(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003 年2 月20 日 (20.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/013559 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 35/74, 31/702, A61P 3/06, 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/08167

(22) 国際出願日: 2002 年8 月9 日 (09.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-244742 2001 年8 月10 日 (10.08.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道ティー・エル・オー株式会社 (HOKKAIDO TECHNOLOGY LICENSING OFFICE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒060-0808 北海道 札幌市 北区北７条西２丁目８番地１ Hokkaido (JP). 日本甜菜製糖株式会社 (NIPPON BEET SUGAR MANUFACTURING CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0031 東京都 中央区 京橋２丁目３番地１３号 Tokyo (JP). ホクレン農業協同組合連合会 (HOKUREN FEDERATION OF AGRICULTURAL CO-OPPERATIVES) [JP/JP]; 〒060-8651 北海道 札幌市 中央区北４条西１丁目３番地 Hokkaido (JP).

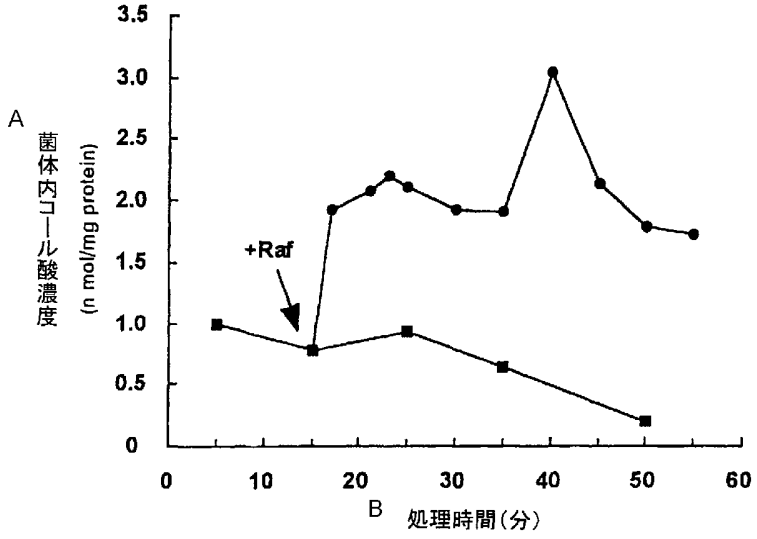
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横田 篤 (YOKOTA,Atsushi) [JP/JP]; 〒004-0881 北海道 札幌市 清田区平岡公園６丁目７番２号 Hokkaido (JP). 冨田 房男 (TOMITA,Fusao) [JP/JP]; 〒063-0824 北海道 札幌市 西区発寒４条西５丁目７－８ Hokkaido (JP). 佐山 晃司 (SAYAMA,Kouji) [JP/JP]; 〒080-0836 北海道 帯広市 空港南町２９６番地２７ Hokkaido (JP). 福森

[続葉有]

(54) Title: BILE ACID ABSORBENT/ADSORBENT

(54) 発明の名称: 胆汁酸吸収、吸着剤



A...CHOLIC ACID CONCENTRATION IN CELL
B...TREATMENT TIME (MIN)

(57) **Abstract:** It is intended to provide bile acid absorbents/adsorbents comprising, as the active ingredients, a lactic acid bacterium, which incorporates bile acid into the cells in the presence of an oligosaccharide but does not release the bile acid from the cells, and the oligosaccharide. Examples of the above-described lactic acid bacterium include Lactobacillus *salivarius ssp. salicinius* JCM-1044 strain and *Bifidobacterium breve* JCM-1192 strain. Examples of the oligosaccharide include raffinose, kestose, nystose and trehalose. The bile acid absorbents may be in the form of oral preparations, foods, drinks and so on. These bile acid absorbents/adsorbents are usable as cholesterol-lowering agents and colon cancer inhibitors.

[続葉有]

WO 03/013559 A1

保則 (HUKUMORI,Yasunori) [JP/JP]; 〒060-0012 北海道 札幌市 中央区北１２条西１７丁目１－４ クリーンリバー桑園駅前２０６ Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 萼 経夫， 外(HANABUSA,Tsuneo et al.); 〒101-0062 東京都 千代田区 神田駿河台３丁目２番地 新御茶ノ水アーバントリニティ 萼特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、オリゴ糖の存在下で菌体内に胆汁酸を取り込んで菌体外に胆汁酸を放出しないという性質を有する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とする胆汁酸吸収、吸着剤を提供する。前記乳酸菌としては、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius ssp. salicinius）ＪＣＭ－１０４４株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＪＣＭ－１１９２株等がある。また、オリゴ糖としてはラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロース等があり、胆汁酸吸着剤としては、経口製剤や飲食品等の形態が挙げられる。また、本発明に係る胆汁酸吸収、吸収剤は、コレステロール低減剤、大腸癌発癌抑制剤としても利用できる

明細書

胆汁酸吸収、吸着剤

技術分野

本発明は、胆汁酸吸収、吸着剤に関するものであって、さらに詳細には胆汁酸を吸着および／または吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とする胆汁酸吸収、吸着剤に関するものである。本発明によれば、胆汁酸をビフィズス菌および乳酸菌に吸着させ体外に排泄させることができるので、いわゆる胆汁酸の腸肝循環を一部制御することから、その結果として体内の血清コレステロール濃度を低減させることができ、また大腸内の二次胆汁酸濃度の低下により、大腸癌の発病リスクを低下させることができ、コレステロール低減剤、大腸癌の発癌抑制剤の提供も可能とするものである。

背景技術

人の胆汁酸は、コール酸４０％、ケノデオキシコール酸３０％、デオキシコール酸２０％よりなり、脂肪酸消化吸収に重要な役割をしている。

一方、胆汁酸の効率的利用回路として腸肝循環が行われている。それは使用し終わった胆汁酸を小腸、大腸で再吸収し、再利用する回路である。その再利用率は健常人で９５％以上であり、再利用された胆汁酸に対する小腸各部位における割合は小腸で９０％、大腸で１０％と報告されている（金村稔（１９８２）：日本外科学会誌８３：６７７～６９０）。そして大腸で再吸収しきれなかった胆汁酸に応じて必要となった胆汁酸が血液中のコレステロールから肝臓中で生合成される。以上が胆汁酸の腸肝循環の概要である。

従って、胆汁酸の腸肝循環を抑制すれば、例えば腸管からの胆汁酸の再吸収を抑えるべく胆汁酸を何かに吸着させることができれば、排泄される胆汁酸が増え、従って必要となる胆汁酸が血清コレステロールから盛んに合成されるようになり、結果として血清コレステロール濃度が低下する。この考え方で胆汁酸吸着剤なるものが提案され実際にコレスチラミンの名称で医療に使用されている（水島裕、

宮本昭正：今日の治療薬（１９９５）３９４)。しかし、この薬剤の実体はイオン交換樹脂であり厳密な処方が必要であり、通常の保健用途には適さない。

本発明は、このような技術の現状に鑑み、胆汁酸を体内から排出、除去することにより、コレステロール濃度が低下し、ヒト血清脂質の代謝が改善され、また大腸内の二次胆汁酸濃度の低下により、大腸癌の発癌リスクが低下する点にも着目し、胆汁酸を低下、除去する技術の重要性を痛感し、胆汁酸を低下、除去する新しいシステムを開発する目的でなされたものである。そのシステムは、有効性はもとより、安全性にも強く配慮した全く新しいタイプの胆汁酸除去システムでなければならない。

発明の開示

本発明者等は、各方面から検討の結果、安全性の面から微生物に着目し、鋭意研究の結果、胆汁酸を取り込みしかもそれを排出しない乳酸菌、胆汁酸を吸収、吸着して放さない乳酸菌が存在すること、しかもこの作用はオリゴ糖の存在下で行われることおよび／またはオリゴ糖の存在下でさらに促進されることを初めて見出し、この有用新知見に基づきさらに研究の結果、ついに本発明の完成に至った。

従って、本発明は第１の観点として、胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤、

第２の観点として、オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤、

第３の観点として、乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第１または第２の観点に記載の胆汁酸吸収、吸着剤、

第４の観点として、オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、第１ないし第３の観点のうちのいずれか一つに記載の胆汁酸吸収、吸着剤、

第５の観点として、オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第１ないし第３の観点のうちのいずれか一つに記載の胆汁酸吸収、吸着剤、

第６の観点として、胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤、

第７の観点として、オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤、

第８の観点として、乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第６または第７の観点に記載のコレステロール低減剤、

第９の観点として、オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、第６ないし第８の観点のうちのいずれか一つに記載のコレステロール低減剤、

第１０の観点として、オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第６ないし第８の観点のうちのいずれか一つに記載のコレステロール低減剤、

第１１の観点として、胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤、

第１２の観点として、オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤、

第１３の観点として、乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第１１または第１２の観点に記載の大腸癌発癌抑制剤、

第１４の観点として、オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする第１１ないし第１３の観点のうちのいずれか一つに記載の大腸癌発癌抑制剤、そして

第１５の観点として、オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、第１１ないし第１３の観点うちのいずれか一つに記載の大腸癌発癌抑制剤に関する。

本発明は、胆汁酸を吸収、吸着する乳酸菌（胆汁酸を吸収および／または吸着する乳酸菌はもとより、その他、胆汁酸を表面に付着する乳酸菌、胆汁酸を菌体内に取り込む乳酸菌等、胆汁酸を保持し得る乳酸菌が全て包含され、しかもさらに胆汁酸を菌体外に排出しない性質が強い乳酸菌が好適であり、これらの乳酸菌

が全て包含される。）を有効成分とする胆汁酸吸収、吸着剤、コレステロール低減剤、並びに大腸癌発癌抑制剤に関し、オリゴ糖を同時および／または別途に使用して体内において乳酸菌とオリゴ糖を共存せしめることにより、乳酸菌の上記作用を生ぜしめおよび／または促進せしめるようにしてなるものである。

図面の簡単な説明

図１は、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius ssp. salicinius）ＪＣＭ－１０４４株のラフィノース（Ｒａｆ）の存在下におけるコール酸取り込み活性を示す。

図２は、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＪＣＭ－１１９２株のラフィノースの存在下におけるコール酸取り込み活性を示す。

図３は、上記ＪＣＭ－１１９２株のラフィノースの存在下におけるケノデオキシコール酸の取り込み活性を示す。

図４は、上記ＪＣＭ－１０４４株の１－ケストース（Ｋｅｓ）の存在下におけるコール酸の取り込み活性を示す。

図５は、上記ＪＣＭ－１１９２株の１－ケストースの存在下におけるコール酸の取り込み活性を示す。

図６は、上記ＪＣＭ－１１９２株の１－ケストースの存在下におけるケノデオキシコール酸の取り込み活性を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、胆汁酸を吸収、吸着して生体内での胆汁酸量を低減せしめるため上記した性質を有する乳酸菌の一つまたはそれ以上が適宜使用されるが、その好適例の一つとして、オリゴ糖の存在下で菌体内に胆汁酸を取り込んで菌体外に胆汁酸を排出しないという性質を有する乳酸菌が挙げられる。

本発明で使用できる乳酸菌としては、上記した乳酸菌が全て使用可能であって、ラクトバチルス(Lactobacillus)属菌やビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)属菌等が適宜使用できる。これらの乳酸菌としては、例えば理化学研究所微生物系統保存施設（ＪＣＭ）に登録・保存されている菌株を挙げることができる。

理化学研究所微生物系統保存施設（ＪＣＭ）に登録・保存されている菌株の中で、ラクトバチルス属菌としては、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス（Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus）ＪＣＭ－１００２株、ラクトバチルス・アシドフィルス（Lactobacillus acidophilus）ＪＣＭ－１０２８株、ラクトバチルス・アシドフィルスＪＣＭ－１０３４株、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius ssp. salicinus）ＪＣＭ－１０４４株、ラクトバチルス・ヘルベチクス（Lactobacillus helveticus）ＪＣＭ－１０６２株、ラクトバチルス・ブヒネリ（Lactobacillus buchneri）ＪＣＭ－１１１５株、ラクトバチルス・マリ（Lactobacillus mali）ＪＣＭ－１１１６株、ラクトバチルス・プランタラム（Lactobacillus plantarum）ＪＣＭ－１１４９株、ラクトバチルス・サケイ（Lactobacillus sakei）ＪＣＭ－１１５７株等を使用することができ、またビフィドバクテリウム属菌としては、ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＪＣＭ－１１９２株、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）ＪＣＭ－１２５５、ビフィドバクテリウム・インファンティス（Bifidobacterium infantis）ＪＣＭ－１２２２株等を使用することができる。

なお、これらの乳酸菌はいずれも、ＪＣＭ菌株カタログに収録されており、自由に分譲、入手することが可能である。

特に好ましい乳酸菌は、上記のＪＣＭ－１０４４株（Lactobacillus salivarius ssp. salicinus JCM1044）およびＪＣＭ－１１９２株（Bifidobacterium breve JCM1192）であって、これらはそれぞれ２００２年８月７日に独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターへ国際寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－８１４５およびＦＥＲＭ　ＢＰ－８１４４の下で寄託されているものである。

これらの乳酸菌は、胆汁酸を吸収、吸着する性質を有するものであるが、この性質はオリゴ糖の存在下で初めて発揮されるかおよび／またはオリゴ糖の存在下でさらに促進される。従って、本発明に係る胆汁酸吸収、吸着剤は、乳酸菌とオリゴ糖を配合した製剤を経口投与する、別々に用意した乳酸菌とオリゴ糖を同時に経口投与する、あるいは生体内、特に腸内にオリゴ糖が存在する場合には乳酸菌のみを経口投与する、あるには逆にオリゴ糖のみを経口投与する等の投与形態

をとり得るものを全て包含するものであって、経口投与時に常に乳酸菌とオリゴ糖が並存する場合のみに限定されるものではない。なお、以下、本発明を胆汁酸吸収、吸着剤を代表例にとって説明するが、コレステロール低減剤、大腸癌発癌抑制剤の場合も同様である。

本発明に係る胆汁酸吸収、吸着剤を製造するに当っては、製剤化の常法が適宜使用可能であって、有効成分に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤、その他常用される補助剤を加えて、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、ドリンク剤等に製剤化すればよい。なお常法に従い、溶腸剤に製剤化することも可能である。

また、有効成分を飲食品成分と共に、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状に製剤化してもよいし、発酵乳、チーズ、バター等の乳製品；ドリンクヨーグルトや乳酸菌飲料等の飲料；バターケーキ等の菓子、パン類；その他の飲食品の形態としてもよい。

有効成分としては、乳酸菌およびオリゴ糖を使用するが（両者は常に同時に配合される必要はない）、乳酸菌としては、単離した乳酸菌自体が使用できる他、乳酸菌含有物、同処理物も使用可能であって、これらも本発明における乳酸菌に包含される。

乳酸菌含有物としては、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物（菌体、培養上清液、培地成分を含む）、乳酸菌培養物から固形分を除去した乳酸菌培養液、乳酸菌飲料、酸乳、ヨーグルト等の乳酸菌発酵した飲食品からなる乳酸菌発酵乳等が挙げられる。

処理物としては、乳酸菌、乳酸菌含有物、発酵乳について、それらの濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等）、希釈物等が挙げられる。

もう一方の有効成分であるオリゴ糖についても同様であって、精製品、乾燥物等が使用可能である他、発酵法等で製造したオリゴ糖等にあっては、オリゴ糖含有物、同処理物も上記と同様に使用可能である。

オリゴ糖としては、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロース、ラクチュロースの他、各種のオリゴ糖が使用可能であって、市販品も使用可能で

ある。

本発明に使用されるラフィノースとしては、例えば、甜菜根から公知の方法（例えば、特開昭５４－４９３４５号公報）で製造されたものや、大豆オリゴ糖（ジャパン・フード・サイエンス、第２６巻、第１０号、第５６～６４頁、１９８７年）として製造され、市販されている粗生成物を直接「ラフィノースを含有するオリゴ糖」として用いることもできる。さらに、大豆ホエーから公知の方法（例えば、特開昭５９－１７９０６４号公報等）により直接製造したラフィノースであってもよい。

また、本発明に使用されるラクチュロースとしては、公知の方法により乳糖をアルカリ異性化して製造され、シロップ状、粉末状、顆粒状等いずれの剤型のものでも使用できるが、副生成物が少ないことから、例えば、特公昭５２－２１０６３号公報に記載の方法により製造したものが望ましい。

また、本発明に使用されるフラクトオリゴ糖としては、１－ケストース、ニストース等を例示することができ、ショ糖溶液等から公知の方法（例えば、特開平８－１７３１０９号公報、特公昭５９－５３８３４号公報等）により、製造することができる。

さらに、ガラクトオリゴ糖としては、次の一般式

Ｇａｌ－（Ｇａｌ）$_{n}$－Ｇｌｃ

［但し、式中、Ｇａｌはガラクトース残基、Ｇｌｃはグルコース残基、ｎは１～４の整数を表す。］で示される化合物を例示することができ、ラクトース溶液から公知の方法（例えば、特公昭５８－２０２６６号公報等）により、製造することができる。

市販されているオリゴ糖の例としては、トレハロース（とれはのいのち：㈱エイチプラスビィ・ライフサイエンス社商品名）の他、ラフィノース（日本甜菜製糖社製）、ラクチュロース（森永乳業社製）、ガラクトオリゴ糖（日新製糖社製）、ラクトスクロース（林原商事社製）、フラクトオリゴ糖（明治製菓社製）、イソマルトオリゴ糖（林原商事社製）、キシロオリゴ糖（サントリー社製）等が例示される。

また、オリゴ糖としては、上記した方法で製造したものが使用できる。1－ケス

トース、ニストース、Ｆ－ニストースの混合物からなるオリゴ糖についていえば、アスペルギルス・ニガー由来酵素を利用した生産法（特開昭６１－２６８１９０号公報）、オーレオバシデイム・プルランス由来酵素を用いる生産法（特開昭５７－１６６９８１号公報）が提案されて実施されており、これらの混合物も使用可能である。なお、これらのオリゴ糖の内、特に１－ケストースは、多くの種類の乳酸菌が資化可能（日高秀昌、原哲朗、栄田利章、岡田淳、島田馨、光岡知足：フラクトオリゴ糖の腸内フローラに及ぼす影響、腸内フローラと食物因子（光岡知足編）、第３９～６６頁、学会出版センター、東京、（１９８４））なので、例えばスコプラリオプシス・ブレビカウリスを用いる１－ケストースの発酵生産（特公平４－４１６００号公報）またはエウロチウム・リーペンス由来酵素を用いクロマト分離を行い、１－ケストースをリッチにする方法（特開２０００－２３２８７８公報）および１－ケストース結晶法（特公平６－７００７５号公報）を組み合わせて生産させる１－ケストース結晶を使用すると好適である。また、目的によってはニストース結晶化法（特許第２６４０５７７号公報）を用い、ニストース結晶を生産し使用することもできる。

これらの有効成分（乳酸菌、オリゴ糖）は、通常、腸管にまで到達して効果を発揮するが、所望するのであれば、溶腸剤に製剤化して確実性を期してもよいし、腸管内に既に存在している乳酸菌をそのまま利用することも可能である。その場合には、乳酸菌を別途投与することなく、オリゴ糖のみの投与でも充分である。

オリゴ糖としては、難消化性オリゴ糖および易消化性オリゴ糖のいずれもが使用できる。なお、オリゴ糖は腸管にまで達することが必要であるので、易消化性オリゴ糖等の腸管に達し得ないものあるいは腸管にまで達する量が低いものについては、腸溶剤に製剤化する等により対処すればよい。

また、難消化性オリゴ糖、例えばラフィノース、１－ケストース、ニストース等は、単糖類や易消化性オリゴ糖とは異なり、通常、分解されることなく腸管にまで達するが、例えばラフィノースの場合、分解されてもビフィズス因子であるメリビオースとなるので、必ずしも不利なものとはならない。このように、オリゴ糖は、所期の効果を発揮するだけでなく、ビフィズス因子や免疫増強因子等としての本来の作用も奏することができ、また、単糖類よりも少ない使用量ですみ、

これらの点においても本発明は卓越している。

本発明によれば、このような手段により胆汁酸が血清コレステロールから盛んに合成されるようになり、結果としてコレステロール濃度が低下する。また、一般的に大腸内の胆汁酸の増加は大腸癌の発症に対して促進的に作用する（金澤暁太郎（１９８４）：日本臨床４２：１６９６～１７００）ので、このような方法による胆汁酸吸着作用は大腸癌になるリスクを低減させることもできる。従って本発明は、コレステロール低減剤、大腸癌発癌抑制剤も提供するものである。

次に実施例および製造例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。なお、胆汁酸取り込み活性は、以下に示す方法で測定した。

乳酸菌を市販のＭＲＳ培地で一夜培養した。この培地の組成は次の通りであった。

ＭＲＳ培地（１リットル）	
ペプトン	１０ｇ
肉エキス	１０ｇ
酵母エキス	５ｇ
リン酸水素２カリウム	２ｇ
クエン酸２アンモニウム	２ｇ
グルコース	２０ｇ
ツイーン８０	１ｇ
酢酸ナトリウム	５ｇ
硫酸マグネシウム（７水和物）	０．５８ｇ
硫酸マンガン（４水和物）	０．２８ｇ

次に、２代目の培養物を調製し、培養液の濁度（６６０ｎｍにおける吸光度）が０．６になった時点で菌体を遠心分離によって回収した。回収した菌体を１ｍＭ硫酸マグネシウムを含む５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．０）で洗浄し、その後、洗浄した菌体を同じ緩衝液中に再懸濁した。この菌体懸濁液を３０分間静置することで、菌体の細胞膜を脱エネルギー状態とした。そして、静置した菌体懸濁液を遠心操作して菌体を回収し、さらに１ｍＭ硫酸マグネシウムを含む５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７．０）で菌体を洗浄した。その後、洗

浄した菌体を同じ緩衝液中に再懸濁し、菌体懸濁液の滴度が１０になるよう調整した。

このようにして調製した菌体懸濁液９６μｌに６mMコール酸溶液（^{14}Ｃで標識したコール酸（ケノデオキシコール酸）、１６ｍＣｉ／ｍｍｏｌ）２μｌを加えて１５分間静置した後、０．３３Mオリゴ糖溶液１μｌを加えて胆汁酸取り込み活性の測定を開始した。一定時間経過後、１００mM塩酸リチウムを含む１００mMリン酸カリウム緩衝液３ｍｌを加えて反応を停止し、その後、反応溶液をセルロースアセテート膜（pore size：０．４５μｍ）で濾過し、膜上に留まった放射能量をシンチレーションカウンターで測定した。また、対照として、オリゴ糖を加えないのもについても同様に放射能量を測定した。

実施例１

ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius ssp. Salicinius）ＪＣＭ－１０４４株について、胆汁酸取り込み活性を測定した。その結果を図１に示す。なお図中において、オリゴ糖使用区（試験区）は黒丸、非使用区（対照区）は黒四角で示す（以下、同じ）。

ラフィノースは反応開始後１５分の時点で添加した。ラフィノースを加えない菌体懸濁液では、菌体内に胆汁酸が取り込まれず菌体内のコール酸濃度は変化しなかった。一方、ラフィノースを加えた菌体懸濁液では、速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内のコール酸濃度は菌体外の約８倍に上昇した。

菌体懸濁液に添加したラフィノースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間４０分の時点）以降は、コール酸の受動的な排出が発生し、その結果、菌体内のコール酸濃度は徐々に低下した。

実施例２

ビフィドバクテリウム・ブレーベ（Bifidobacterium breve）ＪＣＭ－１１９２株について、胆汁酸取り込み活性を測定した。その結果を図２に示す。

ラフィノースは反応開始後１５分の時点で添加した。実施例１と同様、ラフィノースを加えない菌体懸濁液では、菌体内に胆汁酸が取り込まれず菌体内のコー

ル酸濃度は変化しなかった。一方、ラフィノースを加えた菌体懸濁液では、速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内のコール酸濃度は菌体外の約３０倍に上昇した。

菌体懸濁液に添加したラフィノースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間６０分の時点）以降は、コール酸の受動的な排出が発生し、その結果、菌体内のコール酸濃度は徐々に低下した。

実施例３

ビフィドバクテリウム・ブレーベＪＣＭ－１１９２株について、ケノデオキシコール酸の取り込み活性を測定した。その結果を図３に示す。

ラフィノースは反応開始後１５分の時点で添加した。ラフィノースを加えない細胞懸濁液では、菌体内にケノデオキシコール酸が取り込まれず菌体内のケノデオキシコール酸濃度は変化しなかった。一方、ラフィノースを加えた細胞懸濁液では、速やかに菌体内にケノデオキシコール酸が取り込まれ、菌体内ケノデオキシコール酸濃度は菌体外の約６倍に上昇した。

細胞懸濁液に添加したラフィノースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間３０分の時点）以降は、ケノデオキシコール酸の受動的な排出が発生し、その結果、菌体内のケノデオキシコール酸濃度は徐々に低下した。

製造例１

ケストース結晶の製造法

（１）エウロチウム・リーペンス由来酵素の生産

炭素源としてショ糖３０％、窒素源として酵母エキス１．５％を含み、燐酸カリウム、硫酸マグネシウム各０．２％よりなる溶液をｐＨ６とした培養液２００Ｌをジャーファーメンターに調製し、滅菌後あらかじめ同一組成で４８時間振とう培養したエウロチウム・リーペンスを接種し３０℃で４８時間、１／２ＶＶＭで通気培養を行い、菌体を濾過分離し湿菌体６ｋｇを得た。この物を粗酵素として次の反応を行った。

（２）酵素反応

反応溶液としてショ糖濃度を７０％（W／V）とした１m^3を調製しｐＨ６とした後、反応温度５５℃とし、それに上記湿菌体５ｋｇを投入し１６時間攪拌しながら反応させた。その結果反応液の糖組成は全糖質当たり、１－ケストース３０％、ニストース９％、グルコース２０％、フルクトース２％、ショ糖３３％の糖組成物ができた。以上反応を５サイクル実施し、下記クロマト分離により１－ケストースを分離精製した。

（３）クロマト分離

上記糖組成物から１－ケストースを主体とするオリゴ糖区分と主にショ糖とグルコースよりなるその他の区分に分けるクロマト分離を１m^3容量の凝似移動床式クロマト分離装置（分離剤としては、陽イオン交換樹脂ＵＢＫ５３０（三菱化学社製）を使用した。）を用いて行った。分離条件は運転負荷が０．０５ｖ／ｖ・ｈ、使用水量を５．３３（D／F）とした。得られたオリゴ糖区分の糖組成は１－ケストース７２％、ニストース１９％、ショ糖２％であり、１－ケストースの回収率は９４％であった。

次に、このオリゴ糖区分を６５％（W／W）まで濃縮したものを原液として同一のクロマト分離装置の分離条件を変更し１－ケストース区分と主にニストースからなるニストース区分に分ける分離を行った。分離条件は運転負荷が０．０４ｖ／ｖ・ｈ、使用水量を５．０（D／F）とした。得られたケストース区分の糖組成は１－ケストース８９％、ニストース３％、ショ糖３％であり、1－ケストースの回収率は６３％であった。以上の結果、処理液として９００Ｌ（７０％（W／V）として）を得た。これを結晶母液として下記結晶化を行いさらに純度を上げた。

（４）結晶化工程

５００Ｌ結晶缶を用い、上記ケストース区分の一部をこれに投入し、８９％（W／W）まで濃縮した時点であらかじめ調整した種結晶を投入し、８５℃で３時間の煎糖を行った。その後、８０から６５℃の温度コントロールを行う助晶を１７時間行った後、遠心分離器で結晶を回収し、乾燥冷却した。得られた結晶製品の重量は４５３ｋｇで母液中のケストースに対する回収率は５０％で、純度は９８％であった。

実施例４

ラクトバチルス・サリバリウスＪＣＭ－１０４４株について、胆汁酸取り込み活性を測定した。その結果を図４に示す。なお、１－ケストースとしては製造例１にて製造した結晶製品を使用した。

１－ケストースは反応開始後１５分の時点で添加した。１－ケストースを加えない細胞懸濁液では菌体内にコール酸は取り込まれず、１－ケストースを加えた細胞懸濁液では速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内のコール酸濃度は菌体外の約１３倍に上昇した。菌体懸濁液に添加した１－ケストースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間４０分の時点）以降はコール酸の受動的な排出が発生する傾向が現れた。

実施例５

ビフィドバクテリウム・ブレーベＪＣＭ－１１９２株についてコール酸の取り込み活性を測定した。その結果を図５に示す。1－ケストースは反応開始後１５分の時点で添加した１－ケストースを加えない細胞懸濁液では菌体内にコール酸は取り込まれず、1－ケストースを加えた細胞懸濁液では速やかに菌体内にコール酸が取り込まれ、菌体内コール酸濃度は菌体外の約２４倍に上昇した。菌体懸濁液に添加した 1－ケストースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間８０分の時点）以降はコール酸の受動的な排出が発生した。また、ビフィドバクテリウム・インファンティスＪＣＭ－１２２２株についても、ニストースを添加した細胞懸濁液での菌体内へのコール酸の取り込みが確認された。

実施例６

ビフィドバクテリウム・ブレーベＪＣＭ－１１９２株についてケノデオキシコール酸の取り込み活性を測定した。その結果を図６に示す。

１－ケストースは反応開始後１５分の時点で添加した。１－ケストースを加えない細胞懸濁液では菌体内にケノデオキシコール酸は取り込まれず、１－ケストースを加えた細胞懸濁液では速やかに菌体内にケノデオキシコール酸が取り込ま

れ、菌体内ケノデオキシコール酸濃度は菌体外の最大約１５倍に上昇した。細胞懸濁液に添加した１－ケストースがほぼ消費されたと考えられる時点（反応時間３０分の時点）以降はケノデオキシコール酸の受動的排出が発生し、その結果菌体内のケノデオキシコール酸濃度は徐々に低下したが、約２倍で平衡した。

実施例７

ケストース錠剤の製造法

１－ケストース５０％、デキストリン３０％、植物油脂２０％の混合比にして打錠機により一粒１５０ｍｇの錠剤を作成した。錠剤強度は４．２ｋｇであった。

実施例８

ビフィドバクテリウム・ブレーベＪＣＭ－１１９２株と上記オリゴ糖の配合錠剤の製造

ビフィドバクテリウム・ブレーベＪＣＭ－１１９２株をＭＲＳ培地に接種し、３７℃で２４時間静置培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収した。５％ショ糖、５％可溶性澱粉、５％グルタミン酸ナトリウム、および１％硫酸マグネシウム７水和物を含む分散媒中に上記菌体を混合し、混合液のｐＨを７．０にした後、混合物を凍結乾燥した。

このように調製した乾燥菌体粉末２ｍｇに１－ケストースまたはニストースを１００ｍｇ、デキストリン６０ｍｇ、ポリビニルピロリドンＫ２５を１８ｍｇ、ステアリン酸マグネシウム０．８ｍｇを加えて均一に混合し、打錠機で圧縮成形しオリゴ糖とビフィズス菌を含む一錠２００ｍｇの２種類の錠剤を製造した。

産業上の利用可能性

本発明の方法によると、オリゴ糖の存在下でビフィズス菌、乳酸菌の菌体内に胆汁酸を取り込ませることができ再び排出されないことを見出し、オリゴ糖を胆汁酸取り込み誘因物質として使用できるので、これらの糖質を上記ビフィズス菌、乳酸菌と共にあるいは腸内にいる常在菌の増加を期待して上記糖質単独で使用し、血清コレステロール濃度を低下させたり、大腸癌の発癌リスクを低減させること

ができる。とりわけ、発癌抑制は少量の有効成分でも効果が奏されるので、医薬品のほか、発癌予防や手術後における再発防止等の目的で、飲食品の形態で投与することもできる。

請 求 の 範 囲

１． 胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤。

２． オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする胆汁酸吸収、吸着剤。

３． 乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項１または２に記載の胆汁酸吸収、吸着剤。

４． オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、請求項１ないし３のうちのいずれか一項に記載の胆汁酸吸収、吸着剤。

５． オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項１ないし３のうちのいずれか一項に記載の胆汁酸吸収、吸着剤。

６． 胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特激とするコレステロール低減剤。

７． オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とするコレステロール低減剤。

８． 乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項６または７に記載のコレステロール低減剤。

９． オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする、請求項６ないし８のうちのいずれか一項に記載のコレステロール低減剤。

１０． オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項６ないし８のうちのいずれか一項に記載のコレステロール低減剤。

１１． 胆汁酸を吸収する乳酸菌およびオリゴ糖を有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤。

１２． オリゴ糖の存在下で胆汁酸を吸収し、吸着する乳酸菌およびオリゴ糖を

有効成分とすることを特徴とする大腸癌発癌抑制剤。

１３．　乳酸菌が、ラクトバチルス属または／およびビフィドバクテリウム属から選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項１１または１２に記載の大腸癌発癌抑制剤。

１４．　オリゴ糖が、難消化性オリゴ糖であることを特徴とする請求項１１ないし１３のうちのいずれか一項に記載の大腸癌発癌抑制剤。

１５．　オリゴ糖が、ラフィノース、ケストース、ニストース、トレハロースから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする、請求項１１ないし１３のうちのいずれか一項に記載の大腸癌発癌抑制剤。

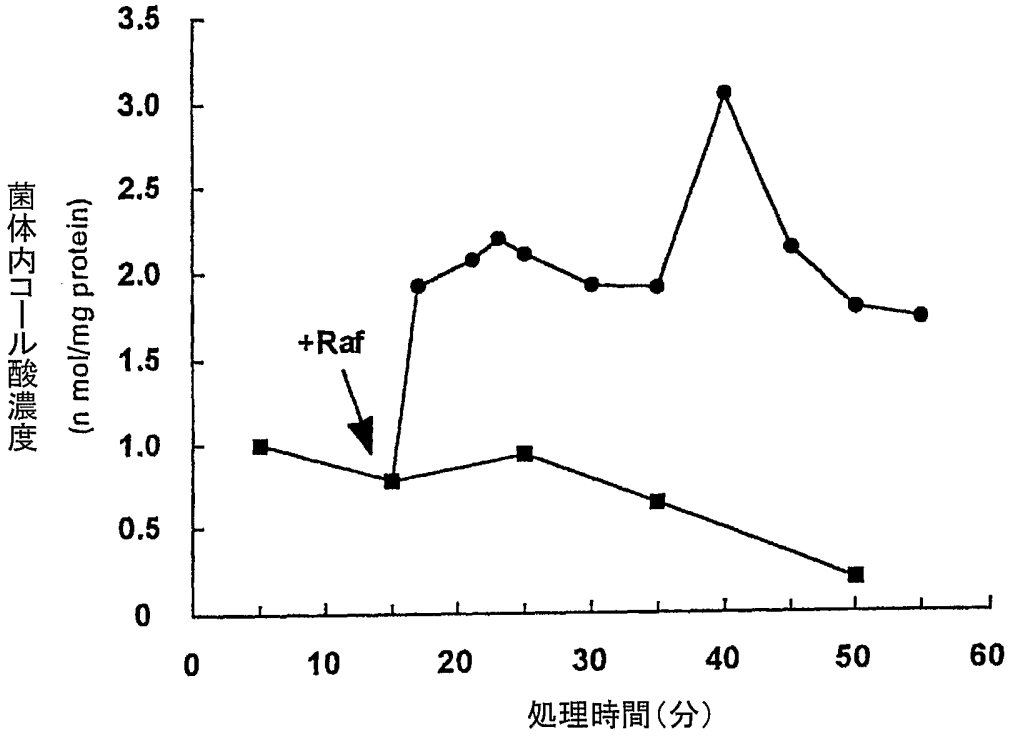


図1

差替え用紙(規則26)

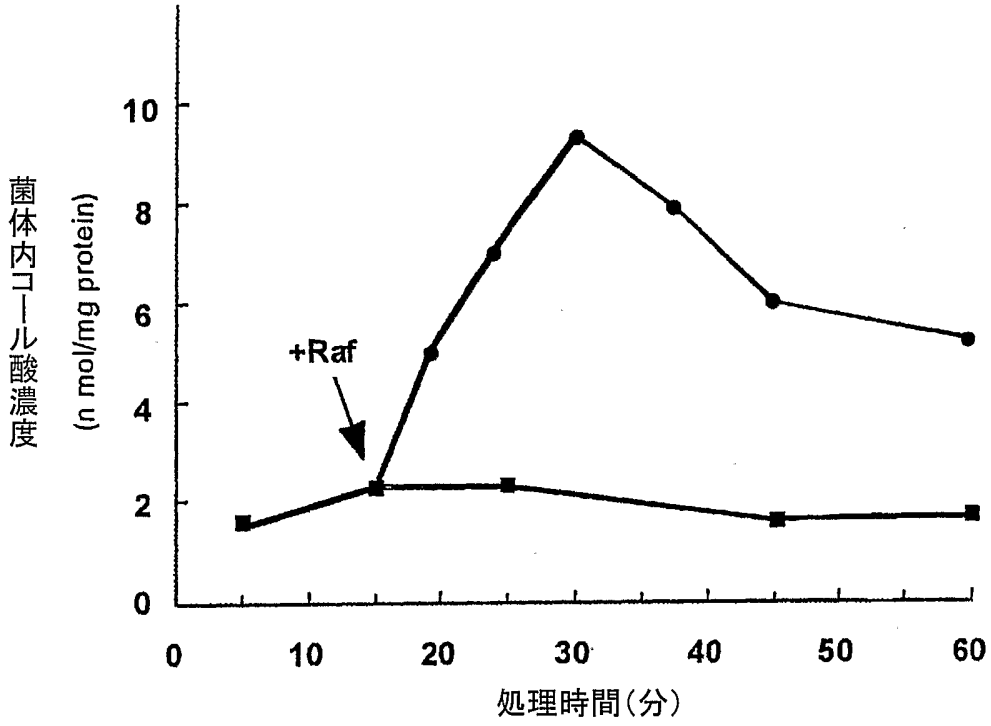


図2

差替え用紙(規則26)

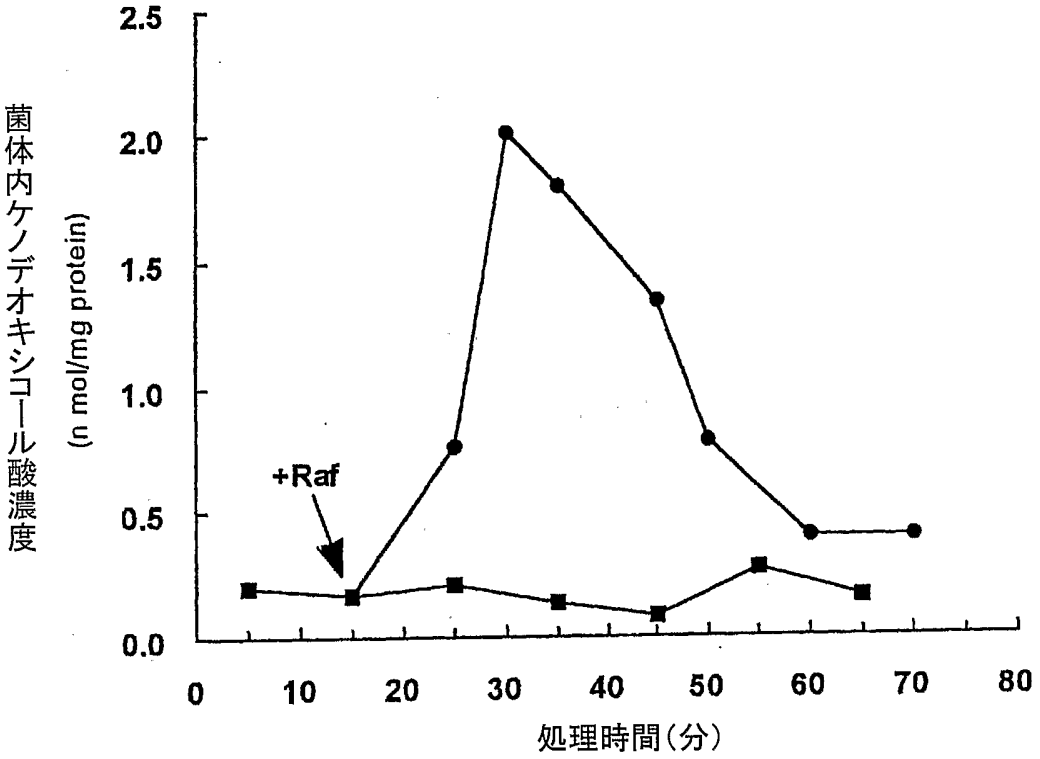

菌体内ケノデオキシコール酸濃度
(n mol/mg protein)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
+Raf
0
10
20
30
40
50
60
70
80
処理時間(分)

図3

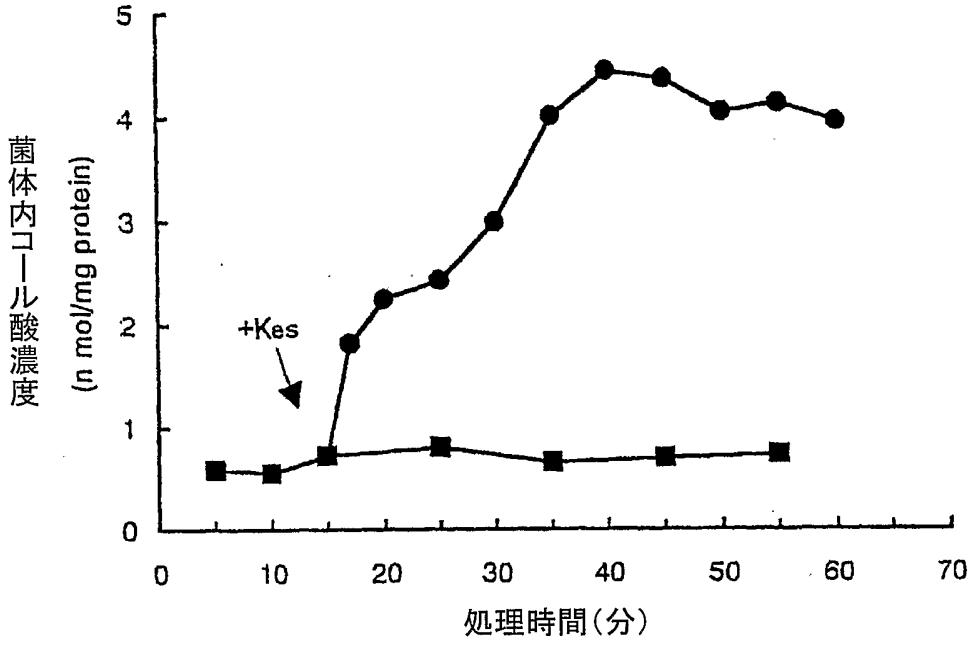

菌体内コール酸濃度
(n mol/mg protein)
5
4
3
2
1
0
+Kes
0
10
20
30
40
50
60
70
処理時間(分)

図4

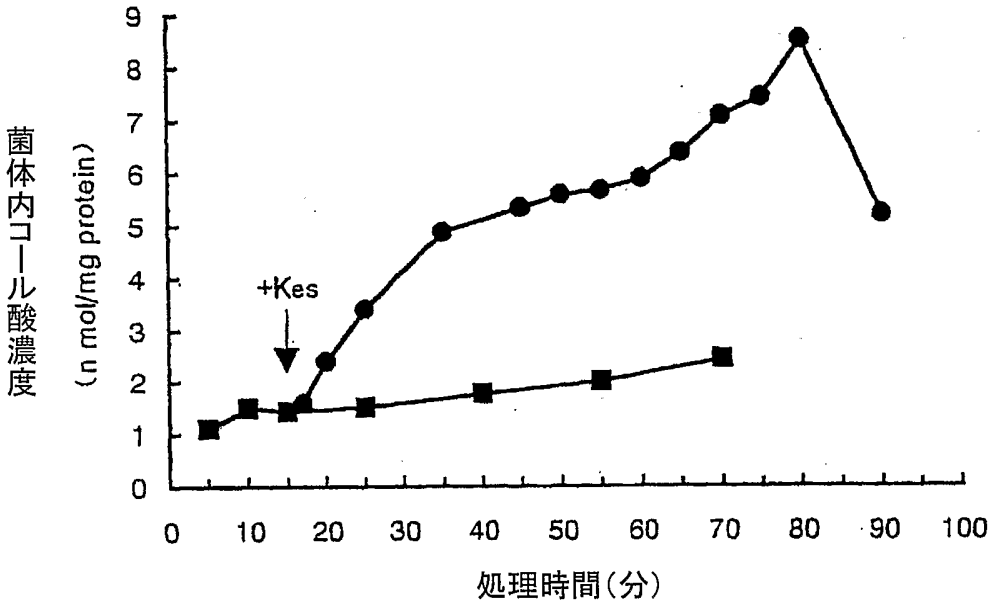

菌体内コール酸濃度
(n mol/mg protein)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
+Kes
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
処理時間(分)

図5

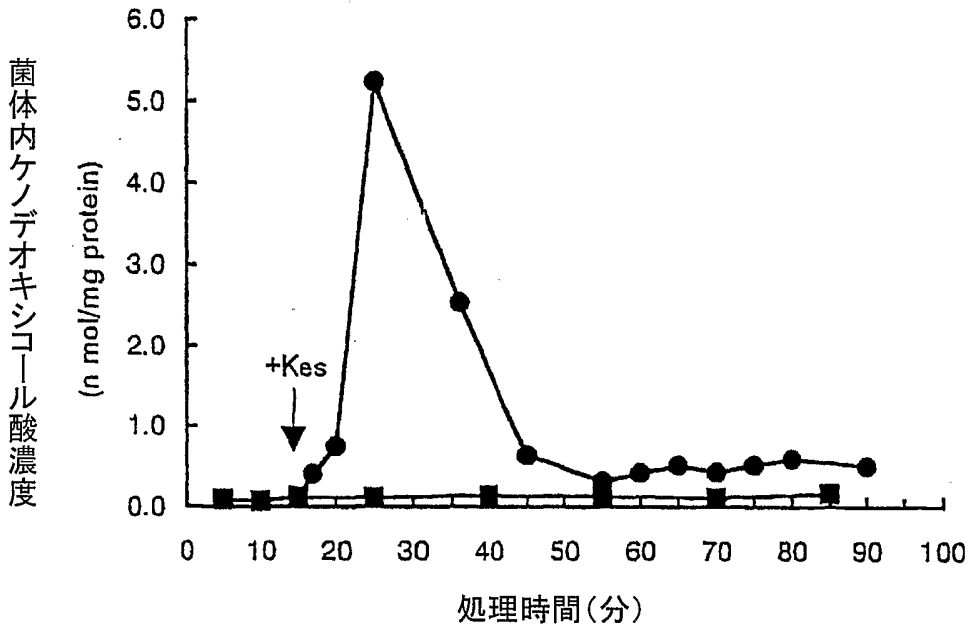

菌体内ケノデオキシコール酸濃度
(n mol/mg protein)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
+Kes
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
処理時間(分)

図6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K35/74, 31/702, A61P3/06, 35/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K35/74, 31/702, A61P3/06, 35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-97870 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 10 April, 2001 (10.04.01), Abstract; Claims; Par. Nos. [0009], [0030] & Chem.abstr., 2001, Vol.134 (Columbus, OH, USA), the abstract No.271276	1-15
A	Atsushi YOKOTA et al., "Chonai Sakkin no Shinkino: *Lactobacillus*-Zoku Nyusankin ni yoru Tanjusan Yuso to Probiotics Mechanism", The Society for Bioscience and Bioengineering Shi, 2001 June, Vol.79, No.6, pages 176 to 177 & Chem.abstr., 2001, Vol.135 (Columbus, OH, USA), the abstract No.329461	1-15

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 November, 2002 (08.11.02)	19 November, 2002 (19.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08167

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 11-239476 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 07 September, 1999 (07.09.99), & JP 3158090 B & Chem.abstr., 1999, Vol.131 (Columbus, OH, USA), the abstract No.182260	1-15
A	Atsushi YOKOTA et al., "Nyusankin no Tanjusan Taisei to sono Mechanism", Journal of Japan Society for Lactic Acid Bacteria, 1998, Vol.9, No.1, page 17	1-15

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０８１６７

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7]　A61K35/74,31/702,A61P3/06,35/00,43/00

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7]　A61K35/74,31/702,A61P3/06,35/00,43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	JP 2001-97870 A(雪印乳業株式会社)2001.04.10 【要約】、【特許請求の範囲】、【０００９】、【００３０】 & Chem. abstr., 2001, Vol.134(Columbus, OH, USA), the abstract No.271276	１－１５
A	横田　篤　等、腸内細菌の新機能：*Lactobacillus*属乳酸菌による胆汁酸輸送とプロビオティックスメカニズム、生物工学会誌、2001年6月、第79巻、第6号、第176-177ﾍﾟｰｼﾞ & Chem. abstr., 2001, Vol.135(Columbus, OH, USA), the abstract No.329461	１－１５

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０８．１１．０２	19.11.02

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｃ	９２８４
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	瀬下　浩一　印 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２		

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	JP 11-239476 A(雪印乳業株式会社)1999.09.07 & JP 3158090 B & Chem. abstr., 1999, Vol.131(Columbus, OH, USA), the abstract No.182260	１－１５
A	横田　篤　等、乳酸菌の胆汁酸耐性とそのメカニズム、日本乳酸菌学会誌、1998年、第9巻、第1号、第17ﾍﾟｰｼﾞ	１－１５