

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2756778号

(45)発行日 平成10年(1998) 5月25日

(24)登録日 平成10年(1998) 3月13日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30 Z
// A 2 3 C 9/12		A 2 3 C 9/12
A 2 3 L 1/08		A 2 3 L 1/08
1/20		1/20 Z
A 6 1 K 35/74	A B X	A 6 1 K 35/74 A B X A

発明の数 1 (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-80497
(62)分割の表示 特願昭58-24768の分割
(22)出願日 昭和58年(1983) 2月18日
(65)公開番号 特開平9-191854
(43)公開日 平成9年(1997) 7月29日
審査請求日 平成8年(1996) 3月11日

(73)特許権者 000126757
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
(72)発明者 河合 康雄
神奈川県厚木市毛利台2の8の12
(72)発明者 矢沢 一良
神奈川県相模原市鶴野森571 グリーン
ハイツD1-501
(72)発明者 石原 一興
東京都千代田区内神田2-13-7
審査官 田中 美奈子

(54)【発明の名称】 コレステロール低下剤を含有する飲食物

1

(57)【特許請求の範囲】

1. 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・エビウム、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・デュランス、ストレプトコッカス・ミティス及びストレプトコッカス・イクイヌスよりなる群から選択される1種又は2種以上の微生物をトリプチケース、酵母エキス、トリプトースを含む液状の可食性培地で培養して得られる培養物をコレステロール低下活性成分として含有する飲食物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コレステロール低下剤を含有する飲食物に関する。

【0002】

2

【従来の技術】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。一方、これらの疾患を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る。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。

【0002】

【課題を解決する為の手段】しかしながら、培地あるいは原料よりその有効成分を分離、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独であるいは種々の飲食物に添加するのみで容易に且つ適当な分量を摂取することの可能なコレステロール低下剤を含有する飲食物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*

菌 株 名

受託番号

Streptococcus	faecium	ADV1009	FERM BP-298
//	// faecalis	ADV9001	FERM BP-297
//	// avium	AD2003	FERM BP-298
//	// salivarius	ADV10001	FERM BP-299
//	// durans	ADV3001	FERM BP-300
//	// mitis	ADV7001	FERM BP-301
//	// equinus	ADV8001	FERM BP-302

【0004】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's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., 490-509(1974)

2) Int. J. Syst. Bact. 16 114(1966)

* 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。

【0003】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、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。

【表1】

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。

【表2】

性 状	菌 株	ADV	ADV	AD	ADV	ADV	ADV	ADV
		1009	9001	2003	10001	3001	7001	8001
細胞形状		球状						
グラム染色性		+	+	+	+	+	+	+
溶血性		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)

【0005】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、トリプチケース、酵母エキス、トリプトースを配合した液体培地が示される。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った場合、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 10^5 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がある。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 10^8 個/mlに達する迄に11時間以上を要するのに対し、水道水にトリプチケース、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ことができる。

【0006】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験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 $10^6 \sim 10^{13}$ 個/kg体重/日、より好ましくは $10^8 \sim 10^{11}$ 個/kg体重/日程度である。

【0007】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 $8.9 \times 10^8 \sim 1.3 \times 10^{10}$ 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

30

40

50

することが望ましい。次にその一例を示す。

【0008】例1

5%脱脂粉乳より成る培地5リットル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。

【0009】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700~1000xg、5~10分で沈渣として得られるのでこの範囲の遠心条件で1/10~1/100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。

【0010】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。その一例を下記に示す。

【0011】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、密封する。5程度で生菌の長期保存が可能である。水分含量は2%。

【0012】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。これを破碎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。

【0013】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とする為、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。

【0014】

【実施例】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実施例によって示す。

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を下記に示す。

製造例1

重量濃度10%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、ストレプトコッカス・フェカールISADV9001、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変化の様子を図1及び図2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・フェカールISADV9001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、培養一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1/10迄凝縮し、これを噴霧乾燥すると粒状の白色粉末が得られた。

【0015】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を表3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。

【0016】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 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 を表 3 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。

【0017】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 pH 7 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 を表 3 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。

【0018】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物を遠心分離処理（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。

【0019】液体培地の組成

蒸留水 1 リットル中に

トリプチケース	25 g
酵母エキス	15 g
トリプトース	10 g

【0020】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。表 3 に 24 時間後の生菌数濃度及び pH を示す。

【0021】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 株と上記と同様に接種、培養した。24 時間後の生菌数濃度及び pH を表 3 に示す。次に上記の方法で 10 時間培養して得られた培養物を遠心分離処理（4000 rpm、10 分間）して菌体を 1/100 迄濃縮し、次いでこれの凍結乾燥物を得た。

【0022】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 を表 3 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。

【0023】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 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 を表 3 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 Kc、60 分）し、破壊菌体懸濁液を得た。

【0024】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。

液体培地の組成

蒸留水 1 リットル中に

トリプチケース	6 g
酵母エキス	3 g
トリプトース	2 g

【表 3】

11		12			
菌種 培地	菌種	フエンウム	フエカーリス	デュランス	エビウム
		ADV1009	ADV9001	ADV3001	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

【0025】実施例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 10^{10} 個相当ダイエツトに添加し、自由摂取させた後、ダイエツトのみで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、コレスキツト（商品名；関東化学社製、Zurkowski法）及びトリグリセライドTG Wak o（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、ダイエツトの組成（重量%）は下記の通りである。

ダイエツトの組成

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

得られた結果を表4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。

【0026】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 10^{10} 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。ダイエツトに関しても実験例1と同様の方法で与えた。結果を表5に示す。

【0027】実験例3

前記製造例10の培養物を12,000rpm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50ml（ 10^{11} /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、

13

平均体重 3.1 g ; 各群 10 匹) に 12 週間、 10^{11} 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値及びトリグリセリド値の各低下率を測定した。結果を表 6 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。

【0028】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 *10 【表 4】

(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	2.27	3.54 (5.3.2)	2.41 (3.5.8)	2.45 (5.2.4)	2.83 (6.8.5)
S. フェンウム ADV1009	2.16	3.27 (4.3.6)	2.03 (4.4.1)		
S. デュランス ADV3001	1.98 (2.3.2)	3.67 (2.4.6)	2.01		
S. エビウム AD2003	1.58 (1.5.9)	2.71 (1.7.1)	2.09		

*) コレステロール負荷ダイエツト

**) 果糖負荷ダイエツト

() 内はトリグリセリド低下率を表す

【0030】

30 【表 5】

(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	2.18	3.51 (6.4.2)	2.38 (3.7.9)	2.41 (5.2.3)	2.78 (6.5.3)
S. フェンウム ADV1009	1.93	3.05 (7.2.4)	2.17 (3.6.7)		
S. デュランス ADV3001	1.97	3.64 (7.1.6)	1.89		
S. エビウム AD2003	1.29 (5.6.0)	2.68 (3.6.2)	2.03		

*) コレステロール負荷ダイエツト

**) 果糖負荷ダイエツト

() 内はトリグリセリド低下率を表す

【0031】

50 【表 6】

14

* 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 (10^{11} / 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 24.6 g ; 各群 15 匹) 及び無菌マウス (雄 18 週令、平均体重 30 g ; 各群 10 匹) に 10^{11} 個経口的に投与後 12 及び 8 週間飼育し、前記と同法にて血清中コレステロール値及びトリグリセリド値低下率を測定した。結果を表 7 に示す。

【0029】

(コレステロール低下率)

微生物	無菌		通常		
	マウス	マウス	ラット	ラット ^(*)	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)		
S. エビウム AD2003	29.8 (61.1)			38.8 (56.8)	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

【0032】

20【表7】
(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	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

【0033】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の、各群10匹)に2週間死菌体個数 10^{11} 個相当量を表2のダイエットに添加して経口的に連続摂取させた。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。結果を図3に示す。培養時間により、ラットの血中コレステロール値及びトリグリセリド値低下率に変化が認められた。

【0034】実験例6

ICR系マウス(雄6週令、平均体重 30.0 ± 0.5 g)を使用し、前記実験例3に用いた生理食塩水0.5

ml懸濁液をマウス当り 9×10^9 、 $9 \times 10^{8,9 \times 10^7}$ 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。

【外1】

Behrens-Kärber法

に従って算出したLD₅₀値(菌体個数/マウス)を表8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。

【表8】

17

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

【0035】実施例3

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。

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	91 (oz)
MSG	12
粉末月桂樹葉	3
製造例2の粉末	300

【0036】食品配合例2 (お茶漬けのり)

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

【0037】食品配合例3 (カレールー)

原料	配合 (g)
牛脂	40
シュガーエステル	0.5
小麦粉 (薄力)	31.7
食塩	10
砂糖	2
MSG	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
アジポールビーフ (粉末)	5
製造例6の泡沫乾燥物	0.8

【0038】食品配合例4 (ハンバーグ)

原料	配合 (g)
ミンチ肉	20
植物蛋白肉	10
玉ねぎ	40
卵	10

18

パン	10
焼小麦粉	3
食塩	1
コショウ	0.4
マーガリン	5
MSG	0.8
製造例9の泡沫乾燥物	0.5

【0039】食品配合例5 (フルーツ乳飲料)

原料	配合 (g)
10 脱脂乳	70
果汁	5
クエン酸	0.3
砂糖	10
色素	0.1
香料	0.2
安定剤	0.4
製造例1の培養物	14

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ことができる。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、培養物を凝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50~500mg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餌療法をより効果的に行なうことができる。

【0040】高リポ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)	30g
マーガリン	10g
40 コッターチーズ	60g

【0041】

間食	脱脂乳製ヨーグルト	150g
(製造例6の噴霧乾燥物を80mg添加)		
クネッケ		8g
マーガリン		5g

【0042】

昼食	トンカツ	
豚肉		100g
油		5g
50 ニンジン料理		

19

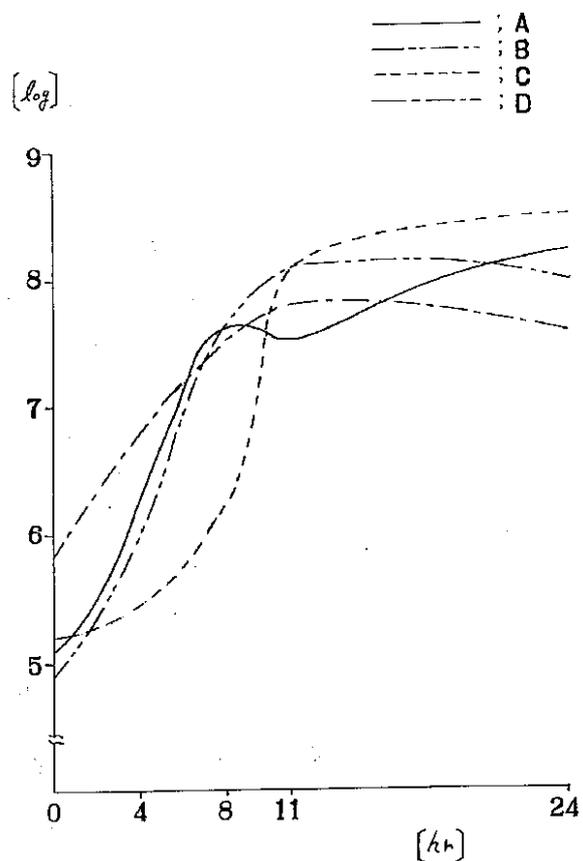
- ニンジン 150 g
- マーガリン 5 g
- (製造例 8 の噴霧乾燥物を 24 mg 添加)
- ジャガイモ 60 g
- ナシ 100 g

【0043】

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 50 g
- マーガリン 10 g
- ハム 40 g
- トマトサラダ
- トマト 100 g
- タマネギ 10 g

【図 1】



20

- * 油 3 g

【図面の簡単な説明】

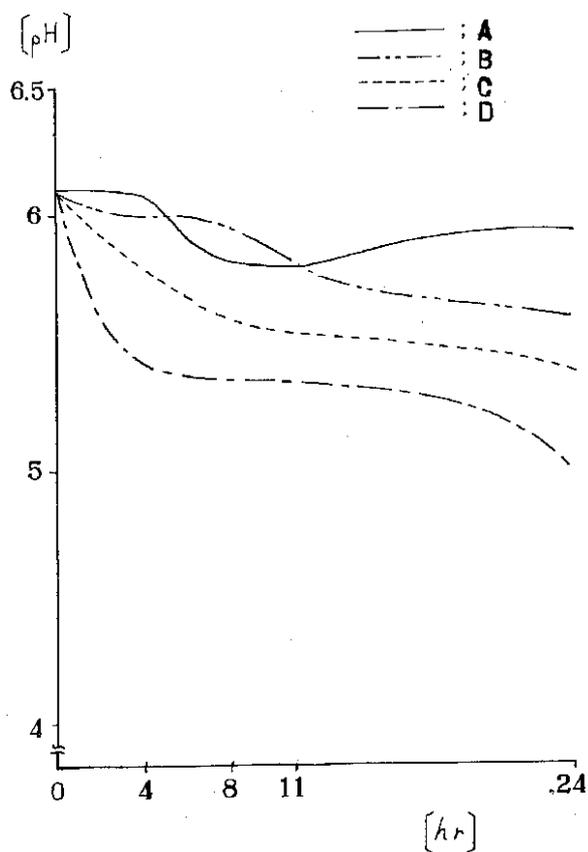
【図 1】

【図 2】 培地中の生菌数の経時変化を示す図であり、図 2 は培養物の pH の経時変化を示す図である。図中 A は、S. デュランス ADV3001、B は、S. エピウム 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。

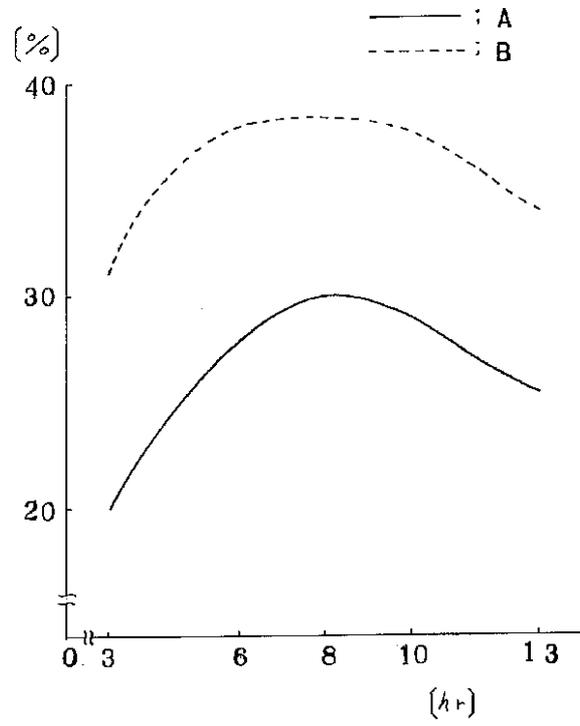
10 【図 3】 菌体の培養時間による高脂血ラットの血中コレステロール及びトリグリセリド低下率の変動を示す図である。実線 A は、コレステロール低下率を、破線 B は、トリグリセリド低下率を示す。

*

【図 2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶
A 6 1 K 35/74

識別記号
A D N

F I
A 6 1 K 35/74

A D N