



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I492768 B

(45) 公告日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 21 日

(21) 申請案號：100130279

(22) 申請日：中華民國 100 (2011) 年 08 月 24 日

(51) Int. Cl. : A61K8/99 (2006.01)

A61K8/30 (2006.01)

A61Q17/00 (2006.01)

A61K35/744 (2015.01)

(30) 優先權：2010/08/27 日本

2010-190851

(71) 申請人：養樂多本社股份有限公司 (日本) KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (JP)
日本(72) 發明人：伊澤直樹 IZAWA, NAOKI (JP)；倉澤智子 KURASAWA, TOMOKO (JP)；曾根俊
郎 SONE, TOSHIRO (JP)；千葉勝由 CHIBA, KATSUYOSHI (JP)

(74) 代理人：林志剛

(83) 生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC910364 2007 年 10 月 25 日

(56) 參考文獻：

TW 200829262

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：2 共 22 頁

(54) 名稱

細胞保護劑

(57) 摘要

本發明為由乳酸菌的培養上清液中發現新穎且有用的成分，其目的為提供該成分之有效利用方法。該方法為一種細胞保護劑，其係以屬於嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)之乳酸菌的培養上清液中之低分子部分作為有效成分。

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100130279

※申請日：100年08月24日

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

細胞保護劑

A61K 8/99 (2006.01)

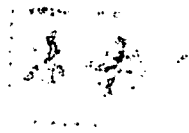
A61K 8/30 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

A61K 35/744 (2015.01)

二、中文發明摘要：

本發明為由乳酸菌的培養上清液中發現新穎且有用的成分，其目的為提供該成分之有效利用方法。該方法為一種細胞保護劑，其係以屬於嗜熱鏈球菌（*Streptococcus thermophilus*）之乳酸菌的培養上清液中之低分子部分作為有效成分。



三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種細胞保護劑，進一步詳細而言，關於一種細胞保護劑，其係以屬於嗜熱鏈球菌的之乳酸菌的培養上清液中之低分子部分作為有效成分。

【先前技術】

已有文獻報告出在乳酸菌的培養上清液中，亦即在將乳酸菌接種至以乳品為主要成分的培養基所得到的培養物中，含有一種具有作為皮膚外用劑效果的成分。例如文獻報告出乳酸菌的培養上清液具有抗氧化作用或光線的防禦作用（專利文獻 1、非專利文獻 1 及 2）。另外還已知此物具有皺紋形成的抑制作用（專利文獻 2），甚至還已知在乳酸菌萃取物中存在具有細胞增殖作用的成分（專利文獻 3）。

然而乳酸菌有許多種類，因此可預測其培養上清液中所含的有效成分也多樣化，另外，在利用作為化妝料或外用劑的有效成分方面，有效的方式是因應目的而選擇活性特別高的部分加以利用，因此正需要針對乳酸菌培養上清液或乳酸菌萃取物進一步進行研究，以找到具有更優異效果的成分。

先前技術文獻

專利文獻

專利文獻 1：日本特開昭 58-198584

專利文獻 2：WO2008/026318

專利文獻 3：日本專利第 3172599 號

非專利文獻

非專利文獻 1：日本香妝品科學會第 7 回學術學會講演要旨,59,1982

非專利文獻 2：日本香妝品科學會第 8 回學術學會講演要旨,210,1983

【發明內容】

[發明所欲解決之課題]

因此，本發明之課題在於從乳酸菌的培養上清液中發現新的且有用的成分，並提供該成分之有效利用方法。

[用於解決課題之手段]

本發明人針對各種乳酸菌培養上清液其中所含的有效成分進行檢討的結果，發現在屬於嗜熱鏈球菌的之乳酸菌的培養上清液之低分子部分中，存在具有優異細胞保護效果的物質，而完成了本發明。

亦即本發明提供一種細胞保護劑，其係以屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌的培養上清液中之低分子部分作為有效成分。

另外本發明還提供一種皮膚外用劑，其係含有前述細胞保護劑。

進一步本發明還提供一種皮膚細胞之保護方法，其特

徵為：將屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌的培養上清液中之低分子部分，適用於保護目標之皮膚上。

[發明之效果]

依據本發明之細胞保護劑，則即使在皮膚等的細胞曝露於羥基自由基等的情況下也能夠保護細胞，而不會發生活細胞數目的減少與其接下來所引起的過度細胞生產，可防止皮膚肥厚或皮膚發炎、皮膚乾燥、乾燥所引起的皺紋形成、彈力性的降低，斑點的發生以及惡化。

【實施方式】

本發明之細胞保護劑中有效成分的乳酸菌培養上清液之低分子部分，可藉由以培養基培養屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌，由所得到的培養物除去固形物而製造出乳酸菌培養上清液，且進一步將該上清液供應至超過濾等以採取分子量 20,000Da 以下的部分而得到。

此處所使用的屬於嗜熱鏈球菌的之乳酸菌可列舉嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*) YIT2001 株 (FERM BP-7538, 寄存日：平成 13 年 (2001 年) 1 月 31 日)、嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*) YIT2084 株 (FERM BP-10879, 寄存日：2006 年 8 月 18 日) 等，該等可單獨使用或使用多種。此外，該等屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌株被寄存於獨立行政法人產業技術綜合研究所的專利生物寄存中心 (日本茨城縣筑波市東 1 丁目 1 番地 1 中

央第 6 (郵遞區號 305-8566)) 。

培養該屬於嗜熱鏈球菌的之乳酸菌的培養基所適合使用的物質可列舉人乳、牛乳、山羊乳等的動物乳、或脫脂乳、由奶粉或脫脂奶粉製成的還原乳、鮮奶油等乳製品，另外還可使用豆漿等的黃豆加工品，然而希望為以乳品為主成分的培養基。此外該等亦可直接使用作為培養基，另外還可因應必要稀釋成適當的濃度而使用。

進一步亦可在該等培養基中另外摻合一般在培養乳酸菌時以補充營養源為目的所使用的成分。這樣的物質可列舉酵母萃取物、綠藻萃取物、維生素 A、維生素 B 類、維生素 C、維生素 E 等的維生素類、或含各種胜肽類的蛋白質分解物、胺基酸類、鈣、鎂等的鹽類。

使用前述培養基培養屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌只要依據常法進行即可，其培養的一個例子可列舉在 30°C ~ 45°C 的培養溫度（較佳為 37°C ~ 42°C）、1 小時 ~ 48 小時的培養時間（較佳為 4 小時 ~ 24 小時）。此外，此時的其他培養條件可列舉靜置、攪拌、振盪、通氣等，只要由該等適當地選擇適合於培養的方法即可。

本發明所使用的乳酸菌培養上清液，可藉由將固形物依據過濾、離心分離等的常法由如上述方式所得到的乳酸菌培養物除去而得。另外，乳酸菌培養上清液之低分子部分，可藉由將分子量大於 20,000Da 的部分依照超過濾或膠體過濾的常法由乳酸菌培養上清液除去而得。

將以這種方式得到的本發明之細胞保護劑，在曝露於

過氧化氫等的損傷物質之前或曝露中添加至細胞，藉此可抑制曝露於損傷物質所造成的細胞數目降低，然而如果在曝露於損傷物質之前添加，則能夠有效地預防細胞數目降低，因此以在曝露於損傷物質之前添加至細胞為佳。

另外，上述細胞保護效果機制的細節仍然不明，而在曝露於損傷物質時，即使在本發明之細胞保護劑並未與細胞共存的情況下依然可發揮其效果，因此認為藉由本發明之細胞保護劑，可對於細胞本身賦予對損傷的耐性亦為機制的其中之一。

上述損傷物質並無特別限制，而可列舉羥基自由基、過氧化氫、單重項氧、超氧化物等的活性氧。此外，曝露於引發細胞數目的降低的紫外線、放射線或變異原性物質等、壓力、吸菸這些各種類型的損傷主要原因也包括在損傷物質之中。

另外，成為本發明之細胞保護劑的對象的細胞，只要是有可能曝露於損傷物質的生物細胞，則並無特別限制，而可列舉例如表皮細胞、樹狀細胞、纖維芽細胞、肥胖細胞、形質細胞、蘭格罕細胞、血管內皮細胞等。其中適合使用於皮膚細胞，尤其是纖維芽細胞。

此外，本發明所使用的屬於嗜熱鏈球菌的之乳酸菌的例子，例如前述般的嗜熱鏈球菌 YIT2001 株以及嗜熱鏈球菌 YIT2084 株，而與在前述專利文獻 2 之中為了得到具有皺紋形成的抑制作用的培養上清液所使用的為同一種。然而專利文獻 2 所使用的培養上清液，是在培養乳酸菌之後

加入三氯醋酸 (TCA) 使其沉澱，然後加入乙醇所得到之物質。

接下來藉著進行 TCA 沉澱以使蛋白質除去，然後再以乙醇萃取而主要得到多糖類，且由於低分子成分被除去，因此專利文獻 2 的培養上清液並不含蛋白質，且為平均分子量 90 萬左右的多糖類。

相對於此，本發明申請案中屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌的培養上清液之低分子部分（以下稱為「培養上清液低分子部分」）如後述般並不進行 TCA 沉澱，因此蛋白質亦存在，且由於採取分子量 20,000Da 以下的部分，所以顯然為低分子之物質，在構成成分及其分子量方面與專利文獻 2 不同。

本發明之細胞保護劑係以上述培養上清液之低分子部分作為有效成分，所使用的培養上清液低分子部分可直接使用將分子量超過 20,000Da 的部分由乳酸菌的培養上清液除去後所得到之物，或者以濃縮、稀釋的液狀物體的形式使用、或以藉由噴霧乾燥或冷凍乾燥等手段而使其乾燥的粉末狀物體的形式使用。

另外，本發明之細胞保護劑可將其摻合於化妝品、醫藥品、準藥物等的皮膚外用劑組成物。此皮膚外用劑組成物之製造可依據常法進行，只要使本發明之細胞保護劑以可發揮所希望的作用效果的程度適量溶解或分散於例如純化水或化妝水基劑、乳霜基劑、乳液基劑等即可。

較具體的皮膚外用劑組成物的例子可列舉化妝水、乳

液、各種乳霜、面膜、美容液等的基礎化妝料、洗髮精、潤絲精、髮質護理劑、養髮液、整髮液、護髮霜、護髮乳等的頭髮用製品、泡澡劑等的浴用化妝品、粉底、口紅、睫毛膏、眼影等的化妝用化妝品、防曬乳等。

作為細胞保護劑的培養上清液低分子部分，其摻合至該等皮膚外用劑組成物中的摻合量並未受到特別限定，只要因應於所使用的細胞保護劑之劑型或用途而決定即可，而在直接使用培養上清液低分子部分的情況宜為 0.01~100 質量%，特佳為 0.1~90 質量%左右，更佳為 1~20 質量%。另外，在使培養上清液低分子部分乾燥而後使用的情况，摻合量為 0.001~10 質量%，特佳為 0.01~9 質量%左右，更佳為 0.1~2 質量%。

另外，在上述皮膚外用劑組成物中，除了必須成分的本發明之細胞保護劑以外，還可摻合通常摻合於皮膚外用劑的任意成分。這樣的任意成分可列舉界面活性劑、油分、醇類、保濕劑、增黏劑、防腐劑、抗氧化劑、螯合劑、pH 調整劑、香料、色素、紫外線吸收劑或散射劑、粉體、維生素類、胺基酸類、水溶性高分子、發泡劑、顏料、植物萃取物、來自動物的成分、海藻萃取物、各種藥劑、添加劑、水等。

此外，由於本發明之細胞保護劑以有食用歷史的乳酸菌培養上清液低分子部分作為有效成分，因此進一步還可摻合至各種飲食品。例如可在前述培養上清液低分子部分中添加適當的助劑之後，使用慣用的手段成形為適合食用

的形態，例如顆粒狀、粒狀、錠劑、膠囊、糊劑等以供食用，另外還可添加至各種食品，例如火腿、香腸等的食肉加工食品、魚板、竹輪等的水產加工食品、麵包、點心等而使用、或可添加至水、果汁、牛乳、清涼飲料等飲料而使用。

[實施例]

接下來列舉實施例對本發明作進一步詳細說明，而本發明完全不受該等實施例制約。

實施例 1

將保存在 -80°C 的嗜熱鏈球菌 YIT2084 菌株以 1 白金耳的量接種至 2mL 試管中的 MRS 培養基 (Difco) 中，在 40°C 靜置培養一晚。接下來，將此培養物以成爲 1% 的方式接種至 2mL 的 10% 脫脂奶粉水溶液 (10% Skim Milk (Difco)) 中之後，在 40°C 進行靜置培養一晚，以作爲第一次前培養。

進一步以同樣方式進行第二次前培養，將此前培養物以 1% 接種至正式培養的培養基 (3% 脫脂奶粉水溶液) 100mL，在 40°C 靜置培養 24 小時。

將培養後的菌液以 4°C 、 $8,000\times g$ 離心分離 15 分鐘，並除去沉澱物。將所得到沉澱物除去後的液體，使用 Centricut Mini V-20 (截留分子量 20,000Da；倉敷紡績)，以 4°C 、 $3000\times g$ 進行 1 小時超過濾，而得到 10mL 的透

過液 1。

將所得到的透過液 1 冷凍乾燥，使其溶於 50mM 的 NaCl 之後，依照下述條件進行 HPLC。將此結果表示於圖 1。由 HPLC 的結果可知上述透過液 1 的平均分子量為 300Da。

[HPLC 條件]

裝置：Waters-600E

偵測器：ISI RI-980

管柱：ShodexSUGAR KS-804

管柱溫度：80℃

移動相：50mM 的 NaCl

流量：1mL/分鐘

注入量：10 μ L

實施例 2

除了將嗜熱鏈球菌 YIT2084 改變為嗜熱鏈球菌 YIT2001 以外，係以與實施例 1 同樣的方式得到 10mL 的透過液 2。

亦對於此透過液 2 以與實施例 1 同樣的方式進行 HPLC，而得到圖 2 的結果。可知此透過液 2 的平均分子量為 300Da。

實施例 3

利用過氧化氫進行的細胞曝露測試：

將 1.3×10^4 個來自小鼠皮膚的纖維芽細胞 3T3 接種至 96 孔盤，含 10%FBS 的 D-MEM 培養基中，在 37°C 、5% CO_2 環境下培養 24 小時。

培養後，除去培養基並以 PBS 洗淨 2 次之後，更換為 D-MEM 培養基（ $100\mu\text{L}$ ）。將透過液 1 及透過液 2 以及分別將其使用 PBS 稀釋 2 倍的液體各 $10\mu\text{L}$ 添加至盤孔中，在 37°C 、5% CO_2 環境下培養 24 小時。上述透過液是直接使用由乳酸菌的培養上清液除去分子量超過 20,000Da 的部分。

再度除去培養基，並以 PBS 洗淨 2 次之後，以最終濃度分別成為 $400\mu\text{M}$ 及 $5\mu\text{M}$ 的方式添加 H_2O_2 及 FeSO_4 ，在 37°C 、5% CO_2 環境下培養 6 小時。此外，在非曝露群中只加入 PBS，然後以相同條件培養。

最後使用結晶紫將細胞染色，以 590nm 的吸光度作為活細胞數目之指標。此外，對照組不使用透過液而只利用 PBS。將其結果揭示於表 1。

[表 1]

| | | 590nm 吸光度 |
|-------------|-----------|-----------|
| 曝露於 過氧化氫 | 透過液 1 原液 | 0.053 |
| | " 2 倍稀釋液 | 0.035 |
| | 透過液 2 原液 | 0.043 |
| | " 2 倍稀釋液 | 0.036 |
| | 對照液 (PBS) | 0.023 |
| 無 過氧化氫 | 透過液 1 原液 | 0.051 |
| | 透過液 2 原液 | 0.064 |
| | 對照液 (PBS) | 0.031 |

如上述所述般，透過液 1 及 2 在 590nm 的吸光度隨著濃度增加而變高，而可知具有細胞保護作用。另外在表 1 中，若比較未曝露於過氧化氫（無過氧化氫）與曝露於過氧化氫的情況下的細胞存活比例，則在透過液 1 為 1.04 倍，細胞數目並未因為曝露於過氧化氫而減少。

實施例 4

過氧化氫除去作用：

在 50 μ M 的 H₂O₂ 液中分別加入透過液 1 及透過液 2 以及將該等以 PBS 稀釋 2、4 及 8 倍的稀釋液，在 37 $^{\circ}$ C 恆溫 30 分鐘之後，測定 H₂O₂ 濃度。將其結果揭示於表 2。

[表 2]

| | H ₂ O ₂ 濃度 (μM) | |
|--------|---------------------------------------|-------|
| | 透過液 1 | 透過液 2 |
| 直接 | 15.38 | 16.02 |
| 2 倍稀釋液 | 17.94 | 20.06 |
| 4 倍稀釋液 | 27.09 | 26.02 |
| 8 倍稀釋液 | 34.32 | 33.68 |
| 無 | 47.30 | 47.30 |

由此結果看來，透過液 1 及透過液 2 對於過氧化氫的作用大致相同。

此結果提示在前述實施例 3 所觀察到透過液 1 的效果並非藉由過氧化氫的消除等所產生，而是藉由其他機制所產生。

實施例 5

化妝水的調製：

按照下述組成調製出化妝水。此外，調製方法是將（7）與（6）混合，在其中加入（1）～（5）並且充分攪拌，而得到化妝水。透過液 1 是直接使用培養上清液之低分子部分。

[表 3]

| | 原料 | 使用量(質量%) |
|-----|-----------|--------------|
| (1) | 乙醇 | 5.0 |
| (2) | 1,3-丁二醇 | 2.0 |
| (3) | 聚氧乙烯硬化蓖麻油 | 0.05 |
| (4) | 對羥基安息香酸甲酯 | 0.1 |
| (5) | 香料 | 0.1 |
| (6) | 透過液 1 | 3.0 |
| (7) | 蒸餾水 | 使全體成爲 100 的量 |

實施例 6

乳液的調製：

按照下述組成調製出乳液。此外，調製方法是在（11）中加入（7）、（8）及（10）並加熱，在 80℃ 加入（1）～（6）使其乳化，然後加入（9）並加以攪拌，使其冷卻至室溫而得到乳液。透過液 1 是直接使用培養上清液之低分子部分。

[表 4]

| | 原料 | 使用量(質量%) |
|------|--------------------|--------------|
| (1) | 硬脂酸 | 2.0 |
| (2) | 流動石蠟 | 5.0 |
| (3) | 鯨烷 | 2.0 |
| (4) | 去水山梨醇單硬脂酸酯 | 0.05 |
| (5) | 聚氧乙烯(20)去水山梨醇單硬脂酸酯 | 2.0 |
| (6) | 對羥基安息香酸丁酯 | 0.05 |
| (7) | 甘油 | 2.0 |
| (8) | 對羥基安息香酸甲酯 | 0.1 |
| (9) | 香料 | 0.15 |
| (10) | 透過液 1 | 5.0 |
| (11) | 蒸餾水 | 使全體成爲 100 的量 |

實施例 7

乳霜的調製：

按照下述組成調製出乳霜。此外，調製方法是在（14）中加入（9）、（10）、（12）及（13）並加熱，在 80℃ 加入（1）～（8）使其乳化，然後加入（11）並攪拌，冷卻至室溫而得到乳霜。透過液 1 是直接使用培養上清液低分子部分。

[表 5]

| | 原料 | 使用量（質量%） |
|------|--------------------|--------------|
| (1) | 流動石蠟 | 23.0 |
| (2) | 凡士林 | 7.0 |
| (3) | 鯨蠟醇 | 1.0 |
| (4) | 硬脂酸 | 2.0 |
| (5) | 蜜蠟 | 2.0 |
| (6) | 去水山梨醇單硬脂酸酯 | 3.5 |
| (7) | 聚氧乙烯（20）去水山梨醇單硬脂酸酯 | 2.5 |
| (8) | 對羟基安息香酸丁酯 | 0.05 |
| (9) | 1,3-丁二醇 | 1.0 |
| (10) | 對羟基安息香酸甲酯 | 0.1 |
| (11) | 香料 | 0.15 |
| (12) | 乳酸菌培養液 | 5.0 |
| (13) | 透過液 1 | 1.0 |
| (14) | 蒸餾水 | 使全體成爲 100 的量 |

產業上之可利用性

本發明之細胞保護劑如上述實施例所示般，具有由過氧化氫等的損傷物質保護住細胞的功能。於是，只要細胞

受到保護而維持細胞數目，則可形成足夠的細胞間脂質，角質層的屏障機能充足，因此水分損失會受到抑制，水分含量增加，而能夠改善肌膚乾裂等。另外，由於隨著老化會發活細胞數目減少，因此亦可期待藉由本發明之細胞保護劑發揮出抗老化作用。

本發明之細胞保護劑如此地具有由過氧化氫等的損傷物質保護住細胞的效果，因此可利用作為皮膚外用劑或化妝品中有效的摻合成分。

另外，上述細胞保護劑中有效成分的屬於嗜熱鏈球菌之乳酸菌的培養上清液中之低分子部分，具有由如上述般的損傷物質保護住細胞的作用，因此藉著將其適用於欲保護的皮膚上，例如包括角層、基底層等的表皮或真皮等，即可保護皮膚細胞。

【圖式簡單說明】

圖 1 表示實施例 1 所得到的透析液之 HPLC 的結果之圖。圖中分別以 a 表示分子量 10,000Da 的位置、b 表示分子量 342Da 的位置、c 表示分子量 180Da 的位置。

圖 2 表示實施例 2 所得到的透析液之 HPLC 的結果之圖。圖中的 a、b 及 c 與上述相同。

空白頁

七、申請專利範圍：

104年3月18日修正本

p. 1-2

1. 一種細胞保護劑，其包含作為有效成分之嗜熱鏈球菌（*Streptococcus thermophilus*）YIT2084 株（FERM BP-10879）的培養上清液中之低分子部分，其中該低分子量部分之分子量為 20,000Da 以下，其抑制當細胞曝露於損傷物質時的細胞數目降低，且其中該低分子部分由以下方法所製造，該方法包含：

將嗜熱鏈球菌 YIT2084 株（FERM BP-10879）培養在培養基中；

由培養過之培養基得到培養上清液；

將該培養上清液超過濾或膠體過濾以得到該低分子部分。

2. 如申請專利範圍第 1 項之細胞保護劑，其中該損傷物質係活性氧。

3. 如申請專利範圍第 1 項之細胞保護劑，其中該損傷物質係羥基自由基。

4. 一種外用劑，其係含有有效量之如申請專利範圍第 1 項之細胞保護劑。

5. 如申請專利範圍第 4 項之外用劑，其中該劑係化妝品。

6. 一種製造細胞保護劑之方法，該方法包含：

將嗜熱鏈球菌 YIT2084 株（FERM BP-10879）培養在培養基中；

從培養過之培養基移除固體以得到該乳酸菌之培養上

清液；及

將該培養上清液超過濾或膠體過濾以得到分子量為 20,000Da 以下之低分子部分；其中細胞保護劑抑制當細胞曝露於損傷物質時的細胞數目降低。

公告本

圖1

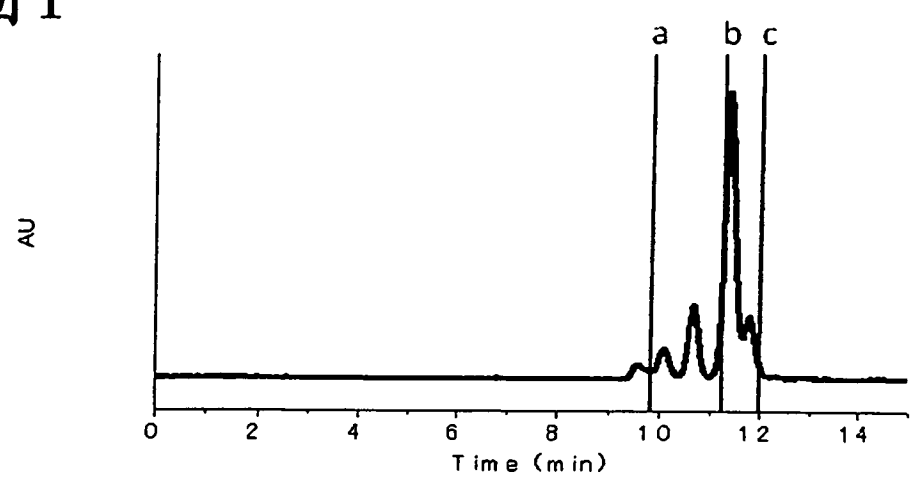


圖2

