

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—122428

⑮ Int. Cl.³
A 61 K 37/02
35/74
// C 07 G 7/00

識別記号
ADN

庁内整理番号
7138—4C
7138—4C
6956—4H

⑬ 公開 昭和59年(1984)7月14日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑭ コレステロール低下活性蛋白質

⑯ 発明者 矢沢一良

相模原市鶴野森571グリーンハイ
イツD1—501

⑰ 特願 昭57—227395

⑱ 出願 昭57(1982)12月28日

⑲ 出願人

株式会社アドバンス開発研究所
東京都中央区日本橋小舟町5番
7号

⑳ 発明者 河合康雄

厚木市毛利台2の8の12

明 細 書

1. 発明の名称

コレステロール低下活性蛋白質

2. 特許請求の範囲

(1)(a) ゲルろ過法による分子量：30,000 ±
7,000

(b) 等電点：7.9 ± 0.2

(c) アミノ酸組成 (モル比%)：グリシン
25.23, アラニン10.98, グルタミン
酸10.34, アスパラギン酸8.20, リジ
ン6.39, ロイシン5.58, バリン5.41,
イソロイシン5.18, スレオニン4.23,
チロシン4.19, セリン3.46, プロリン
2.62, アルギニン2.60, フェニルアラ
ニン2.51, メチオニン1.56, ヒスチジ
ン1.30及びシステイン0.16

(d) 電気泳動パターン：ポリアクリルアミド
ゲル電気泳動 (ポリアクリルアミド濃度7
%, トリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3))

に於いて陽極側に先鋭な単一のバンドを与
え、且つ

(e) 哺乳動物に対しその血中コレステロール
低下作用を有することを特徴とする、コレ
ステロール低下活性蛋白質CRP。

(2) ストレプトコッカス属に属する微生物より
得られることを更に特徴とする特許請求の範
囲第(1)項に記載の前記蛋白質CRP。

(3) 有効成分として前記蛋白質CRPを含有す
ることを特徴とするコレステロール低下乃至
抗動脈硬化剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規なコレステロール低下活性蛋白
質CRP及び有効成分としてこの蛋白質を含有
するコレステロール低下乃至抗動脈硬化剤に関
する。今日、所謂典型的成人病の1種である動
脈硬化性疾患乃至高脂血症等の治療・予防薬と
してはクロフィブレート関連製剤を始めとして
幾つかが提案されているが、薬理効果及び副作用
等の点でこれらは必ずしも充分満足し得る

ものとは云い難くより効果的な薬剤への希求が一段と高まっている。

本発明者らは新規抗動脈硬化剤につき鋭意研究の結果、ストレプトコッカス属に属する各種微生物菌体乃至その培養上清から得られる新規蛋白質が血中コレステロール値を極めて効果的に低下せしめ得るものであり且つその起源が所謂腸内細菌であるこれら菌体乃至培養上清の当該抽出成分は経口では実質的無毒性であることを知見し、本発明に到達したものである。

以下、本発明に於いて使用され得る微生物、蛋白質CRPの製法、理化学的性質及び薬理作用等につき詳細に分説する。

微生物

1. 種類

ストレプトコッカス属に属する各種微生物が使用され得、就中、ストレプトコッカス・フェシウム、ストレプトコッカス・フェカリス、ストレプトコッカス・ボービス、ストレプトコッカス・エビウム、ストレプトコッ

(3)

と同一の諸性質を有する。

すなわち、本発明微生物の菌学的性質及び培養条件等に関しては下記諸文献が参照される。

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 490-509 (1974)
- 2) Int. J. Syst. Bact. 16 114 (1966)
- 3) Microbiol. Immunol. 25(3), 257-269 (1981)
- 4) J. Clin. Pathol. 33 53-57 (1980)
- 5) J. General Microbiol., 128 713-720 (1982)
- 6) Applied Microbiol., 23(6) 1131-1139 (1972)

ここで、前出各種菌株につきその主な菌学的性状を要約して表示すれば次の通りである。

(5)

カス・デユランス、ストレプトコッカス・サリヴァリウス、ストレプトコッカス・ミティス、ストレプトコッカス・イクイヌス等を好適なものとして例示し得る。

更に、本発明に於いて特に有用な具体的菌株例を微工研受託番号と共に表示すれば下記の通りである。

第 1 表

菌 株 名	受託番号		
Streptococcus faecium	ADV1009	FERM	P-6624
“ “ faecalis	ADV9001	“ “	-6625
“ “ avium	AD2003	“ “	-6626
“ “ salivarius	ADV10001	“ “	-6627
“ “ durans	ADV3001	“ “	-6628
“ “ mitis	ADV7001	“ “	-6629
“ “ equinus	ADV8001	“ “	-6630

2. 菌学的性質

菌学的性質の点では、本発明で使用する微生物は同一分類菌につき公知各文献の示すもの

(4)

第 2 表

性 状	菌 株						
	ADV 1009	ADV 9001	AD 2003	ADV 10001	ADV 3001	ADV 7001	ADV 8001
細胞形状	球状	球状	球状	球状	球状	球状	球状
グラム染色性	+	+	+	+	+	+	+
溶血性	α	α	α	α	α	α	α
10℃での増殖	+	+	±	-	+	-	-
45℃での増殖	+	+	+	±	+	±	+
50℃での増殖	+	-	-	-	+	-	-
60℃30分での熱耐性	+	+	+	-	+	-	-
pH 9.6 培地での増殖	+	+	+	-	+	-	-
メチレンブルー還元性	+	+	-	-	+	-	-
ゼラチンの液化	-	-	-	-	-	-	-
NaCl 添加(65%)培地での増殖	+	+	-	-	+	-	-
胆汁添加(40%)培地での増殖	+	+	+	-	+	-	+
アンモニア産生	+	+	ND	-	+	±	-
馬尿酸水解性	-	±	-	-	+	-	-
テルライト添加培地での増殖	-	+	-	ND	-	ND	-
TTC [®] 添加培地での増殖	-	+	-	ND	-	ND	-
炭素源からの酸生産性							
グルコース	+	+	+	+	+	+	+
エスクリン	±	+	+	+	±	ND	+
イヌリン	-	-	-	+	-	-	±
ラクトース	+	+	+	±	+	±	-
グリセロール	-	+	±	-	-	-	-
アラビノース	+	-	+	-	-	-	-
メレシトース	-	+	±	ND	-	ND	-
ソルビトール	-	+	+	-	-	-	-
血清(群抗原)	D	D	Q(D)	K	D	-	D

(※ 2, 3, 5 - トリフェニルテトラゾリウムクロリド)

(6)

3. 培養方法

これらの微生物の培養は上記の通り常法によるものであるが、例えばロゴサ (Rogosa) 液体培地 (註) にて好氣的に静置培養し、得られた培養液を遠心分離してその菌体が採集される。

(註)

ロゴサ液体培地の組成

蒸留水 1 ℓ 中に	
トリプチケース	10 g
酵母エキス	5 g
トリプトース	3 g
K ₂ HPO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	3 g
クエン酸三アンモニウム	2 g
ツイーン 80	1 g
グルコース	20 g
システイン塩酸塩	0.2 g
※塩類溶液	5 ml
(pH 7, 121°C 15分間加熱滅菌)	
※塩類溶液蒸留水 100 ml 中に	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1.15 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0.68 g
MnSO ₄ · 2 H ₂ O	2.4 g

(7)

3. 脱脂処理工程

前記破壊菌体懸濁液をクロロホルム・メタノール (2 : 1 V/V) 混合溶媒により充分に脱脂する。次いで遠心分離処理 (3,000 rpm : 10分) してクロロホルム層を捨て他を取り、これを以下の工程に付する。

4. 蛋白分解酵素処理工程

前記採取物を常法によりプロナーゼ、トリプシン、ペプシン等の蛋白分解酵素処理する。ここにおいて各種蛋白分解酵素中プロナーゼが特に有用であり、その処理条件等は次の文献に準ずる；

Methods in Enzymology Vol. VII, p 26 (1966)。

5. 精製処理工程

前記酵素処理後の遠心分離上清液をトリクロロ酢酸、硫酸アンモニウム等の蛋白沈澱剤等を添加して蛋白質画分を沈澱、分取する。次いでこの画分に混入するDNA, RNA等の核酸成分をそれらの分解酵素により分解処理し透析を繰り返して除去する。

(9)

蛋白質CRPの製法

本発明蛋白質CRPの典型的製法の1例につきその概要を各工程ごとに示せば次の通りである。

1. 菌体採集工程

前記各微生物等の菌株を前述のロゴサ液体培地に接種し、37°Cにて5~10時間好氣的に静置培養して所定生菌数濃度の培養液をつくり、得られた培養液を12,000 rpmの連続遠心分離に付し菌体を集め、生理食塩水で2~3回洗浄して採集菌体とする。

2. 菌体破壊処理工程

- 前記採集菌体を生理食塩水 (0.85% NaCl水溶液) に懸濁して得られる菌液を115°Cで10分間加熱 (オートクレーブ) し、破壊菌体懸濁液とする。
- 前項 a) に示す菌液を超音波破壊処理 (15 K C, 60分) し、破壊菌体懸濁液とする。

(8)

このようにして精製の進んだ試料は、更にゲルろ過法、硫酸沈澱法等により精製が繰り返されて最終的に単離された蛋白質CRP精製標品を与える。

尚、増殖菌体等からの蛋白質CRPの製造は、より一般的にはその理化学的性質 (後記) を参照して沈澱一再溶解抽出、透析、カラムクロマトグラム、電気泳動、ゲルろ過、或いはこれらの手段の組合せなど当該分野で汎用の多くの分別精製方法により達成され得、従って本発明は特定の採取精製方法に何等限定されるものではない。

すなわち、当該薬理活性は蛋白質画分に認められるのであるから、本発明はストレプトコッカス属微生物より蛋白質成分を採取することより成るコレステロール低下剤の製法にも係わるものである。

そのより詳細は後記実施例が参照される。尚、培養上清の活性は菌体の夫の約1/5程度である。

蛋白質CRPの理化学的性質

本発明蛋白質CRPの理化学的乃至生理学的諸性質を要約して示せば次の通りである。

1. 存在状態及び溶解特性

脱塩後、凍結乾燥して得られる粉末標品は、非潮解性白色粉末であり、100mg/ml程度までは室温で水に易溶、アセトン等の有機溶媒に易溶。

冷時(4℃)、蛋白質CRPの水溶液に硫酸、トリクロロ酢酸の添加により各々白濁、沈澱を生ずる。

2. 分子量

0.3M NaCl付加25mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化させた東洋漕達社製 Toyopearl HW-55 カラム(2.7×45cm)を用いたゲルろ過法による分子量は30,000±7,000である。

3. 等電点

LKB社製 Ampholine®(pH 3.5-10)終濃度2%を含む5%ポリアクリルアミドゲル

(570mm)、電極液0.02M H₂PO₄(+), 1M NaCl(-)、4℃、200V定電圧下通電3時間、試料添加量100μg、クーマシープリリアントブルーによる検出の条件下でのゲルディスク等電点分離法による等電点pHは参照蛋白質ラットヘモグロビン及び同マッコウクジラミオグロビンの間に位置し、7.9±0.2。

4. アミノ酸組成

試料1mgを1ml 6NHClに懸濁した後、アンプルに注入し、ドライアイス・メタノール寒剤にて凍結し真空ポンプ減圧下、N₂ガス置換する。この減圧置換操作を3回繰り返した後、減圧状態で封管する。次に、110℃ドライブロックバスにて24時間加水分解処理し、ロータリエバポレータにより完全に塩酸を除去し、1/50NHCl 200μlに懸濁し、その50μlをアミノ酸分析(日立製作所社製835型日立高速アミノ酸分析計)操作に付した。

結果を下記第3表に示す。

01

02

第3表

アミノ酸	モル比%
グリシン	25.23
アラニン	10.98
グルタミン酸	10.34
アスパラギン酸	8.20
リジン	6.39
ロイシン	5.58
バリン	5.41
イソロイシン	5.18
スレオニン	4.23
チロシン	4.19
セリン	3.46
プロリン	2.62
アルギニン	2.60
フェニルアラニン	2.51
メチオニン	1.56
ヒスチジン	1.30
システイン	0.16

5. ディスク電気泳動パターン

ポリアクリルアミドゲル(ポリアクリルアミド濃度7%、トリス・グリシン緩衝液(pH 8.3))、試料25μg、通電4mA、2.5時間/ゲル1本、プロモフェノールブルーによる検出の条件下でのディスク電気泳動に於いて、距離(スパーサ・ゲル先端を基準として)4.2±0.2cmの位置に先鋭な単一のバンドを与える。

第1図はそのゲル状態図及びデンストメータによる泳動図である。

6. 生理学的性質

哺乳動物に対し経口投与によりその血中コレステロール値低下作用を有する。

この活性は少なくとも-80~115℃或いはpH 4.1~10.9のはん囲内で安定である。

蛋白質CRPの薬理作用

1. 薬理効果

後記実施例に示す通り本発明蛋白質CRPより成る抗動脈硬化剤は、血中コレステロー

ル値を極めて効果的に低下せしめるものであり、したがって、この指標と密接な関連を有する動脈硬化症を始めとし、高脂血症、高リポ蛋白血症、黄色腫症、胆石症、高血圧症、糖尿病等の疾患に対しその治療乃至予防薬として有用なものと云い得る。

本発明剤は又、経口投与、腹腔内投与、静注等の手段で適用され得、その用量は通常約1 μg ~ 約1 g / kg 体重 (1回)、より好ましくは経口投与で約0.1 mg ~ 約100 mg / kg 体重 (1回) 程度であり、その剤型としては生理食塩水等への溶解液剤、注射液剤、凍結乾燥等による粉末剤、或いは座剤、腸溶剤、舌下錠、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等々、通常の剤型を適当なキャリヤ、増量剤、希釈剤等と共に適宜選択使用し得る。

2. 急性毒性

後記実施例に示す通り、本発明蛋白質CRPのLD₅₀値は802 mg / kg 体重・マウス (腹腔内投与) 以上であり、経口投与の場合は実質

的に無毒性である。

実施例 I

(蛋白質CRPの製造及び精製)

ストレプトコッカス・フェシウム (Streptococcus faecium) ADV1009 (FERM P-6624) 菌株をロゴサ液体培地2 ℓ に生菌濃度 1×10^8 個/ ml 接種し、37 $^{\circ}\text{C}$ にて10時間、好氣的に静置培養して生菌数 10^8 個/ ml の培養液を調製し、これを12000 rpm の連続遠心分離に付して菌体を採集し (菌体乾燥重量2.0 g)、生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液) で充分洗浄した後、生理食塩水に懸濁して菌液100 ml (2×10^{10} / ml) を得た。

次にこの菌液を115 $^{\circ}\text{C}$ 、10分間オートクレーブ処理し、更にこれをクロロホルム・メタノール (2:1 V/V) 混合溶媒200 ml / 回で3回脱脂処理した。

脱脂処理後の菌液を3000 rpm、10分間遠心分離しその下層のクロロホルム層を捨て、残りを以下の精製単離の出発材料とした。

09

次いで前記材料に0.0015 M CaCl₂ 付加リン酸緩衝液 (pH 7.8) 100 ml を加え、これをプロナーゼ (シグマ社製プロテアーゼ・タイプXV) 20 mg により47 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間酵素処理し、その後更にプロナーゼ10 mg を添加して47 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間酵素処理した。尚、プロナーゼによる処理条件等は次の文献に準拠した; Methods in Enzymology Vol. VI, P26 (1966)。得られた被処理物を3000 rpm、10分間遠心分離処理に付し上清と沈澱に分別しその上清を取り試料液とした。

次に試料液に100% TCA (トリクロロ酢酸; W/V) $\frac{1}{9}$ 容加え4 $^{\circ}\text{C}$ 、3時間攪拌し、3000 rpm、10分間遠心分離処理し上清と沈澱に分別した。沈澱は更に10% TCA 同量により4 $^{\circ}\text{C}$ 、3時間攪拌、次いで同様に遠心分離により再採取後、エーテルにてTCA除去、洗浄処理し (3回)、蒸留水50 ml に溶解して1 N NaOH 水溶液にて中和し、透析して完全にTCAを除去、遠心分離して最終的に沈澱画分 (乾燥

10

重量345 mg) を得た。

この沈澱画分 (345 mg) に0.1 M トリス酢酸緩衝液 (pH 8.0) 5 ml 、0.1 M 酢酸マグネシウム1 ml 及びDNA分解酵素 (シグマ社製Deoxy-ribonuclease I) 水溶液 (2 mg / ml) 0.06 ml を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間振盪反応させ、分子量3,500以下透過性透析膜 (半井化学薬品社製セロチューブ) で3昼夜、蒸留水で透析し、透析内液減圧濃縮試料を調製した。次いで、この試料を440 Units のRNA分解酵素 (シグマ社製Ribonuclease T₂) の添加された0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 5 ml に分散、37 $^{\circ}\text{C}$ 、3時間反応させ、透析処理しその透析内液 (分子量 > 20,000) として精製画分 I (乾燥重量285 mg) を得た。

精製画分 I は上記と同一の条件下で再度RNA分解酵素処理及び透析処理されて精製画分 II (乾燥重量274 mg) を与える。この画分を0.3 M NaCl 付加25 mM Tris・HCl 緩衝液で平衡化させたToyopearl HW 55 カラム (前出) により溶出速

度 1 ml / 分でゲルろ過したときのカラムクロマトグラフ図を第 2 図に示す。

図中、曲線 A は 280 nm で比色定量した蛋白質、同 B は 260 nm 比色定量核酸、同 C はフェノール・硫酸法による糖を示すものである。

次に第 2 図破線 D (溶出容量 67 ml) 以上の部分を分取し、硫酸分画 (55% 飽和上清) 処理しその上清として精製画分 III (乾燥重量 205.5 mg) を得た。

第 3 図は前記と同一の条件下での精製画分 III のカラムクロマトグラフ図である。

この画分は未だわずかに糖を含むのでこれを前記と同様に 10% TCA で 3 回除糖、透析処理して最終的に単離、精製された本発明蛋白質 CRP (乾燥重量 197.3 mg) を得た。

前記と同等条件下での蛋白質 CRP のカラムクロマトグラフ図を第 4 図に示す。

このようにして単離された蛋白質 CRP の理化学的性質は前記の通りである。

ここで、以上の各工程ごとの収量 (乾燥重量)、

蛋白質量 (Lowry 法)、RNA 量 (オルシノール法)、DNA 量 (ジフェニルアミン法) 及び糖質量 (フェノール・硫酸法) を要約して示せば下記第 4 表の通りである。

表中、単位は全て乾燥重量 (mg) である。

第 4 表

画 分	収量	蛋白質	RNA	DNA	糖	比活性
沈澱画分	345	265.9	43.6	6.3	14.3	9.1
精製画分 I	285	260.1	11.3	1.2	12.1	11.7
精製画分 II	274	258.3	3.6	0.8	11.2	11.8
精製画分 III	205.5	202.6	trace	trace	2.9	16.9
蛋白質 CRP	197.3	197.3	trace	trace	trace	17.6

尚、第 4 表中、比活性は通常ラットに於けるコレステロール低下活性につき死菌体の夫を 1 としたときの単位重量当りの相対活性を示すものであり、測定条件等は後記実施例 II に準ずる。

他方、前記第 1 表に揭示の他の菌株を使用した場合も、収率に多少はあるが本例と全く同様に蛋白質 CRP が精製単離されることが確認さ

09

れた。

実施例 II

(蛋白質 CRP の薬理効果)

1. コレステロール低下活性 (I)

蛋白質 CRP 凍結乾燥精製標品各 50 mg / Kg 体重相当量を生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液) 1 ml に溶解して試料を調製し、これを通常ラット (雄 18 週令、平均体重 246 g ; 各群 10 匹)、通常及び無菌マウス (雄 18 週令、平均体重 30 g ; 各群 10 匹) に経口的に連日投与後、12 及び 8 週間飼育し、次いでこれらラットの下大動脈より動脈血を採集、遠心分離して血清標品を得、コレスキット (商品名 ; 関東化学社製、Zurkowski 法) により血清標品中コレステロール値を測定した。結果を第 5 表に要約して示す。

尚、表中、対照は試料無投与ラット及びマウス群であり、各数値は対照群を 100% としたときの低下率 (%) である。

又、ダイエットすなわち飼料の組成 (重量%)

00

は下記第 6 表の通りでありこれを自由摂取とした (以下、同様)。

第 5 表

動物種	低下率 (%)
通常ラット (12 週間)	25.2 ± 0.7
通常マウス (8 週間)	33.5 ± 1.1
無菌マウス (8 週間)	21.7 ± 0.9

第 6 表

カゼイン	20
大豆油	10
小麦でんぷん	61
ミネラル	4
ビタミン混合物	2
ろ紙粉末	3

2. コレステロール低下活性 (II)

前記試料 1 ml を通常ラット (雄 18 週令、平均体重 238 g ; 各群 15 匹)、通常及び無菌マウス (雄 18 週令、平均体重 31 g ;

各群10匹)に12週間、経口的に連日投与し、前記と同様にして血清中コレステロール値を測定した。結果を第7表に示す。

尚、表中、“コレステロール負荷”又は“果糖負荷”は、前記飼料に更に1%コレステロールを添加したもの或いは小麦でんぷんを果糖にて全量置換した飼料を使用した場合を示すものであり、数値は無投与群を100%としたときの低下率(%)である。

第7表

動物種	低下率
無菌マウス(*)	35.4 ± 1.3
通常マウス(*)	38.9 ± 0.7
通常ラット(*)	49.2 ± 1.1
通常ラット(**)	41.5 ± 1.3

*)コレステロール負荷ダイエツト

**)果糖負荷ダイエツト

3. コレステロール低下活性(III)

蛋白質CRP精製標品各10mg/生理食塩

(2)

結果を第9表に示す。

第9表

mg/ラット	コレステロール低下率(平均値;%)
対照	0
0.1	9.8 ± 0.7
1	14.3 ± 1.2
10	47.9 ± 1.1
20	51.1 ± 0.9

5. 急性毒性

ICR系マウス(雄6週令、平均体重31.4 ± 0.6g、各群10匹)を使用し、蛋白質CRP精製標品1mg、10mg及び100mgの3段階の投与量でその生理食塩水0.5ml溶解液を腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値は802mg/Kg体重以上であり、経口投与の場合は実質的に無毒性であった。

尚、対照は生理食塩水である。

(2)

水1mlの試料を、コレステロール負荷ダイエツトにより作製した高脂血ラット(雄18週令、平均体重250g、各群5匹)に連日経口的に2週間投与し、前記と同様にしてその血清中コレステロール値を測定した。

結果を第8表に示す。表中、対照群は試料無投与群であり、数値は無投与群を対照としたときの低下率である。

第8表

コレステロール低下率(%)

投与群	49.9
対照群	0

4. 用量-反応関係

蛋白質CRP精製標品各0.1mg~20mgを生食水1mlに溶解して試料を調製し、これを通常ラット(雄6週令、平均体重216g、各群5匹)に4週間、経口的に連日投与し、前記と同様にして血清中コレステロール値を測定した(対照無投与群)。

(2)

6. 製剤例

① 蛋白質CRP精製標品50mgを精製でんぷん末250mgと均一に混合、打錠して経口投与用錠剤とした。この錠剤は体重50kgの成人における死菌体用量約 10^{10} 個/kg体重に相当する。

② 蛋白質CRPは炭酸カルシウム、ラクトース等の賦形剤、でんぷん、アルギン酸塩等の顆粒形成剤、ステアリン酸、タルク等の滑沢剤等々と混合、打錠して経口投与用錠剤形態を取り得るものであるが、その1日当りの投与量は通常、0.1mg~100mg/kg・体重程度である。

③ 本品900mgをシロップで呈味した精製水30ccに分散、溶解してシロップ液剤を調製した。

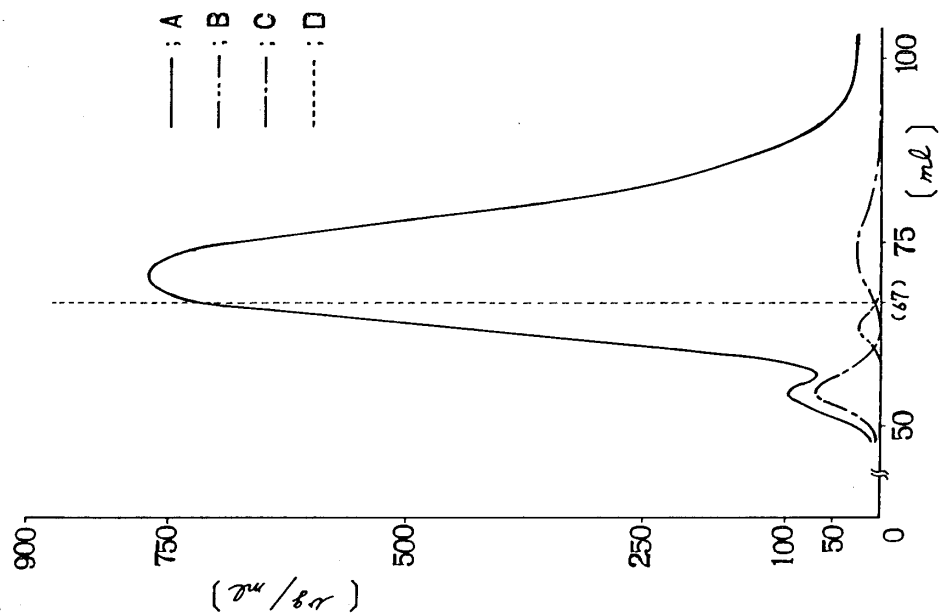
4. 図面の簡単な説明

添付第1図は本発明蛋白質CRPのポリアクリルアミドゲル電気泳動実験説明図、第2乃至4図は本発明実施例IIの実験説明図である。

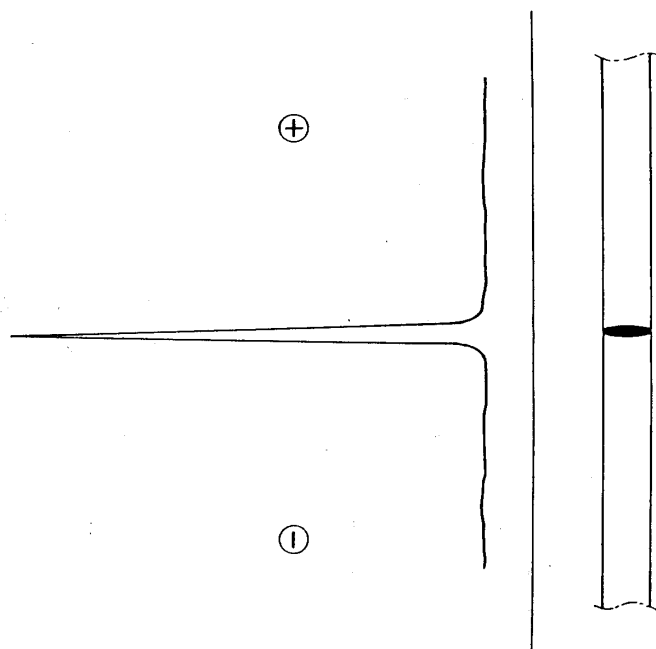
特許出願人 株式会社 アドバンス開発研究所

(2)

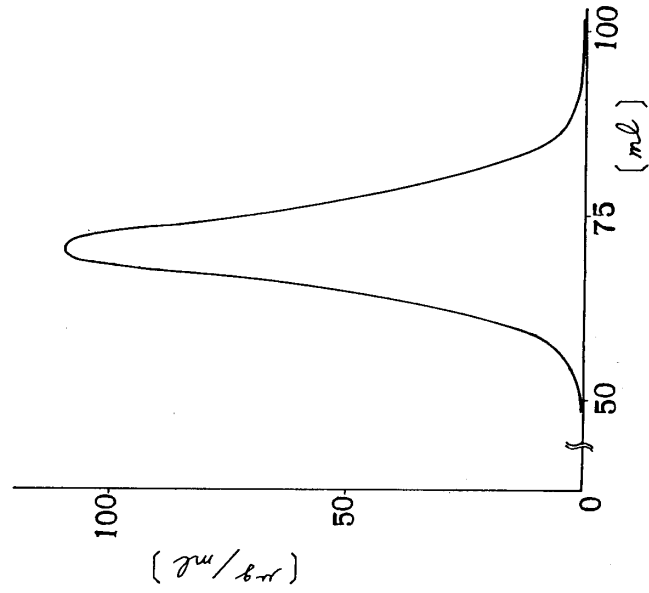
第 2 図



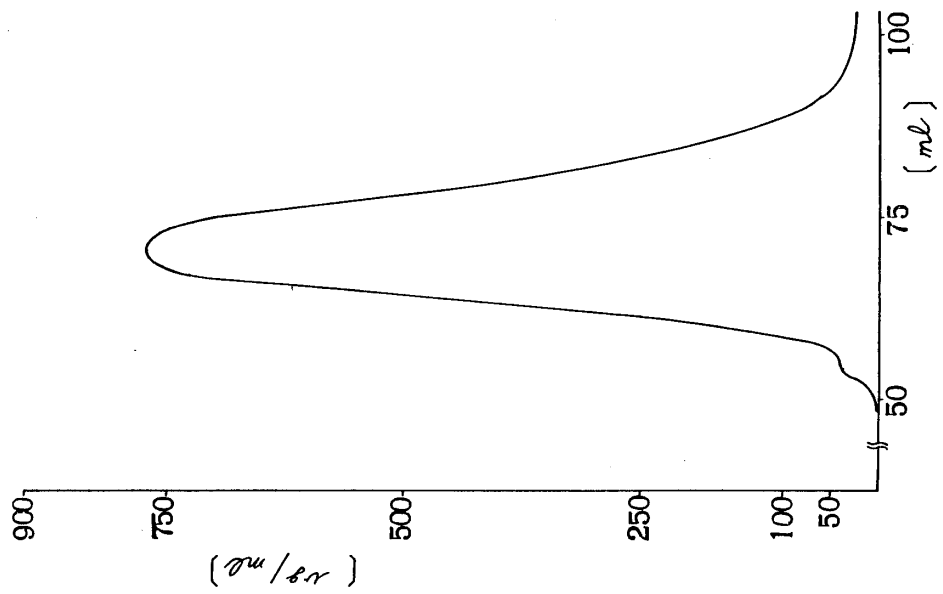
第 1 図



第 4 図



第 3 図



手続補正書(自発)

昭和58年7月27日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許願第227395号

2. 発明の名称

コレステロール低下活性蛋白質

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋小舟町5番7号
(TEL 03-667-1551)

氏名 株式会社アドバンス開発研究所

代表取締役 浦 壁 伸 周



4. 補正の対象

明細書の[発明の詳細な説明]の欄

5. 補正の内容

明細書第4頁第8行目から16行目第1表を下記の通りに訂正する。

第1表

菌 株 名	受託番号
Streptococcus faecium ADV1009	FERN BP-298
" " faecalis ADV9001	" " -297
" " avium AD2003	" " -298
" " salivarius ADV10001	" " -299
" " durans ADV3001	" " -300
" " mitis ADV7001	" " -301
" " equinus ADV8001	" " -302