

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-221124

⑬ Int. Cl.⁴
A 61 K 35/74

識別記号 庁内整理番号
ACS 7138-4C
ABU 7138-4C

⑭ 公開 昭和61年(1986)10月1日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 肝機能改善剤並びに血圧降下剤

⑯ 特 願 昭60-59679

⑰ 出 願 昭60(1985)3月26日

⑱ 発 明 者	河 合	康 雄	厚木市毛利台2の8の12
⑲ 発 明 者	石 原	一 興	東京都千代田区内神田2-13-7
⑳ 発 明 者	矢 沢	一 良	相模原市鶴野森571 グリーンハイツD1-501
㉑ 出 願 人	株式会社	アドバンス	東京都中央区日本橋小舟町5番7号
	開発研究所		

明 細 書

1. 発明の名称

肝機能改善剤並びに血圧降下剤

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の生菌又は死菌体を有効成分として含有することを特徴とする肝機能改善剤。
- (2) 前記微生物がストレプトコッカス・フェカーリス、ストレプトコッカス・フェシウム、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・ミティ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1項に記載の肝機能改善剤。
- (3) ストレプトコッカス属に属する微生物の生菌又は死菌体を有効成分として含有することを特徴とする血圧降下剤。
- (4) 前記微生物がストレプトコッカス・フェカーリス、ストレプトコッカス・フェシウム、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・ミティ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(3)項に記載の血圧降下剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、肝機能改善剤並びに血圧降下剤に関する。

近年成人病による死亡率が急増しており、就中、肝疾患並びに高血圧症における予防及び治療は重要な課題となっている。

上記に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、ストレプトコッカス属(Streptococcus)に属する各種微生物の生菌体及び死菌体が肝機能改善作用すなわち血清中のGOT, GPT値を効果的に低下させる作用並びに血圧降下作用を有すること、又その起源が所謂腸内細菌であるこれら菌体は経口では実質的に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、本発明剤に於いて使用され得る微生物、菌体の調製、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・フェカーリス、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・ミティ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(3)項に記載の血圧降下剤。

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(ブタベスト条約寄託)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
ストレプトコッカス・フェシウム (<i>Streptococcus faecium</i>)	FERM BP-296
ストレプトコッカス・フェカリス (<i>Streptococcus faecalis</i>)	FERM BP-297
ストレプトコッカス・エビウム (<i>Streptococcus avium</i>)	FERM BP-298
ストレプトコッカス・サリヴァリウス (<i>Streptococcus salivarius</i>)	FERM BP-299
ストレプトコッカス・デュランス (<i>Streptococcus durans</i>)	FERM BP-300
ストレプトコッカス・ミティス (<i>Streptococcus mitis</i>)	FERM BP-301
ストレプトコッカス・イクイヌス (<i>Streptococcus equinus</i>)	FERM BP-302

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	-
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)

2. 菌学的性質

菌学的性質の点では、本発明で使用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) バージイ・マニュアル・オブ・デタミネティフ・バクテリオロジイ, 第8版 (Bergey' Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.,) 490-509 (1974)
- 2) インターナショナル・ジャーナル・オブ・システミック・バクテリオロジイ, (Int. J. Syst. Bact.) 16 114 (1966)
- 3) マイクロバイオロジイ・アンド・イミュノロジイ, (Microbiol. Immunol.) 25(3), 257-269 (1981)
- 4) ジャーナル・オブ・クリニカル・パスロジイ, (J. Clin. Pathol.) 33 53-57 (1980)
- 5) ジャーナル・オブ・ゼネラル・マイクロバイオロジイ, (J. General Microbiol.,) 128 713-720 (1982)
- 6) アプライド・マイクロバイオロジイ, (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。

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: エフチミオ・シー・アンド・ハウセン・ピー・エー, (1962), アン・アンチゲニック・アナリシス・オブ・ラクトバチルス・アシドフィルス, ジャーナル・オブ・インフェクシャス・デイズィーズ, (Efthymiou, C., and Hausen, P. A. (1962) An antigenic analysis of *Lactobacillus acidophilus*. J. Infect. Dis.) 110: 258~267)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

得られた菌体は生菌体または加熱処理等による死菌体としていずれもそのまま利用することができるが、超音波処理等により破壊菌体として利用に供されてもよい。したがって、本発明に於ける「死菌体」とはこれら破壊菌体の全部又は1部分をも包含するものである。

菌体の調製

生菌体及び死菌体の各調製法の1例を示せば次の通りである。

1. 生菌体調製例

前記各微生物等の菌株を前述のロゴサ液体培地5ℓに接種し、37℃にて5時間好氣的に静置培養して生菌数10⁹/ml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回洗浄した後、生理食塩水に懸濁して菌液50ml(10¹¹/ml)を得る。

2. 死菌体(加熱処理菌体)調製例

上記1の生菌体調製例に従って得られた生菌体菌液50ml(10¹¹/ml)を115~121℃で10~15分間加熱し、死

るもの場合8.9×10⁸~1.3×10¹⁰個/マウス(腹腔内投与)、死菌体より成るもの場合はいずれの菌にあっても6×10¹¹個/マウス(腹腔内投与)以上である。

実験例1

肝機能に対する薬理活性(1)

前記死菌体(加熱処理菌体)調製例に従って、ストレプトコッカス・フェカリス(*Streptococcus faecalis*)ADV9001(FERM BP-297)の加熱処理菌体懸濁液を得た。上記懸濁液を凍結乾燥処理し、ニュージーランドホワイト系ウサギ(雄性、平均体重2kg、日本クレアより購入、各群5匹)に経口的に60mg/日をゼラチンカプセルに入れて連日投与した。菌体非投与対照群には空カプセルを投与した。

投与開始後6,7,8,9週目に耳静脈より採血し栄研製血清GOT測定用試薬及び同GPT測定用試薬を用いて血清中GOT及びGPTを測定した。

以上より得られたGOT値(カーメン単位)測定結果を第1図にGPT値(カーメン単位)測定結果を第2図に示した。図中、縦軸はGOT及びGPT値(カーメン単位)、横軸は投与開始後の飼育週数、A:菌体非投与対照群(空カプセル投与群)、B:正常食対照群、C:加熱処理菌体(60mg/日)投与群である。

菌体懸濁液を得る。

薬理作用

1. 薬理効果

後記各実験例に示す通り、本発明剤は肝機能改善剤としては血清中のGOT、GPT値を極めて効果的に低下せしめ、且つ血圧降下剤としては高血圧状態から正常血圧へと低下させるのに著しい効果を表わす。したがってこれらの指標と密接な関連を有する心筋梗塞、脳卒中、動脈硬化を始めとして、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、脂肪肝、アルコール性肝炎、肝腫瘍、胆汁うっ滞、筋疾患、溶血性疾患、骨格筋やその他の疾患、そして高血圧症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10⁷~10¹⁴個/kg体重、より好ましくは10⁹~10¹²個/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、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値は生菌体より成

尚、飼料として、正常食対照群はウサギ用CR-1[®](日本クレア製)、加熱処理菌体(60mg/日)投与群及び菌体非投与対照群(空カプセル投与群)はコレステロールを0.2%添加したウサギ用CR-1[®]を与えた。

図からも明らかな様に、本発明剤投与により、GOT及びGPT値はそれぞれ正常値である30単位以下に保たれている。

実験例2

肝機能に対する薬理活性(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懸濁液の凍結乾燥物を得、これをニュージーランドホワイト系ウサギ(雄性、平均体重2.01kg、日本クレアより購入、各群5匹)に60mg/日、経口的に連日投与し、実験例1と同様にして血清中GOT及びGPT値(カーメン単位)を測定した。結果を第3表に示した。

表より明らかな様に本発明剤投与によりGOT値は20~40単位、GPT値は10~35単位に保たれる。

第3表

微生物	飼育週	飼育週			
		6	7	8	9
S. フェシウム ADV1009	GOT	23.1	28.6	29.2	25.3
	GPT	16.4	19.7	18.6	22.3
S. エピウム AD2003	GOT	30.5	28.1	28.9	33.5
	GPT	29.4	32.6	24.3	31.1
S. デュランス ADV3001	GOT	29.9	34.6	29.4	29.1
	GPT	25.5	31.5	31.9	32.4
S. サリヴァリウス ADV10001	GOT	29.0	26.1	30.3	31.0
	GPT	20.3	29.4	30.1	31.9
S. ミティス ADV7001	GOT	34.5	30.1	31.6	29.6
	GPT	18.6	26.3	27.5	30.0
S. イクイヌス ADV8001	GOT	26.2	39.6	27.7	26.1
	GPT	29.9	31.6	28.7	31.8

実験例3

血圧に対する薬理活性(1)

フィッシャー344系通常ラット(雄性, 5週令, 平均体重156g, 日本クレアより購入, 各群5匹)を2週間CE-II[®](日本クレア製)自由摂取にて予備飼育の後、飲料水を1%食塩水に換え同様に飼育した。8週令にて、実験例1と同様にして得たS. フェカリスADV9001(FERM BP-297)

第4表

微生物	投与日数	投与日数							
		0	1	2	3	4	5	6	7
S. フェシウム ADV1009	0	10.6	7.1	9.4	11.7	9.1	9.3	9.4	9.1
S. エピウム AD2003	0	8.4	2.3	11.6	7.6	10.8	6.5	7.4	8.3
S. デュランス ADV3001	0	4.3	6.3	7.8	7.6	10.4	7.1	6.8	6.9
S. サリヴァリウス ADV10001	0	7.6	9.6	8.1	7.3	12.3	9.6	8.0	8.1
S. ミティス ADV7001	0	8.1	7.4	10.0	8.1	7.3	10.3	8.2	7.3
S. イクイヌス ADV8001	0	6.3	10.3	9.4	7.2	6.9	10.1	7.1	11.6

実験例5

ICR系マウス(雄6週令, 平均体重30.0±0.7g)を使用し、前記生菌体調製例に従って得られた生菌体をマウス当り 9×10^9 、 9×10^8 、 9×10^7 個の3段階の生菌数(各群10匹)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。

ベレンスーケルベル法(Behrens-Kärber法)に従って算出したLD₅₀値(菌体個数/マウス)を第5表に示す。

尚、死菌体の場合はいずれの菌にあってもLD₅₀値は 6×10^{11} 個/マウス以上(腹腔内投与)であり且つ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。

の加熱処理菌体凍結乾燥物を60mg/日で連日経口投与した。(対照は無投与) 血圧測定は8週令より開始しラットの尾動脈血圧を夏目製作所(株)製KN-210型ラット尾動脈圧・脈拍測定装置(Type KN-210 Rat tail manometer-tachometer system)にて測定した。

得られた結果より算出した血圧低下率(%)を第3図に示した。図中縦軸は血圧低下率(%), 横軸は投与数(日)、D: 対照群, E: 加熱処理菌体(60mg/日)投与群である。

図からも明らかな様に血圧低下率は本発明剤により10%前後を示す。

実験例4

血圧に対する薬理活性(2)

実験例2と同様にストレプトコッカス属の各種微生物の加熱処理菌体懸濁液の凍結乾燥物を得、フィッシャー344系通常ラット(雄性, 5週令, 平均体重162g, 日本クレアより購入, 各群5匹)を用いて、実験例3と同様にして血圧低下率(%)を測定した。結果を第4表に示した。

表より明らかな様に本発明剤投与により血圧低下率は7~13%を示す。

第5表

S. フェシウムADV1009	6.3×10^9
S. フェカリスADV9001	3.8×10^9
S. エピウムAD2003	4.2×10^9
S. デュランスADV3001	8.9×10^9

製剤例

- 前記生菌体調製例に従って得られたS. フェシウムADV1009生菌体の凍結乾燥物50mg(菌体数 5×10^{10} 個に相当)を精製でんぶん末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の成人における用量 10^9 個/kg体重に相当する。
 - 上記凍結乾燥物500mgを精製でんぶん末500mgと混合、打錠したものは、同様に用量 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、菌体と薬学的に許容され得る担体と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。

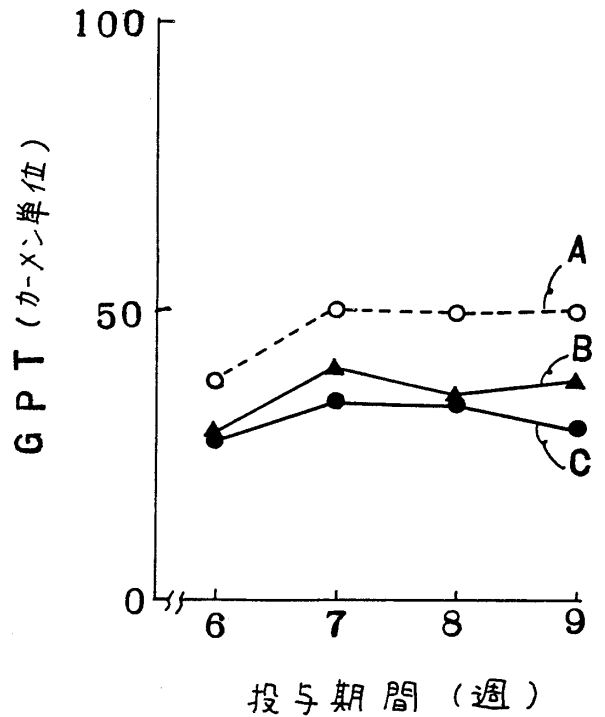
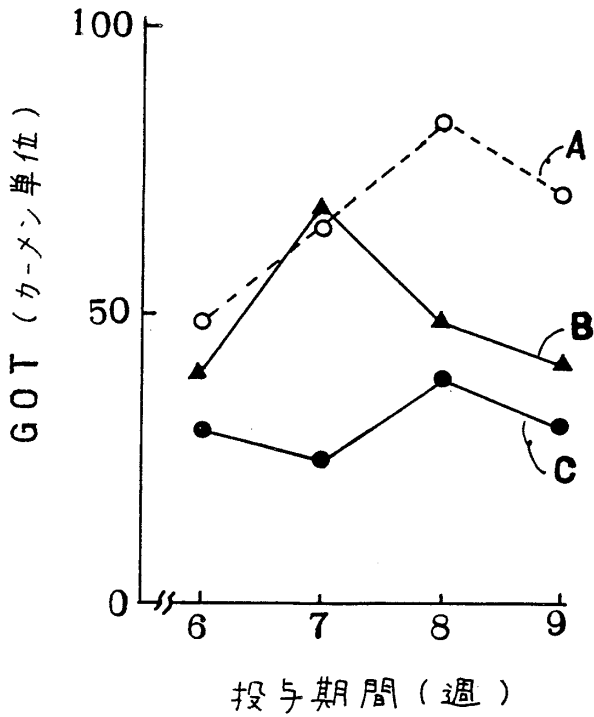
4. 図面の簡単な説明

添付第1乃至3図は、本発明実験例の説明図である。

特許出願人 株式会社アドバンス開発研究所

第1図

第2図



第3図

