

① 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭59—151890

⑤ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和59年(1984) 8月30日
C 12 P 1/04		6760—4B	
A 23 L 1/34		6971—4B	発明の数 1
// A 61 K 35/74	ABX	7138—4C	審査請求 未請求
(C 12 P 1/04			
C 12 R 1/46)			(全 13 頁)

④ コレステロール低下剤の製造方法及び同剤を含有する飲食物

相模原市鷓野森571グリーンハイッD1—501

① 特 願 昭58—24768

② 発 明 者 石原一興

② 出 願 昭58(1983) 2月18日

東京都千代田区内神田 2—13—7

② 発 明 者 河合康雄
厚木市毛利台 2 の 8 の 12

① 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

② 発 明 者 矢沢一良

明 細 書

1. 発明の名称

コレステロール低下剤の製造方法及び同剤を含有する飲食物

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可食性培地で培養することを特徴とするコレステロール低下活性剤の製造方法
- (2) 前記微生物の培養菌体を濃縮乃至採集することを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載のコレステロール低下活性剤の製造方法。
- (3) 前記培地の固形分含量を 0.01 ~ 5 % とすることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項乃至(2)項に記載のコレステロール低下活性剤の製造方法。
- (4) 前記培地の固形分含量を 0.1 ~ 2.0 % とすることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項乃至(3)項に記載のコレステロール低下剤の

製造方法。

- (5) 前記培地の固形分含量を 0.1 ~ 1.0 % とすることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項乃至(4)項に記載のコレステロール低下剤の製造方法。
- (6) 前記微生物の培養菌体を破壊処理することを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項乃至(5)項に記載のコレステロール低下剤の製造方法。
- (7) 前記微生物菌体の培養物を乾燥処理することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項乃至(6)項に記載のコレステロール低下剤の製造方法。
- (8) 前記培地の主原料として乳質原料、糖質原料、豆質原料、及び穀類から成る群より選択される1種または2種以上を配合することを特徴とする特許請求の範囲第(1)項乃至(7)項に記載のコレステロール低下剤の製造方法。
- (9) 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・フェッカーリス、ストレプトコッカス・エビウム、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・デユランス、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(1)項乃至(8)項に記載のコレステロール低下剤の製造方法。

10 特許請求の範囲第(1)項乃至(9)項のいずれかに記載のコレステロール低下剤を有効成分として含有することを特徴とする飲食物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、コレステロール低下剤の製造方法及び同剤を含有する飲食物に関する。

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。一方、これらの疾患を

独であるいは種々の飲食物に添加するのみで容易に摂取することの可能なコレステロール低下剤を提供することを目的とする。

すなわち本発明者らは、ストレプトコッカス属に属する各種微生物が、乳質原料、糖質原料、豆質原料あるいは穀類を主原料とする種々の可食性培地に於いて良く増殖し、その生菌体及び死菌体が血中コレステロール値及びトリグリセリド値を効果的に低下せしめ得るものであり且つこれら菌体の起源が所謂腸内細菌であって、経口では実質的無毒性であることを知見し本発明を完成させるに至ったものである。

以下、本発明によるコレステロール低下剤の製造に係る微生物、培地、同剤の各製造工程、同剤の使用形態、薬理効果及び急性毒性につき詳細に分説する。

微生物

本発明に於いては、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

招く直接的要因となり得る血中コレステロールの約35%が食物から吸収されたものであるといわれ、また食物中の各種栄養素が血中脂質の増減に深い関係を有することから、治療食を長期間摂取し食習慣を変えることにより病状を改善するいわゆる食餌療法が広く行なわれている。これは副作用等の心配がなく家庭において可能であるので最も好ましい療法とすることができ、こうした食物摂取を通しての治療あるいは予防をより効果的にするものとしてある種の微生物を培養することによって得られる多糖類(例えば特開昭57-29292)やコーンファイバーから得られる食物繊維(特開昭57-36947)を食品材料として飲食物に添加することが試みられている。しかしながら、培地あるいは原料よりその有効部分を分離、採集することは極めて煩雑で困難である為これらを市場に廉価に提供することは不可能である。

したがって本発明は面倒な分離、採集、洗浄等の工程を必要とせず、微生物菌体培養物を単

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・デユランス、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

第 2 表

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じの諸性質を有する。

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。

(以下余白)

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(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	-	+	±	-
馬尿酸水溶性	-	±	-	-	+	-	-
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	-
炭素源からの微生物産生							
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	+	-	+	-	-	-	-
メレジットース	-	+	±	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)

培 地

本発明によるコレステロール低下剤の製造に使用し得る可食性培地の主原料としては、全乳、脱脂乳、脱脂粉乳、ホエー、あるいはこれらに含まれる蛋白質の酵素処理物などの乳質原料、蜂蜜、糖蜜等の糖質原料、豆乳、豆乳ホエー等の豆質原料、小麦粉、米粉等の穀類が例示され得る。また培地濃度は0.01~5%、より好ましくは0.1~1.0%程度である。

菌体の培養

発酵乳製造に於ける乳酸菌培養の常法に従えば良い。すなわち、先ず前記の如く調整した培地を110℃で10~30分間加熱滅菌する。約40℃迄冷却したら、ストレプトコッカス属微生物菌体をおよそ10⁵個/mlとなるように接種し、37~40℃で好氣的に静置培養する。ただし前記の如く、各種可食性培地を用いることが可能なため培養時間が通常とは異なる場合もある。

例えば脱脂粉乳と水で調整した培地に於いては

後記実験例にも示す通り菌体濃度がおよそ10⁸個/mlに達する迄に11時間以上を要するのに対し、水道水にトリブチケース、酵母エキス、トリプトースを配合した液体培地に於いては6時間以内に同程度の菌体濃度を得る。

薬理効果

後記各実験例に示す通り本発明のコレステロール低下剤は、血中コレステロール値及び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、またその有効成分である菌体を可食性培地で培養する故、通常の培地に配合されている重金属等の非可食性成分の完全洗浄除去を要することなく、培養物に凍結乾燥、噴霧乾燥等の処理を行なうのみで後記実施例にも示す如く種々の食品に自由に添加することが可能となる。したがって、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、糖尿病等の疾患の治療乃至予防を家庭に於いてきわめて容易に長期的に可能ならしめるものである。

尚、本発明剤の用量は通常、死菌体個数 10^6 ~ 10^{13} 個/kg 体重/日、より好ましくは 10^8 ~ 10^{11} 個/kg 体重/日程度である。

急性毒性

後記実験例に示す通り本発明剤のLD₅₀値は、生菌体より成るものの場合 8.9×10^8 ~ 1.3×10^{10} 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 6×10^{13} 個/マウス(腹腔内投与)以上である。

又、経口投与の場合は生菌体、死菌体とも実質的に無毒性である。

菌体の破壊処理

前記微生物菌体中の有効成分をより効果的に作用させる為に菌体をオートクレーブまたは超音波により破壊処理することが望ましい。次にその1例を示す。

例 1

5%脱脂粉乳より成る培地5ℓに前記各微生物を接種し37℃で10時間好氣的に静置培養して生菌数 5×10^7 /mlの培養液をつく

して得られるのでこの範囲の遠心条件で $\frac{1}{10}$ ~ $\frac{1}{100}$ 迄濃縮する。菌体培養物を乾燥して最終的に水分含量1~3%程度にする場合においても、その前処理として遠心分離処理をすることが望ましい場合もある。

培養物の乾燥

前記の如き方法で得られた菌体培養物を適宜手段により乾燥する。乾燥方法は凍結乾燥、噴霧乾燥、Foam-mat dryingあるいは遠心薄膜乾燥法、泡沫乾燥法など、使用形態に合わせて選択する。その1例を下記に示す。

乾燥例 1

製造例10の方法に従い微生物を8時間培養し、その培養液から遠心分離により菌体を集め、これを10%脱脂乳に懸濁させた後、アンプルに分注する(菌数濃度 10^9 /ml)。アンプルを-30℃に冷却して凍結し凍結したままで真空乾燥を行ない、熔封する。5℃程度で生菌の長期保存が可能である。水分含量は2%。

り、得られた培養液を115℃で10分間オートクレーブ処理すると破壊菌体の懸濁液が得られる。

例 2

例1と同様の方法で得られた培養液を15KCで60分間超音波破壊処理し、破壊菌体の懸濁液を得る。

菌体の濃縮

本発明に係る可食性培地の固形分含量は前記の如く0.01~5%の範囲内であるが、例えば乳質原料から成る培地で得られる菌体培養物の所定の菌数相当量を飲食物に添加することにより、その飲食物自体の風味が著しく損なわれる場合がある。そこで、添加する飲食物の種類によっては、培養物中の菌体を濃縮する必要が生ずる。

ここにおいて遠心分離による菌体の濃縮方法はその操作が簡便であり且つ経済的であることから最も好ましい方法とされ得る。未破碎の細胞は $700 \sim 1000 \times g$, 5~10分で沈澱と

乾燥例 2

製造例2の方法に従い微生物を10時間培養した培養液を炭酸水素ナトリウムで中和し、110℃で10分間加熱滅菌しこれを薄膜流下式の真空濃縮機で85℃、短時間濃縮を行ない、固形分含量50%にする。これを57℃で100kg/cm²一段式ホモゲナイザで乳化し、細多孔ガラス吹込機でN₂ガスを均質に吹き込みスポンジ状にし、次に13℃まで冷却して乾燥することにより、多泡質の乾燥濃縮物を得る。これを粉砕すると復水性に極めて優れ、したがって茶、コーヒー等に添加し容易に溶かすことの可能な飲料用添加剤と成る。

使用形態

本発明によるコレステロール低下剤は、可食性培地より得られる菌体より成るものであり、前記の如く各種処理工程を比較的簡便に行なうことが可能な為、使用時に於いても種々の形態を取ることができる。すなわち菌体培養物を、そのまま、あるいは調味料等の添加物を加える

のみでも飲食物として摂取することが可能であるし、また、これをそのままの状態、あるいは前記の濃縮、乾燥等の処理を行なった状態で種々の飲食物に添加することも可能である。

例えば、乳酸飲料、発酵乳あるいは酸味を特徴とする清涼飲料その他の食品を得る場合には培養物をそのまま添加することもできるが、茶、調味料、その他それ自体の風味を損なってはならない食品に対しては、培地の成分を極力除去し、且つ所定の用量を摂取可能にする為、菌体を濃縮し、また、茶等に於いては保存の便宜上乾燥処理を行なう必要を有するなど、本発明剤の使用形態はその添加される各々の食品自体の性質あるいは特徴と同剤の摂取されるべき用量とにより選ばれるものである。

次に本発明によるコレステロール低下剤の製造例、薬理効果、急性毒性及び食品配合例を裏例例によって示す。

実施例 1 (製造例)

本発明によるコレステロール低下剤の製造例

ッカス・エビウムAD2003を接種したものはpHはあまり低下せず、培養1週間後でも凝乳しなかった。

次に上記の方法で10時間培養した菌体培養液を15分間3000rpmで遠心分離処理することにより菌体を $\frac{1}{10}$ 迄濃縮し、これを噴霧乾燥すると粒状の白色粉末が得られた。

製造例 2

市販の牛乳を110℃で10分間加熱滅菌し、上記4株を製造例1と同様に接種、培養した。24時間後の生菌数濃度及びpHを第3表に示す。本4株は市販牛乳中でよく増殖した。凝乳については、製造例1と同様な結果であった。

次に上記の方法で10時間培養した菌体の培養液を製造例1と同様に処理し、白色粉末を得た。

製造例 3

市販の大豆を一夜水に浸漬した後、粉碎し、浸漬前の大豆重量の8倍量の水を加え、80

を下記に示す。

製造例 1

重量濃度10%となるように調製した脱脂粉乳を110℃で10分間加熱滅菌し、ストレプトコッカス・フェカーリスADV9001、ストレプトコッカス・フェシウムADV1009、ストレプトコッカス・デュランスADV3001、ストレプトコッカス・エビウムAD2003を各々単独に、生菌数濃度がおよそ 10^5 個/mlとなるように接種し、37℃で静置培養した。生菌数濃度変化及びpH変化の様子を第1図及び2図に示す。4株とも、最高生菌数濃度はおよそ 10^8 個/mlとなり、脱脂粉乳中で、よく増殖し得ることを示した。

また、ストレプトコッカス・フェカーリスADV9001を接種したものは、pH4.2まで、ストレプトコッカス・フェシウムADV1009を接種したものはpH4.4までpHが低下し、凝乳したが、ストレプトコッカス・デュランスADV3001又は、ストレプトコ

℃で10分間加熱後布で濾して豆乳を得た。

これを120℃で10分間加熱滅菌し、前例の4株を前例と同様に接種、培養した。24時間後の生菌数濃度及びpHを第3表に示す。4株とも、きわめてよく増殖し、24時間以内に豆乳は凝固した。

製造例 4

市販の糖蜜(大日本製糖株式会社製)1容と水9容とを混合し、1規定NaOHでpH7に調整後、110℃で10分間加熱滅菌した。前例4株を前例と同様に接種、培養した。24時間後の生菌数濃度とpHを第3表に示す。4株とも増殖したが、特に、ストレプトコッカス・フェカーリスADV9001、ストレプトコッカス・フェシウムADV1009がよく増殖した。

製造例 5

下記のように調整した液体培地に前例の4株を前例と同様に接種し、37℃で好氣的に静置培養したところ、いずれの菌株も良く増

殖し、接種後約6時間で生菌数濃度 5×10^7 個/ml以上を得た。

次に上記の方法で8時間培養して得られた培養液を遠心分離処理(4000 rpm, 10分間)することにより菌体を1/100迄濃縮し、これを凍結乾燥し固形物を得た。

液体培地の組成

蒸留水 1 ℓ 中に

トリプチケース	25 g
酵母エキス	15 g
トリプトース	10 g

製造例 6

重量濃度 0.8 % となるように調整した脱脂粉乳を 110℃ で 10 分間加熱滅菌し、前例の 4 株を生菌数濃度がおよそ 10^5 個/ml となるように接種し、37℃ で静置培養した。第 3 表に 24 時間後の生菌数濃度及び pH を示す。

に調整後、110℃ で 10 分間加熱滅菌した。前例の 4 株を前例と同様に、接種、培養した。24 時間後の生菌数濃度及び pH を第 3 表に示す。

次に上記の方法で 10 時間培養して得られた培養液を超音波破壊処理(15 K C, 60 分)し、破壊菌体懸濁液を得た。

製造例 10

下記のように調整した液体培地に前例の 4 株を前例と同様に接種し、37℃ で好氣的に静置培養したところ、いずれの菌株も良く増殖し、接種後約 6 時間で生菌数濃度 2×10^7 個/ml 以上を得た。

上記の方法で 8 時間培養して得られた培養液をオートクレーブにより 115℃ で 10 分間加熱処理し、次いでこの破壊菌体懸濁液を遠心分離(4000 rpm, 15 分間)にかけ、濃縮された破壊菌体含有部分の凍結乾燥物を得た。

製造例 7

市販の牛乳を 10 倍に希釈し、110℃ で 10 分間加熱滅菌し、前例 4 株を上記と同様に接種、培養した。24 時間後の生菌数濃度及び pH を第 3 表に示す。

次に上記の方法で 10 時間培養して得られた培養液を遠心分離処理(4000 rpm, 10 分間)して菌体を 1/100 迄濃縮し、次いでこの凍結乾燥物を得た。

製造例 8

固形分含量が 0.6 % の豆乳を 120℃ で 10 分間加熱滅菌し、前例の 4 株を前例と同様に接種、培養した。24 時間後の生菌数濃度及び pH を第 3 表に示す。

上記の方法により、10 時間後に得られた培養液を前例と同様に遠心分離処理し、これを噴霧乾燥して粒状粉末を得た。

製造例 9

市販の糖蜜(大日本製糖株式会社製) 1 容と水 11 容とを混合し、1 規定 NaOH で pH 7

液体培地の組成

蒸留水 1 ℓ 中に

トリプチケース	6 g
酵母エキス	3 g
トリプトース	2 g

(以下余白)

第 3 表

培地	菌種 フェシウム ADV1009	フェカリス ADV9001	デュランス ADV3001	エビウム AD2003
<u>脱脂粉乳</u>				
製造例 1	6 × 10 ⁸ 5.4	4 × 10 ⁷ 5.0	2 × 10 ⁸ 6.0	5 × 10 ⁷ 5.6
製造例 6	3 × 10 ⁸ 5.6	2 × 10 ⁷ 5.3	9 × 10 ⁷ 6.3	3 × 10 ⁷ 5.9
<u>市販牛乳</u>				
製造例 2	6 × 10 ⁸ 5.2	2 × 10 ⁹ 5.0	3 × 10 ⁸ 6.0	1 × 10 ⁸ 6.0
製造例 7	4 × 10 ⁸ 5.3	9 × 10 ⁸ 5.0	1 × 10 ⁸ 6.2	8 × 10 ⁷ 6.2
<u>豆乳</u>				
製造例 3	1 × 10 ⁹ 4.9	7 × 10 ⁸ 5.0	9 × 10 ⁸ 4.4	9 × 10 ⁸ 5.2
製造例 8	8 × 10 ⁸ 5.0	3 × 10 ⁸ 5.0	7 × 10 ⁸ 4.7	6 × 10 ⁸ 5.3
<u>糖蜜</u>				
製造例 4	2 × 10 ⁸ 5.1	1 × 10 ⁸ 5.1	6 × 10 ⁷ 5.0	1 × 10 ⁷ 5.2
製造例 9	1 × 10 ⁸ 5.3	8 × 10 ⁷ 5.2	5 × 10 ⁶ 5.2	9 × 10 ⁶ 5.3

上段：生菌数濃度 (個/ml)
下段：pH

ダイエットの組成

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

得られた結果を第 4 表に示す。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低下率である。

実験例 2

前記製造例 10 により得られた凍結乾燥物を通常ラット (雄 16 週令, 平均体重 235g, 各群 10 匹), 通常及び無菌マウス (雄 16 週令, 平均体重 18g; 各群 10 匹) に 4 週間, 死菌体個数 10¹⁰ 個相当量を経口的に連日摂取させた。次いでこれらラットの下大動脈より動脈血を採集、実験例 1 と同様の

実験例 2 (薬理作用)

以下、本発明によるコレステロール低下剤の薬理効果及び急性毒性に関する実験例を示す。

実験例 1

前記製造例 10 の培養物に菌体破壊処理を行わずに凍結乾燥し、これを通常及び無菌マウス (雄 16 週令, 平均体重 19g; 各群 10 匹), 通常ラット (雄 16 週令, 平均体重 232g; 各群 10 匹) に生菌体個数 10¹⁰ 個相当ダイエットに添加し、自由摂取させた後、ダイエットのみで 4 週間飼育した。次いでこれらマウス及び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) 及びトリグリセライド TG Wako (商品名; 和光純薬社製, アセチルアセトン抽出法) により血清標品中コレステロール値及びトリグリセリド値を測定した。尚、ダイエットの組成 (重量%) は下記の通りである。

方法でコレステロール値及びトリグリセリド値を測定した。ダイエットに関しても実験例 1 と同様の方法で与えた。

結果を第 5 表に示す。

実験例 3

前記製造例 10 の培養物を 12,000 rpm の連続遠心分離に付し、菌体を集め、生理食塩水で洗浄した後、生理食塩水に懸濁して菌液 50 ml (10¹¹/ml) を得、これを通常ラット (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 12 週間、10¹¹ 個/日、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及びトリグリセリドの各低下率を測定した。結果を第 6 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低下率である。

実験例 4

前記実験例 3 の生菌体生食水懸濁液をさらに生理食塩水で 2 回洗浄した後生理食塩水 (0.85% NaCl 水溶液) に懸濁して得られる菌液 50 ml (10¹¹/ml) を 115℃ で 10 分間加熱し、菌体懸濁液を得る。これを通常ラット (雄 18 週令、平均体重 246g ; 各群 15 匹) 及び無菌マウス (雄 18 週令、平均体重 30g ; 各群 10 匹) に 10¹¹ 個経口的に投与後 12 及び 8 週間飼育し、前記と同法にて血中コレステロール及びトリグリセリド低下率を測定した。結果を第 7 表に示す。

第 4 表 (コレステロール低下率)

微生物	無菌マウス	通 マウス	常 ラット	常 ラット(*)	常 ラット(**)
S. フェカリス ADV9001	22.7	35.4 (53.2)	24.1 (35.8)	24.5 (52.4)	28.3 (68.5)
S. フェシウム ADV1009	21.6	32.7 (43.6)	20.3 (44.1)		
S. デュランス ADV3001	19.8 (23.2)	36.7 (24.6)	20.1		
S. エビウム AD2003	15.8 (15.9)	27.1 (17.1)	20.9		

*) コレステロール負荷ダイエット

***) 果糖負荷ダイエット

() 内はトリグリセリド低下率を表す

(以下余白)

第 5 表 (コレステロール低下率)

微生物	無菌マウス	通 マウス	常 ラット	常 ラット(*)	常 ラット(**)
S. フェカリス ADV9001	21.8	35.1 (64.2)	23.8 (37.9)	24.1 (52.3)	27.8 (65.3)
S. フェシウム ADV1009	19.3	30.5 (72.4)	21.7 (36.7)		
S. デュランス ADV3001	19.7 (71.6)	36.4	18.9		
S. エビウム AD2003	12.9 (56.0)	26.8 (36.2)	20.3		

*) コレステロール負荷ダイエット

***) 果糖負荷ダイエット

() 内はトリグリセリド低下率を表す

(以下余白)

第 6 表 (コレステロール低下率)

微生物	無菌マウス	通 マウス	常 ラット	常 ラット(*)	常 ラット(**)
S. フェカリス ADV9001	36.4 (57.4)	42.4 (69.7)	33.9 (48.5)	44.6 (58.9)	32.5 (56.3)
S. フェシウム ADV1009	42.5 (59.1)	47.3 (68.9)	40.4		
S. デュランス ADV3001	41.9		44.7 (66.7)	51.9	
S. エビウム AD2003	29.8 (61.1)			38.8	6.2

*) コレステロール負荷ダイエット

***) 果糖負荷ダイエット

() 内はトリグリセリド低下率を表す

(以下余白)

表7表 (コレステロール低下率)

微生物	ラット	マウス	
	12週間	12週間	8週間
S. フェカリスADV9001	42.9	55.8 (64.5)	41.1
S. フェシウムADV1009	39.6 (66.1)	34.6	30.8 (48.8)
S. デュランスADV3001	42.7 (68.6)	52.4	
S. エビウムAD2003	33.7 (75.6)	44.9	(55.5)

() 内はトリグリセリド低下率を表す

実験例5

前記製造例10の方法によりS.フェシウムADV1009を培養し、その培養物を同例の方法を経て凍結乾燥処理し、これを高脂血ラット(雄18週令、平均体重233g、コレステロール負荷ダイエットで飼育したもの、各群10匹)に2週間死菌体個数 10^{11} 個相当量を第2表のダイエットに添加して経口的

第8表

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

実施例3 (食品配合例)

本発明によるコレステロール低下剤は、単独で、あるいは調味料、香料等の添加物を加えるだけでそのまま摂取することができるが、種々の食品に添加して予防医学的食品として使用することもまた可能であり、その利用範囲は極めて広い。

以下に同剤を用いた食品配合例を示す。

(以下余白)

に連日摂取させた。次いでこれらラットの動脈血中のコレステロール値を実験例1乃至4と同様の方法で測定した。結果を第3図に示す。培養時間により、ラットの血中コレステロール及びトリグリセリド低下率に変化が認められた。

実験例6

ICR系マウス(雄6週令、平均体重30.0±0.5g)を使用し、前記実験例3に用いた生理食塩水0.5ml懸濁液をマウス当り 9×10^9 , 9×10^8 , 9×10^7 個の3段階の菌数(各群10匹)に相当量で腹腔内投与し、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(菌体個数/マウス)を第8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^{13} 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当然のことながら、全然無毒性であった。

食品配合例1 (粉末スープ)

原料	配合(g)
調理豆粉末	3600
小麦粉	135
乾燥酵母粉末	90
乾燥タマネギ	90
食塩	11
白コショウ	910z
MSG	12
粉末月桂樹葉	3
製造例2の粉末	300

食品配合例2 (お茶漬のり)

原料	配合(g)
あられ	2.5
のり	0.75
調味料顆粒	3.3
製造例10の凍結乾燥物	0.3

食品配合例 3 (カレールー)

原 料	配合 (g)
牛 脂	4 0
シュガーエステル	0.5
小麦粉 (薄力)	3 1.7
食 塩	1 0
砂 糖	2
M S G	1
脱脂粉乳	1.5
カレー粉	6.2
オニオンパウダー	1.6
カラメル	0.5
アジボールビーフ (粉末)	5
製造例 6 の泡沫乾燥物	0.8

(以下余白)

尚、本発明によるコレステロール低下剤の家庭に於ける最も容易な使用形態であり且つ本発明の目的に最もかなったものの一つとなり得る例として、飲料用添加剤を挙げる事ができる。この製法は、菌体培養物の乾燥工程に於ける一例にも示したように、培養物を濃縮して泡沫乾燥するか、あるいは、Form-mat drying法にて乾燥することにより特徴づけられる。この方法で得られた粉末を1人分菌体個数 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^9$ 個相当量 (乾燥例 2 により加工した添加剤に於いては $50 \sim 500 \text{ mg}$ 程度)、茶、コーヒー、ヨーグルト、ジュース等に添加すると速やかに混合あるいは溶解し、飲料の風味や外観を損わない。したがって同剤のこうした形態での使用は日常の食習慣を著しく変えることなく、動脈硬化症等の長期にわたる治療、予防を楽に行なうことを可能にするものである。また、下記に一例を示すように、治療食に毎回その適量を添加することによって食飼療法をより効果的に行なう事ができる。

食品配合例 4 (ハンバーグ)

原 料	配合 (g)
ミンチ肉	2 0
植物蛋白肉	1 0
玉ネギ	4 0
卵	1 0
パ ン	1 0
焼小麦粉	3
食 塩	1
コショウ	0.4
マーガリン	5
M S G	0.8
製造例 9 の泡沫乾燥物	0.5

食品配合例 5 (フルーツ乳飲料)

原 料	配合 (g)
脱脂乳	7 0
果 汁	5
クエン酸	0.3
砂 糖	1 0
色 素	0.1
香 料	0.2
安定剤	0.4
製造例 1 の培養物	1 4

高リボタンパク血症治療食の一例

朝食	コーヒーまたは紅茶 (同剤泡沫乾燥物を菌数 3×10^9 個相当量添加)	
	パン (ライ麦と小麦)	3 0 g
	マーガリン	1 0 g
	コッテージチーズ	6 0 g
間食	脱脂乳製ヨーグルト (製造例 6 の噴霧乾燥物を 80 mg 添加)	1 5 0 g
	クネッケ	8 g
	マーガリン	5 g
昼食	トンカツ	
	豚肉	1 0 0 g
	油	5 g
	ニンジン料理	
	ニンジン	1 5 0 g
	マーガリン	5 g
	(製造例 8 の噴霧乾燥物を 24 mg 添加)	
ジャガイモ	6 0 g	
ナ シ	1 0 0 g	

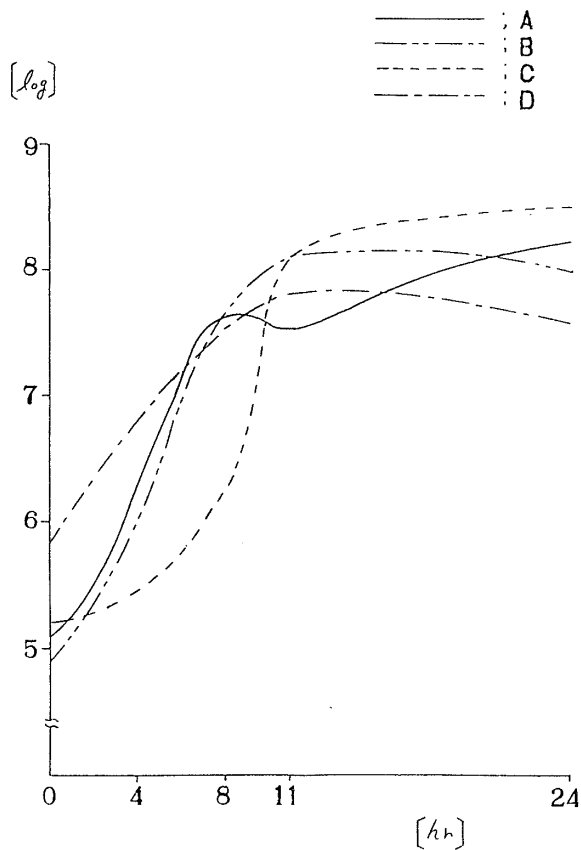
夕食	紅茶	
	(同剤泡沫乾燥物を菌数 2×10^9	
	個相当量添加)	
	全粒パン	50g
	マーガリン	10g
	ハム	40g
	トマトサラダ	
	トマト	100g
	タマネギ	10g
	油	3g

4. 図面の簡単な説明

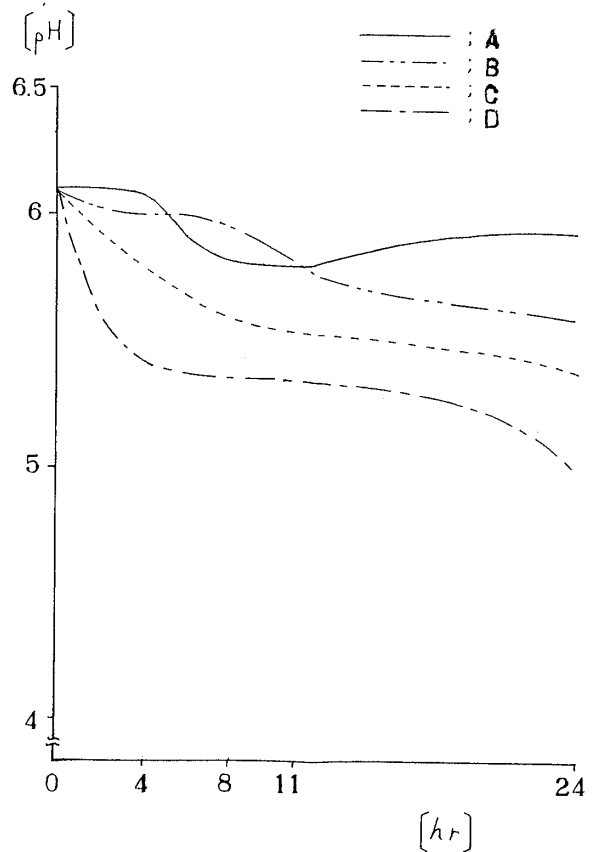
第1図は培地中の生菌数の、第2図は培養物のpHの経時的変化を示す図である。図中Aは、S.デュランスADV3001、Bは、S.エビウムAD2003、Cは、S.フェシウムADV1009、Dは、S.フェカーリスADV9001を各々表す。第3図は、菌体の培養時間による高脂血ラットの血中コレステロール及びトリグリセリド低下率の変動を示す図である。実線Aは、コレステロール低下率を、破線Bは、トリグリセリド低下率を示す。

特許出願人 株式会社 アドバンス開発研究所

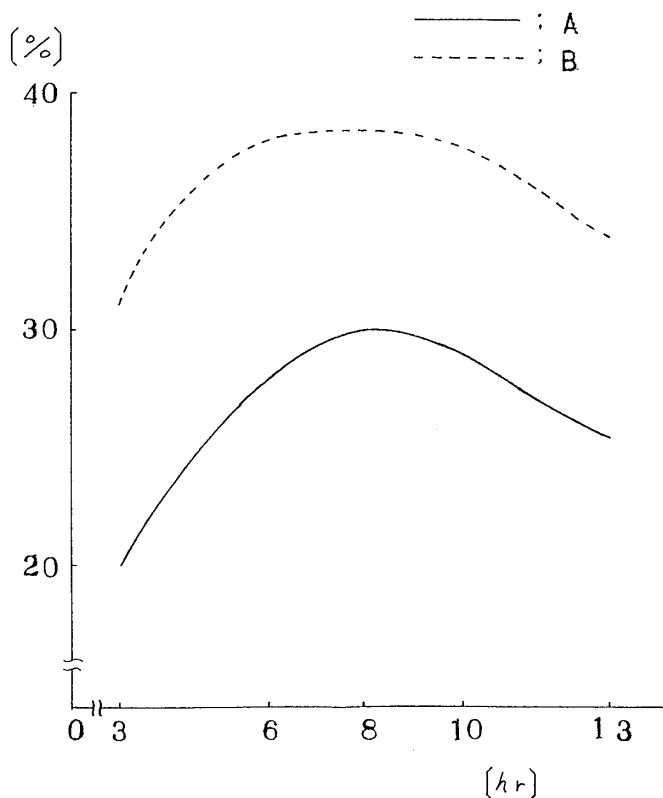
第1図



第2図



第 3 図



手 続 補 正 書 (自 発)

5. 補正の内容

昭和58年7月27日

明細書第6頁第10行目から18行目第1表を下記の通りに訂正する。

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

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

1. 事件の表示

昭和58年特許願第24768号

2. 発明の名称

コレステロール低下剤の製造方法及び同剤を含有する飲食物

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

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58年特許願第24768号

2. 発明の名称

コレステロール低下剤の製造方法及び同剤を含有する飲食物

3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

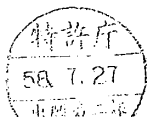
住所 〒103 東京都中央区日本橋小舟町5番7号
(TEL 03-667-1551)

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
(受託証の写)

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)