

明 細 書

発明の名称：血管内皮機能を改善するための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、血管内皮機能を改善するための組成物に関する。

背景技術

[0002] 心血管疾患（CVD）は、世界でも主要な死亡原因になり、特に低・中所得国に対して大きな影響を及ぼしている。2019年にCVDが原因で死亡した人の数は推定1790万人で、それは全世界の死者数の32%に相当する。現在の予防・治療戦略にもかかわらず、心血管疾患による死亡率は今後10年間でさらに増加すると予想されている。動脈硬化は、プラーク形成による動脈内腔の狭窄を特徴とする心血管系の炎症性疾患であり、その進展がCVD発症に直接つながる。血管内皮機能障害が起こることでプラークが形成され疾患が進行し、アテローム性動脈硬化症の発症に至る。

[0003] 同様にCVDはメタボリックシンドロームとの関係についても、多くの報告がされている。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪過剰（腹部肥満）、インスリン抵抗性、高血糖、高血圧、脂質異常症〔中性脂肪が高く、高密度リポタンパク質（HDL）コレステロールが低い〕という代謝危険因子のうち少なくとも3つを伴う臨床症状のことである。これらのメタボリックシンドローム構成因子は、個々に内皮機能を低下させることが分かっている。そしてメタボリックシンドローム患者は血管内皮機能障害を頻度高く発症することが知られている。これらの状況の下、血管内皮機能を改善する新たな手段の開発が熱望されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2021-169517

特許文献2：特許5881801

非特許文献

- [0005] 非特許文献1 : J Biosci Bioeng. 2012;113:587-91.
非特許文献2 : Sci Rep. 2017;7:43522
非特許文献3 : Food Sci Nutr. 2019;7:1828-37
非特許文献4 : Scientific Reports. volume 4, Article number: 4548 (2014)
)
非特許文献5 : Hypertension. 2018;72:1060-71
非特許文献6 : Biosci Microbiota Food Health. 2016;35(4):163-171.
非特許文献7 : Genome Biol. 2022 Apr 14;23(1):95.
非特許文献8 : Microbiome. 2021 Apr 29;9(1):95. doi: 10.1186/s40168-021-01048-3.
非特許文献9 : 日本循環器学会、日本血管不全学会編集 「血管不全の生理学的診断指針」 ライフサイエンス出版 2021年
非特許文献10 : Am J Clin Nutr 2018;107:965-83.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明が解決すべき課題は、血管内皮機能を改善する新たな手段を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0007] かかる状況の下、本発明者は鋭意研究した結果、ビフィズス菌に水溶性食物繊維を組み合わせることにより、血管内皮機能を改善し得ることを見出した。本発明はかかる新規の知見に基づくものである。従って、本発明は、以下の項を提供する：

項1．ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、血管内皮機能を改善するための組成物。

- [0008] 項2．血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項1に記載の組成物。

- [0009] 項3．ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための組成物。

- [0010] 項 4. ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、動脈硬化症を予防するための組成物。
- [0011] 項 5. ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、腎機能を改善するための組成物。
- [0012] 項 6. 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。
- [0013] 項 7. 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。
- [0014] 項 8. 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。
- [0015] 項 9. 食品である、項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。
- [0016] 項 10. さらにアルギニンを含む、項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。
- [0017] 項 11. 血管内皮機能を改善するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [0018] 項 12. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項 11 に記載の使用。
- [0019] 項 13. 血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [0020] 項 14. 動脈硬化症を予防するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [0021] 項 15. 腎機能を改善するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [0022] 項 16. ビフィズス菌を含む血管内皮機能改善用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [0023] 項 17. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項 16 に記載の使用。
- [0024] 項 18. ビフィズス菌を含む血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下

抑制用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。

- [0025] 項 19. ビフィズス菌を含む動脈硬化症予防用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [0026] 項 20. ビフィズス菌を含む腎機能改善用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [0027] 項 21. 水溶性食物繊維を含む血管内皮機能改善用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用。
- [0028] 項 22. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項 21 に記載の使用。
- [0029] 項 23. 水溶性食物繊維を含む血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用。
- [0030] 項 24. 水溶性食物繊維を含む動脈硬化症予防用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用。
- [0031] 項 25. 水溶性食物繊維を含む腎機能改善用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用。
- [0032] 項 26. 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、項 11～25 のいずれか一項に記載の使用。
- [0033] 項 27. 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、項 11～26 のいずれか一項に記載の使用。
- [0034] 項 28. 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、項 11～27 のいずれか一項に記載の使用。
- [0035] 項 29. 前記組成物が食品である、項 11～28 のいずれか一項に記載の使用。
- [0036] 項 30. 前記組成物がさらにアルギニンを含む、項 11～29 のいずれか一項に記載の使用。
- [0037] 項 31. それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、血管内皮機能を改善する方法。
- [0038] 項 32. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一

方又は両方を含む、項 3 1 に記載の方法。

- [0039] 項 3 3. それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための方法。
- [0040] 項 3 4. それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、動脈硬化症を予防するための方法。
- [0041] 項 3 5. それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、腎機能を改善するための方法。
- [0042] 項 3 6. 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、項 3 1～3 5 のいずれか一項に記載の方法。
- [0043] 項 3 7. 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、項 3 1～3 6 のいずれか一項に記載の方法。
- [0044] 項 3 8. 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、項 3 1～3 7 のいずれか一項に記載の方法。
- [0045] 項 3 9. ビフィズス菌及び水溶性食物繊維が食品として摂取される、項 3 1～3 8 のいずれか一項に記載の方法。
- [0046] 項 4 0. さらにアルギニンを投与することを含む、項 3 1～3 9 のいずれか一項に記載の方法。
- [0047] 項 4 1. 血管内皮機能の改善における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ。
- [0048] 項 4 2. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項 4 1 に記載の組み合わせ。
- [0049] 項 4 3. 血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ。
- [0050] 項 4 4. 動脈硬化症の予防における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ。
- [0051] 項 4 5. 腎機能の改善における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ。

- [0052] 項 4 6. 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、項 4 1～4 5 のいずれか一項に記載の組み合わせ。
- [0053] 項 4 7. 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、項 4 1～4 6 のいずれか一項に記載の組み合わせ。
- [0054] 項 4 8. 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、項 4 1～4 7 のいずれか一項に記載の組み合わせ。
- [0055] 項 4 9. 食品である、項 4 1～4 8 のいずれか一項に記載の組み合わせ。
- [0056] 項 5 0. さらにアルギニンを含む、項 4 1～4 9 のいずれか一項に記載の組み合わせ。
- [0057] 項 5 1. 血管内皮機能の改善におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維。
- [0058] 項 5 2. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項 4 1 に記載の水溶性食物繊維。
- [0059] 項 5 3. 血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維。
- [0060] 項 5 4. 動脈硬化症の予防におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維。
- [0061] 項 5 5. 腎機能の改善におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維。
- [0062] 項 5 6. 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、項 5 1～5 5 のいずれか一項に記載の水溶性食物繊維。
- [0063] 項 5 7. 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、項 5 1～5 6 のいずれか一項に記載の水溶性食物繊維。
- [0064] 項 5 8. 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、項 5 1～5 7 のいずれか一項に記載の水溶性食物繊維。
- [0065] 項 5 9. 食品である、項 5 1～5 8 のいずれか一項に記載の水溶性食物繊維。
- [0066] 項 6 0. さらにアルギニンと組み合わせて用いられる、項 5 1～5 9 のい

ずれか一項に記載の水溶性食物繊維。

- [0067] 項 6 1. 血管内皮機能の改善における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌。
- [0068] 項 6 2. 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項 6 1 に記載のビフィズス菌。
- [0069] 項 6 3. 血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌。
- [0070] 項 6 4. 動脈硬化症の予防における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌。
- [0071] 項 6 5. 腎機能の改善における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌。
- [0072] 項 6 6. 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、項 6 1 ～ 6 5 のいずれか一項に記載のビフィズス菌。
- [0073] 項 6 7. 腸内での増殖能を有する、項 6 1 ～ 6 6 のいずれか一項に記載のビフィズス菌。
- [0074] 項 6 8. 抗メタボリックシンドローム効果を有する、項 6 1 ～ 6 7 のいずれか一項に記載のビフィズス菌。
- [0075] 項 6 9. 食品である、項 6 1 ～ 6 8 のいずれか一項に記載のビフィズス菌。
- [0076] 項 7 0. さらにアルギニンと組み合わせて用いられる、項 6 1 ～ 6 9 のいずれか一項に記載のビフィズス菌。

発明の効果

- [0077] 本発明によれば、血管内皮機能を改善する新たな手段を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0078] [図1]実施例における被験者の組入れから解析までの流れを図1のフローチャートに示す。
- [図2]サブグループ解析集団（被験食品群：n = 22、プラセボ群：n = 21

）におけるGCL2505及びイヌリンを含む被験食品の摂取が便中微生物叢に及ぼす影響を示す。箱ひげ図は、5パーセンタイル、95パーセンタイル、四分位範囲（25%～75%）、中央値を表す。A） α -多様性（Chao1）。B） β -多様性（属レベルのBray-Curtis距離の主成分分析）。C）12週目の*B. animalis*の相対的存在量。データはLindaで解析した。

発明を実施するための形態

[0079] 血管内皮機能を改善するための組成物

本発明は、ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、血管内皮機能を改善するための組成物を提供する。本発明において、ビフィズス菌の種類は特に限定されず、例えば、*Bifidobacterium animalis*、*Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium catenulatum*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium pseudocatenulatum*等が挙げられ、*Bifidobacterium animalis*が好ましい。*Bifidobacterium animalis*のなかでも*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*が好ましい。また、ビフィズス菌としては、腸内で増殖する能力を有しているものが好ましい。より具体的には、ビフィズス菌としては、腸内で総ビフィズス菌数を増加させることができるものが好ましい。腸内で増殖する能力を有しているか否かは、例えば、リアルタイムPCRを用いて糞便試料中のビフィズス菌数を測定することにより求めることができ、より具体的には、非特許文献1に記載の方法に準じて測定、評価することができる。また、本発明においては、上記方法により、腸内での増加が確認できれば本発明の好ましいビフィズス菌として選択され得る。上記方法により測定したときの値が、体内に摂取した菌数と比較して、2倍以上、好ましくは5倍以上、より好ましくは10倍以

上に増殖し得る菌が好ましい。また、本発明において、前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有することが好ましい。抗メタボリックシンドローム効果は、例えば、内臓脂肪面積を測定することにより求めることができ、より具体的には、非特許文献6に記載の方法に準じて測定、評価することができる。本発明においては、上記方法により内臓脂肪面積の減少が確認できれば本発明の好ましいビフィズス菌として選択されうる。上記方法により測定した場合の内臓脂肪面積が0.98倍以下となるようなビフィズス菌が好ましく、0.96倍以下となるようなビフィズス菌がより好ましい本発明の好ましい実施形態において、ビフィズス菌としては、*Bifidobacterium animalis subsp. lactis*に属するGCL2505が挙げられる。GCL2505株は、受領番号FERM ABP-21918にて寄託されている。当該菌株は、2010年2月17日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター（〒292-0818 日本国千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室）に、ブタペスト条約に基づく寄託がされている。

[0080] 本発明組成物中のビフィズス菌の菌数は限定されないが、例えば、1000個/g、好ましくは、3000個/g、より好ましくは5000個/g、さらに好ましくは8000個/g以上、特に好ましくは1億個/g以上の範囲で適宜設定できる。上限は特にないが、例えば、10兆個/g以下、1000億個/g以下、100億個/g以下等があげられる。典型的な実施形態において、本発明においてはビフィズス菌は生菌を使用する。

[0081] 水溶性食物繊維としては、イヌリン、難消化性デキストリン、水溶性大豆多糖類、ポリデキストロース、アルギン酸ナトリウム、サイリウム、フコイダン、ラミナラン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プルラン、カードラン、低分子化ヘミセルロースなどが挙げられ、好ましくはイヌリンが挙げられる。これら水溶性食物繊維は、単独で配合してもよいし、複数種を組み合わせ合わせて配合してもよい。

[0082] 本発明組成物中の水溶性食物繊維の含有量は限定されないが、例えば、組

成物全体の質量に対し、0.5～10重量%、好ましくは1～5重量%、より好ましくは1.5～3重量%の範囲で設定できる。

[0083] 本発明においては、本発明の有効成分であるビフィズス菌と水溶性食物繊維との組み合わせを血管内皮機能を改善するための組成物として用いても、当該これらの組合せと、薬学的に許容される、もしくは食品に添加され得る各種担体（例えば、等張化剤、キレート剤、安定化剤、pH調節剤、防腐剤、抗酸化剤、溶解補助剤、粘稠化剤、賦形剤、結合剤等）とを組み合わせた組成物として用いてもよい。各種担体を含む実施形態において、組成物中のビフィズス菌と水溶性食物繊維との合計含有量は限定されないが、例えば、50質量%以上、60質量%以上、70質量%以上、80質量%以上、90質量%以上、95質量%以上、99質量%以上等の範囲で適宜設定できる。

[0084] 等張化剤としては、例えば、グルコース、トレハロース、ラクトース、フルクトース、マンニトール、キシリトール、ソルビトール等の糖類、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等の多価アルコール類、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等の無機塩類等が挙げられる。これらの等張化剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0085] キレート剤としては、例えば、エデト酸二ナトリウム、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、エデト酸四ナトリウム、エデト酸カルシウム等のエデト酸塩類、エチレンジアミン四酢酸塩、ニトリロ三酢酸又はその塩、ヘキサメタリン酸ソーダ、クエン酸等が挙げられる。これらのキレート剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができる。

[0086] 安定化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム等が挙げられる。

[0087] pH調節剤としては、例えば、塩酸、炭酸、酢酸、クエン酸等の酸が挙げられ、さらに水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム等のアルカリ金属炭酸塩又は炭酸水素塩、酢酸ナトリウム等のアルカリ金属酢酸塩、クエン酸ナトリウム等のアルカリ金属クエン酸塩

、トロメタモール等の塩基等が挙げられる。これらのpH調節剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0088] 防腐剤としては、例えば、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル等のパラオキシ安息香酸エステル、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム等の第4級アンモニウム塩、アルキルポリアミノエチルグリシン、クロロブタノール、ポリクォード、ポリヘキサメチレンビグアニド、クロルヘキシジン等が挙げられる。これらの防腐剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0089] 抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、乾燥亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、濃縮混合トコフェロール等が挙げられる。これらの抗酸化剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0090] 溶解補助剤としては、例えば、安息香酸ナトリウム、グリセリン、D-ソルビトール、ブドウ糖、プロピレングリコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、D-マンニトール等が挙げられる。これらの溶解補助剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0091] 粘稠化剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、カルメロースナトリウム、キサントガム、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒドロキシアセチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等が挙げられる。これらの粘稠化剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

[0092] 賦形剤としては、例えば、乳糖、コーンスターチ、L-システイン、トレハロース、マルチトール、ソルビトール等が挙げられる。これらの賦形剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせる用いることができる。

- [0093] 結合剤としては、例えば、結晶セルロース、デンプン、ショ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン、アラビアゴム末、ポリビニルピロリドン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等が挙げられる。これらの結合剤は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いることができる。
- [0094] 本発明の組成物を対象（好ましくはヒト等の哺乳動物）が摂取することにより、血管内皮機能を改善することができる。特許文献1には、実施例2に、ビフィドバクテリウム・アニマリス亜種ラクティス LKM512株 生菌粉末（約 6×10^9 cfu／包 $\times$ 1包）にアルギニン錠剤（100mg／錠 $\times$ 3錠）を組み合わせて1セットとし、1日に2回、朝・夕食後に8週間摂取した結果、血管内皮機能（EndoPAT測定値）が向上したと記載されている一方で、LKM512株にアルギニン錠剤を組み合わせる代わりにデンプンを組み合わせたプラセボ群では血管内皮機能は向上しなかったことが記載されている。従って、特許文献1には、ビフィズス菌が単独では血管内皮機能は向上しなかったことが記載されている。また、特許文献1を含めて、ビフィズス菌に水溶性食物繊維を組み合わせることにより血管内皮機能を向上できることはこれまで報告が無い。従って本発明のかかる効果は先行技術から予想し得ないものである。
- [0095] また、特許文献2にはアルギニン摂取により腸内細菌の代謝産物中のポリアミン（プトレッシン）の濃度が上昇することが記載されており非特許文献4には、LKM512株とアルギニンとを組み合わせることでポリアミン（プトレッシン）のアップレギュレーションが生じるとの記載がされている。従って、LKM512株とアルギニンとを組み合わせることで接種することによるEndoPAT測定値の上昇は、アルギニン取り込みによるポリアミン（プトレッシン）の産生に起因するものであることが示唆されてる。本発明のビフィズス菌に水溶性食物繊維を組み合わせる効果は、ポリアミン（プトレッシン）

の産生によるものではないため、アルギニン投与とは全く異なる機序により血管内皮機能を向上することができるため有用である。

[0096] 本発明の組成物の摂取量は限定されないが、有効成分であるビフィズス菌の1日摂取量として、例えば、1000万個～10兆個、好ましくは1億～1兆個、より好ましくは10億個～1000億個、さらに好ましくは50億～300億個、特に好ましくは100億～200億個の範囲で適宜設定できる。ビフィズス菌の重量基準での本発明の組成物の摂取量も限定されないが、有効成分であるビフィズス菌の1日摂取量として、例えば、1mg～10g、好ましくは10mg～1000mg、より好ましくは40mg～300mg、さらに好ましくは200mg以上の範囲で適宜設定できる。

[0097] また、本発明の組成物は、上記ビフィズス菌以外に、血管内皮機能を有することが知られている物質をさらに含んでもよい。血管内皮機能機能を有することが知られている物質としては、例えば、アルギニン、松樹皮由来プロシアニジン、黒大豆ポリフェノール、カツオ由来エラスチンペプチド等が挙げられる。これらの物質は、1種単独で、又は2種以上を組み合わせで用いることができる。

[0098] 本発明の組成物は、経口組成物であることが好ましい。経口組成物としては、飲食品組成物、医薬組成物等が包含される。本発明において飲食品組成物には、保健機能食品（栄養機能食品、特定保健用食品、機能性表示食品）等も包含される。

[0099] 飲食品組成物としては、野菜汁飲料、果汁飲料、野菜汁・果汁混合飲料、発酵乳飲料、アーモンド含有飲料等の飲料；アイスクリーム類、氷菓、飴、グミ、アーモンド含有食品、ビスケット類（クリームサンドビスケット等）、チョコレート類（準チョコレート等を含む）、発酵乳食品（ヨーグルト、チーズ）等の食品等が挙げられる。アイスクリーム類としては、ラクトアイス（発酵乳入りラクトアイス等）等が好ましい。準チョコレートとしては、コーン含有準チョコレート等が挙げられる。乳製品としては、発酵乳、アイスクリーム類、乳飲料等が挙げられる。本発明における飲食品組成物には、

サプリメント等も包含される。

[0100] その他組成物等

以上、一部の実施形態を用いて本発明の説明を行ってきたが、本発明は上記実施形態に限定されない。例えば、後述する実施例で示すように、本発明によれば、ビフィズス菌と水溶性食物繊維とを組み合わせることにより血管の柔軟性（典型的には、血管を締め付けた後の血管の拡張度）を向上し得る。本発明において、「血管内皮機能」「血管の柔軟性」等の記載における「血管」としては、特に限定されないが、例えば、脳、心臓等の血管が挙げられる。また、本発明において、「血管」としては、限定されないが、動脈等が挙げられる。また、ビフィズス菌と水溶性食物繊維とを組み合わせることにより血管のしなやかさを向上し得る。これらのことから、加齢などによるこれらの血管状態に対し、予防的に作用することも期待できる。従って、一実施形態において、本発明は、ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための組成物を提供する。血管の柔軟性(或いはしなやかさ)は、例えば、FMD（血流依存性血管拡張反応（Flow Mediated Dilation））検査で測定することができる。血管の柔軟性(或いはしなやかさ)の維持又は低下の抑制は、例えば、FMD値が4%以上(好ましくは6%以上、より好ましくは7%以上)で維持されている、又は、FMD値が4%以上(好ましくは6%以上、より好ましくは7%以上)の値から増加することを意味する（非特許文献5）。また、後述する実施例で示すように、ビフィズス菌と水溶性食物繊維とを組み合わせることにより血管内皮機能の改善及び血中LDL-c濃度の低下も見られた。これらのことから、本発明によれば、動脈硬化リスクを低減し得る。従って、一実施形態において、本発明は、ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、動脈硬化症を予防するための組成物を提供する。さらに、後述する実施例で示すように、ビフィズス菌と水溶性食物繊維とを組み合わせることによりFMD検査で測定される血管の柔軟性が向上するが、FMDの測定値は腎機能との間にも相関が報告されていることから、血管内皮機能障害の改善により、腎臓の病気の発症リスクを下げ得る。従って

、本発明は、ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、腎機能を改善するための組成物を提供する。これらの実施形態において、ビフィズス菌及び水溶性食物繊維の種類、使用量、その他の成分等の条件は、「血管内皮機能を改善するための組成物」の項で記載したのと同様のものを採用し得る。

[0101] また、別の実施形態において、本発明は、血管内皮機能を改善するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用；血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用；動脈硬化症を予防するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用；腎機能を改善するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用；水溶性食物繊維を含む血管内皮機能改善用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用；血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、項21に記載の使用；水溶性食物繊維を含む血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用；水溶性食物繊維を含む動脈硬化症予防用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用；水溶性食物繊維を含む腎機能改善用組成物を製造するためのビフィズス菌の使用；それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、血管内皮機能を改善する方法；それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための方法；それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、動脈硬化症を予防するための方法；それを必要とする対象にビフィズス菌及び水溶性食物繊維の有効量を投与することを含む、腎機能を改善するための方法；血管内皮機能の改善における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ；血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ；動脈硬化症の予防における使用のためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の組み合わせ；腎機能の改善における使用のためのビフィズス菌

及び水溶性食物繊維の組み合わせ；血管内皮機能の改善におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維；血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維；動脈硬化症の予防におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維；腎機能の改善におけるビフィズス菌と組み合わせての使用のための水溶性食物繊維；血管内皮機能の改善における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌；血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌；動脈硬化症の予防における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌；腎機能の改善における水溶性食物繊維と組み合わせての使用のためのビフィズス菌を提供する。

これらの実施形態における、ビフィズス菌、水溶性食物繊維、及び任意選択でのその他の成分についての詳細（種類、量等）、使用方法（医薬品、飲食品等）、用途（血管内皮機能の改善、動脈硬化症の予防、腎機能の改善等）等は前述したものと同様である。本発明においてビフィズス菌及び水溶性食物繊維を投与する（摂取させる）対象としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット等（好ましくはヒト）の哺乳動物等が挙げられる。ヒトを対象とする場合、当該対象には、例えば、動脈硬化症、腎臓病、高血圧等でないヒトが挙げられるが特に限定はされない。また、対象の年齢も特に限定されないが、一般的に加齢に伴い血管内皮機能、腎機能等が低下しうるとされる年齢層が挙げられる。非限定的な好ましい一実施形態において、本発明の対象には、動脈硬化症、腎臓病、高血圧等にまでは至っていないヒト（特に中高年のヒト）等が挙げられる。

[0102] 以下で、実施例を用いて本発明の特定の実施形態をより詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されない。

実施例

[0103] 抗メタボリックシンドローム効果を有するGCL2505とイヌリンによる動脈硬化リスクの低減効果の可能性を評価するために、血管内皮機能への影響につ

いて無作為二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験で検討した。

[0104] 対象者（解析対象集団）

本研究においては、ヘルシンキ宣言に基づき、すべての参加者から書面によるインフォームドコンセントを取得した。参加者は血管内皮機能が低下傾向にある40歳以上65歳未満の日本人男女で、選択基準に合致し、除外基準に該当せず、かつ試験責任医師が適格であると認めた者である。選択基準は、以下の通り：(1)本試験の意義、内容、目的を十分に理解し、本試験の参加について文書にて同意を得られた者、(2)スクリーニング検査時の年齢が40歳以上65歳未満の日本人男女、(3)スクリーニング検査時のpentraxan 3 (PTX3)が高値の者、(4)スクリーニング検査時のLDL-コレステロール / HDL-コレステロール比率 (L/H比) が高値の者。除外基準は、以下の通り：(1)右腕でFMD測定が困難である者、(2)高血圧症、脂質異常症、糖尿病により医師による治療、投薬、生活指導を受けている者、(3)喘息、結核、肋膜炎など気管支系の既往歴を持つ者、(4)ペースメーカー、除細動器を使用している者、(5)重篤な脳血管疾患、心疾患、肝疾患、腎疾患、消化器疾患、届出が必要な感染症などに罹患している者、(6)胃切除、胃腸縫合術、腸管切除など消化器系に大きな手術歴のある者、(7)血圧測定、身体計測、血液検査で著しい異常が認められる者、(8)高度の貧血のある者、(9)閉経前後の女性で体調の著しい変化がみられる者、(10)薬物又は食品（特に乳成分）に対しアレルギー症状を示すおそれのある者、(11)摂取開始12週間前から試験終了までの間に、抗菌薬を服用した、または服用する予定がある者、(12)便通に影響する医薬品（整腸剤、便秘薬、下痢止めなど）を常用している者、(13)ヨーグルト、乳酸菌飲料、整腸作用のある健康食品（乳酸菌、ビフィズス菌、オリゴ糖、食物繊維強化食品、などの成分を含むもの）を試験期間中にやめることが出来ない者、(14)喫煙者、アルコールの常用者又は生活習慣が極度に不規則な者、(15)摂取開始前16週間以内に400 mL献血を行った女性、摂取開始前12週間以内に400 mL献血を行った男性、摂取開始前4週間以内に200 mL献血又は2週間以内に成分献血を行った者、(16)妊娠中もしくは妊娠している可能性のある女性、

授乳中の女性、(17)試験実施期間開始4週間前から摂取終了までの間に、他の臨床試験、観察研究、治験、ホームユーステストに参加の者、(18)その他、試験責任医師が不適格であると判断した者。試験期間の概要を図1のフローチャートに示す。本研究では、149名の参加者がスクリーニングされた。スクリーニングの結果60名の参加者が対象となった：30名が被験食品群とプラセボ群にそれぞれ割り付けられた。試験終了までに、3名の参加者が個人的な理由で辞退した（被験食品群からn=1、プラセボ群からn=2）。また、1名の参加者がコンプライアンスの観点から中止と判断された。全試験終了後、試験とは関係のない疾患への罹患が確認され、結果への影響が懸念されたため、1名の参加者が除外された。よって、被験食品群の27名とプラセボ群の28名を併せた55名が解析対象集団に設定された。

[0105] 被験食品群（Active）及びプラセボ群（Placebo）の参加者は、それぞれ、下記表1に示す組成の飲料を1日1回摂取した。飲料以外の食事メニューは制限していないが、乳酸菌を含む食品の摂取を禁止するなど、禁止項目は設定した。上記飲料の摂取を84日間継続した。

[0106] [表1]

Table 1. Nutritional details of the test drinks

	Active	Placebo
Energy (kcal)	52.0	48.0
Moisture (g)	84.9	86.9
Protein (g)	2.8	2.8
Fat (g)	0.1	0.1
Carbohydrate (g)	11.2	9.1
Ash (g)	1.1	1.1

The active drink contained 2 g inulin and 1.0×10^{10} colony-forming units GCL2505

[0107] 下記表2に、解析対象集団全体における被験者のバックグラウンドと安全性評価の概要を示す。表3に、解析対象集団全体における被験食品群（Active）及びプラセボ群（Placebo）における、FMD及び血中成分の測定結果を示す。

[0108]

[表2]

Table 2. Summary of the subjects' characteristics and safety in the efficacy analysis population.

	Active	Placebo	<i>P</i> -value
Age, years	50.37 (7.47)	50.04 (6.33)	0.859
Number of women	24 of total 27	24 of total 28	-
Systolic blood pressure, mmHg	112.81 (12.52)	114.86 (13.40)	0.562
Diastolic blood pressure, mmHg	77.63 (9.23)	79.21 (8.68)	0.515
Heart rate, bpm	69.22 (11.24)	65.36 (6.75)	0.131
Height, cm	159.66 (5.92)	160.56 (8.03)	0.637
Body weight, kg	54.27 (6.78)	54.24 (9.84)	0.987
Body fat, %	29.11 (6.51)	27.41 (6.37)	0.332
Body mass index, kg/m ²	21.29 (2.56)	20.93 (2.59)	0.609

All data are presented as mean (SD), except for the number of women.

P-value shows the inter-group difference (active group vs. placebo group; Student's *t*-test).

[0109]

[表3]

Table 3. Effects of the test drinks on FMD and blood parameters in the efficacy analysis population.

		Week 8		Week 12	
		Change	P-value	Change	P-value
FMD, %	Active	0.61 (2.13)		1.05 (2.21)	
	Placebo	0.53 (2.24)	0.899	-0.26 (2.87)	0.065
Total cholesterol, mg/dL	Active	-0.74 (13.05)		-2.78 (20.64)	
	Placebo	2.32 (13.65)	0.399	1.48 (14.19)	0.382
LDL-c, mg/dL	Active	-2.89 (9.97)		-3.44 (14.51)	
	Placebo	2.82 (10.36)	0.042	1.41 (10.01)	0.159
HDL-c, mg / dL	Active	2.74 (6.71)		2.11 (8.25)	
	Placebo	1.07 (5.89)	0.332	1.33 (7.47)	0.718
Triglycerides, mg/dL	Active	-6.11 (27.74)		-4.59 (23.99)	
	Placebo	-4.93 (22.38)	0.863	-0.96 (18.11)	0.533
LDL-c/HDL-c	Active	-0.09 (0.21)		-0.10 (0.24)	
	Placebo	0.01 (0.13)	0.035	-0.01 (0.14)	0.120
PAI-1, ng/mL	Active	-2.07 (5.34)		-1.22 (4.41)	
	Placebo	0.39 (2.41)	0.035	0.89 (2.97)	0.045
TMAO, µg/mL	Active	0.10 (0.39)		0.29 (0.82)	
	Placebo	-0.03 (0.34)	0.211	0.18 (0.78)	0.608

All data are presented as mean (SD).

The data for weeks 8 and 12 show the amount of change from week 0, respectively.

P-value shows the inter-group difference (change value of active group vs. placebo group; Student's *t*-test).

[0110] 下記表 4 に、Week 0 時点の FMD (%) が 4 %以上の被験者集団における被験食品群 (Active) 及びプラセボ群 (Placebo) における、FMD 及び血中成分の測定結果を示す。

[0111]

[表4]

Table 4. Effects of the test drinks on FMD and blood parameters in a population of subgroup analysis (active group: $n = 24$; placebo group: $n = 23$).

		Week 8		Week 12	
		Change	<i>P</i> -value	Change	<i>P</i> -value
FMD, %	Active	0.35 (1.98)	0.692	0.88 (2.23)	0.046
	Placebo	0.12 (1.95)		-0.68 (2.81)	
Total cholesterol, mg/dL	Active	-2.75 (11.51)	0.081	-3.75 (21.09)	0.200
	Placebo	3.87 (13.74)		3.00 (13.55)	
LDL-c, mg/dL	Active	-4.17 (9.18)	0.012	-4.29 (15.14)	0.092
	Placebo	3.57 (10.93)		2.14 (9.73)	
HDL-c, mg/dL	Active	2.08 (6.50)	0.849	2.04 (7.39)	0.985
	Placebo	1.74 (5.79)		2.00 (7.98)	
Triglycerides, mg/dL	Active	-6.08 (29.03)	0.955	-4.42 (25.02)	0.757
	Placebo	-6.52 (23.71)		-2.41 (18.43)	
LDL-c/HDL-c	Active	-0.10 (0.21)	0.041	-0.10 (0.24)	0.150
	Placebo	0.01 (0.14)		-0.02 (0.14)	
PAI-1, ng/mL	Active	-1.83 (5.25)	0.058	-1.25 (4.66)	0.076
	Placebo	0.52 (2.61)		0.86 (3.12)	
TMAO, μ g/mL	Active	0.12 (0.41)	0.228	0.34 (0.86)	0.197
	Placebo	-0.02 (0.37)		0.06 (0.59)	

All data are presented as mean (SD).

The data for weeks 8 and 12 show the amount of change from week 0, respectively.

P-value shows the inter-group difference (change value of active group vs. placebo group; Student's *t*-test).

[0112] 安全性の評価

解析対象集団（表2）の安全性が確認され、臨床的に問題となる点はなかった。また、副作用や医学的に問題のある有害事象も認められなかった。したがって、試験に使用された乳飲料は、摂取しても安全であると考えられた。

[0113] FMD

FMDは、試験開始0日目、56日目、84日目に、以下の方法により測定を行った：測定には、UNEX-EF18VG（（株）ユネクス）を用いた。測定には右腕が用いられた。最初に安静時の右上腕動脈の血管径を測定し、その後、右前腕部に5分間駆血した。駆血解放後、最大拡張期の血管径

を再度測定した。安静時からの血管径の拡張率をFMD (%)として表した。

Week 0時点のFMD (%)が4%以上の被験者集団において12週目の被験食品群のFMD (%)の上昇が確認された($0.88\% \pm 2.23\%$)。さらに被験食品群における0週から12週目のFMD (%)の変化量と、プラセボ群のそれ($-0.68\% \pm 2.81\%$)との間には統計上有意な差が認められた($p = 0.046$ by スチューデントのt検定) (表4)。解析対象集団において、12週目の被験食品群のFMD (%)の上昇が確認された($1.05 \pm 2.21\%$)。被験食品群における0週から12週目のFMD (%)の変化量はプラセボ群のそれ($-0.26\% \pm 2.87\%$)より大きくなった($p = 0.065$ by スチューデントのt検定) (表3)。

[0114] 糞便微生物

Week 0とWeek 12の時点でのサブグループ解析集団において、ショットガンメタゲノム解析により糞便微生物叢を調べた。 α -多様性(Chao 1)および β -多様性解析を行い、両群の糞便微生物叢を比較した。興味深いことに、0週目および12週目において、両群間及び両群内で差は観察されなかった(図2 A、B)。しかし、被験食品群の腸内における*B. animalis*の相対存在量は0週目で $0.061\% \pm 0.002\%$ 、12週目で $1.503\% \pm 0.018\%$ に増加した。プラセボ群では0週目で $0.085\% \pm 0.004\%$ 、12週目で $0.014\% \pm 0.001\%$ であった。両群間の存在量の差は、組成データのLinear Model for Differential Abundance (LINDA)法を用いて評価し、偽発見率を最小化するためにBenjamini-Hochberg手順を用いてp値を補正した(非特許文献7)。12週目において、プラセボ群と比較した被験食品群の*B. animalis*の相対存在量には統計的に有意な差が認められた($p = 5.62 \times 10^{-9}$) (図2 C)。

[0115] <試験方法>

(糞便採取)

0週目、8週目、12週目の糞便サンプルは、RNA later Stabilization Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA) を入れた糞便容器を用いて、指定された受診日の3日前から当日の朝までに参加者が自宅で採取した。糞便サンプルは自宅では冷蔵庫で保管し、検査当日は保冷剤で冷却しながら検査室に持ち込んだ。

[0116] (糞便DNA抽出)

糞便サンプルの10倍希釈液から、ISOSPIN Fecal DNA Kit (株式会社ニッポンジーン、東京、日本) を用いて、前述の方法で細菌DNAを抽出した(非特許文献8)。具体的には、サンプル(ここでは200 μ Lの糞便希釈液)、700 μ LのFE1バッファー、および10 μ LのRNaseを、付属のビーズ付きチューブに加えた。FastPrep-24 (MP Biomedicals, Irvine, CA) を用いて、6 m/sの速度で1分間ビーズビートを行い、細胞を破碎した。ビーズ叩打を3回繰り返し、その間にサンプルを5分間室温に保った。その後、90 μ LのFE2緩衝液を加え、サンプルを12,000 $\times$ gで15分間遠心した。上清(最大500 μ L)を回収し、0.4容量のFB緩衝液およびイソプロパノールと混合した。最終的にサンプルをスピニングカラムにロードし、メーカーの指示に従って洗浄した。精製DNAは50 μ LのTris-EDTA (pH 8.0) バッファーで溶出した。

[0117] (ショットガンライブラリーの構築と配列決定)

特に断りのない限り、メタゲノムシーケンシングライブラリーの構築は、QIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、メーカーの指示に従って行った。簡単に説明すると、酵素断片化反応(50 μ L)には10 $\times$ FXバッファー、10 μ L FX酵素ミックス、500 ng DNAテンプレートを含み、反応は32 $^{\circ}$ Cで9分間インキュベートした。アダプターライゲーションに

は、5 μ Lのアダプター、20 μ LのDNAリガーゼバッファー、10 μ LのDNAリガーゼ、15 μ LのRNase-free H₂Oを加え、反応は20℃で15分間インキュベートした。Agencourt AMPure XP PCR purification system (Beckman Coulter, Brea, CA)を用いて、1容量および0.8容量のビーズ溶液を順次用いてアダプター結合断片を精製・サイズ選択し、10 mM Tris-HClバッファーで溶出した。

[0118] (メタゲノムリードの品質管理)

メタゲノムリードの品質管理とアダプター配列のトリミングはfastp (バージョン0.20.0)を用いて行った。50bp未満のリードは以降の解析から除外した。残りのリードはminimap2 (version 2.17)を用いてヒト(hg38)とphiXバクテリオファージゲノムにマッピングし、マッピングされたリードは除外した。フィルターステップで除外されたペアのリードも除去された。

[0119] (非冗長遺伝子セットの構築と機能アノテーション)

HMPおよび個体群レベルのメタゲノミクスデータをもとに、冗長性のない遺伝子セットを構築した。全遺伝子をcd-hit (version 4.8.1)を用いて95%の同一性閾値でクラスタリングした。非冗長遺伝子の機能アノテーションはeggNOG-mapper (version 2.1.9)を用い、eggNOG orthology database (version 5.0.2)に基づいて行われた。配列検索はDIAMOND (version 2.0.15)を用いて行った。

[0120] (サンプルの分類学的および機能的プロファイル)

mOTUs2 (バージョン3.0.3)を用いたマーカー遺伝子ベースのアプローチにより、種および属レベルの分類学的プロファイルを得た。遺伝子機能の定量化のために、メタゲノムリードを非冗長遺伝子にマップし、同一性閾値95%以上のminimap2を用いて、各遺伝子のマップリード数をカウントした。一意にマップされたリードの数の遺伝子に対する比率に基

づいて、多重マップされたリードの数をマップされた遺伝子に分配した。カウントは、100万あたりの転写産物に正規化され、100万あたりの転写産物マトリックスを形成した。

[0121] 身体パラメーター

Week 0時点のFMD (%) が4 %以上の被験者集団において、被験食品群の血中総コレステロール濃度 (8週目: $-2.75 \pm 11.51 \text{ mg/dL}$ 、12週目: $-3.75 \pm 21.09 \text{ mg/dL}$) が低下し、0週から8週目における被験食品群の変化量とはプラセボ群のそれ ($3.87 \pm 13.74 \text{ mg/dL}$) より大きくなった ($p = 0.081$ by スチューデントのt検定)。被験食品群の血中LDL-c濃度 (8週目: $-4.17 \pm 9.18 \text{ mg/dL}$ 、12週目: $-4.29 \pm 15.14 \text{ mg/dL}$) が低下した。0週から8週目における被験食品群の血中LDL-c濃度変化量とプラセボ群のそれ ($3.57 \pm 10.93 \text{ mg/dL}$) との間には統計上有意味な差が認められた ($p = 0.012$ by スチューデントのt検定)。0週から12週目における被験食品群の血中LDL-c濃度変化量はプラセボ群のそれ ($2.14 \pm 9.73 \text{ mg/dL}$) より大きくなった ($p = 0.092$ by スチューデントのt検定)。被験食品群の血中PAI-1濃度 (8週目: $-1.83 \pm 5.25 \text{ ng/mL}$ 、12週目: $-1.25 \pm 4.66 \text{ ng/mL}$) が低下した。0週から8週目における被験食品群の血中PAI-1濃度変化量はプラセボ群のそれ ($0.52 \pm 2.61 \text{ ng/mL}$) より大きく ($p = 0.058$ by スチューデントのt検定)、0週から12週目における被験食品群の血中PAI-1濃度変化量はプラセボ群のそれ ($0.86 \pm 3.12 \text{ ng/mL}$) より大きくなった ($p = 0.076$ by スチューデントのt検定) (表4)

上記試験により、*Bifidobacterium animalis subsp. lactis* GCL2505とイヌリンを含むヨーグルトの摂取が、健康な成人の血管内皮機能に及ぼす影響について調査した。

- [0122] 今回の試験には Flow-Mediated Dilation (FMD) が用いられた。FMDは上腕駆血処理の解除によって生じる血流依存性の血管拡張反応を利用した血管内皮機能検査である。駆血解除後に血流が増加することで、血管内皮に Shear Stress (ずり応力) がかかり、一酸化窒素をはじめとした血管拡張物質が産生される。それらが血管内皮に隣接する血管平滑筋に作用し、血管平滑筋が弛緩することによって血管拡張反応が惹起される。安静時血管径に対する最大拡張血管径の比率は、FMD (%) と表記される。血管内皮機能障害が生じると、血管内皮より産生、放出される一酸化窒素の生物学的利用度が低下するため血管拡張反応が減弱し、FMD (%) は低値になる。FMDは非侵襲的で患者への負担が少なく、さらにCVD発症リスク評価に有用な検査だと認識されている（非特許文献9）。
- [0123] GCL2505とイヌリンを含むヨーグルトを12週間摂取した今回の試験では、被験食品群のFMD (%) が0.85%上昇した。さらに被験食品群における0週から12週目のFMD (%) の変化量は、プラセボ群のそれと比べて有意に増加した。
- [0124] 被験者の糞便微生物叢を分析した結果、 α -多様性と β 多様性解析において、GCL2505とイヌリンの影響は認められなかった。健康なヒトにおける食物繊維の介入は、特定の細菌の存在量を増加させるが、腸内細菌叢の多様性には影響を与えないことが報告されている（非特許文献10）。糞便微生物叢に変化がなかったのは、本研究の対象者が健康であり、腸内細菌叢異常症がなかったための可能性がある。B. animalisの相対量は、活性群の被験者のみ腸内で増加し、プラセボ群では増加しなかった。つまり、摂取されたGCL2505は生きたまま腸に到達したのである。一方で、腸内におけるB. animalisの相対存在量の増加は、主要なSCFAである酢酸の産生を増加させた可能性がある
- [0125] 今回の試験では被験食品群の血中LDLコレステロール (LDL-c) 濃度に影響が確認された。血管壁に沈着したLDL-cは酸化LDLになり

、その刺激が血管内皮細胞の機能障害や接着因子の発現亢進に寄与する。酸化LDLはマクロファージに取り込まれて泡沫細胞の形成に関係し、局所的および全身的なプラークの炎症に寄与することによって動脈硬化病変の成長を持続させる。すなわち今回の試験で見られた血管内皮機能の改善は、血中LDL-c濃度の低下によって引き起こされた可能性がある。さらに、今回の試験では被験食品群の血中plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 濃度がプラセボ群のそれと比べて減少していた(8週目、 $p=0.058$ 、12週目、 $p=0.076$)。PAI-1は線溶制御を担うサイトカインで、フィブリン上で血栓溶解薬として知られるtissue plasminogen activator (t-PA) を阻害することで血栓の溶解を強く阻害する。PAI-1の上昇はアテローム性血栓症と相関があり、PAI-1は肥満のメタボリックシンドローム患者およびII型糖尿病患者で増加したと報告されている。すなわちGCL2505とイヌリンの摂取が血管内皮機能を改善した理由は、血中PAI-1濃度が内臓脂肪の低減を介して減少し、線溶を活性化されたからだと考えることもできる。また、内臓脂肪と血中LDL-c濃度の間には正の相関があることが報告されているため、血中LDL-c濃度の低下が確認された今回の試験の被験食品群は内臓脂肪量に影響があった可能性がある。

[0126] GCL2505とイヌリンによる血管内皮機能の改善効果は以下の2ステップで構成された作用機序によって達成されたとの仮説が成り立つ。第1ステップ: GCL2505とイヌリンの摂取によって、腸内細菌叢の変化を介した内臓脂肪低減効果が発揮される。臨床研究でGCL2505を含むヨーグルトの毎日の摂取が、腹部の内臓脂肪量を減少させることが明らかにされている。そして堀内らはGCL2505の投与は腸内のB. lactis 数および血漿中の酢酸濃度を増加させ、続いてGPR43依存的に宿主のエネルギー代謝を調節する(体脂肪蓄積抑制、インスリン感受性向上、全身脂肪酸代謝促進など)ことをGPR43ノックアウトマウスによって証明した。GPR43は宿主の短鎖脂肪酸受容体として知られているGタンパク質共

役受容体の1つで、酢酸が脂肪細胞のGPR43を活性化して脂肪細胞のインスリンシグナルを調節することで脂肪蓄積を抑制することが報告されている。第2ステップ：内臓脂肪の減少を契機として以下のステップを介して血管内皮機能障害の発生が抑制される。1) 内臓脂肪の減少を介した血中脂質濃度の減少による、血中LDL-c濃度の低下：LDL-cはプラーク生成の原因物質であり、その合成は内臓脂肪組織から排出される遊離脂肪酸の量と関係がある。2) 内臓脂肪の減少を介したplasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の発現抑制：PAI-1は脂肪細胞で産生されるアディポサイトカインの1つで、動脈硬化に強く関連する線溶を制御している。今回の試験では、GCL2505とイヌリンが脂肪蓄積の抑制効果を介して血管内皮機能に対する貢献をすることが証明された。

[0127] 以上のことから、GCL2505とイヌリンを含むシンバイオティクス飲料を摂取すると、内臓脂肪低減効果が発揮された結果、血管内皮機能を向上させることが示唆された。メタ解析の結果から1%のFMD (%)の上昇によってCVD発症リスクの約13%の低下が生じるとの報告があるため、今回の知見は臨床的に意味のある結果だと考えられる。さらにFMD (%)は、腎機能との間にも相関が報告されていることから、血管内皮機能障害の改善は、腎臓の病気の発症リスクを下げる可能性もある。よってこれらの組合せはCVDだけに留まらない複数の疾患に対するリスクを低下させ、健康増進に大きく寄与する可能性があることから、今回得られた結果は臨床的に意義があるものだと考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、血管内皮機能を改善するための組成物。
- [請求項2] 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための組成物。
- [請求項4] ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、動脈硬化症を予防するための組成物。
- [請求項5] ビフィズス菌及び水溶性食物繊維を含む、腎機能を改善するための組成物。
- [請求項6] 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項7] 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項8] 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項9] 食品である、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項10] さらにアルギニンを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。
- [請求項11] 血管内皮機能を改善するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [請求項12] 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、請求項11に記載の使用。
- [請求項13] 血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制のための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [請求項14] 動脈硬化症を予防するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。

- [請求項15] 腎機能を改善するための組成物を製造するためのビフィズス菌及び水溶性食物繊維の使用。
- [請求項16] ビフィズス菌を含む血管内皮機能改善用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [請求項17] 血管内皮機能の改善が血中LDL-c濃度の低下及びPAI-1の低下の一方又は両方を含む、請求項 16 に記載の使用。
- [請求項18] ビフィズス菌を含む血管の柔軟性又はしなやかさの維持又は低下抑制用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [請求項19] ビフィズス菌を含む動脈硬化症予防用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [請求項20] ビフィズス菌を含む腎機能改善用組成物を製造するための水溶性食物繊維の使用。
- [請求項21] 水溶性食物繊維がイヌリンを含む、請求項 11 ～ 20 のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項22] 前記ビフィズス菌が腸内での増殖能を有する、請求項 11 ～ 20 のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項23] 前記ビフィズス菌が抗メタボリックシンドローム効果を有する、請求項 11 ～ 20 のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項24] 前記組成物が食品である、請求項 11 ～ 20 のいずれか一項に記載の使用。
- [請求項25] 前記組成物がさらにアルギニンを含む、請求項 11 ～ 20 のいずれか一項に記載の使用。