

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60—28401

⑤ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和60年(1985)2月13日
C 08 B 37/00		7133—4C	
A 61 K 35/74	A B X	7138—4C	発明の数 1
C 12 P 1/04		6760—4B	審査請求 未請求
		7110—4B	
//(C 12 P 19/04			
C 12 R 1:46)			

(全 8 頁)

⑭ トリグリセリド低下活性多糖類

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58—135982

⑱ 出 願 昭58(1983)7月27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

明細書の添付(内容に変更なし)
日 月 年 日

1. 発明の名称

トリグリセリド低下活性多糖類

2. 特許請求の範囲

(1) (a) 比旋光度： $[\alpha]_D^{29} = +190.1(1.8w/v\% \text{水溶液})$

(b) ゲルろ過法による分子量：14,000±3,000

(c) ガスクロマトグラフによる糖構成：グルコース70.3
%, ラムノース13.7%及び残部ウロン酸

(d) 酸塩基特性：中性多糖類、且つ

(e) 生理学的活性：哺乳動物に対しその血中トリグリセリ
ド低下作用を有すること、を特徴とするトリグリセリド
低下活性多糖類TRS。(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)項に記載の前記多糖類TR
S。(3) 有効成分として前記多糖類TRSを含有することを特徴とす
るトリグリセリド低下乃至抗動脈硬化剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規なトリグリセリド低下活性多糖類TRS及び有効成分としてこの多糖類TRSを含有するトリグリセリド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かなら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多糖類TRSが血中トリグリセリド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、多糖類TRS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・

フエカーリス、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、ストレプトコッカス・デュランス、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・ミテイス、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(アタベスト条約寄託)により表示すれば下記の通りである。

第 1 表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i>	FERM BP-296
<i>Streptococcus faecalis</i>	FERM BP-297
<i>Streptococcus avium</i>	FERM BP-298
<i>Streptococcus salivarius</i>	FERM BP-299
<i>Streptococcus durans</i>	FERM BP-300
<i>Streptococcus mitis</i>	FERM BP-301
<i>Streptococcus equinus</i>	FERM BP-302

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' 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。

以下余白

第 2 表

性状	菌株	FERM BP						
		-296	-297	-298	-299	-300	-301	-302
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(6.5%)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	-
* T T C 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		+	-	+	-	-	-	-
メレジトース		-	+	±	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)

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 1ℓ中に	
トリプチケース	10g
酵母エキス	5g
トリプトース	3g
K ₂ HPO ₄	3g
KH ₂ PO ₄	3g
クエン酸三アンモニウム	2g
ツイーン 80	1g
グルコース	20g
システイン塩酸塩	0.2g
* 塩類溶液	5ml
(pH 7, 121℃ 15分間加熱滅菌)	
* 塩類溶液蒸留水 100mlに	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	11.5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.68g
MnSO ₄ · 2H ₂ O	2.4g

多糖類TRSの製法

本発明多糖類TRS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℃にて5～10時間好気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12,000rpm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

- a) 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℃で10分間加熱(オートクレーブ)し、破壊菌体懸濁液とする。
- b) 前項 a)に示す菌液を超音波破壊処理(15KC, 60分)し、破壊菌体懸濁液とする。

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(3,000rpm: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。

法に何等限定されるものではない。

すなわち、当該薬理活性は糖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糖成分を採取することより成るトリグリセリド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。

多糖類TRSの理化学的性質

本発明多糖類TRS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、エタノール、メタノール及びアセトンには難溶、エーテル及びクロロホルムには不溶。

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瀧達社製Toyopearl HW-55Fカラム(2.2×82cm)を用い且つ各種分子量のデキストランを指標としたゲルろ過法による分子量は14,000±3,000である。

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, p26 (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除去し、その上清を分取する。次いでこの上清画分に混入するDNA, RNA等の核酸成分及び蛋白質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。

このようにして精製の進んだ試料は、更にゲルろ過法、カラムクロマトグラフ法等により精製が繰り返されて最終的に単離された多糖類TRS精製標品を与える。

尚、増殖菌体等からの多糖類TRS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-再溶解抽出、溶剤抽出、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わ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

3. 比旋光度

1.8W/V%水溶液の29℃に於ける比旋光度(日本分光工業社製OIP-4型デジタル旋光計)、 $[\alpha]_D^{29} = +190.1$ (右旋性)。

4. 糖構成

a) 試料4mgを0.2M TFA(トリフロロ酢酸)と混合し、100℃、7時間加水分解処理し、更にTMS化处理(0.2mlヘキサメチルジシラザン試薬(20%V/Vピリジン溶液)と0.02mlトリメチルクロロシラン添加、15分振とう、5分後注入)し、カラム温度179℃でグルコース、ラムノース等につきガスクロマトグラフ分析し、更に、カルバゾール硫酸法(Bitter-Muirの改良法; Bitter, T. & Muir, H. Anal. Biochem. 4 330(1962))によりウロン酸等を定量した結果、グルコース70.3%, ラムノース13.7%及びウロン酸16.0%。

5. 酸塩基特性

試料0.1%及び0.5%水溶液のpHは共に6.71であり、中性糖。

6. 赤外線吸収スペクトル

日本分光工業社製 JASCO A-302型赤外分光光度計による KBr タブレット 赤外線吸収スペクトルは第1図に示す通りであり、図中、横軸は波数(cm^{-1})縦軸は透過率(%)を示す。

7. 元素分析

パーキン・エルマ社製 240B型元素分析計による元素分析値は、C 37.2%、H 6.4%及びO 56.4%であり、これを示性式で示せば $\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{O}_{55}$ 。

8. 融点

柳本製作所社製 Yanaco MP-3型微量融点測定装置による融点は、235~241°C。

9. 生理学的性質

哺乳動物に対し経口投与によりその血中トリグリセリド値低下作用を有する。

この活性は少なくとも -80~115°C 或いは pH 4~11 のはん圏内で安定である。

多糖類 TRS の薬理作用

1. 薬理効果

後記実施例に示す通り本発明多糖類 TRS より成る抗動脈硬

$\times 10^8$ 個/ml 接種し、37°Cにて10時間、好氣的に静置培養して生菌数 10^9 個/ml の培養液を調製し、これを 12,000 rpm の連続遠心分離に付して菌体を採集し(菌体乾燥重量 2.0g)、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 100ml (2×10^{10} /ml)を得た。

次にこの菌液を 115°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(2:1V/V)混合溶媒 200ml/回で3回脱脂処理した。

脱脂処理後の菌液を 3,000 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。

次いで前記材料に 0.0015M CaCl_2 付加リン酸緩衝液(pH 7.8) 100ml 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 X IV) 20mg より 47°C、24時間酵素処理し、その後更にプロナーゼ 10mg を添加して 47°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. VII, P 26 (1966)。得られた被処理物を 3,000 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) 1/9

化剤は、血中トリグリセリド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 0.5 g/kg 体重(1回)、より好ましくは経口投与で約 0.01 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ヤリヤ、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、本発明多糖類 TRS の LD_{50} 値は 1,200 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

(多糖類 TRS の製造及び精製)

ストレプトコッカス・フェシウム (*Streptococcus faecium*)

FERM BP-296 菌株をロゴサ液体培地 2ℓ に生菌濃度 1

容加え 4°C、3時間攪拌し、3,000 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°C、3時間攪拌、次いで同様に遠心分離によりその上清を再採取後、先の上清と合わせてエーテルにて TCA 除去、洗浄処理(3回)、蒸留水 50 ml で希釈して 1N NaOH 水溶液にて中和し、透析して完全に TCA を除去して最終的に上清画分(乾燥重量 258 mg)を得た。

この上清画分を前記と同様にプロナーゼ処理し、更に透析処理しその透析内液(分子量 > 3,500)として精製画分 I (乾燥重量 176 mg)を得た。

次に、この精製画分 I を 0.05M トリス・塩酸緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 カラム(ファルマシア社製)により溶出速度 1 ml/分でゲルろ過し、124 ml 以下のフラクションを分取し、精製画分 II (乾燥重量 93.6 mg)とした。第2図は上記ゲルろ過のカラムクロマトグラフ図であり、図中、横軸は溶出液量(ml)、縦軸は溶出物濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す。

第3図は 0.3M NaCl 付加 2.5mM トリス・塩酸緩衝液で平衡化させた Toyopearl HW-55F カラム(前出)により溶出速度 1 ml/分でこの精製画分 II をゲルろ過した時のカラムクロマトグラフ図であり、図中、符号 1~3 は各々糖、蛋白質、核酸成分

を示す。

このゲルろ過に於いて、同図溶出液量80~100mlの範囲のものを再度分取することにより、最終的に単離、精製された本発明多糖類TRS(乾燥重量87.9mg)を得た。

第4図はToyopearl HW-55Fカラムを用いた上記と同条件下での多糖類TRSのカラムクロマトグラフ図である。

このようにして単離された多糖類TRS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mg)、蛋白質量(ローリー法)、RNA量(オルシノール法)、DNA量(ジフェニールアミン法)及び糖質量(フェノール・硫酸法)を要約して示せば下記第3表の通りである。

表中、単位は収量を除き全て重量%である。

第3表

画分	収量	蛋白質	RNA	DNA	糖	比活性
上清画分	258	14.1	1.8	trace	76.3	7.1
精製画分I	176	2.8	1.6	trace	95.6	10.2
精製画分II	93.6	2.1	0.9	trace	97.0	12.3
多糖類TRS	87.9	trace	trace	trace	100	23.0

尚、第3表中、比活性は通常ラットに於けるトリグリセリド低

又、ダイエツトすなわち飼料の組成(重量%)は下表第5表の通りでありこれを自由摂取とした(以下、同様)。

第4表

動物種	低下率(%)
通常ラット(12週間)	40.5
通常マウス(8週間)	45.1
無菌マウス(8週間)	39.6

第5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. トリグリセリド低下活性(II)

前記試料1mlを通常ラット(雄18週令、平均体重238g;各群15匹)、通常及び無菌マウス(雄18週令、平均体重31g;各群10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トリグリセリド値を測定した。結果を第6表に示

下活性につき死菌体(オートクレーブ処理菌体)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表に掲示の他の菌株を使用した場合も、収率は多少はあるが本例と全く同様に多糖類TRSが精製単離されることが確認された。

実施例II

(多糖類TRSの薬理効果)

1. トリグリセリド低下活性(I)

多糖類TRS凍結乾燥精製標品各16mg/kg体重相当量を生理食塩水(0.85%NaCl水溶液)1ml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246g;各群10匹)、通常及び無菌マウス(雄18週令、平均体重30g;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、トリグリセライドTG WAKO(和光純薬社製;アセチルアセトン抽出法)により血清標品中トリグリセリド値を測定した。結果を第4表に要約して示す。

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

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、数値は無投与群を対照としたときの低下率(%)である。

第6表

動物種	低下率
無菌マウス ^(*)	45.4
通常マウス ^(*)	41.6
通常ラット ^(*)	43.2
通常ラット ^(**)	42.0

*) コレステロール負荷ダイエツト

**) 果糖負荷ダイエツト

3. トリグリセリド低下活性(III)

多糖類TRS精製標品各4mg/生理食塩水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トリグリセリド値を測定

した。

結果を第7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7表

トリグリセリド低下率(%)	
投与群	45.4
対照群	0

4. 用量-反応関係

多糖類TRS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トリグリセリド値を測定した(対照無投与群)。結果を第8表に示す。

第8表

mg/ラット	トリグリセリド低下率(平均値;%)
対照	0
0.1	<10.0
1	17.4
10	43.0
20	48.2

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図は本発明多糖類TRSの赤外線吸収スペクトル図、第2乃至4図は本発明実施例Ⅱの実験説明図である。

5. 急性毒性

ICR系マウス(雄6週令、平均体重31.6±0.6g、各群10匹)を使用し、多糖類TRS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1,200mg/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。

6. 製剤例

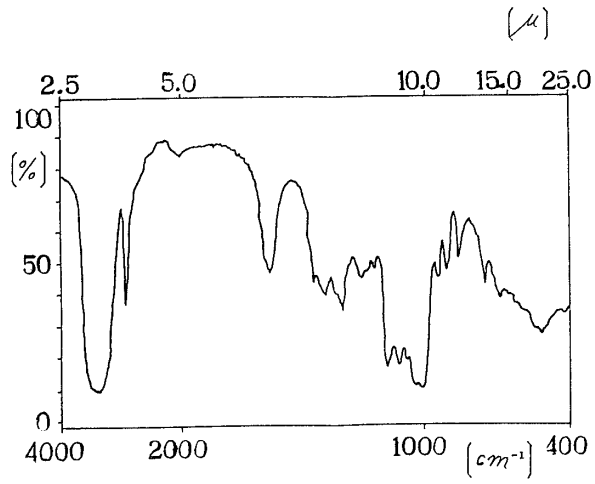
① 多糖類TRS精製標品25mgを精製でんぷん末275mgと均一に混合、打錠して経口投与用錠剤とした。この錠剤は体重50kgの成人における死菌体用量約10¹⁰個/kg体重に相当する。

② 多糖類TRS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。

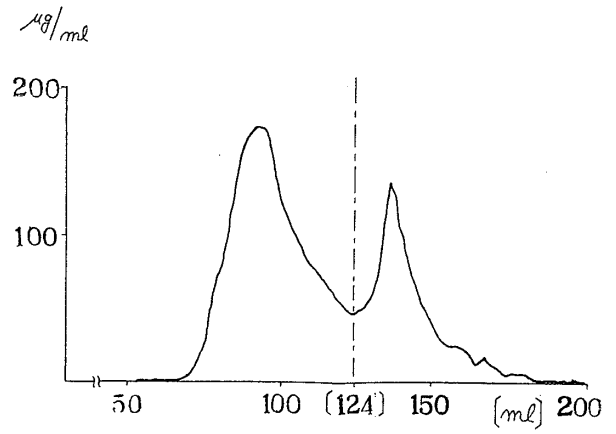
③ 本品900mgをシロップで呈味した精製水30ccに分散、

特許出願人 株式会社 アドバンス開発研究所

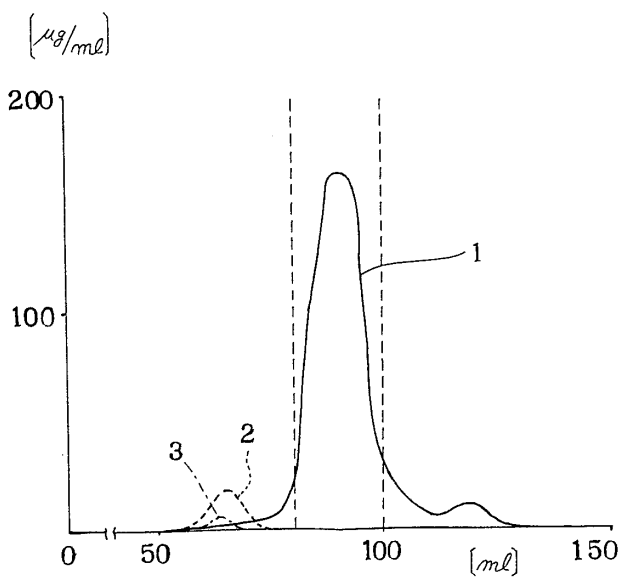
第 1 図



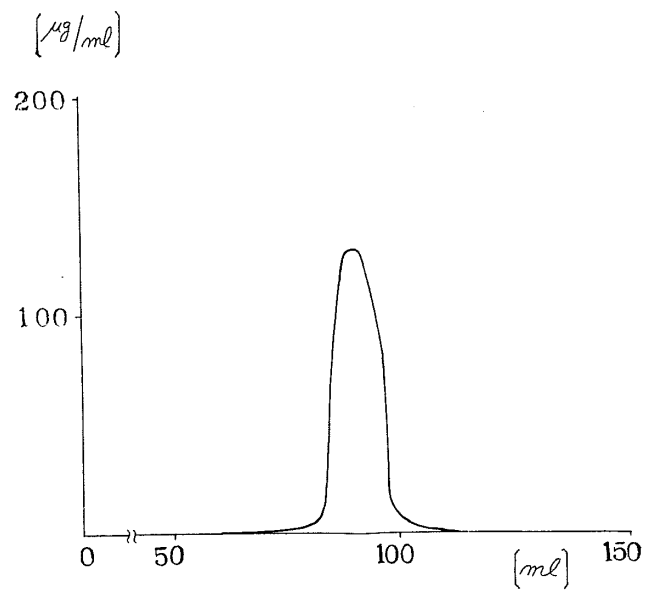
第 2 図



第 3 図



第 4 図



手続補正書(方式)

昭和58年12月26日

特許庁長官 若杉和夫 殿

1. 事件の表示

昭和58年特許願第135982号

2. 発明の名称

トリグリセリド低下活性多糖類

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. 補正命令の日付

昭和58年11月8日
(発送日 昭和58年11月29日)

5. 補正の対象

明細書全文

6. 補正の内容

明細書の浄書(内容に変更なし)

