



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201225962 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：100133446

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K36/00 (2006.01)

A61Q11/00 (2006.01)

A61K131/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/21 日本

2010-211023

(71)申請人：樂天股份有限公司 (日本) LOTTE CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：津金貴則 TSUGANE, TAKANORI (JP)；佐伯洋二 SAEKI, YOJI (JP)

(74)代理人：林志剛

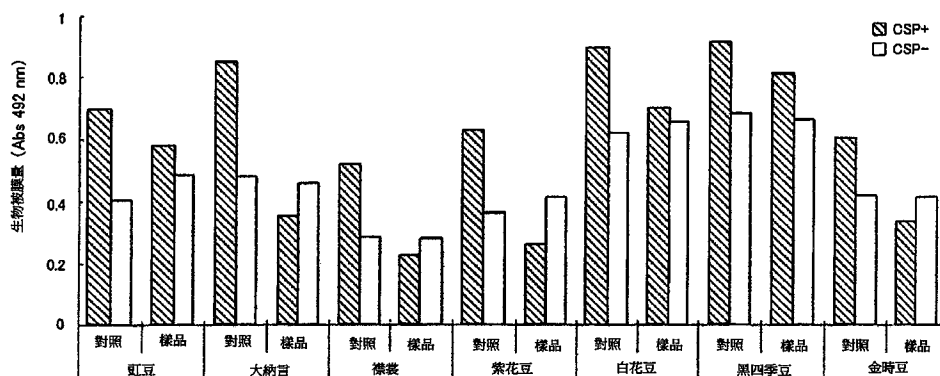
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：2 共 19 頁

(54)名稱

口腔用組成物

(57)摘要

傳統上使用某種抗菌劑、酵素抑制劑或抗生物之齲齒抑制法，因為口腔生物被膜之菌體外多糖阻礙抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等之滲透，難以顯示目標之抑制齲齒的效果。並且，因為使用抗菌劑等，出現抗藥耐性菌的危險性高，所以並不適宜。因此，期望有並非進行控制齲齒原因菌，而是開發藉由進行控制由齲齒原因菌形成的生物被膜，而更安全且效果高之齲齒抑制方法。本發明係藉由控制聚量感應(quorum sensing)之組成物而可抑制齲齒生物被膜形成。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201225962 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：100133446

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl.：

A61K36/00 (2006.01)

A61Q11/00 (2006.01)

A61K131/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/21

日本

2010-211023

(71)申請人：樂天股份有限公司 (日本) LOTTE CO., LTD. (JP)

日本

(72)發明人：津金貴則 TSUGANE, TAKANORI (JP)；佐伯洋二 SAEKI, YOJI (JP)

(74)代理人：林志剛

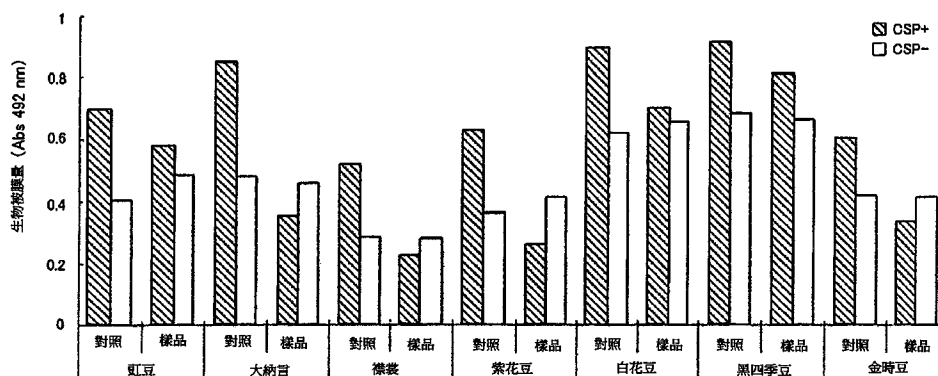
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：7 項 圖式數：2 共 19 頁

(54)名稱

口腔用組成物

(57)摘要

傳統上使用某種抗菌劑、酵素抑制劑或抗生物之齲齒抑制法，因為口腔生物被膜之菌體外多糖阻礙抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等之滲透，難以顯示目標之抑制齲齒的效果。並且，因為使用抗菌劑等，出現抗藥耐性菌的危險性高，所以並不適宜。因此，期望有並非進行控制齲齒原因菌，而是開發藉由進行控制由齲齒原因菌形成的生物被膜，而更安全且效果高之齲齒抑制方法。本發明係藉由控制聚量感應(quorum sensing)之組成物而可抑制齲齒生物被膜形成。



六、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於有效的預防齲齒之抑制生物被膜形成之口腔用組成物，尤其係關於藉由利用口腔微生物之聚量感應，使用新穎的抑制生物被膜形成的方法之口腔用組成物。

【先前技術】

物體表面附著的微生物並非單獨存在，而是於具有特徵的結構中與其他微生物形成生物被膜。此生物被膜係見於固定化微生物的利用，對人類有益的運作，另一方面，相反地亦顯示成為引起齲齒或食品污染的原因，近年來研究盛行。

口腔生物被膜係由 700 種類以上的細菌所構成，1mg 中存在 10^8 個以上的菌。其中佔有多數(20%~40%)之 Streptococci 係基於藉由口腔表面之動態的細菌間活性物質之細菌間交流，形成生物被膜。其中 Streptococcus mutans(S. mutans)產生具有黏著性之菌體外多糖，扮演形成具有病原性生物被膜的中心角色。已知口腔生物被膜成為齲齒或牙周病原因，掌握此等疾病係以 S. mutans 為首之細菌之微生物感染症。

傳統的齲齒預防係藉由殺死 S. mutans，或抑制葡萄糖基轉移酶(glucosyltransferase)等酵素，防止牙斑的形成以抑制齲齒的想法為主流。然而，因為實際的齲齒病灶係藉

由覆蓋生物被膜表層之菌體外多糖妨礙抗生素、抑制酵素物質或抗生素等之滲透，多不能得到預期的效果。甚至使用抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等常伴隨著抗藥耐性菌出現的危險性。另外，雖有藉由刷牙或洗牙等機械性去除以抑制生物被膜的方法，但對於難以如此機械性地控制口腔生物被膜之需介護高齡者等，現在的方法難以正確地實踐口腔護理。

就此等觀點，期望開發與至今不同的發想以去除生物被膜、預防齲齒的方法。另外，對於控制口腔生物被膜，因為期望日常習慣地繼續實施，所以利用口香糖等食品及牙膏等口腔組成物係有效的。

作為候補的新的口腔生物被膜去除法，可舉例如抑制聚量感應。近年來，顯示細菌相互間訊號傳遞系統之分子機制之聚量感應(QS;細菌密度依賴性基因發生抑制系統)係作用於 *S. mutans* 之形成生物薄膜或發生病原性、或 *S. mutans* 之 QS 係由感受刺激多肽(CSP, Competence stimulating peptide)所控制。現在，以此 QS 為標的，控制生物薄膜形成或病原性發現之研究，期待與以口腔疾病為首之開發微生物感染病之預防方法相連繫，嘗試各種研究，但尚未達成實用化。

例如非專利文獻 1 揭示稱為 *S.salivarius* 的菌阻礙 *S. mutans* 形成生物薄膜之要旨、及特定基因表現(gene expression)而可控制 CSP 要旨。但是，導入微生物於口腔內有安全性的問題，並且控制基因發表大多伴隨困難。因

此，期望開發安全性更高，而且簡便的生物被膜形成阻礙方法。

[先前技術文獻]

[非專利文獻 1] Oral Microbiology And Immunology,
2009 24(2):pp152-61

【發明內容】

發明之揭示

發明所欲解決之課題

傳統以來使用某種抗菌劑、酵素抑制劑或抗生物之齲齒抑制法，因為口腔生物被膜之菌體外多糖阻礙抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等之滲透，難以顯示目標之抑制齲齒的效果。並且，因為使用抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等，出現抗藥耐性菌的危險性高，所以並不適宜。因此，本發明並非進行控制齲齒原因菌，而是以提供進行控制由齲齒原因菌形成的生物被膜，而更安全且效果高之齲齒抑制用之口腔用組成物為目的。

課題之解決手段

本發明者等努力研究的結果，發現藉由控制聚量感應之組成物而可抑制生物被膜形成，因而完成本發明。

發明之功效

藉由本發明之口腔用組成物，抑制齲齒原因菌形成生

物被膜。此等口腔用組成物係可添加於飲食品、醫藥品、潔牙劑等，安全地使用於齲齒預防治療用。

用以實施發明之最佳型態

依據非專利文獻 1 所記載之傳統的研究，可知 *S. mutans* 之聚量感應(QS)係由特定的微生物或基因表現所控制。然而，就摻合於口香糖等食品及潔牙劑等之口腔用組成物，進行日常習慣地控制齲齒生物被膜之觀點，於安全或簡便性方面有許多應解決的問題，此等中任一種 QS 控制方法皆尚未達成實用化。

針對於此，本發明者等努力研究的結果，發現 *S. mutans* 之聚量感應為日常中可安全攝取的特定物質所控制，因此，實現藉由控制聚量感應以抑制齲齒生物被膜的形成。

亦即，本發明係以藉由含豆類萃取物之口腔用組成物抑制聚量感應關連之齲齒生物被膜形成為特徵。

依據有關本發明的口腔用組成物，因 CSP 依賴性之 *S. mutans* 之生物被膜形成被抑制，所以病原性細菌不能附著於口腔內。因此，不藉由刷牙或洗牙等機械方法而可抑制生物被膜形成。

另外，亦不發生如傳統之使用抗菌劑、酵素抑制劑或抗生素等之齲齒抑制法，口腔生物被膜之菌體外多糖阻礙抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等之滲透而難以出現抑制齲齒的效果之問題。

進而，因為不使用抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等而可抑制齲齒，所以可抑制對抗菌物質或抗生素之抗藥耐性菌出現的可能性。

本發明中使用的豆類種類雖無特別的限制，但以使用至少 1 種以上的豆類選自豇豆、小紅豆、紫花豆、白花豆、黑四季豆、金時豆所萃取之萃取物為宜。

對於本發明之得到有效成份之豆類萃取物之方法，雖無特別限定，但藉由將前述豆類的種子或果實(豆)，以適當的粉碎方法粉碎，溶劑萃取等之方法，調製萃取物。作為萃取溶劑，可使用水及甲醇、乙醇、正丙醇及正丁醇等之低級醇、醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甘油、丙二醇等之有機溶劑中之 1 種或混合 2 種以上，但以使用熱水或親水性有機溶劑為宜。另外，若考慮本發明之萃取物多作為飲食品使用時，作為萃取溶劑，就安全性上，以組合水及乙醇使用為宜。以 90% 以下之乙醇萃取為宜，以 60% 以下之乙醇萃取尤佳，以 30% 以下之乙醇萃取更好，以熱水萃取最好。

作為萃取條件，雖可以高溫、室溫、低溫中任一種溫度進行萃取，但以 50~90℃，萃取 1~5 小時程度為宜。所得萃取物亦可過濾，餾去萃取溶劑後，於減壓下濃縮或冷凍乾燥。並且，亦可使用將此等萃取物藉由有機溶劑、色譜法等分離精製者。

另外，因為本發明之口腔用組成物安全性高，所以可摻合於例如漱口藥、牙膏、消臭噴劑等之口腔用組成物、

或口香糖、硬糖、錠果、軟糖、巧克力、餅乾、零食等點心、冰淇淋、冰沙、冰果等之冷果、飲料、麵包、熱餅、乳製品、火腿、香腸等之畜肉製品類、魚板、竹輪等之魚肉製品、熟食類、布丁、湯以及果醬等之飲食品，可日常上使用。

作為該摻含量，雖可依各種製造條件而改變，但相對於口腔用組成物，以摻合豆類萃取物為 0.01 重量%以上，2.0 重量%以下，進而以 0.01 重量%以上，1.0 重量%以下為宜。

因為本發明係使用傳統以來食用物之萃取物，所以即使口腔內或體內攝取，對於其安全性沒有問題。另外，使口香糖等之食品或牙膏等含有而可簡便地攝取，因為無須如調製基因表現之複雜步驟，所以可於日常上持續而控制生物被膜。

【實施方式】

實施例

以下係使用實施例說明關於本發明，但本發明之範圍並不受此等實施例任何限制。

[實施例 1]

1、調製萃取物

使用豇豆、小紅豆(大納言)、小紅豆(襟裳小紅豆)、紫花豆、白花豆、黑四季豆、金時豆 7 種作為植物樣品。

各植物樣品係購買市售品，以粉碎機細細粉碎 20g 後，以 200ml 水，70℃，萃取 2 小時。所得之萃取液係以 3000rpm，離心 10 分鐘，將上清液過濾後，冷凍乾燥物作為各植物熱水萃取物，供予實驗。

2、評估抑制生物薄膜形成之活性

2-1、形成生物薄膜

將 159 株 *S. mutans* UA，於 5ml 之 Brain Heart Infusion(BHI)液體培養基，於 37℃ 下嫌氣培養 10 小時，以 3000rpm，離心 10 分鐘，將所收集細菌，藉由磷酸緩衝生理食鹽水(PBS)，調製成 $OD_{550nm} = 0.5$ ，將此作為試驗菌懸濁液。

生物被膜形成係使用 96 孔微孔細胞培養盤，進行試驗。各孔中，添加 60 μ l 之植物熱水萃取物、20 μ l 之 CSP、20 μ l 之 *S. mutans* 試驗菌懸濁液、100 μ l 之添加 0.1%蔗糖之 Todd Hewitt Broth，於 37℃、5%CO₂ 之條件下，進行培養 16 小時，形成 CSP 衍生組之生物被膜。CSP 濃度係最終濃度為 1 μ M，各樣品之熱水萃取物之濃度係最終濃度為 1mg/ml。

比較用係不添加 CSP，除此以外與前述相同條件進行培養，形成 CSP 非衍生組之生物被膜。

進而，作為對照組，對於各 CSP 衍生組及 CSP 非衍生組，不添加樣品之熱水萃取物，除此以外與前述相同條件進行培養。

2-2、定量生物被膜

對於各 CSP 衍生組及 CSP 非衍生組，去除培養後之上清液，以 PBS 進行清洗各孔 2 次。洗淨後，於各孔中添加 0.25% 之藏紅溶液，靜置 15 分鐘後，去除多餘的藏紅溶液，以 PBS 進行清洗各孔 2 次。洗淨後於各孔添加乙醇，振盪 30 分鐘使溶出使染色的藏紅，使用微量盤式分析儀測定 492nm 的吸光度，定量生物被膜形成量。

該結果如圖 1 及圖 2 所示。

圖 1 係表示對於各 CSP 衍生組及 CSP 非衍生組之加入植物萃取物進行培養組(樣品組)及對照組之生物被膜形成量。另外，圖 2 係表示對於各 CSP 衍生組及 CSP 非衍生組之以對照組之生物被膜形成量為 100 時之樣品組之生物被膜形成量之比例。

依據圖 1，對照組中 CSP 衍生組亦比 CSP 非衍生組之生物被膜形成量增加。認為此增加部份係藉由以 CSP 為自誘導物(autoinducer)之聚量感應之生物被膜增加部份。

另外，樣品組中，CSP 衍生物(黑棒)的生物被膜形成量係比對照組少，但 CSP 非衍生物(白棒)的生物被膜形成量則與對照組無改變。此事亦可由圖 2 顯示，CSP 衍生物(黑棒)中樣品組之生物被膜形成量比對照組少(未滿 100%)，但 CSP 非衍生物(白棒)中樣品組之生物被膜形成量則與對照組無改變(約 100%)。由此認為，藉由樣品組所添加的植物萃取物，控制以 CSP 為自誘導物之 *S. mutans* 聚量感應，生物被膜形成量未增加。

另外，於圖 1 中，CSP 衍生組係添加大納言小紅豆、襟裳小紅豆、紫花豆、金時豆之熱水萃取物，進行培養時(樣品組之 CSP+)，比 CSP 及植物萃取物皆未添加組(對照組之 CSP-)的生物被膜形成量減少。

進而，使用實施例 1 調製的小紅豆萃取物，以常法調製口香糖、硬糖、牙膏。以下係表示該配方。另外，本發明品之範圍並不受此等任何限制。

[實施例 2]

依據下述配方調製口香糖。

膠基材	20.0 重量 %
砂糖	55.0
葡萄糖	15.0
水飴	9.0
香料	0.5
襟裳小紅豆熱水萃取物(實施例 1)	0.5
	100.0

[實施例 3]

依據下述配方調製硬糖。

砂糖	50.0 重量 %
水飴	34.0
香料	0.5
大納言小紅豆熱水萃取物(實施例 1)	0.5
水	剩餘量
	100.0

[實施例 4]

依據下述配方調製牙膏。

碳酸鈣	50.0 重量 %
甘油	20.0
羧甲基纖維素	2.0
月桂基硫酸鈉	2.0
香料	1.0
糖精	0.1
襟裳小紅豆熱水萃取物(實施例 1)	1.0
雙氯苯雙胍己烷(Chlorhexidine)	0.01
水	剩餘量
	100.0

【圖式簡單說明】

[圖 1]實施例 1 中各對照組與樣品組之 CSP 衍生組與 CSP 非衍生組之生物被膜形成量表示圖。

[圖 2]實施例 1 中各 CSP 衍生組與 CSP 非衍生組，添加植物萃取物時之生物被膜形成量變化比例表示圖。

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：100133446

※申請日：100 年 09 月 16 日

※IPC 分類：

A61K 36/00

(2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

A61Q 11/00 (2006.01)

A61K 131/00 (2006.01)

口腔用組成物

二、中文發明摘要：

傳統上使用某種抗菌劑、酵素抑制劑或抗生物之齲齒抑制法，因為口腔生物被膜之菌體外多糖阻礙抗菌劑、酵素抑制劑、抗生素等之滲透，難以顯示目標之抑制齲齒的效果。並且，因為使用抗菌劑等，出現抗藥耐性菌的危險性高，所以並不適宜。因此，期望有並非進行控制齲齒原因菌，而是開發藉由進行控制由齲齒原因菌形成的生物被膜，而更安全且效果高之齲齒抑制方法。本發明係藉由控制聚量感應(quorum sensing)之組成物而可抑制齲齒生物被膜形成。

三、英文發明摘要：

七、申請專利範圍

1. 一種用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其特徵為摻合有控制藉由 CSP(感受刺激多肽，Competence stimulating peptide)所控制之 *Streptococcus mutans* 之聚量感應之物質。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其中控制聚量感應之物質為豆類萃取物。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其中豆類萃取物係至少 1 種以上選自小紅豆、豇豆、白花豆、紫花豆、黑四季豆、金時豆之豆類萃取物。

4. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其中豆類萃取物係至少 1 種以上選自大納言小紅豆、襟裳小紅豆、紫花豆、金時豆之豆類萃取物。

5. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其係未添加抗菌劑、酵素抑制劑及抗生素。

6. 如申請專利範圍第 3 項之用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其係未添加抗菌劑、酵素抑制劑及抗生素。

7. 如申請專利範圍第 4 項之用以抑制生物被膜形成之口腔用組成物，其係未添加抗菌劑、酵素抑制劑及抗生素。

圖1

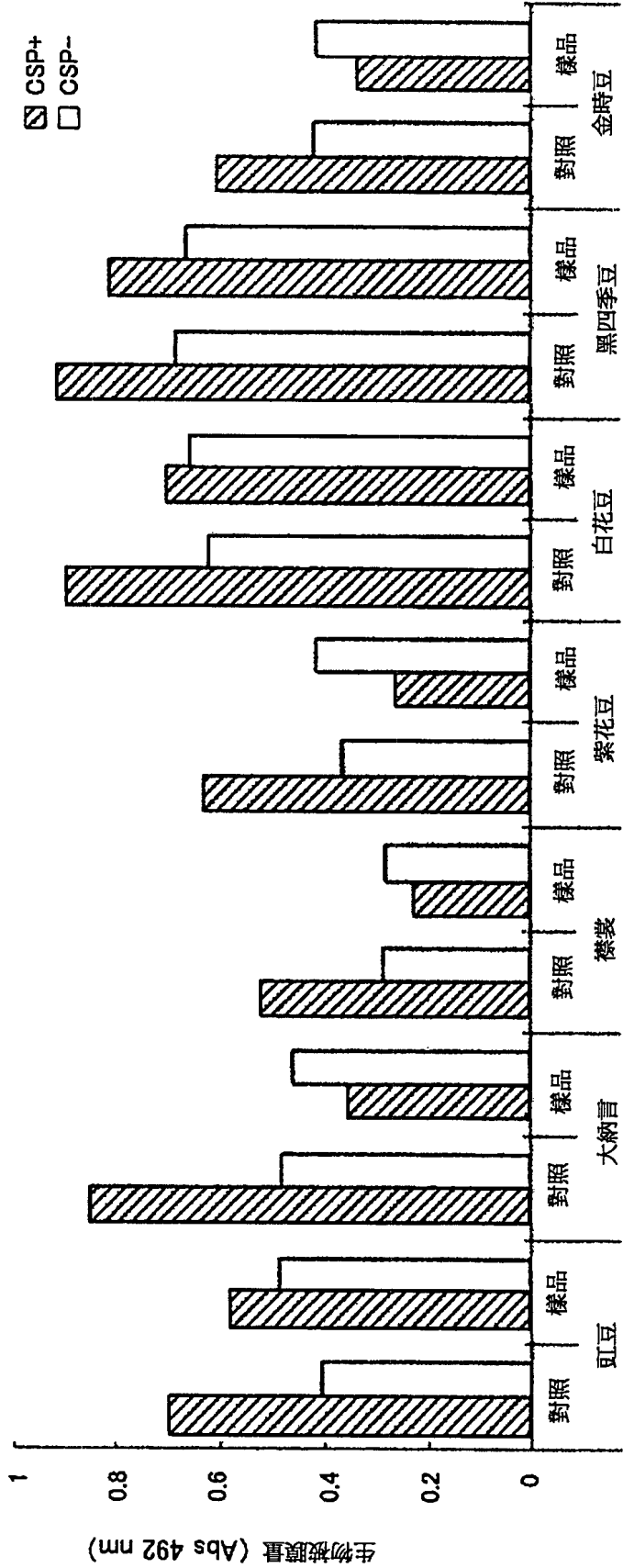
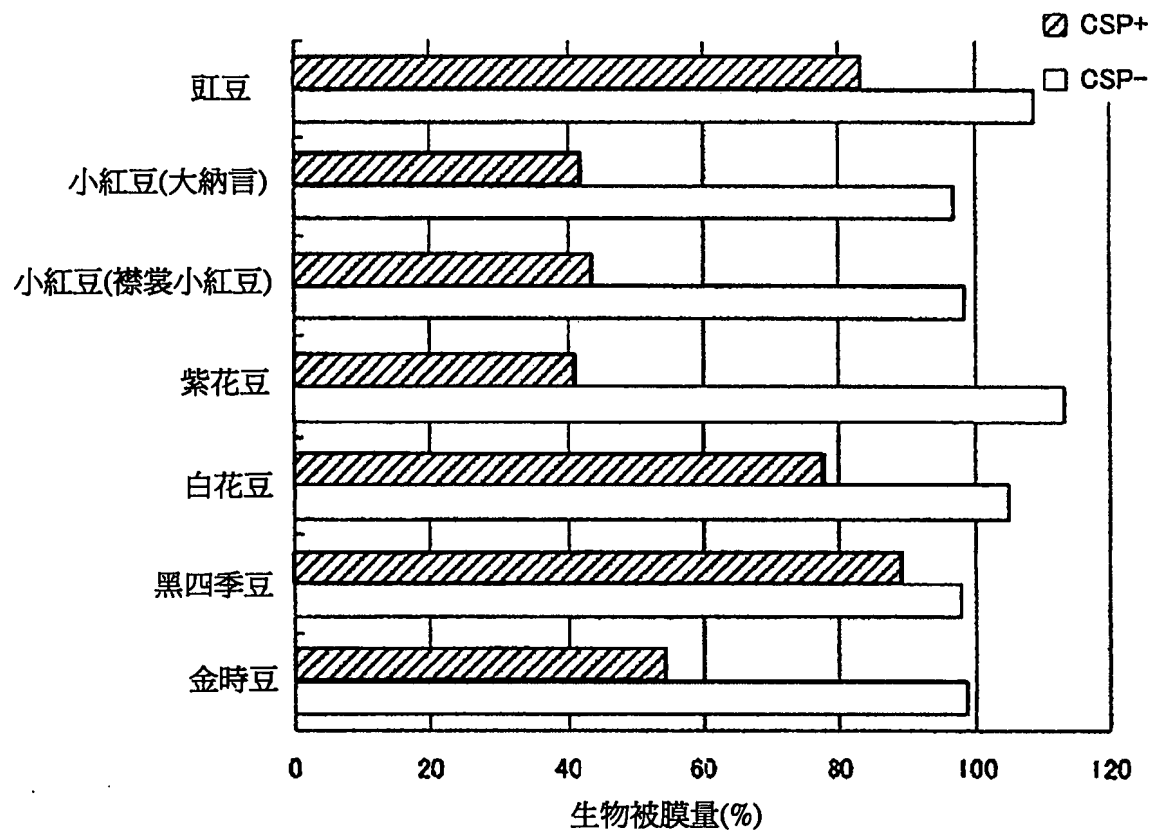


圖2



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1)圖。

(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