

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—80609

⑮ Int. Cl.³
A 61 K 35/74

識別記号
ADN
ABX

庁内整理番号
7138—4C
7138—4C

⑯ 公開 昭和59年(1984)5月10日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑰ コレステロール低下活性画分の製造方法及び
当該活性画分含有抗動脈硬化剤

イツD1—501

⑱ 発明者 末柄信夫
神奈川県津久井郡津久井町太井
336—7

⑲ 特 願 昭57—189253

⑲ 発明者 下橋博隆

⑳ 出 願 昭57(1982)10月29日

小平市小川町1の877

㉑ 発明者 河合康雄

㉒ 出 願 人 株式会社アドバンス開発研究所

厚木市毛利台2の8の12

東京都中央区日本橋小舟町5番
7号

㉓ 発明者 矢沢一良

相模原市鶴野森571グリーンハ

明 細 事

1. 発明の名称

コレステロール低下活性画分の製造方法及び
当該活性画分含有抗動脈硬化剤

2. 特許請求の範囲

(1) ストレプトコッカス属に属する微生物を培養し、培養物から菌体を採集し、前記菌体を水抽出処理し次いで得られる抽出液から分子量3,500以上の成分含有画分を分取することより成るコレステロール低下活性画分の製造方法。

(2) 特許請求の範囲第(1)項に記載の方法で得られる前記活性画分を有効成分として含有することを特徴とする抗動脈硬化剤。

(3) 前記微生物が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・ポービス、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・ミテイス及びストレプトコッカス・イクイヌスより成る群から選択される1種又は2種以上の微生物であることを更に特徴とする特許請求の範囲第(2)項に記載の抗動脈硬化剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新規な抗動脈硬化剤及びその製造方法に関する。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からの特定抽出画分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の抽出画分は経口では実質的無毒性である

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 |

こと、更にはより高度の精製のための出発材料として好適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の種類等、活性画分の製法、薬理作用等につき詳細に分説する。

微生物

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・サリグアリウス、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、本発明に於いて最も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。

- 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

菌学的性質

菌学的性質の点では、本発明で使用するの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'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)

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 | - | + | ± | - | |
| 尿素加水解性 | - | ± | - | - | + | - | - | |
| フェ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)

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 7.1, 21°C 15分間加熱滅菌)

※塩類溶液蒸留水 100 ml に

| | |
|---------------------------------------|--------|
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 1.15 g |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0.68 g |
| MnSO ₄ · 2H ₂ O | 2.4 g |

(15 KC, 60分) し、得られた抽出懸濁液を遠心分離処理 (20,000~25,000 G, 30分) するとその上清として目的抽出液が得られる。

尚、抽出溶媒としては上記生理食塩水のみならず所定 pH 値に調整された各種緩衝液等も適宜使用され得る。

3. 活性画分分取工程

前記各抽出液を分子量 3,500 以下透過性透析膜 (商品名 "セロチューブ"; 半井化学薬品社製) 等で3昼夜、蒸留水で透析処理し、目的活性画分が得られる。

尚、他の透析データを勘案すれば、本発明活性画分は水抽出物中、その分子量が 3,500 ~ 50,000 のはん阻内に分布するものと推定される。

薬理作用

1. 薬理効果

後記各実験例に示す通り本発明活性画分より成る抗動脈硬化剤は、血中コレステロール

活性画分の製法

本発明活性画分の典型的製法の1例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 5 ℓ に接種し、37°C にて5時間好氣的に静置培養して生菌数 6×10^8 / ml 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. 水抽出工程

a) 前記採集菌体を生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液) 15 ml に懸濁して得られる菌液 (2×10^{11} / ml) を 15°C で10分間加熱 (オートクレーブ) し、菌体の破壊と熱水抽出とを併せ行なう。

得られた抽出懸濁液を遠心分離処理 (2000 G × 20分) するとその上清として目的抽出液が与えられる。

b) 前項 a) に示す菌液を超音波破壊処理

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、静注等の手段で適用され得、その用量は通常数 mg ~ 数 10 g / kg 体重、より好ましくは経口投与で数 10 mg ~ 数 g / kg 体重程度であり、その剤型としては生理食塩水等への懸濁液剤、凍結乾燥等による粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等々、通常の剤型を適当なキャリア、増量剤、希釈剤等と共に適宜選択使用し得る。

2. 急性毒性

後記実験例に示す通り、本発明剤の LD₅₀ 値は 3.7 mg / 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。

実験例 1

その生菌数が 2×10^{11} 個 / ml の菌液 (生理

食塩水懸濁)を用い、前記活性画分の製法に準じてストレプトコッカス・フェシウム A D V 1 0 0 9 から熱水抽出(前記 2. a)項)により活性画分を得た。

ここに於いて、菌液 1 0 ml (生菌数 2×10^{12} 個)当りの菌体乾燥重量は 2.0 g であり、これより得られる活性画分の夫は 4 3 5 mg であった。次に、このようにして得られた活性画分 2 1 7 mg (乾燥重量換算)、これに相当量の各画分及びオートクレーブ処理したのみの死菌体菌液 0.5 ml を通常ラット(雄 6 週令, 平均体重 2 1 9 g, 各群 5 匹)に 4 週間、経口的に連日投与した。次いでこれらラットの右下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 3 表に要約して示す。

尚、表中、対照は試料無投与ラット群であり、各数値は対照群を 1 0 0 % としたときの低下率(%)であり、又、比活性は死菌体の夫を 1 とした

ときの単位重量当りの相対活性を示す。

又、ダイエツトすなわち飼料の組成(重量%)は下記第 4 表の通りでありこれを自由摂取とした(以下、同様)。

第 3 表

| 画 分 | 低下率(%) | 比 活 性 |
|-----------|--------|-------|
| 熱水抽出残渣 | — 1.3 | — |
| 活 性 画 分 | 2 8.7 | 4.8 |
| 死 菌 体 菌 液 | 2 7.7 | 1 |

第 4 表

| | |
|---------|-----|
| カゼイン | 2 0 |
| 大豆油 | 1 0 |
| 小麦でんぷん | 6 1 |
| ミネラル | 4 |
| ビタミン混合物 | 2 |
| ろ紙粉末 | 3 |

実験例 2

実験例 1 と同様にしてストレプトコッカス属各種微生物の加熱処理菌体及び活性画分を得、これを通常ラット(雄 1 8 週令, 平均体重 2 4 0 g; 各群 5 匹)、通常及び無菌マウス(雄 1 8 週令, 平均体重 2 0 g; 各群 1 0 匹)に 4 週間菌数にして 10^{11} 個/日相当量を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の各低下率を測定した。結果を第 5 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、数値は無投与群を対照とした加熱処理菌体の低下率及び活性画分の比活性(括弧内数値)である。

第 5 表

| 微 生 物 | 無 菌 マウス | 通 常 | | |
|---------------------|----------------|----------------|-------|-----------------|
| | | マウス | ラット | ラット*) ラット**) |
| S. フェカリス ADV9001 | | 3 4.6 (6.1) | 2 4.1 | 2 4.7 2 8.5 |
| S. エビウム AD2003 | 2 3.0 (4.1) | 3 1.1 | 2 2.4 | |
| S. サリヴァリウス ADV10001 | 2 7.6 (4.3) | 4 2.3 | | |
| S. デュランス ADV3001 | 3 4.5 (5.3) | 3 8.7 | 1 9.7 | |
| S. ミテイス ADV7001 | | 2 9.9 (4.2) | | |
| S. イクイヌス ADV8001 | 1 8.7 (3.6) | 2 4.4 | | |

*) コレステロール負荷ダイエツト

***) 果糖負荷ダイエツト

実験例 3

S. エビウム A D 2 0 0 3 菌株を用い、実験例 1 と同様にして(但し、破綻抽出工程は 8 0 °C の熱水による前項 2. b)項の超音波処理に従った)、活性画分を得た。

これを前記実験例1と同様に通常ラットに投与した結果、比活性は6.2であった。

実験例4

ICR系マウス(雄6週令, 平均体重30.0 ± 0.7g)を使用し、前記活性画分の製法に従って得られた活性画分をマウス当り 9×10^9 、 9×10^8 、 9×10^7 個の3段階の出発菌数(各群10匹)に相当量でその生理食塩水0.5ml懸濁液を腹腔内投与し、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(mg/マウス)を第6表に示す。

尚、連日経口投与では、いずれの場合でも実質的に無毒性であった。

第6表

| | |
|--------------------|-----|
| S. フェシウムADV1009 | 4.7 |
| S. フェカリスADV9001 | 3.8 |
| S. エビウムAD2003 | 4.2 |
| S. サリヴァリウスADV10001 | 6.1 |
| S. デュランスADV3001 | 5.5 |
| S. ミテイヌADV7001 | 3.7 |
| S. イクイヌスADV8001 | 5.5 |

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189253号

2. 発明の名称

コレステロール低下活性画分の製造方法及び当該活性画分含有抗動脈硬化剤

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 賢 伸 周



4. 補正の対象

明細書の[発明の詳細な説明]の欄

製剤例

- 前記実験例1に従って得られたS. フェシウムADV1009活性画分の凍結乾燥物43mg(死菌体数 1.5×10^{11} 個に相当)を精製でんぷん末950mg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数用量 3×10^9 個/kg体重に相当する。
- 上記凍結乾燥物430mgを精製でんぷん末500mgと混合、打錠したものは、同様に用量 3×10^{10} 個/kgに相当する。
このように、本発明剤は前記標準用量等に基づいて、活性画分と薬学的に許容され得る担体を混合して所定の活性を有する所望の剤型とすることができる。

特許出願人 株式会社 アドバンス開発研究所

5. 補正の内容

明細書第4頁第1行目から9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 | FERM BP-296 |
| " " faecalis ADV9001 | " " -297 |
| " " avium AD2003 | " " -298 |
| " " salivarius ADV10001 | " " -299 |
| " " durans ADV3001 | " " -300 |
| " " mitis ADV7001 | " " -301 |
| " " equinus ADV8001 | " " -302 |

受託番号変更届

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189253号

2. 発明の名称

コレステロール低下活性画分の製造方法及び当該活性画分含有抗動脈硬化剤

3. 手続をした者

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. 旧寄託機関の名称

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

微工研条寄第300号
(FERM BP-300)
微工研条寄第301号
(FERM BP-301)
微工研条寄第302号
(FERM BP-302)

8. 添付書類の目録

(1) 新受託番号を証明する書面 7 通
(受託社の写)

5. 旧受託番号

微工研菌寄第6624号
(FERM P-6624)
微工研菌寄第6625号
(FERM P-6625)
微工研菌寄第6626号
(FERM P-6626)
微工研菌寄第6627号
(FERM P-6627)
微工研菌寄第6628号
(FERM P-6628)
微工研菌寄第6629号
(FERM P-6629)
微工研菌寄第6630号
(FERM P-6630)

6. 新寄託機関の名称

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

7. 新受託番号

微工研条寄第296号
(FERM BP-296)
微工研条寄第297号
(FERM BP-297)
微工研条寄第298号
(FERM BP-298)
微工研条寄第299号
(FERM BP-299)