

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：**96130744**

※ 申請日期：**96.8.20**

※IPC 分類：~~A23K, C12N~~
A61K 35/44
A61P 3/06

一、發明名稱：(中文/英文)

脂質代謝改善劑

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：**(中文/英文)**

日商可爾必思股份有限公司

CALPIS CO., LTD

代表人：**(中文/英文)**

石渡 總平

ISHIWATA, SOUHEI

住居所或營業所地址：**(中文/英文)**

日本國東京都涉谷區惠比壽南2丁目4番1號

4-1, 2-CHOME, EBISU-MINAMI, SHIBUYA-KU, TOKYO 150-0022

JAPAN

國 籍：**(中文/英文)**

日本 JAPAN

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 鈴木 宏美
SUZUKI, HIROMI
2. 藤原 茂
FUJIWARA, SHIGERU

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN
2. 日本 JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2006年08月21日；特願2006-224672

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種脂質代謝改善劑，其係以桿菌屬之細菌，尤其是枯草桿菌C-3102株之菌體或其培養物作為有效成分，且具有降低血清三酸甘油酯值之作用。

【先前技術】

血清之三酸甘油酯值之上升係導致高脂血症、動脈硬化症、缺血性心臟病(心絞痛或心肌梗塞)，又，糖尿病等發病之原因，其通常成為生活習慣病之指標。又，已知飯後中性脂肪之增加及維持係對循環系統疾病影響最大的因素。

通常，治療高脂血症係採用藥物療法及限制脂質攝取量之飲食療法。於藥物療法中，係使用藉由阻止膽固醇合成途徑之自3-羥基-3-甲基戊二醯輔酶A(HMG-CoA)合成羥戊酸，而阻止膽固醇生物合成之HMG-CoA還原抑制劑(MEVALOSTATIN等)或膽汁酸吸附劑(陰離子交換樹脂)等藥物。

然而，HMG-CoA還原抑制劑具有過敏症或肝功能異常、橫紋肌溶解症等副作用。又，若使用膽苯烯胺等陰離子交換樹脂，則陰離子交換樹脂於消化管內吸附大量含有膽固醇之膽汁酸，阻斷其腸肝循環，而使膽固醇外排，但其存在投與量較大難以飲用，且會引起便秘或消化管症狀等問題。又，飲食療法由於限制飲食而伴隨有精神上之苦痛，故而難以長期持續實施。

因此，業者謀求一種無副作用且易於連續攝取，且具有降低血清三酸甘油酯作用的藥劑及食品。

[專利文獻1]日本專利特公平4-24022

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

本發明之目的在於提供一種可用於動脈硬化症等疾病之治療及預防的脂質代謝改善劑。

[解決問題之技術手段]

本發明提供一種以屬於桿菌屬之細菌的菌體或培養物作為有效成分之脂質代謝改善劑。又，本發明提供一種以屬於桿菌屬之細菌的菌體或培養物作為有效成分之血清三酸甘油酯值降低劑。屬於桿菌屬之細菌較好的是枯草桿菌，更好的是枯草桿菌C-3102(FERM BP-1096)。

【實施方式】

桿菌屬細菌(例如，枯草桿菌(*Bacillus subtilis*))自古便與人類之飲食生活息息相關，關於其機能性之資訊較多，但尚未報告其具有降低血清三酸甘油酯之作用或改善脂質代謝之效果。

本發明之脂質代謝改善劑及血清三酸甘油酯值降低劑之特徵在於，其含有屬於桿菌屬之細菌的菌體或其培養物，較好的是枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)之菌體或其培養物作為有效成分。枯草桿菌之細菌學性質係記載於伯吉氏鑑別細菌學手冊(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) Vol.11(1986)等中，具體而言，例如具有以下特徵。

- (1)革蘭氏陽性
- (2)形成卵圓形之芽孢
- (3)桿菌
- (4)運動性：有
- (5)好氣性
- (6)觸酶：陽性
- (7)於50°C下之增殖：+
- (8)於pH5.7下之增殖：+
- (9)檸檬酸鹽之利用：+
- (10)自糖類有無酸生成：阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、甘露醇：+
- (11)VP反應：+
- (12)澱粉之水解：+
- (13)硝酸鹽之還原性：+
- (14)吲哚之生成：-
- (15)白明膠之水解：+
- (16)酪蛋白之水解：+
- (17)於液體培養基中形成被囊：+
- (18)牛奶之凝固：-
- (19)牛奶之腓化：+

作為本發明之脂質代謝改善劑及血清三酸甘油酯值降低劑所使用之枯草桿菌，例如可舉出：枯草桿菌C-3102株(生命工學工業技術研究所，寄託編號FERM BP-1096，寄託日期1985年12月25日)。枯草桿菌C-3102株之大豆培養

物對家畜具有改善腸內菌群、增加體重、感染感染、強化卵殼、改善肉質、改善便臭等之效果，可用作添加物(日本專利特公平4-24022)。又，作為該株之保健效果，已知有整腸作用、減少腸內腐敗產物等。(腸內細菌學會志，第18卷，第二號，93-99(2004))。

枯草桿菌C-3102具有使用下述序列1及序列2之PCR引子進行PCR反應，可擴增大約700 bps之片斷之特徵。其他枯草桿菌藉由該PCR引子不會引起擴增。以枯草桿菌C-3102之基因組作為模板擴增而成之大約700 bps之片斷之特徵為，與澱粉酶之序列不具有同源性，該方面可明確地區別C-3102株與枯草桿菌之其他株。

序列1：5'-GCCCCGCACATACGAAAAGACTGGCTGAAA-3'(序列編號1)

序列2：5'-GGATCCCACGTTGTGATTAAGCAGCGAT-3'(序列編號2)

進而，枯草桿菌C-3102株具有以下性質：

(1)不具有質體DNA。

(2)調製基因組DNA，以限制酶NotI或SfiI進行消化，再藉由瓊脂糖電泳進行分離時之消化圖案如圖1所示。

(3)產生B.cerous抗菌物質。

(4)對安比西林、氯黴素、環丙沙星、紅黴素、建它黴素、康微素、利奈唑胺(linezolid)、奎奴普汀/達福普汀(quinupristin/dalfopristin)、利福平、鏈黴素、四環素、三甲氧苄胺嘧啶、梵谷黴素並不具有耐藥性(最低抑菌濃度

均為0.03~4 µg/ml)。

枯草桿菌可使用通常用於微生物培養之含有碳源、氮源、無機物等之液體培養基或固體培養基作為培養基而進行培養。作為碳源，為枯草桿菌可同化之碳源即可，例如可舉出：葡萄糖、果糖、蔗糖、澱粉、糖蜜等；又，作為氮源，例如可舉出：蛋白胨、酪蛋白水解物、肉汁、硫酸胺等。進而，根據需要亦可添加磷酸、鉀、鎂、鈣、鈉、鐵及錳等之鹽類，維他命類，胺基酸類，界面活性劑等。又，除該等合成培養基以外，亦可使用大豆粕等來自天然之物質進行培養。作為培養條件，較好的是需氧條件，作為培養裝置，例如較好的是利用醱酵槽之通風攪拌液體培養裝置、棚式固體培養裝置、自動製麩培養裝置等。培養溫度較好的是20~50℃、尤其好的是30~45℃，培養時間較好的是12小時~7日，培養初始pH值較好的是pH5~9、尤其好的是pH6~8。

如此而獲得之培養物包含枯草桿菌之菌體、培養基及醱酵生成物。培養物可直接用作脂質代謝改善劑或三酸甘油酯降低劑，亦可將培養物濃縮或對該等添加賦形劑等，製成乾燥粉末、顆粒、錠劑等製劑而使用。又，可使用自培養物分離之菌體，亦可自培養物去除菌體而使用，亦可使用包含菌體之形式的培養物。尤其好的態樣為：使用大豆粕、煮大豆、煮小豆、米飯、麥飯、小麥糠、煮玉米、其他穀類等適合食用之來自天然之物質進行培養枯草桿菌，不自培養物分離菌體而直接調配於食品中。

本發明之脂質代謝改善劑及血清三酸甘油酯值降低劑可以液體、粉末、造粒物、錠劑等形式投與，亦可作為食品添加物調配於飲料食品中而進行攝取。作為飲料食品，例如可舉出：飲料、糖果片、醬、麵包、魚肉加工製品、乳製品等。將本發明之脂質代謝改善劑及血清三酸甘油酯值降低劑添加至該等各種食品素材中，可作為健康飲料、健康食品或機能性食品而提供。

如以上所述，本發明係關於以枯草桿菌之菌體或其培養物作為有效成分之具有降低血清三酸甘油酯之效果的脂質代謝改善劑。作為本發明之有效成分的枯草桿菌為微量且於短時間內有效，保存性及耐酸性優異而使其到達腸內後可容易地進行增殖，可期待持續之降低血清三酸甘油酯作用。

本說明書中註明引用之全部專利及參考文獻內容均藉由參照而編入本說明書中。又，本申請案所具有之優先權主張之基礎的申請案，即日本專利申請案2006-224672號說明書及圖式所記載之內容亦藉由參照而全部編入本說明書中。

以下藉由實施例更加詳細說明本發明，但該等實施例並不限制本發明之範圍。

[實施例1]

於以下實施例中，作為屬於桿菌屬之細菌的例子，係使用枯草桿菌C-3102株(生命工學工業技術研究所，寄託編號FERM BP-1096，寄託日期1985年12月25日)。

向 5 kg 之市售大豆粕造粒品中添加 5 kg 之自來水，於 121°C 下進行 120 分鐘之殺菌，接種預先培養之枯草桿菌 C-3102 株的培養液，再於 37°C 下培養 40 小時，藉此製造枯草桿菌 C-3102 株之大豆培養物。將如此而獲得之培養物乾燥粉碎，調配入下述表所示之其他成分，而製成 1 錠約 500 mg (包含 3×10^9 個枯草桿菌芽孢) 的錠劑。將錠劑之營養成分示於表 1-1，將組成示於表 1-2。

[表 1]

錠劑之營養成分分析值(100 g 中)

營養成分		分析值
蛋白質	g/100 g	4.1
脂質	g/100 g	1.4
灰分	g/100 g	18
碳水化合物	g/100 g	74.6
能量	Kcal/100 g	327
鈉	mg/100 g	20.2

錠劑之組成

組成	含有率(%)
粉糖	64.10%
卵殼鈣	22.00%
葡萄糖	6.00%
枯草桿菌 C-3102 株大豆培養物	5.60%
蔗糖酯	1.00%
蟲膠	0.60%
阿拉伯膠粉末	0.35%
巴西棕櫚蠟	0.35%

[實施例 2]

抑制血清三酸甘油酯上升試驗(實施人體攝食試驗)

試驗方法

將 10 名年齡 25 歲至 40 歲之健康男女(女性 5 名、男性 5 名)定為被試驗者。選定標準示於表 2。再者，投與或攝取特定藥劑或特定保健用食品者除外。

[表 2]

將滿足以下基準，且不違背除外基準之 10 名(男性 5 名、女性 5 名)定為試驗對象。

選擇標準(試驗對象選擇標準)

- (1) 年齡範圍為 25~40 歲。
- (2) 無投藥治療(TG、T-cho、BS、血壓、便秘等)之疾病者。
 - a) 中性脂肪未滿 250 mg/dl。
 - b) 總膽固醇未滿 240 mg/dl。
 - c) 空腹時之血糖未滿 126 mg/dl。
 - d) GOT(glutamic oxaloacetic transaminase, 麩胺酸草酸轉胺酶)未滿 50 IU/l、GPT(glutamic pyruvic transaminase, 麩胺酸丙酮酸轉胺酶)未滿 50 IU/l、 γ -GTP(γ -glutamyl transpeptidase, γ -丙麩胺轉肽酶)未滿 100 IU/l。
 - e) 收縮期血壓未滿 140 mmHg 且擴張期血壓未滿 90 mm Hg。
- (3) 進餐/運動量變化較小。
- (4) 於醫療機構接受定期健康診查。
- (5) 對被試驗食品(納豆菌)之攝取不表現出過敏反應。
- (6) 可限制飲酒量(1 日相當於啤酒 500 ml 量以下)。
- (7) 試驗期間，可固定維持日常生活習慣。
- (8) 試驗期間，可記錄「生活日誌(攝取、運動、進餐、健康狀態)記錄」。
- (9) 試驗開始前，同意參加試驗，於同意書上簽字蓋章或簽名及記錄下日期。

被試驗者盡可能於早飯後經口攝取 1 日 1 次 1 錠 500 mg(含有 3×10^9 個芽孢之枯草桿菌 C-3102 株大豆培養物的錠劑)且持續 4 週。於攝食開始前、攝食 1 週後、2 週後、3 週後、4 週後、空腹時(前一日晚 9 時以後禁食，上午之採血時間為固定時間)採集血液，測定血清三酸甘油酯值。試驗時間示於表 3。

[表 3]

試驗時間表(檢查項目/時間)

檢查項目/時間(週)	攝取期間(4週)				
	開始時	1週	2週	3週	4週
	9月22日 左右	9月29日 左右	10月6日 左右	10月13 日左右	10月20 日左右
[體格指數+循環系統器官檢查]					
身高(初診時)、體重、体脂肪率(BI 法)、血壓、脈搏、體溫	○	○	○	○	○
[血液生化學檢查(1)]					
TG、T-cho、AG比、總膽紅素量、 空腹時之血糖、GOT、GPT、AL- P、 γ -GTP、澱粉酶、LDL-cho、 HDL-cho、LDH、總蛋白量、白蛋 白、UA、BUN、肌酸酐、ZTT、 Na、CL、K、Ca、離子鈣、P、 Mg、Fe	○	○	○	○	○
[血液生化學檢查(2)]					
PT(凝血酶原)、HP(肝促凝血酶)、 HbA1c、TT(血栓試驗)、血纖維蛋白 原、APTT(部分凝血活酶時間)、維 生素K檢查	○	○	○	○	○
[血液常規檢查]					
WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、 MCH、MCHC、血小板	○	○	○	○	○
[尿液常規檢查]					
糖、蛋白、尿膽素原、沈積(於蛋白 為陽性之時實施)	○	○	○	○	○
[問診：診查]					
確認自知症狀、確認有害現象、確 認生活日誌及指導	○	○	○	○	○

將上述試驗結果示於圖 2。血清三酸甘油酯之變化為：
於攝取開始時為 103.6 ± 42.82 mg/dl、攝取 1 週後為
 69.8 ± 32.00 mg/dl、攝取 2 週後為 63.0 ± 24.58 mg/dl、攝取 3
週後為 77.0 ± 35.63 mg/dl、攝取 4 週後為 71.8 ± 37.26 mg/dl。
由攝取期間之平行測定單因子變異數分析之結果中可見有
意義之差異 ($p < 0.01$)。由多重比較 (Tukey-Kramer 審定) 之結

果可確認：攝取開始時與攝取1週後之間($p < 0.05$)、攝取開始時與攝取2週後之間($p < 0.05$)、攝取開始時與攝取4週後之間($p < 0.05$)存在有意義之差異。根據以上結果可明確：枯草桿菌C-3102株大豆培養物具有降低血清三酸甘油酯之作用。

[產業上之可利用性]

本發明之脂質代謝改善劑可藉由為人體所攝取而降低血清三酸甘油酯濃度，可用作動脈硬化症之預防·改善劑。

【圖式簡單說明】

圖1A)、B)係表示枯草桿菌C-3102株基因組DNA之限制酶NotI或SfiI消化圖。

圖2係表示攝取本發明之脂質代謝改善劑的被試驗者之血清三酸甘油酯濃度之變化情況。

序列表

<110>	日商可爾必思股份有限公司	
<120>	脂質代謝改善劑	
<130>	PCP-9006WO	
<140>	096130744	
<141>	2007-08-20	
<150>	JP2006-224672	
<151>	2006-08-21	
<160>	2	
<170>	PatentIn 3.1版	
<210>	1	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	枯草桿菌	
<400>	1	
	gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa	30
<210>	2	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	枯草桿菌	
<400>	2	
<	ggatcccacg ttgtgattaa aagcagcgat	30

五、中文發明摘要：

本發明之目的在於提供一種無副作用且易於繼續攝取，且具有降低血清三酸甘油酯作用的藥劑及食品。本發明係揭示以屬於桿菌屬之細菌之培養物作為有效成分之脂質代謝改善劑及血清三酸甘油酯值降低劑。屬於桿菌屬之細菌較好的是枯草桿菌，更好的是枯草桿菌 C-3102 (FERM BP-1096)。本發明之脂質代謝改善劑及血清三酸甘油酯值降低劑對動脈硬化症等疾病之治療及預防有效。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種脂質代謝改善劑，其係以屬於桿菌屬之細菌培養物作為有效成分。
2. 如請求項1之脂質代謝改善劑，其中屬於桿菌屬之細菌係枯草桿菌。
3. 如請求項1或2之脂質代謝改善劑，其中屬於桿菌屬之細菌係枯草桿菌C-3102(FERM BP-1096)。
4. 一種血清三酸甘油酯值降低劑，其係以屬於桿菌屬之細菌的培養物作為有效成分。
5. 如請求項4之血清三酸甘油酯值降低劑，其中屬於桿菌屬之細菌係枯草桿菌。
6. 如請求項4或5之血清三酸甘油酯值降低劑，其中屬於桿菌屬之細菌係枯草桿菌C-3102(FERM BP-1096)。
7. 一種脂質代謝改善劑，其係以屬於桿菌屬之細菌作為有效成分。
8. 一種脂質代謝改善劑，其係以屬於枯草桿菌之細菌作為有效成分。
9. 一種脂質代謝改善劑，其係以枯草桿菌C-3102(FERM BP-1096)作為有效成分。
10. 一種血清三酸甘油酯值降低劑，其係以屬於桿菌屬之細菌作為有效成分。
11. 一種血清三酸甘油酯值降低劑，其係以屬於枯草桿菌之細菌作為有效成分。
12. 一種血清三酸甘油酯值降低劑，其係以枯草桿菌C-3102(FERM BP-1096)作為有效成分。

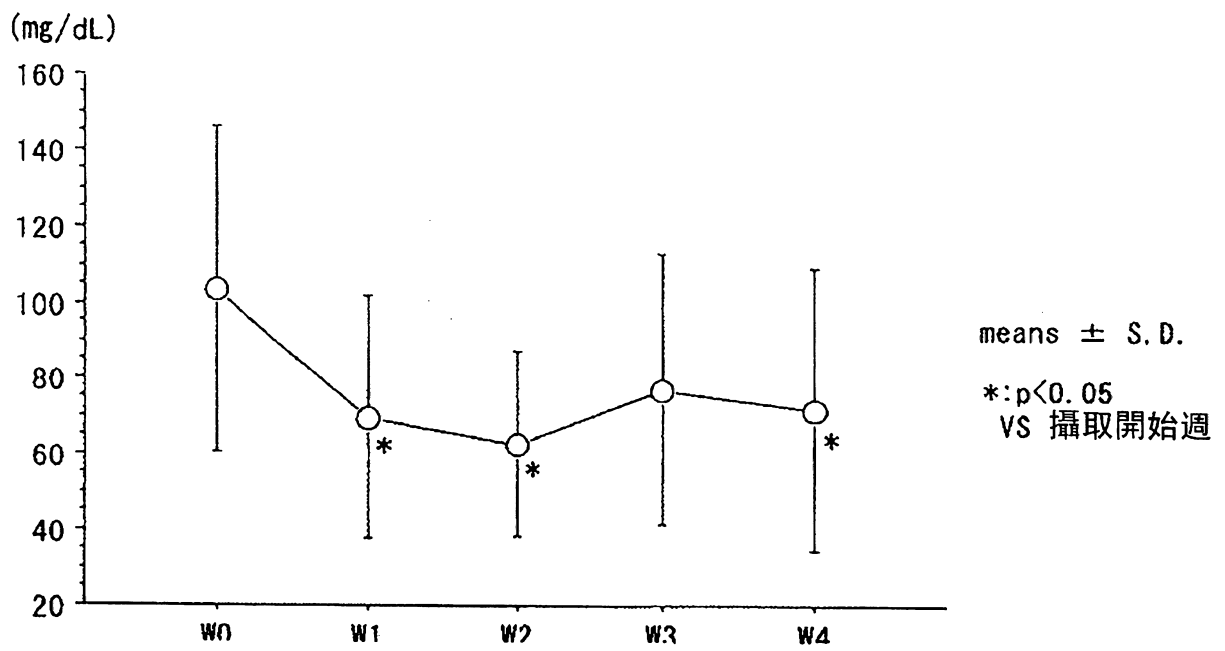


圖2

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (2) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)