lactobacillus fermentum* MEP181504株(以下において、場合により「*Lactobacillus*」を「L.」と略す)、*L. brevis* MEP181507株、*L. gaserri* JCM8787株、*L. gaserri* OLL2959株、*L. oris* OLL2779株の5株を使用した。各種の乳酸菌からin vitro試験と同様にして菌体懸濁液を調製した。菌体懸濁液を $1 \times 10^9$  CFU/10mL/kgでラットへ経口投与した。

[0031] [実験動物]

ラット(Wister SPF、雄、7週齢)を使用した。飼育(馴化と試験)には、ラット用プラスチックケージを使用し、1ケージ当たり1匹のラットを収容した。明暗サイクルは明期を午前7時～午後7時(12時間)とした。

[予備飼育(馴化)と群分け]

実験動物は搬入した後に1週間の予備飼育(馴化)を行った。馴化中には、餌(飼料)としてAIN-93G(オリエンタル酵母工業(株))、飲水として水道水を自由摂取させた。予備飼育したラット(入荷7日後、8週齢、0日目)を午前中に非絶食下で尾静脈より採血した。この血液を室温で30分以上放置した後に、回転数10000 rpmにて10分間遠心分離して血清を分取し、血清中の尿酸値をリンタングステン酸法にて測定した。

[0032] 群分けは各群の血清中の尿酸値が同等になるように行った。試験には、1群当たり5匹のラットを使用し、陰性群(第1、5群)、対照群(第2、6群)、菌体投与群(第3,4,7-9群)の合計9群を設定した。群名、餌、投与物(投与用量)、匹数などを以下に示す。

・陰性群(第1、5群):「AIN-93G」給餌、「生理食塩水」投与(10mL/kg)、5匹

・対照群(第2、6群):「オキシニン酸カリウムを2.5重量%、RNAを1.0重量%で混合したAIN-93G」給餌、「生理食塩水」投与(10mL/kg)、5匹

・菌体投与群(第3、4、7～9群):いずれの群も、「オキシニン酸カリウムを2.5重量%、RNAを1.0重量%で混合したAIN-93G」給餌、5匹。各群の投与菌体および投与量は

、

第3群は、「*L. fermentum* MEP181504株の懸濁液( $1 \times 10^8$  CFU/mL)」投与(10mL/kg)、

第4群は、「*L. brevis* MEP181507株の懸濁液( $1 \times 10^8$  CFU/mL)」投与(10mL/kg)、

第7群は、「*L. oris* OLL2779株の懸濁液( $1 \times 10^8$  CFU/mL)」投与(10mL/kg)、

[0033] 第8群は、「*L. gaserri* JCM8787株の懸濁液( $1 \times 10^8$  CFU/mL)」投与(10mL/kg)

、

第9群は、「*L. gaserri* OLL2959株の懸濁液( $1 \times 10^8$  CFU/mL)」投与(10mL/kg)

。

[0034] [本飼育(試験)]

群分けした後の翌日より試験期間とし、「AIN-93G」飼料(陰性群)と「AIN-93G+オキシニン酸カリウム+RNA」飼料(対照群、菌体投与群)をそれぞれ給餌器によりラットに8日間自由摂取させた。本飼料の給餌開始日を1日目とし、以後では日付と共に日数を起算した。「AIN-93G+オキシニン酸カリウム+RNA」飼料は、オキシニン酸カリウム(100g、ALDRICH)を2.5重量%とRNA(500g、MP Biomedicals. Inc.)を1.0重量%で含んでいる。菌体投与群の実験動物には、前記の菌体懸濁液を $1 \times 10^9$  CFU/10 mL/kgで強制経口投与した。陰性群と対照群には、菌体懸濁液ではなく、生理食塩水を10mL/kgで強制経口投与した。

[測定と検査等]

・一般状態の観察と体重の測定

全例(全群)において1日目から8日目の連日、投与時に一般状態を観察し、0日目、1日目、5日目、8日目の午前9～10時に定時で体重を測定した。

・摂餌量と摂水量の測定

全例(全群)において1日目(セット値)、5日目(残値、セット値)、8日目(残値)の午前9～10時に定時で摂餌量と摂水量を測定した。

- ・採血と生化学的検査

全例(全群)において0日目(午前中)、2日目(投与1時間後)、5日目(投与1時間後)、8日目(投与前)に尾静脈より採血した。採取した血液は、回転数10000 rpmにて10分間遠心分離して血清を分取し、血清中の尿酸値をリンタングステン酸法にて測定した。前記した通り、0日目では当日に血清中尿酸値を測定し、群分けに使用した。

- ・剖検と生化学的検査

全例(全群)において8日目に尾静脈より採血した後に、菌体懸濁液を経口投与した。投与1時間後にネンブタール麻酔(ペントバルビタール40mg/kg)状態にて、腹大動脈より全採血して致死させた。採取した血液は、回転数3000 rpmにて15分間遠心分離して血清を分取し、血清中のクレアチニン、尿酸、尿素窒素を測定した。

- ・臓器重量の測定

ラットの腎臓を摘出し、湿重量を測定した。

[0035] [統計処理]

結果は平均値±標準偏差で示し、対照群と菌体投与各群を比較した。数値化した検査値の分散比はF検定を行い、等分散の場合にはStudent's t-検定を、不等分散の場合にはAspin-Welch t-検定を行った。統計処理には、エクセル統計 2004 の統計解析を使用し、最低有意水準を両側5%とした。

[2-2 結果]

一般状態の結果を表1(L.fermentumとL.brevis)と表2(L.orisとL.gasseri)に、血清尿酸値の推移を図4および5に示す。

各種乳酸菌投与による血清中の尿酸値の低下について、図5に示すように、L.oris OLL 2779投与群およびL.gasseri OLL2959投与群において、有意差が認められた。一般状態は、いずれの群においても、腎機能(クレアチニン値、血清中尿素窒素、腎重量)に問題がなく、体重・摂餌量・摂水量もいずれの群も問題はなかった。また、一般状態の所見については、各種乳酸菌の間で有意差は観察されなかった。L.oris OLL2779およびL.gasseri OLL2959の科学的特徴を表3に示す。

[表1]

	第1群	第2群	第3群	第4群
試験期間中の体重増加量 (g)	28.6 ± 2.3	23.0 ± 2.9	20.0 ± 3.5	20.0 ± 3.7
試験期間中の摂餌量 (g)	106.9 ± 7.7	88.2 ± 3.9	82.7 ± 4.2	85.1 ± 6.3
試験期間中の摂水量 (g)	96.7 ± 15.1	192.2 ± 11.9	183.3 ± 12.7	190.8 ± 16.7
血清中クレアチニン値 (8日目) (mg/dL)	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0
血清中尿素窒素量 (8日目) (mg/dL)	15.5 ± 1.5	15.2 ± 2.4	16.3 ± 2.0	14.8 ± 1.7
腎絶対重量 (8日目) (g)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1



[表2]

	第5群	第6群	第7群	第8群	第9群
試験期間中の体重増加量 (g)	29.2 ± 2.8	18.4 ± 7.3	19.2 ± 1.4	18.6 ± 4.0	21.3 ± 4.5
試験期間中の摂餌量 (g)	102.8 ± 7.4	87.6 ± 4.7	87.8 ± 4.4	94.4 ± 12.3	87.9 ± 6.7
試験期間中の摂水量 (g)	108.0 ± 13.0	170.7 ± 15.3	173.0 ± 13.4	183.6 ± 8.1	168.2 ± 13.1
血中クレアチニン値 (8日目) (mg/dL)	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0
血清中尿素窒素量 (8日目) (mg/dL)	14.5 ± 1.1	14.5 ± 2.0	13.5 ± 0.7	15.1 ± 2.4	13.1 ± 1.4
腎絶対重量 (8日目) (g)	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1

[表3]

		ラクトバシラス ・ガセリ OLL2959 ( <i>L. gasseri</i> OLL2959) (NITE BP-224)	ラクトバシラス ・オリス OLL2779 ( <i>L. oris</i> OLL2779) (NITE BP-223)
培養条件		培養温度：37℃ 酸素要求性：通性嫌気	培養温度：37℃ 酸素要求性：通性嫌気
培地上のコロニー性状 ( <i>Lactobacilli</i> MRS Agar, DIFCO)		円形、淡黄色、 smooth型、扁平状	円形、淡黄色、 smooth型、扁平状
菌形態		桿菌	桿菌
グラム染色		陽性	陽性
乳酸発酵形式		ホモ乳酸発酵	ホモ乳酸発酵
好氣的発育		+	+
発育温度		15℃ - 45℃ +	15℃ - 45℃ +
糖 類 発 酵 性	アラビノース	-	+
	キシロース	-	+
	ラムノース	-	-
	リボース	-	+
	グルコース	+	+
	マンノース	+	-
	フルクトース	+	+
	ガラクトース	+	+
	スクロース	+	+
	セロビオース	+	-
	ラクトース	-	+
	トレハロース	-	-
	メリビオース	-	+
	ラフィノース	-	+
	メリチトース	-	-
	マンニトール	-	-
ソルビトール	-	-	
ガス産生		-	+

## [0036] [実施例3] 発酵乳の製造

(発酵乳の製造例1)

プレーンヨーグルトを*L. gasseri* OLL2959 (NITE BP-224)、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>

、*S. thermophilus* ATCC19258により調製した。まず、脱脂粉乳10%培地を用いて、*L. gasseri* OLL2959 (NITE BP-224)、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>、*S. thermophilus* ATCC19258のバルクスターターを調製した。次に、ヨーグルトミックス(無脂乳固形分(SNF): 9.5%、脂肪分(FAT): 3.0%)を95°C、5分間で加熱処理した。この加熱処理後のヨーグルトミックスに、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>と、*S. thermophilus* ATCC19258のスターターを各1%、*L. gasseri* OLL2959 (NITE BP-224)のスターターを5%で接種し、43°C、4時間で発酵して、プレーンヨーグルトを得た。このプレーンヨーグルトを冷蔵庫(5°C)で冷却してから、風味と物性を確認した。このとき、風味と物性はいずれも良好であった。

#### (発酵乳の製造例2)

プレーンヨーグルトを*L. oris* OLL2779 (NITE BP-223)、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>、*S. thermophilus* ATCC19258により調製した。まず、脱脂粉乳10%培地を用いて、*L. oris* OLL2779 (NITE BP-223)、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>、*S. thermophilus* ATCC19258のバルクスターターを調製した。次に、ヨーグルトミックス(無脂乳固形分(SNF): 9.5%、脂肪分(FAT): 3.0%)を95°C、5分間で加熱処理した。この加熱処理後のヨーグルトミックスに、*L. bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>と、*S. thermophilus* ATCC19258のスターターを各1%、*L. oris* OLL2779 (NITE BP-223)のスターターを5%で接種し、43°C、4時間で発酵して、プレーンヨーグルトを得た。このプレーンヨーグルトを冷蔵庫(5°C)で冷却してから、風味と物性を確認した。このとき、風味と物性はいずれも良好であり、*L. oris* OLL2779は食品の製造に好適に使用できることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

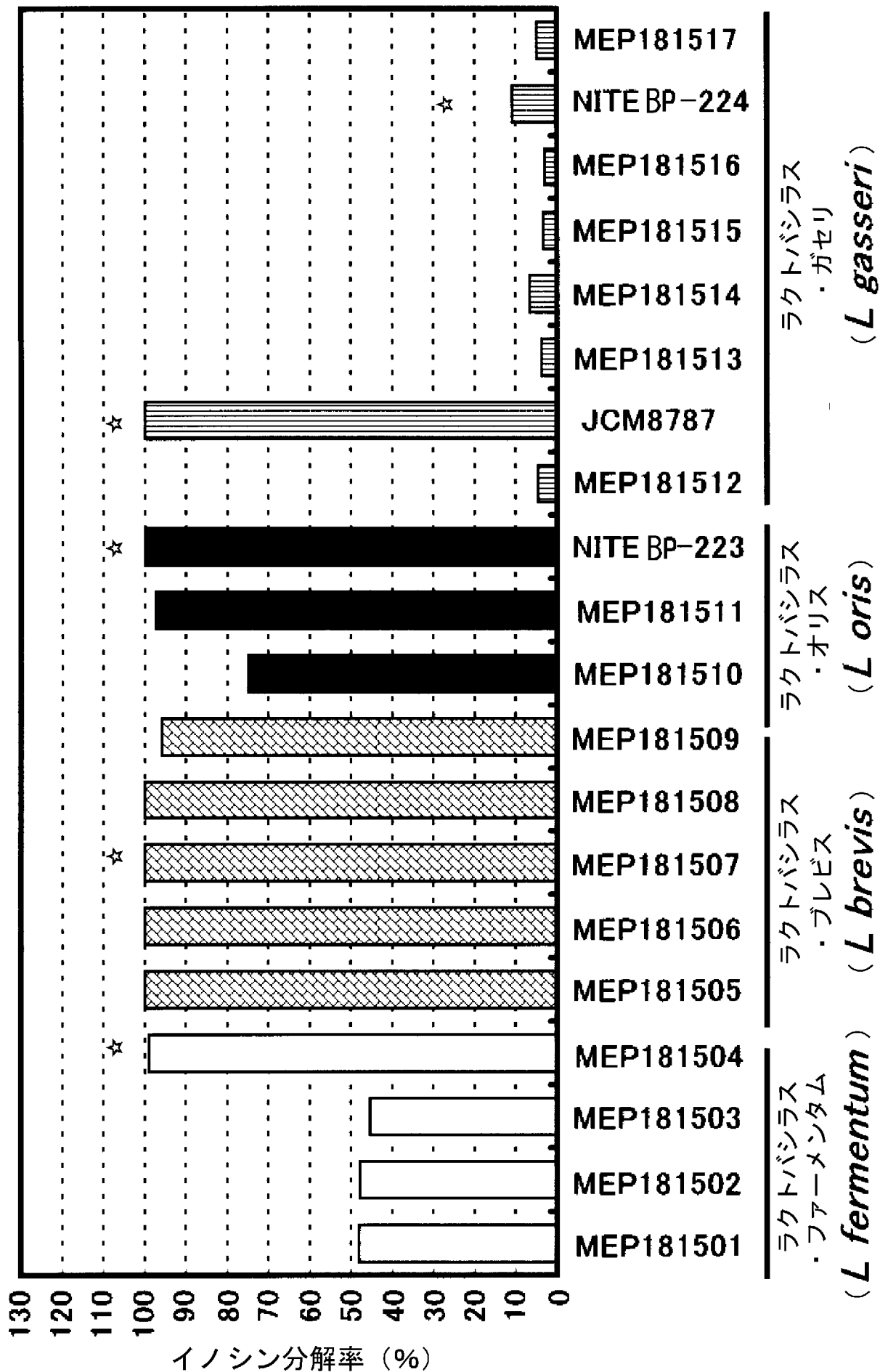
[0037] 本発明によって、血中尿酸値を低減可能な乳酸菌が提供された。本発明の乳酸菌を経口摂取することにより、血中尿酸値を低減することができるため、本発明の乳酸菌は痛風や高尿酸血症の予防および／または治療用の食品または医薬品として利用できる。特に、本発明の乳酸菌は、食品製造上、ガス産生による問題がないことが確認されている点で、実用化に適しているといえる。さらに、本発明の乳酸菌を利用すれば、プリン体量を低減させた加工食品の製造も可能になると考えられる。このように、本発明の乳酸菌は、食品および医薬品産業上、極めて有用性が高いといえる。

## 請求の範囲

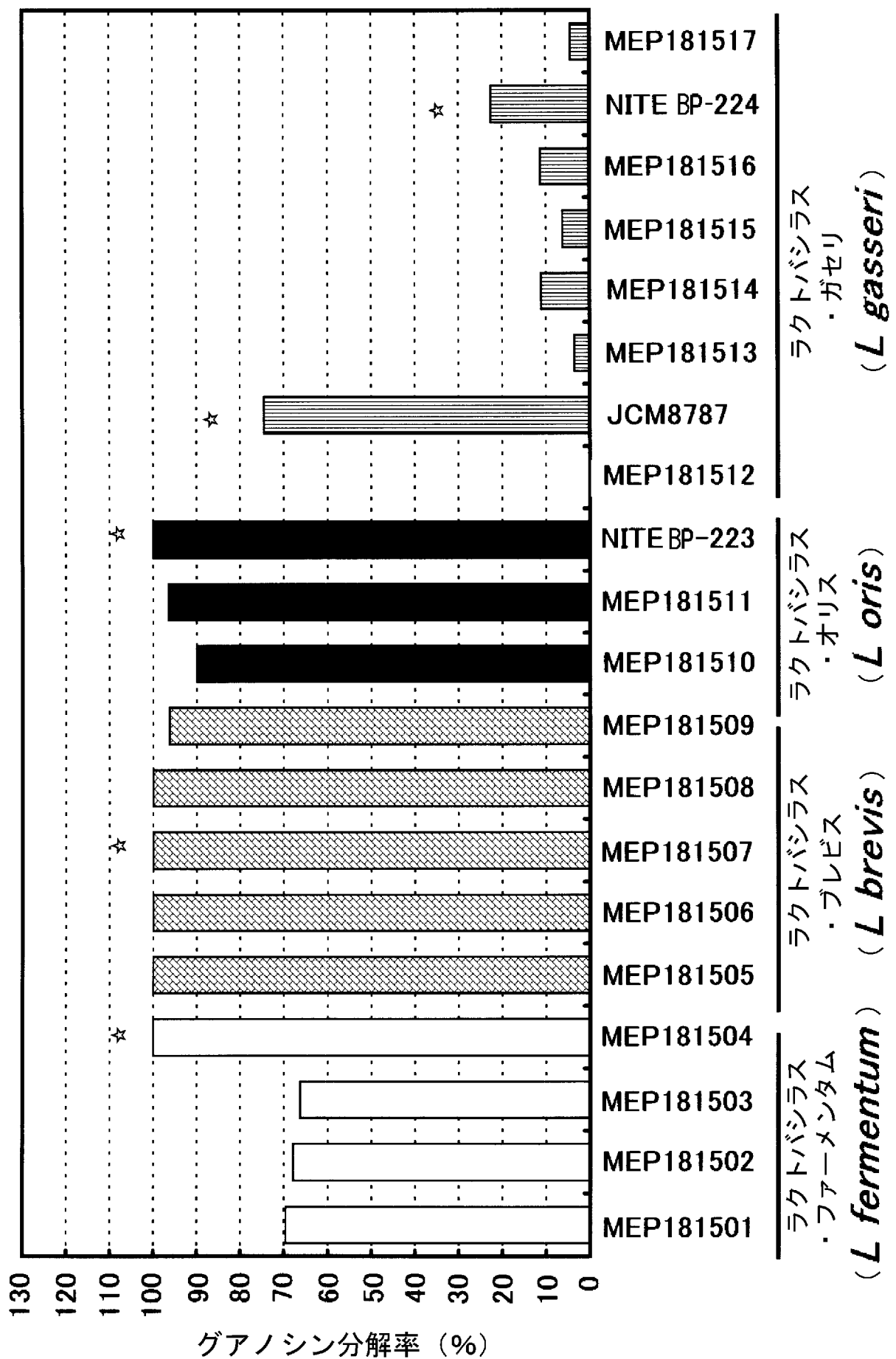
- [1] プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない、Lactobacillus 属乳酸菌。
- [2] Lactobacillus gasseriである、請求項1記載の乳酸菌。
- [3] プリン体分解能を有する、Lactobacillus oris乳酸菌。
- [4] Lactobacillus gasseri OLL2959 (受託番号:NITE BP-224)である、請求項2記載のLactobacillus 属乳酸菌。
- [5] Lactobacillus oris OLL2779 (受託番号:NITE BP-223)である、請求項3記載のLactobacillus 属乳酸菌。
- [6] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、血中尿酸値上昇抑制用の飲食品。
- [7] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、血中尿酸値上昇抑制用の医薬品。
- [8] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、高尿酸血症の予防および／または治療用の医薬品。
- [9] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を含む、高尿酸血症の予防および／または治療用の飲食品。
- [10] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を投与することを特徴とする、食品から摂取するプリン体量を抑制する方法。
- [11] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を投与することを特徴とする、血中尿酸値上昇を抑制する方法。
- [12] 飲食品の原料または中間製品を請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物に接触させる工程を含む、プリン体量が低減化された飲食品の製造方法。
- [13] 請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物を投与することを特徴とする、高尿酸血症、痛風、腎機能障害、尿路結石、および動脈硬化症からなる群のいずれか1以上の疾患または症状を治療および／または予防する方法。

- [14] 投与対象における血中尿酸値上昇抑制用の飲食品および／または医薬品を製造するための、請求項1から5のいずれか1項に記載の乳酸菌、該乳酸菌含有物および／またはその処理物の使用。

[図1]

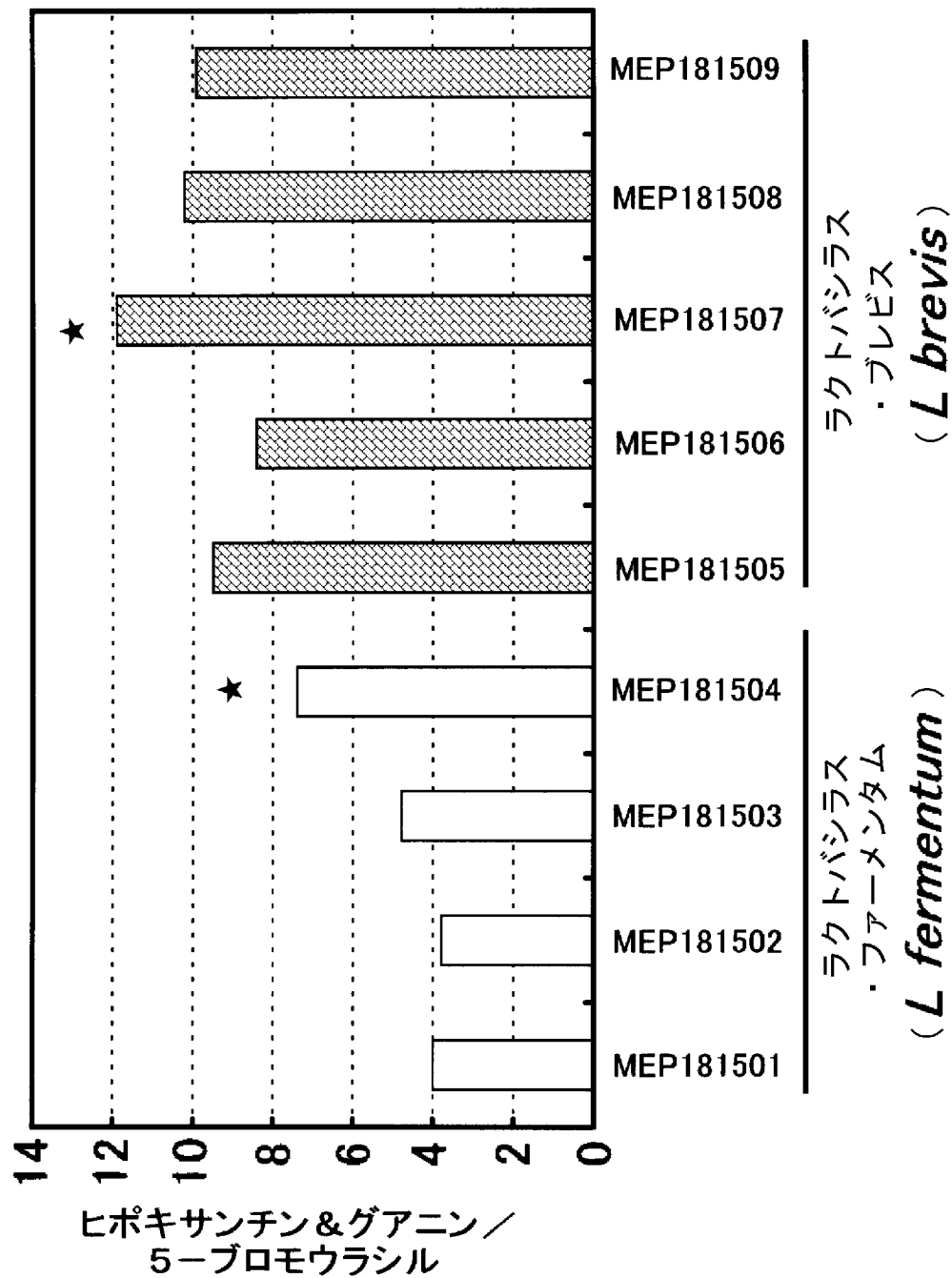


[図2]

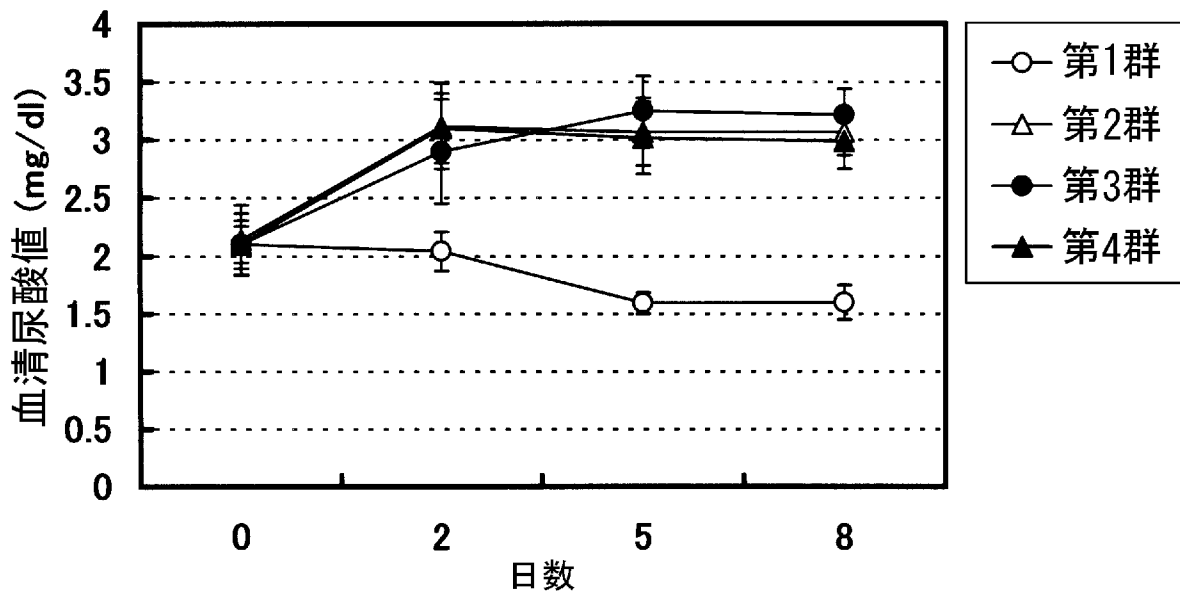




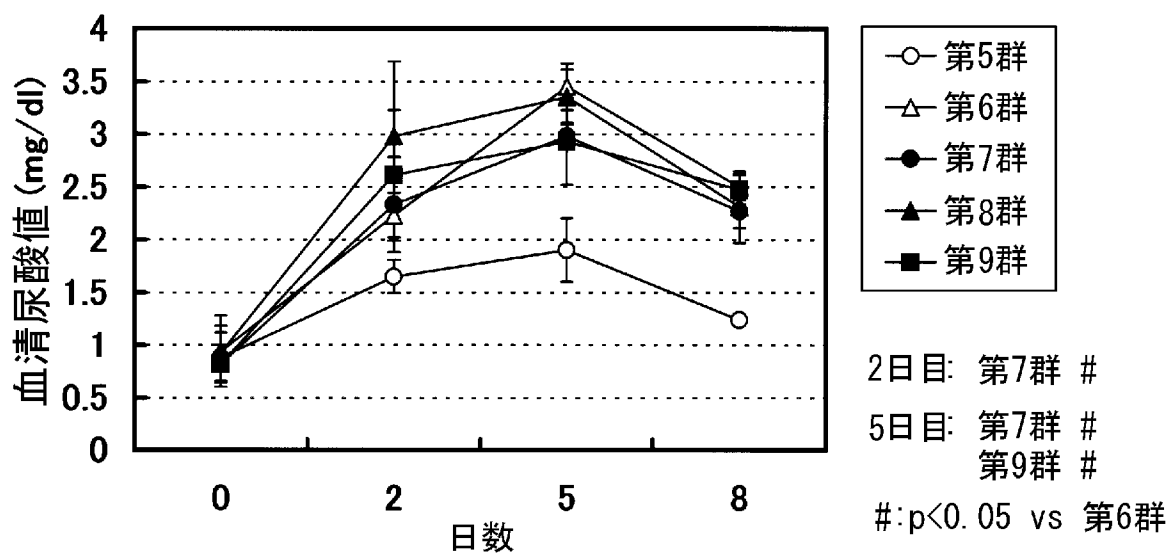
[図3]



[図4]



[図5]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/073108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N1/20(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) C12N1/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), Science Direct, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/112809 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 December, 2004 (29.12.04), Full text & EP 1649863 A1 & JP 2005-507319 A & AU 2004249060 A1 & KR 2006028426 A & CN 1812801 A	1-10, 12, 14
X	Jun OGAWA et al., "Konyosan Kessho ni Yuko na Nyusankin ni okeru Purine-tai Taisha no Kaiseki", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 2005, Vol.2005, page 244	3, 5-9, 11, 13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 13 December, 2007 (13.12.07)		Date of mailing of the international search report 25 December, 2007 (25.12.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/073108

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Takeshi IKENAGA et al., "Takai Purine Nucleoside Taishano o Yusuru Nyusankin no Shokujisei Konyosan Kessho Model Rat no Kecchu Nyosanchi ni Oyobosu Eikyo", The Japanese Society of Nutrition and Food science Sokai Koen Yoshishu, 2004, Vol.58th, page 318	3,5-9,11,13
X	Takeshi IKENAGA et al., "Shokujisei Konyosan Kessho Model Rat no Kecchu Nyosanchi ni Oyobosu Nyusankin no Eikyo", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 2004, Vol.2004, page 197	3,5-9,11,13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2007/073108

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 10-11, 13

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 10-11 include a method of administering a lactic acid bacterium containing substance or treated substance and relate to a method for treatment of a human body. Further, claim 13 is the invention relating to a treatment method. (Continued to extra sheet)

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/073108

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

Therefore, the above claims do not require an international search in accordance with PCT Rule 39.1(iv).

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The "special technical feature" of the invention of claim 1 relates to "lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* which have a degradation ability of purine body and do not have a gas production ability", and the "special technical feature" of the invention of claim 3 relates to "a lactic acid bacterium, *Lactobacillus oris*, which has a degradation ability of purine body". The technical feature common to both is "lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* which have a degradation ability of purine body". However, lactic acid bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* which have a degradation ability of purine body are known because of Documents 1-4, therefore, the above feature is not a special technical feature.

Further, there is no other special technical feature common to both.

Accordingly, there is no technical relationship between both involving one or more of the same or corresponding special technical features, therefore, they are not considered to be so linked as to form a single general inventive concept.

Incidentally, the inventions of this application are categorized into two invention groups of claims 1-2, 4, 6-14, and claims 3, 5.

Document 1

WO 2004/112809 A1 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) 2004.12.29 whole text

Document 2

OGAWA Jun, et al., "Analysis of metabolism of purine body in lactic acid bacteria effective in hyperuricemia", Abstract paper of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, (2005) Vol. 2005, p. 244

Document 3

IKENAGA Takeshi, et al., "Effect of lactic acid bacteria having high ability of metabolizing purine nucleoside on blood uric acid level in dietary hyperuricemia model rats", Abstract paper of the Annual Meeting of Japanese Society of Nutrition and Food Science, (2004) Vol. 58th, p. 318

Document 4

IKENAGA Takeshi, et al., "Effect of lactic acid bacteria on blood uric acid level in dietary hyperuricemia model rats", Abstract paper of the Annual Meeting of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, (2004) Vol. 2004, p. 197

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		
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		
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		
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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), Science Direct, JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース		
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 請求の範囲の番号
X	WO 2004/112809 A1 (大塚製薬株式会社) 2004. 12. 29, 全文 & EP 1649863 A1 & JP 2005-507319 A & AU 2004249060 A1 & KR 2006028426 A & CN 1812801 A	1-10, 12, 14
X	小川順 他, 高尿酸血症に有効な乳酸菌におけるプリン体代謝の解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2005, Vol. 2005, p. 244	3, 5-9, 11, 13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 13. 12. 2007	国際調査報告の発送日 25. 12. 2007	
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) 左海 匡子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3038

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 請求の範囲の番号
X	池永武 他, 高いプリンヌクレオシド代謝能を有する乳酸菌の食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 2004, Vol. 58th, p. 318	3, 5-9, 11, 13
X	池永武 他, 食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす乳酸菌の影響, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2004, Vol. 2004, p. 197	3, 5-9, 11, 13



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 1 0 - 1 1 , 1 3 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲 1 0 - 1 1 は、乳酸菌含有物または処理物を投与する方法を含むものであり、人体の処置方法に関するものに該当する。また、請求の範囲 1 3 は治療方法に関する発明である。したがって、上記請求の範囲はPCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
特別ページ参照

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求の範囲 1 に係る発明の「特別な技術的特徴」は「プリン体分解能を有し、ガス産生能を有しない *Lactobacillus* 属乳酸菌」に関し、請求の範囲 3 に係る発明の「特別な技術的特徴」は「プリン体分解能を有する *Lactobacillus oris* 乳酸菌」に関するものである。両者に共通する技術的特徴は「プリン体分解能がある *lactobacillus* 属乳酸菌」であるが、プリン体分解能を有する *lactobacillus* 属乳酸菌は文献 1～4 より公知であるから、上記は特別な技術的特徴であるとはいえない。

そして、それ以外に両者に共通する特別な技術的特徴はない。

したがって、両者は一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

なお、本願発明は請求の範囲 1～2, 4, 6～14 と請求の範囲 3, 5 の 2 つの発明群に区分される。

文献 1

WO 2004/112809 A1 (大塚製薬株式会社) 2004.12.29, 全文

文献 2

小川順 他, 高尿酸血症に有効な乳酸菌におけるプリン体代謝の解析, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2005, Vol.2005, p.244

文献 3

池永武 他, 高いプリンヌクレオシド代謝能を有する乳酸菌の食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす影響, 日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 2004, Vol.58th, p.318

文献 4

池永武 他, 食事性高尿酸血症モデルラットの血中尿酸値に及ぼす乳酸菌の影響, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2004, Vol.2004, p.197