

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)1月10日

A 61 K 35/74

7138-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑭ 発明の名称 腸内細菌叢改善剤

⑰ 特 願 昭59-124584

⑱ 出 願 昭59(1984)6月19日

⑲ 発 明 者 河 合 康 雄 厚木市毛利台2の8の12

⑳ 発 明 者 下 橋 博 隆 小平市小川町1の877

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

目 次

1. 発明の名称

腸内細菌叢改善剤

2. 特許請求の範囲

(1) 有効成分として *Streptococcus* 属に属する微生物の菌体及び/又はその水抽出物を含有することを特徴とする腸内細菌叢改善剤。

(2) 前記微生物が *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. salivarius*, *S. durans*, *S. bovis*, 及び *S. equinus* より成る群より選択される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)項に記載の腸内細菌叢改善剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新規腸内細菌叢改善剤に関する

ヒトの腸管内には約300種、100兆個の腸内細菌が存在するといわれ、宿主(ヒト)における意義は極めて大きいことが明らかになりつつある。例えば腸内細菌と老化との関わりについてこれまで行なわれてきた基礎的な研究の結果から、腸内細菌が各臓器の酵素活性や物質代謝に影響を及ぼし、また老化に伴う脂質

の蓄積を抑制したり、肝臓の解毒機能の低下を抑制したりすることが、明らかになっている。^{1), 2), 3), 4)}

その他、腸内細菌叢の宿主に於ける役割の重要性を示す研究が数多く為されている。^{5) ~ 15)}

これら諸研究からも明らかな通り、多くの場合において、宿主の健康状態が腸内細菌叢中の有害細菌の通常レベルを越えた増殖によって損なわれ、*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*等の有用細菌の増殖によって維持され、あるいは向上する事実が示されていることから、腸管内での有用細菌の選択的増殖を達成することは、各種成人病等の予防・治療の観点から極めて重要と云い得る。

本発明者等は、人腸管に於いて有用細菌とされている *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*等の腸管内での増殖につき鋭意研究の結果、*Streptococcus*属に属する微生物の菌体或いは、その水抽出物が有用細菌の増殖を効果的に促進することを知見し、本発明を完成するに至った。

以下、本発明に使用する微生物、本発明剤の調製法、同剤の生理学的作用等につき詳細に分説する。

微生物

*Streptococcus*属に属する各種微生物が使用され得、就中、

Streptococcus faecalis, 同 *faecium*, 同 *avium*, 同 *salivarius*, 同 *durans*, 同 *mitis*, 同 *bovis*, 及び同 *equinus* 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記の通りである。

第 1 表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i> ADV1009	FERM BP-296
<i>Streptococcus faecalis</i> ADV9001	" " -297
" " <i>avium</i> AD2003	" " -298
" " <i>salivarius</i> ADV10001	" " -299
" " <i>durans</i> ADV3001	" " -300
" " <i>mitis</i> ADV7001	" " -301
" " <i>equinus</i> ADV8001	" " -302

菌学的性質

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菌学的諸性質を有する。

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)

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	球状
グラム染色性	+	+	+	+	+	+	+	+
溶血性	α	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	D

(* 2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド)

本発明剤の調製方法

1. 加熱処理菌体調製例

前記各微生物等の菌株をロゴサ液体培地(註)5ℓに接種し、37℃にて10時間好氣的に静置培養して生菌数 10^9 /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、生理食塩水で洗浄した後、生理食塩水に懸濁して菌液50ml(10^{11} /ml)を得る。得られた生菌体菌液をさらに生理食塩水で2回洗浄した後、蒸留水若しくは生理食塩水(0.85% NaCl水溶液)に懸濁して得られる菌液50ml(10^{11} /ml)を115℃で10分間加熱し、菌体懸濁液を得る。この菌体懸濁液を凍結乾燥あるいは減圧乾燥して菌末を得る。

2. 水抽出物の調製例

- 前記採集菌体を蒸留水若しくは生理食塩水(0.85% NaCl水溶液)15mlに懸濁して得られる菌液(2×10^{11} /ml)を115℃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(2,000G×20分)するとその上清として本発明の有効成分が与えられる。
- 前項a)に示す菌液を超音波破壊処理(15KC, 60分)

し、得られた抽出懸濁液を遠心分離処理(20,000~25,000G, 30分)するとその上清として本発明の有効成分が得られる。

尚、抽出溶媒としては上記蒸留水若しくは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。

c) 前記採集菌体を0~130℃、好適には80~120℃のはん囲内で10分~数10時間水抽出し、遠心分離処理するとその上清として本発明の有効成分が与えられる。

d) 前記採集菌体を沸点以下のはん囲内で10分~数10時間水-アルコール(メタノール, エタノール等の低級アルコール)混合乃至単独溶媒系で抽出処理し、遠心分離処理するとその上清として本発明の有効成分が与えられる。

尚、水とアルコールとの混合比は通常、水/アルコール=0~10(重量比)のはん囲内である。

更に、溶媒におけるアルコールがメタノール乃至これを含むものである場合は、上清からこれを除去したものを有効成分とする。

上記a)乃至d)の各工程或いはこれらの組合せにより得られる本発明有効成分は、液状のままもしくは凍結乾燥、減

圧乾燥粉末等として使用に供される。

(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

(pH7, 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

生理学的作用

1. 薬理作用の概要

本発明剤は腸内有用細菌の選択的増殖を促進し、その結果当該細菌叢を効果的に改善する生理学的作用を有する。すなわち、本発明剤を非健常者に経口的に投与した場合、Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus等の有用細菌の健常レベルまでの増殖を効果的に達成するものである。例えば、後記各実験例に示す様に Bifidobacterium, Lactobacillus, 及び Streptococcusの菌数が健常者に於ける夫に比べ極度に少ない異常な腸内菌叢であっても本発明剤の投与により、正常な菌数レベル(糞便1g当り、Bifidobacterium: 10⁸~10¹¹個程度、Lactobacillus: 10⁵~10⁸個程度、Streptococcus: 10⁶~10⁸個程度)に増殖させることが可能である。

2. 急性毒性

後記実験例に示す通り本発明剤のLD₅₀値は、菌体より成るもの場合、6×10¹³個/マウス(腹腔内投与)以上、熱水抽出物の場合、2.6×10¹⁰個/マウス(腹腔内投与)以上である。又、経口投与の場合、いずれの場合も実質的に無毒性である。

用法・用量

尚、本発明剤は、経口等の手段で適用され得、その用量は通常10⁷~10¹⁵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、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される。

以下に実験例を示し、本発明剤につき更に詳細に説明する。

実験例1

菌末の製造

Streptococcus faecalis ADV9001を前述のロゴサ液体培地5ℓに接種し、37℃にて1夜前培養し、これを同培地に0.1%になるように接種し、更に10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た。さらに生理食塩水で2回洗浄した後、蒸留水若しくは生理食塩水(0.85% NaCl水溶液)に懸濁して得られる菌液50ml(10¹¹/ml)を115℃で10分間加熱し、菌体懸濁液を得た。これを凍結乾燥処理して死菌体菌末を得た。

実験例2 (増殖促進効果1)

下記微生物の本発明剤(本実験例ではS. faecalis ADV

9001の加熱処理菌体の凍結乾燥粉末)添加による *in vitro* 増殖促進効果を調べた。

- Bifidobacterium adolescentis* RIMD 0232001
- Lactobacillus salivarius* (人腸管より分離)
- Lactobacillus casei* IID892
- Lactobacillus acidophilus* IID893
- Streptococcus faecalis* AD9001
- Streptococcus faecalis* AD9002
- Streptococcus durans* AD3001
- Streptococcus bovis* AD4002
- Streptococcus faecium* AD1003
- Streptococcus avium* AD2002

実験例1で得られた *S. faecalis* ADV9001 菌末を添加し、115℃、15分間オートクレーブで加熱滅菌した下記第3表に示す様な培地に各菌株を夫々接種し、それらの生菌数を経時的に測定した。尚、比較例として *S. faecalis* ADV9001 菌末の代りに *Bacteroides fragilis ss fragilis* RIMD0230001, *E. coli* IAM1239の115℃、10分加熱処理菌体の凍結乾燥粉末、及び酵母エキス添加による各菌株の増殖についても調べた。

第3表

微生物	培地
<i>Bifidobacterium</i>	PBS(phosphate buffered saline)で10倍希釈したVLG培地
<i>Lactobacillus</i>	グルコース1mg/ml, トリアプチケース5mg/ml添加したPBS
<i>Streptococcus</i>	PBS(第1乃至6図)又はグルコース1mg/ml添加したPBS

結果を第1乃至15図に示す。

又、実験例1と同様の方法で調整した *S. faecium* ADV1009凍結乾燥菌末による増殖促進効果についても調べたところ、第16図乃至18図に示す通り *S. faecalis* ADV9001 添加による場合と略同等の結果が得られた。

上記第1図乃至18図中縦軸は生菌数(log/ml)、横軸は培養時間(hr)を表す。各図についての使用菌株、記号に関しては、第4表に示す通りである。

各図より明らかである様に上述のいずれの微生物においても *S. faecalis* ADV9001及び *S. faecium* ADV1009 菌末添加による顕著な増殖促進効果が認められた。

第4表

図	使用菌株	記号			
		A	B	C	D
1	<i>S. faecalis</i> AD9001				
2	<i>S. faecalis</i> AD9002	<i>S. faecalis</i> ADV9001	<i>S. faecalis</i> ADV9001	<i>S. faecalis</i> ADV9001	菌末無添加
3	<i>S. faecium</i> AD1003	菌末1mg/ml	菌末5mg/ml	菌末10mg/ml	
4	<i>S. avium</i> AD2002	添加	添加	添加	
5	<i>S. durans</i> AD3001				
6	<i>S. bovis</i> AD4002				
7	<i>L. salivarius</i>				
8	<i>L. casei</i>				
9	<i>L. acidophilus</i>				
10	<i>B. adolescentis</i>				

次頁に続く。

図	使用菌株	記号			
		A	B	C	D
11	<i>L. salivarius</i>	<i>S. faecalis</i> ADV9001	<i>Bacteroides</i> 菌末1mg/ml	<i>E. coli</i> 菌末1mg/ml	酵母エキス1mg/ml
12	<i>L. casei</i>	添加	添加	添加	添加
13	<i>S. faecalis</i> AD9001				
14	<i>B. adolescentis</i>	同上菌末5mg/ml	同上菌末5mg/ml	同上菌末5mg/ml	同上エキス5mg/ml
15	<i>L. acidophilus</i>	同上	同上	同上	同上
16	<i>S. faecalis</i> AD9001	<i>S. faecium</i> ADV1009	<i>S. faecium</i> ADV1009	<i>S. faecium</i> ADV1009	菌末無添加
17	<i>S. avium</i> AD2001	菌末1mg/ml	菌末5mg/ml	菌末10mg/ml	
18	<i>S. faecium</i> AD1003	添加	添加	添加	

実験例3 (増殖効果2)

S. faecium ADV1009菌体熱水抽出物添加によるS. faecalis AD9001の増殖促進について調べた。すなわち、前記実験例と同様の方法で得たS. faecium ADV1009菌末をPBSに5mg/mlとなる様に懸濁し、これを115℃10分間加熱し、菌体の破壊と熱水抽出とを併せ行なった。得られた抽出懸濁液を3,000rpm、15分間遠心分離に付し、上清と沈渣に分け、沈渣は再度PBSに懸濁した。両者を培地としてS. faecalis AD9001の生菌数を経時的に測定した。結果は第19図に示す。図中Aは上清、Bは沈渣を夫々添加した場合を、CはPBSのみを培地とした場合(横軸: 時間(hr), 縦軸: 生菌数(log/ml))を示す。上清(熱水抽出物)は前記実験例中の加熱処理菌体凍結乾燥粉末添加の場合と同程度の増殖傾向を示し、沈渣の場合は、増殖の程度が比較的低かった。

実験例4 (臨床試験)

実験例1で製造したStreptococcus faecalis ADV9001菌末を遺伝型と思われる高脂血症者(29才男性)及び健常者(23~42才男性5名)に60mg/日経口投与し、その糞便菌叢に於ける総菌数、Streptococcus, Lactobacillus,

Bifidobacterium, Bacteroides, Enterobacteriaceae, Staphylococcus, Clostridium(lecithinase-positive)及びFungusの生菌数を上記菌末投与開始後8週間測定した。結果を第20図(高脂血症者の場合)及び第21図(健常者の平均値)に示す。図中Aは総菌数、BはStreptococcus, CはLactobacillus, DはBifidobacterium, EはBacteroides, FはEnterobacteriaceaeの生菌数を夫々示し、縦軸は生菌数(log/ml), 横軸は投与日数(週)を示す。又、横軸左下の矢印で示した位置には、菌末投与開始前の各生菌数の測定値を示す。Staphylococcus, Clostridium, 及びFungusの生菌数測定値に関しては、いずれの被験者の場合に於いても菌末投与開始前と開始後で、有意な差が認められなかったため、図示しなかった。

図より、高脂血症者の糞便菌叢に於いて、健常者と比較して極端に少数であったBifidobacterium, Lactobacillus, 及びStreptococcus等の乳酸菌群が投与後8週間後健常者の値に近づき、総菌数が増加したことが明らかである。

尚、S. faecium ADV1009及びS. avium AD2003の加熱処理菌体凍結乾燥粉末についても、上記と同様の臨床試験を行ない、略同等の結果が得られた。

実験例5 (急性毒性)

ICR系マウス(雄6週令, 平均体重30.0±0.6g)を使用し、前記第1表のStreptococcus属微生物7株の加熱処理菌体及び熱水抽出物のLD₅₀値(Behrens-Kärber法)を測定した。すなわち、各菌株の加熱処理菌体及び熱水抽出物をマウスに腹腔内投与し、14日間その生死を観察し、第5表(加熱処理菌体の場合)及び第6表(熱水抽出物の場合)に示す様な結果が得られた。

又、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5表

<u>S. faecium</u> ADV1009	6.3×10 ⁹
<u>S. faecalis</u> ADV9001	3.8×10 ⁹
<u>S. avium</u> AD2003	4.2×10 ⁹
<u>S. salivarius</u> ADV10001	3.6×10 ⁹
<u>S. durans</u> ADV3001	8.9×10 ⁹
<u>S. mitis</u> ADV7001	6.7×10 ⁹
<u>S. equinus</u> ADV8001	6.5×10 ⁹

(単位: 菌体個数/マウス)

第6表

<u>S. faecium</u> ADV1009	7.1
<u>S. faecalis</u> ADV9001	6.8
<u>S. avium</u> AD2003	7.2
<u>S. salivarius</u> ADV10001	6.3
<u>S. durans</u> ADV3001	10.1
<u>S. mitis</u> ADV7001	8.6
<u>S. equinus</u> ADV8001	8.2

(単位: mg/マウス)

製剤例

- 前記調製例に従って得られたS. フェシウム ADV1009加熱処理菌体の凍結乾燥物60mg(菌体数6×10¹⁰個に相当)を精製でんぷん末940mg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60kgの成人における用量10⁹個/kg体重に相当する。
- 上記凍結乾燥物600mgを精製でんぷん末400mgと混合、打錠したものは、同様に用量10¹⁰個/kg体重に相当する。このように、本発明剤は前記用量に基づいて、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。

参考文献

1) Yazawa, K. et al Mechanisms of Ageing and Development, 17, 173 (1981)
 2) Kawai, Y. et al Mechanisms of Ageing and Development, 16, 149 (1981)
 3) Kawai, Y. et al Infection and Immunity 19, 3, 771 (1978)
 4) Kawai, Y. The American Journal of Clinical Nutrition 32, 187 (1979)
 5) Freter, R. Am. J. Clin. Nutr. 27, 1049 (1974)
 6) Gorbach, S. L. Gastroenterology, 60, 1110 (1971)
 7) Savage, D. C. Am. J. Clin. Nutr. 25, 1372 (1972)
 8) de Dombal, F. T., et al Gut, 10, 270 (1969)
 9) Donaldson, R. M., Jr. New Engl. J. Med., 270, 938(1964)
 10) Gordon, H. A., et al Bacteriol. Rev., 35,

390(1971)

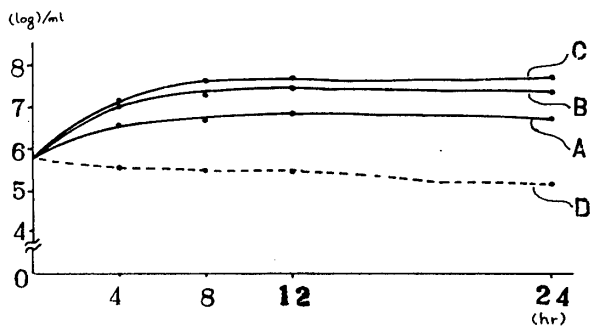
11) Taniguchi, T., et al Microbiol. Immunol., 22, 793(1978)
 12) Elyssen, H., Proc. Nutr. Soc., 32 59 (1973)
 13) Wostmann, B. S. et al, J. Germfree Life Gnotobiol., 5, 4 (1975)
 14) Phear, E. A., et al Br. J. Exp. Pathol., 37 253 (1965)
 15) Wolpert, E. et al Lancet, ii, 1387 (1971)

4. 図面の簡単な説明

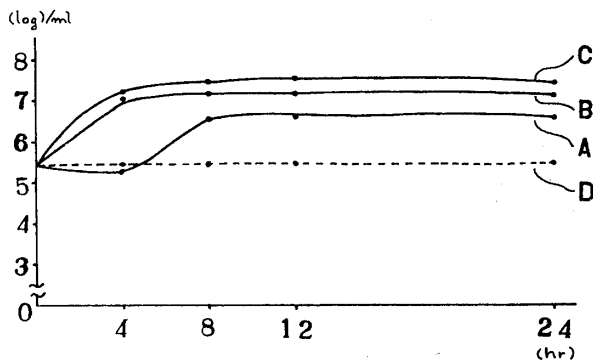
添付第1図乃至21図は、本発明の実験説明図である。

特許出願人 株式会社アドバンス開発研究所

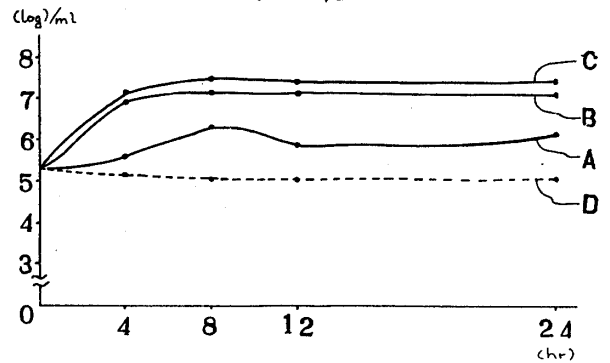
第1図



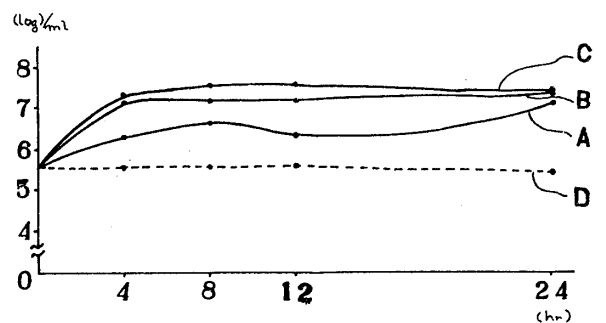
第2図



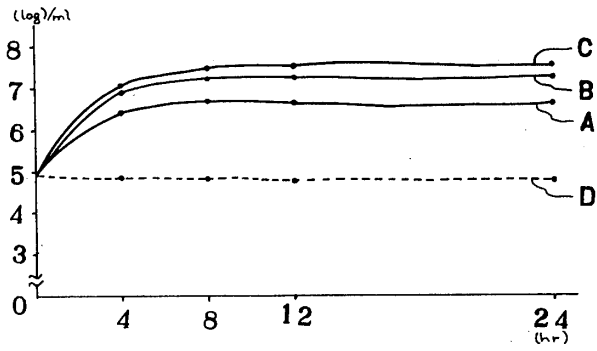
第3図



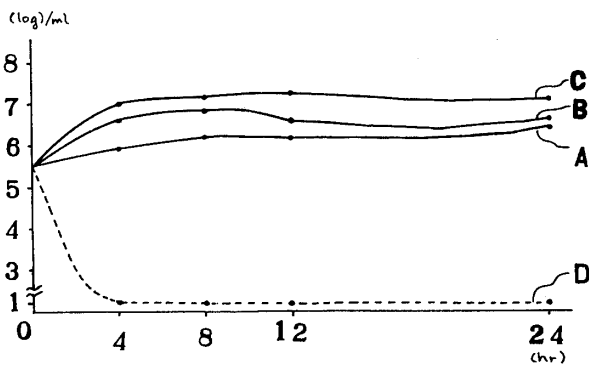
第4図



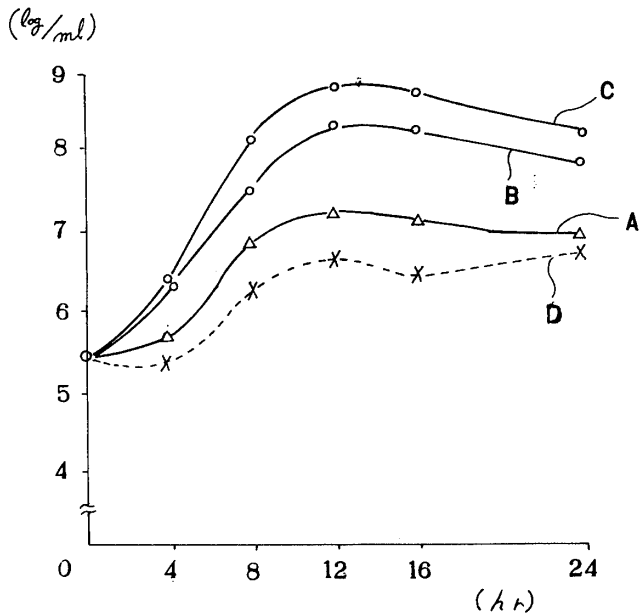
第5図



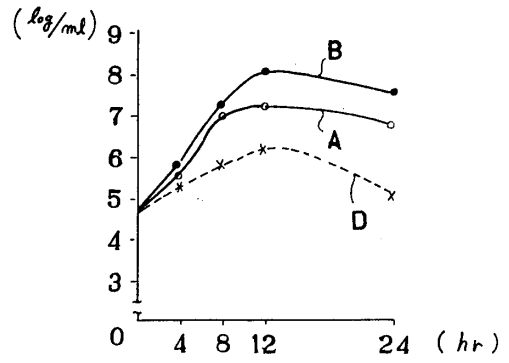
第6図



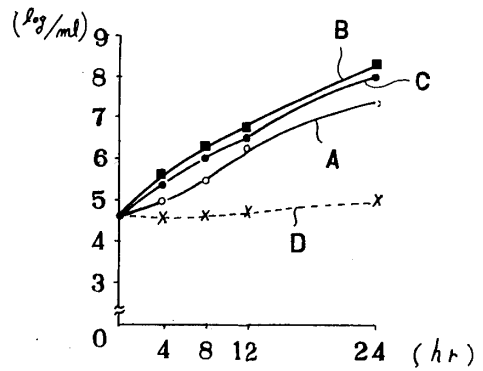
第10図



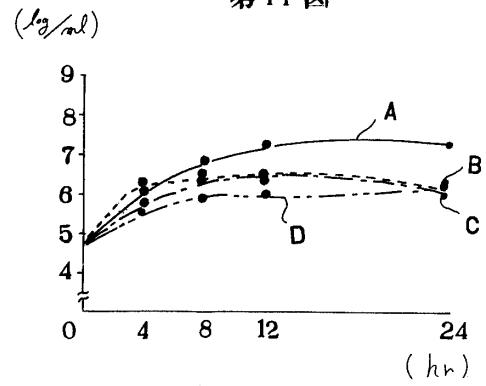
第7図



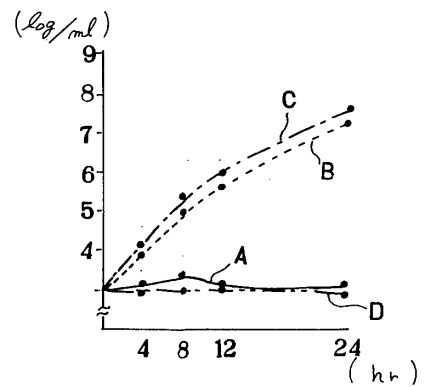
第8図



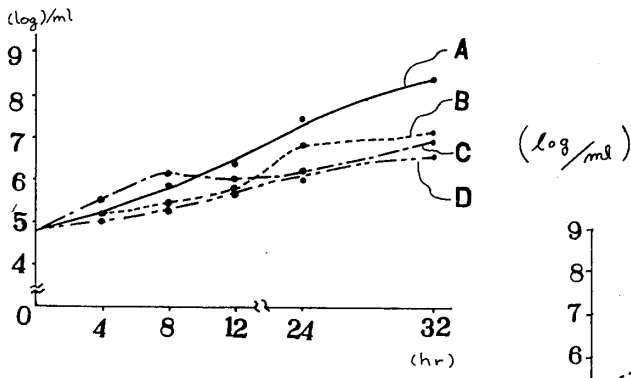
第11図



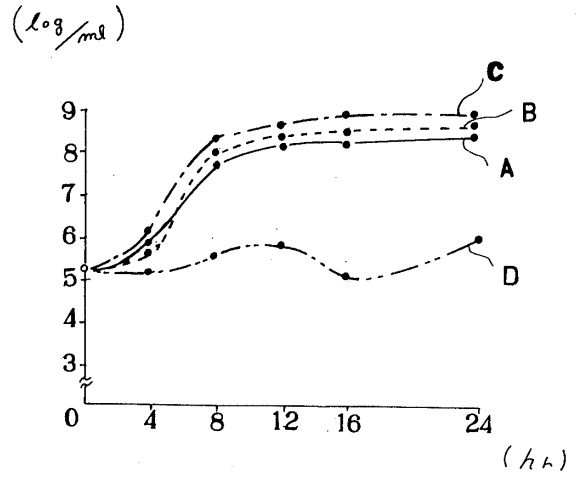
第9図



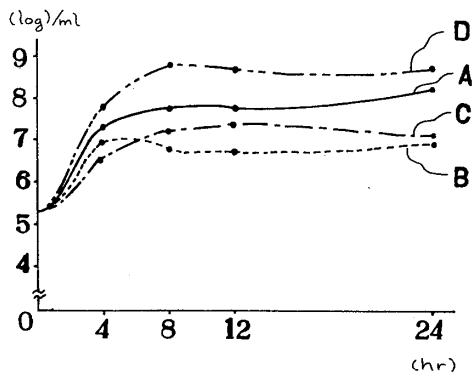
第12図



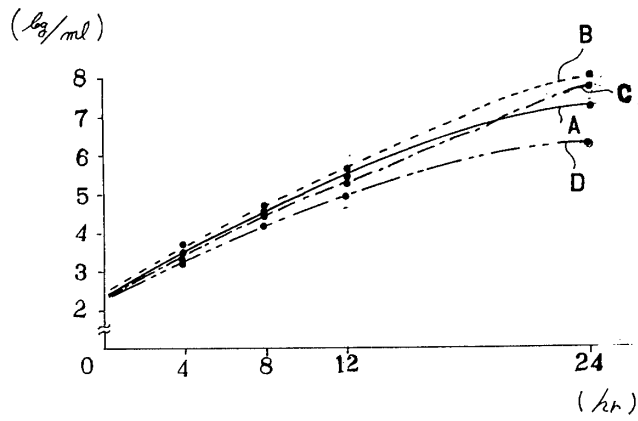
第14図



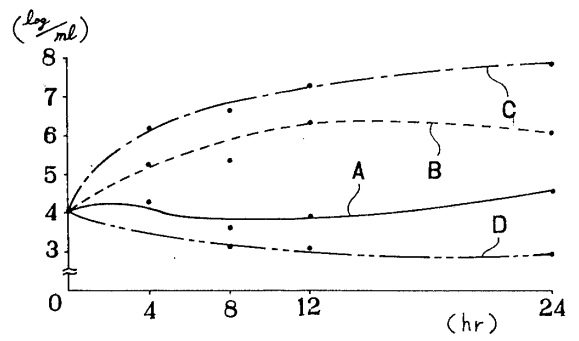
第13図



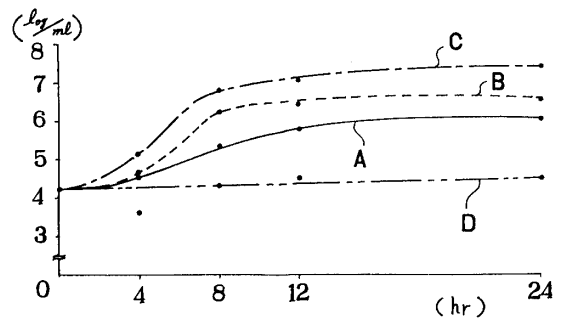
第15図



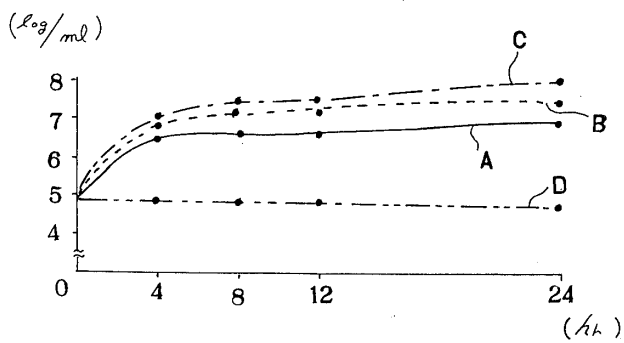
第17図



第18図

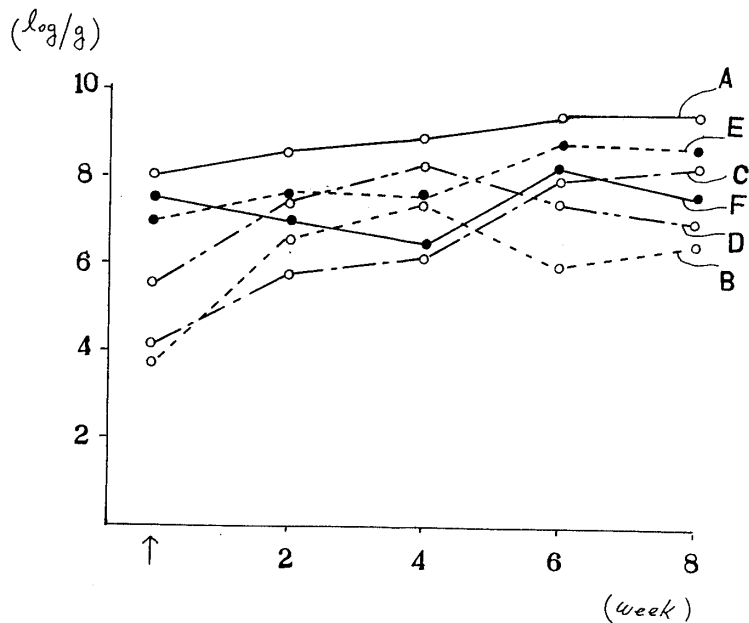
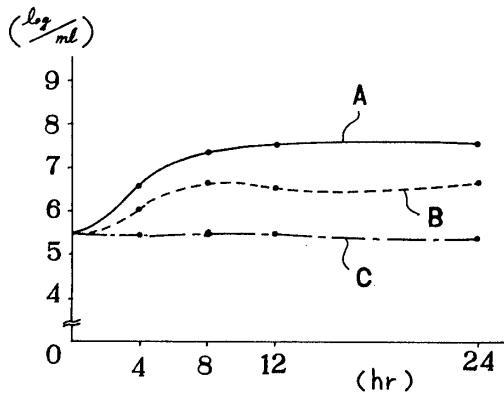


第16図



第 20 図

第 19 図



(\log/g)

第 21 図

