



(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 I565471 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 11 日

(21)申請案號：100100518

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 06 日

(51)Int. Cl. : A61K35/74 (2015.01)

A61K8/99 (2006.01)

A61P17/18 (2006.01)

A61Q19/08 (2006.01)

(30)優先權：2010/01/06 日本

2010-001550

2010/01/06 日本

2010-001576

(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：杉本沙穗 SUGIMOTO, SAHO (JP)；曾根俊郎 SONE, TOSHIRO (JP)；千葉勝由
CHIBA, KATSUYOSHI (JP)

(74)代理人：陳長文

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所 BCRC 910510 2011 年 03 月 18 日

食品工業發展研究所 BCRC 910511 2011 年 03 月 18 日

(56)參考文獻：

CN 1635897A JP 2006-76926A

US 2004/0013706A1 WO 2006/104730A1

Nutrition and Cancer, Volume 26, Issue 3, pages 365-380, 04 Aug
2009

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：3 項 圖式數：4 共 27 頁

(54)名稱

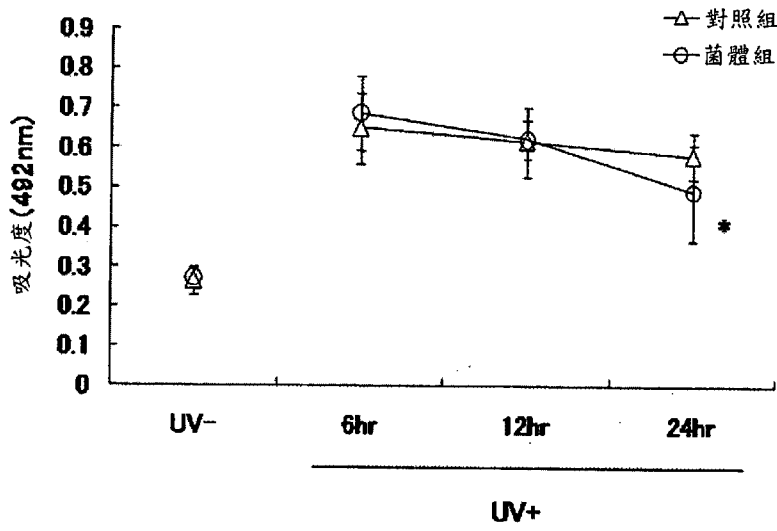
經口用之 DNA 損傷修復促進劑及彈性蛋白酶活性抑制劑

(57)摘要

本發明提供一種經口用 DNA 損傷修復促進劑及經口用彈性蛋白酶活性抑制劑。本發明之經口用 DNA 損傷修復促進劑及經口用彈性蛋白酶活性抑制劑含有雙叉桿菌屬細菌作為有效成分。

指定代表圖：

符號簡單說明：
(無元件符號說明)



* : p<0.05 (vs各時間之對照組)

圖1

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：100100518

※申請日：100.1.6

※IPC 分類：A61K 35/74 (2012.01)
A61K 8/99 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經口用之DNA損傷修復促進劑及彈性蛋白酶活性抑制劑

A61P 17/18 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明提供一種經口用DNA損傷修復促進劑及經口用彈性蛋白酶活性抑制劑。本發明之經口用DNA損傷修復促進劑及經口用彈性蛋白酶活性抑制劑含有雙叉桿菌屬細菌作為有效成分。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

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】

本發明係關於一種經口用之DNA損傷修復促進劑及彈性蛋白酶活性抑制劑。

【先前技術】

DNA(deoxyribonucleic acid, 去氧核糖核酸)之損傷係由各種外在或內在原因所引起, 每天不斷地發生。但是, 若對DNA損傷置之不理, 則不僅會阻礙複製或轉錄等重要之功能, 而且會引起突變, 由此有可能導致癌症或老化等。

因此, 有機體藉由對應於DNA損傷之種類之各種修復機制廣泛地修復DNA之損傷, 維持基因組資訊及其功能。作為該修復機制之代表例, 有: 針對於DNA之雙鏈切斷的同源重組修復機制, 針對於由活性氧種引起之氧化性鹼基損傷的鹼基去除修復機制, 針對於因紫外線而生成之嘧啶二聚物的核苷酸去除修復機制, 針對於複製錯誤的失配修復機制等。

但是, 由於某種原因, 存在修復機制異常或功能下降, 或者產生超過修復能力之損傷之情形。此時, 細胞產生細胞凋亡而容易死亡, 並且會誘發突變, 促進長期的癌化或老化等之過程。

針對於此, 業界正在開發可減輕損傷原因之材料。具體而言, 關於由致癌性物質所引起的大腸・肝臟中之DNA損傷抑制, 報告有: 加氏乳酸桿菌(*Lactobacillus gasseri*) (P79)、融合乳酸桿菌(*Lactobacillus confusus*)

(DSM20196)、嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*) (NCIM50083)、短型雙叉桿菌 (*Bifidobacterium breve*) 或龍根雙叉桿菌 (*Bifidobacterium longum*) 可抑制大腸內因 N-甲基-N'-硝基-N-亞硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 引起之 DNA 損傷 (非專利文獻 1)；利用動物雙叉桿菌 (*Bifidobacterium animalis*) DN-173 010 或嗜熱鏈球菌 DN-001 158 醱酵的牛乳可抑制大腸內由雜環芳香族胺引起之 DNA 損傷 (非專利文獻 2)；以及保加利亞乳酸桿菌 (*Lactobacillus bulgaricus*) 291、嗜熱鏈球菌 F4、嗜熱鏈球菌 V3 或龍根雙叉桿菌 BB536 可抑制大腸或肝臟內由雜環芳香族胺引起之 DNA 損傷 (非專利文獻 3)。

但是，DNA 損傷抑制與 DNA 損傷修復並不同，如上所述的由致癌性物質引起之 DNA 損傷之抑制係藉由使經口攝取之細菌吸附於消化道之表面，或者使致癌性物質吸附於細菌菌體上並排出，而抑制經口投予之各種致癌性物質接觸有機體或由有機體吸收，因此一般認為其並無法促進 DNA 損傷修復。

另一方面，由紫外線引起之 DNA 損傷係由於因紫外線曝露而於皮膚細胞中形成環丁烷嘧啶二聚物或 6-4 型光照產物等而產生，伴隨近年來因臭氧層破壞所致的紫外線量增加之影響，業界不斷地就預防、抑制該 DNA 損傷進行開發。

作為該 DNA 損傷之預防方法，已知有利用防曬劑等吸收或散射紫外線之方法，但是該方法僅可減輕由紫外線引起

之皮膚病，於因紫外線曝露而DNA損傷之情形時，則無法促進修復該損傷。另外，作為抑制由紫外線曝露引起之DNA損傷之化妝組合物，已知有下述用以對抗UV照射誘發性之皮膚損傷的局部適用之化妝組合物，其包括包含雙叉桿菌屬細菌之滅活培養物的第一成分，及包含糖蛋白、碳水化合物聚合物及阿拉伯半乳糖蛋白質的作為植物細胞外基質之萃取出之第二成分(專利文獻1)。

但是，紫外線曝露不僅會造成DNA損傷，亦會引起皺紋形成或彈性降低等皮膚之光老化。該光老化現象之機制並未完全瞭解清楚，但一般認為真皮細胞外基質成分之變化係重要因素之一。該真皮細胞外基質成分有膠原蛋白、彈性蛋白、葡糖胺聚醣等，其中彈性蛋白為彈性纖維之主要蛋白質。

另外，據報告，曝露於紫外線之皮膚中，作為彈性蛋白分解酶之嗜中性細胞彈性蛋白酶或纖維芽細胞彈性蛋白酶的活性亢進，認為由該等彈性蛋白酶所引起的彈性蛋白之量及質的變化，助長了皺紋形成及彈性降低。

針對於此，提出有以防止、改善皮膚老化為目的之各種彈性蛋白酶活性抑制劑，例如已知有以美容效果為目的之含有紫蘇葉之醱酵物(專利文獻2)、香芹之醱酵物(專利文獻3)或甜椒之醱酵物(專利文獻4)的彈性蛋白酶活性抑制劑。

但是，上述醱酵物對彈性蛋白酶活性之抑制係藉由將試驗物質添加於來自於人嗜中性細胞之彈性蛋白酶或來自於

豬胰腺之彈性蛋白酶的溶液中所進行的有機體外(in vitro)試驗評價得知，而並非在有機體內(in vivo)試驗中確認到對彈性蛋白酶活性之抑制。為使實際塗抹於皮膚上之物質發揮彈性蛋白酶活性抑制作用，必需使有效成分透過角質層及表皮而到達真皮層，因此期待開發出有機體內之該抑制作用得到確認的彈性蛋白酶活性抑制劑。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

[專利文獻1]日本專利特開2002-255777號公報

[專利文獻2]日本專利特開2006-61091號公報

[專利文獻3]日本專利特開2006-75085號公報

[專利文獻4]日本專利特開2006-76926號公報

[非專利文獻]

[非專利文獻1]Pool-Zobel BL. et al., Nutr Cancer, 26, 365-80, 1996

[非專利文獻2]Tavan E. et al., Carcinogenesis., 23, 477-83, 2002

[非專利文獻3]Zsivkovits M. et al., Carcinogenesis., 24, 1913-1918, 2003

【發明內容】

[發明所欲解決之問題]

但是，迄今為止尚無人知曉藉由經口投予雙叉桿菌屬細菌，可促進DNA損傷之修復或可抑制彈性蛋白酶活性。

本發明之課題在於提供一種經口用DNA損傷修復促進劑

及經口用彈性蛋白酶活性抑制劑。

[解決問題之技術手段]

本發明者等人關於促進DNA損傷之修復、抑制彈性蛋白酶活性進行了研究，結果意外地發現藉由經口攝取雙叉桿菌屬細菌，可促進DNA損傷之修復且可抑制彈性蛋白酶之活性。

i)亦即，本發明係提供一種經口用DNA損傷修復促進劑，其係含有雙叉桿菌屬細菌作為有效成分。

ii)另外，本發明係提供一種經口用環丁烷嘧啶二聚物量降低促進劑，其係含有雙叉桿菌屬細菌作為有效成分。

iii)進而，本發明係提供一種經口用彈性蛋白酶活性抑制劑，其係含有雙叉桿菌屬細菌作為有效成分。

iv)另外，本發明係提供一種如上述iii)之彈性蛋白酶活性抑制劑，其為皮膚老化防止・改善劑。

v)進而，本發明係提供一種DNA損傷修復促進方法，其特徵在於經口投予雙叉桿菌屬細菌。

vi)進而，本發明係提供一種環丁烷嘧啶二聚物量降低促進方法，其特徵在於經口投予雙叉桿菌屬細菌。

vii)進而，本發明係提供一種彈性蛋白酶活性抑制方法，其特徵在於經口投予雙叉桿菌屬細菌。

viii)另外，本發明係提供一種如上述vii)之方法，其為皮膚老化防止・改善方法。

ix)進而，本發明係提供一種雙叉桿菌屬細菌，其係用於藉由經口投予而促進DNA損傷之修復者。

x)進而，本發明係提供一種雙叉桿菌屬細菌，其係用於藉由經口投予而促進環丁烷嘧啶二聚物量降低者。

xi)進而，本發明係提供一種雙叉桿菌屬細菌，其係用於藉由經口投予而抑制彈性蛋白酶活性者。

xii)另外，本發明係提供一種如上述xi)之細菌，其係用於防止・改善皮膚老化者。

xiii)進而，本發明係提供一種雙叉桿菌屬細菌之用途，其係用於製造經口用DNA損傷修復促進劑。

xiv)另外，本發明係提供一種雙叉桿菌屬細菌之用途，其係用於製造經口用環丁烷嘧啶二聚物量降低促進劑。

xv)進而，本發明係提供一種雙叉桿菌屬細菌之用途，其係用於製造經口用彈性蛋白酶活性抑制劑。

xvi)進而，本發明係提供一種如上述xv)之用途，其係用於製造皮膚老化防止・改善劑。

[發明之效果]

根據本發明，可藉由經口投予而促進DNA損傷之修復。因此，本發明之經口用DNA損傷修復促進劑可用作用於促進DNA損傷之修復的醫藥品、飲食品等。

另外，根據本發明，可藉由經口投予而抑制彈性蛋白酶之活性。因此，本發明之經口用彈性蛋白酶活性抑制劑可用作用於防止・改善皮膚老化的醫藥品、飲食品等。

【實施方式】

本發明之經口用DNA損傷修復促進劑(以下，亦稱為DNA損傷修復促進劑)及經口用彈性蛋白酶活性抑制劑(以

下，亦稱為彈性蛋白酶活性抑制劑)之有效成分為雙叉桿菌屬細菌。首先就該雙叉桿菌屬細菌進行說明。

作為上述雙叉桿菌屬細菌，例如可列舉：短型雙叉桿菌(*Bifidobacterium breve*)、雙歧雙叉桿菌(*Bifidobacterium bifidum*)、龍根雙叉桿菌(*Bifidobacterium longum*)、青春雙叉桿菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、鏈狀雙叉桿菌(*Bifidobacterium catenulatum*)、假鏈狀雙叉桿菌(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、動物雙叉桿菌(*Bifidobacterium animalis*)等，可為該等菌種類之1種或2種以上。該等之中，就DNA損傷修復促進作用及彈性蛋白酶活性抑制作用之方面而言，較佳為短型雙叉桿菌。

作為上述短型雙叉桿菌，較佳為短型雙叉桿菌 YIT 4063(FERM BP-2823)、短型雙叉桿菌 YIT 4064(FERM BP-2824)、短型雙叉桿菌 YIT 4065(FERM BP-6223)、短型雙叉桿菌 YIT 12272(FERM ABP-11320)、以該等短型雙叉桿菌作為母株之子孫株。該等之中，就DNA損傷修復促進作用及彈性蛋白酶活性抑制作用之方面而言，特佳為短型雙叉桿菌 YIT 4065、短型雙叉桿菌 YIT 12272。再者，本發明中所謂之「子孫株」之概念包含自然變異株、藉由變異處理形成之變異株、藉由基因工程形成之變異株等。

另外，上述雙叉桿菌屬細菌可為細菌菌體(活菌)及該細菌菌體之處理物之任一者。該處理物只要為藉由常法之處理所得者則並無特別限定，例如可列舉：加熱菌體(死亡菌體)、其冷凍乾燥物、含有該等之培養物、藉由超音波

等而獲得之細菌粉碎液、細菌之酶處理液、藉由過濾或離心分離等固液分離方法將該等分離所得之固體殘渣等；藉由酶或機械手段去除細胞壁所得之處理液、該處理液之濃縮物、該等之稀釋物、該等之乾燥物等；利用界面活性劑等將細菌溶解後使用乙醇等使之沈澱而得的含核酸之組分；對上述藉由超音波等而獲得之細菌粉碎液或細胞之酶處理液等藉由各種層析法等進行分離等分離・純化處理所得者等。

作為上述雙叉桿菌屬細菌，較佳為細菌菌體(活菌)；加熱菌體(死亡菌體)、其冷凍乾燥物、藉由超音波等而獲得之細菌粉碎液、細菌之酶處理液。其中，就DNA損傷修復促進作用及彈性蛋白酶活性抑制作用之方面而言，特佳為細菌菌體(活菌)、上述之冷凍乾燥物。

再者，上述死亡菌體例如可藉由以下處理而獲得：加熱處理、利用抗生物質等藥物之處理、利用福馬林等化學物質之處理、利用紫外線之處理、利用 γ 射線等放射線之處理。

繼而，就本發明之「DNA損傷修復促進劑」進行詳細說明。

本發明中，所謂「促進DNA損傷修復」，係促進損傷之DNA分子修復之意。如後述之實施例所示，本發明之雙叉桿菌屬細菌可藉由經口投予而促進環丁烷嘧啶二聚物(以下亦稱為CPD)量降低，故而對DNA損傷具有優異之修復促進作用。

因此，雙叉桿菌屬細菌可用作DNA損傷修復促進劑，此外可用於製造DNA損傷修復促進劑。

另外，由於藉由促進DNA損傷之修復可預防・治療癌症及老化，故而雙叉桿菌屬細菌亦可成為癌症或老化之預防・治療劑，上述DNA損傷修復促進劑可用作用以預防・治療癌症或老化的人或動物用之醫藥品、准藥品、飲品、寵物食品等。

另外，本發明之DNA損傷修復促進劑可促進因紫外線曝露而產生之DNA損傷之修復，故而雙叉桿菌屬細菌亦可成為皮膚癌或皮膚老化之預防・治療劑。

另外，如上所述，本發明之雙叉桿菌屬細菌具有CPD量降低促進作用。因此，雙叉桿菌屬細菌可用作CPD量降低促進劑，此外可用於製造CPD量降低促進劑。

本發明之CPD量降低促進劑可使作為DNA損傷之指標的CPD量降低，故而雙叉桿菌屬細菌亦可成為癌症或老化之預防・治療劑，由於CPD係因紫外線曝露而產生者，故而本發明之CPD量降低促進劑尤其可用作皮膚癌或皮膚老化之預防・治療劑。

以下，就本發明之「彈性蛋白酶活性抑制劑」進行詳細說明。

如後述之實施例所示，本發明之雙叉桿菌屬細菌具有藉由經口投予而抑制因紫外線曝露而亢進的皮膚中之彈性蛋白酶之活性的作用。因此，雙叉桿菌屬細菌可用作彈性蛋白酶活性抑制劑，此外可用於製造彈性蛋白酶活性抑制

劑。

另外，由於抑制彈性蛋白酶活性可防止・改善皮膚老化，故而雙叉桿菌屬細菌亦可成為皮膚老化防止・改善劑，上述彈性蛋白酶活性抑制劑可用作用以防止・改善皮膚老化的人或動物用之醫藥品、准藥品、飲食品、寵物食品等。再者，所謂「防止・改善皮膚老化」，包括預防・改善皮膚之皺紋、防止鬆弛、改善彈性、抗老化。

其次，對上述DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止・改善劑之使用態樣等進行說明。

DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止・改善劑之投予形態為經口投予。該投予可於紫外線曝露前、紫外線曝露時、紫外線曝露後之任一時間進行。其中，就DNA損傷修復促進作用、彈性蛋白酶活性抑制作用及皮膚老化防止・改善作用之方面而言，較佳為至少於紫外線曝露前投予，更佳為於紫外線曝露前及紫外線曝露時投予。另外，於自紫外線曝露前開始投予之情形時，就DNA損傷修復促進作用、彈性蛋白酶活性抑制作用及皮膚老化防止・改善作用之方面而言，該曝露前之投予期間較佳為5日以上，更佳為5~10日。再者，即便10日以上地長期投予，亦可期待DNA損傷修復促進作用、彈性蛋白酶活性抑制作用及皮膚老化防止・改善作用。

作為將DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止・改善劑用作醫藥品時的經口投予製劑之劑型，例如可列舉：錠劑、膠囊劑、顆粒劑、糖衣錠、丸

劑、細粒劑、散劑、粉劑、緩釋性製劑、懸浮液、乳液劑、糖漿劑、冷凍乾燥劑、液劑、醃劑等。

另外，上述製劑可藉由常法而製造，另外亦可單獨使用雙叉桿菌屬細菌，且亦可與藥學上所容許之載體組合使用。作為該載體，例如可列舉：賦形劑、結合劑、崩解劑、界面活性劑、潤滑劑、流動性促進劑、調味劑、著色劑、香料、稀釋劑、殺菌劑、滲透壓調整劑、pH值調整劑、乳化劑、防腐劑、穩定劑、吸收助劑、抗氧化劑、紫外線吸收劑、濕潤劑、增稠劑、光澤劑、活性增強劑、抗炎劑、等張劑、鎮痛劑、矯臭劑等。

作為上述結合劑，例如可列舉：澱粉、糊精、阿拉伯膠粉末、明膠、甲基纖維素、羥丙基纖維素、結晶纖維素、乙基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙二醇等。

作為上述崩解劑，例如可列舉：羥丙基澱粉、羧甲基纖維素鈉、羧甲基纖維素鈣、羧甲基纖維素、低取代羥丙基纖維素等。

作為上述界面活性劑，例如可列舉：月桂基硫酸鈉、大豆卵磷脂、蔗糖脂肪酸酯、聚山梨醇酯80等。

作為上述潤滑劑，例如可列舉：滑石、蠟類、氫化植物油、硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸鋁、聚乙二醇等。

作為上述流動性促進劑，例如可列舉：輕質無水矽酸、乾燥氫氧化鋁凝膠、合成矽酸鋁、矽酸鎂等。

作為上述稀釋劑，例如可列舉：注射用蒸餾水、生理鹽水、葡萄糖水溶液、橄欖油、芝麻油、花生油、大豆油、

玉米油、丙二醇、聚乙二醇等。

又，本發明之DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止·改善劑不僅可用作上述之醫藥品，亦可用作飲食品、准藥品、寵物食品等。於此情形時，可將上述雙叉桿菌屬細菌直接、或加入各種營養成分而含於上述飲食品等中。該飲食品可用作對於預防·治療癌症或老化有用之保健用食品或食品材料，或者對於防止·改善皮膚老化有用之保健用食品或食品材料，於該等之飲食品等或其容器上，可附上說明其具有上述效果之顯示。

將DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止·改善劑調配於飲食品中時，可適宜使用飲食品可使用之添加劑，利用慣用之方法成形為適合食用之形態，例如顆粒狀、粒狀、錠劑、膠囊、糊狀物等，另外亦可添加於各種食品，例如火腿、香腸等肉食加工品，板蒸魚糕、圓筒狀魚糕等水產加工品，麵包、點心、奶油、乳粉、醱酵飲食品中使用，或添加於水、果汁、牛乳、清涼飲料、茶飲料等飲料中使用。該等飲食品中，較佳為含有作為有效成分之雙叉桿菌屬細菌的醱酵乳、乳酸菌飲料、醱酵豆乳、醱酵果汁、醱酵植物液等醱酵製品。

另外，該等醱酵飲食品可藉由常法而製造。例如對於醱酵乳，可在經殺菌之乳培養基中接種培養雙叉桿菌屬細菌，對其進行均質化處理而獲得醱酵乳原液。繼而添加另外製備之糖漿溶液並混合，使用均質機等使其均質化，進而添加香料，藉此可獲得最終製品。如此而獲得之醱酵乳

可製成清淡型、柔軟型、水果香料型、固體狀、液狀等的任一形態之製品。

以下，就雙叉桿菌屬細菌之投予量等進行說明。

另外，使用本發明之DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止・改善劑之有效成分即雙叉桿菌屬細菌時之投予量並無嚴格限制。由於根據使用者或應用之疾病等之各種使用態樣的不同，所獲得之效果並不同，故而較理想為適宜設定投予量，就DNA損傷修復促進作用、彈性蛋白酶活性抑制作用及皮膚老化防止・改善作用之方面而言，較佳為含有雙叉桿菌屬細菌之菌數 1×10^3 CFU以上作為1日量的量，更佳為含有 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{13}$ CFU作為1日量的量，特佳為含有 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU作為1日量的量。

再者，上述紫外線之波長並無特別限定，波長280~400 nm之紫外線造成DNA損傷之比例較高，因而容易導致皮膚癌或皮膚老化，並且會使彈性蛋白酶之活性更亢進，故而容易導致皮膚老化，因此本發明之DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止・改善劑可較佳地用作因波長280~400 nm之紫外線曝露而引起的DNA損傷之修復促進劑、彈性蛋白酶活性之亢進之抑制劑以及皮膚老化防止・改善劑。另外，紫外線量並無特別限定，於紫外線量為每1日20 mJ/cm²以上，尤其是40 mJ/cm²以上時，可較佳地應用本發明之DNA損傷修復促進劑、彈性蛋白酶活性抑制劑及皮膚老化防止・改善劑。

另外，本發明之DNA損傷修復促進劑及環丁烷嘧啶二聚物量降低促進劑係經口使用食用經驗豐富之雙叉桿菌屬細菌，故而相比先前之藉由靜脈注射等而使用的伴有嚴重副作用之癌症化學療法劑，其安全性極高，可顯著減輕對使用者之負擔。

[實施例]

以下，示出實施例而詳細說明本發明，但是本發明並不限定於該等實施例。再者，於以下之實施例中，只要無特別說明則%均表示mass/vol%。

實施例1(菌體溶液之製備)

將對Rogosa等之培養基(Eftymiou C. et al., J infect dis., 110, 258-267, 1962)加以改變所得的下述組成之培養基於121°C下加熱殺菌15分鐘。於該培養基中接種1 v/v%之短型雙叉桿菌YIT 4065株(FERM BP-6223)，於37°C下厭氧培養約20小時獲得培養液。以3500×G對該培養液進行離心分離，收集雙叉桿菌屬細菌之菌體。以成為 1.0×10^{10} CFU/mL之方式使該菌體懸浮於生理鹽水中，獲得菌體溶液。

培養基之組成

胰酪酶：1%，酵母萃取物：0.5%，胰朮：0.3%，磷酸(I)鉀：0.3%，磷酸(II)鉀：0.39%，檸檬酸銨：0.2%，乳糖：1%，L-半胱胺酸鹽酸鹽：0.03%，吐溫80(Tween 80)：0.1%，鹽溶液0.5%(將 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 11.5 g、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.68 g、 $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 2.4 g溶解於100 mL之水中

所得之溶液)

試驗例1(CPD量測定試驗)

測定上述菌體溶液中之CPD量，藉此研究上述菌體溶液之DNA修復促進效果。

搬入無毛小鼠Hos:HR-1(6週齡)後馴化1週，然後以每組6隻分為共計8組，分別作為第1組~第8組。

分別於9日內以0.1 mL/day對上述小鼠組中之第1組、第3組、第5組及第7組(以下亦稱為對照組)經口投予生理鹽水，對第2組、第4組、第6組及第8組(以下亦稱為菌體組)經口投予實施例1所製備之菌體溶液。

另外，不對上述第1組及第2組照射紫外線，對於第3組~第8組，於投予開始後第6日之後之4日內，與上述投予之同時使用紫外線照射裝置(東芝SE-FL-20)以每1日40 mJ/cm²照射包含280~400 nm之紫外線。

並且，對第1組及第2組於最後之投予後24小時之後，對第3組及第4組於最後之照射後6小時之後，對第5組及第6組於最後之照射後12小時之後，對第7組及第8組於最後之照射後24小時之後分別採集背部皮膚。

再者，下述表1中，UV+表示經紫外線照射，UV-表示未經紫外線照射。

[表1]

未進行紫外線照射	第1組：對照組(UV-，生理鹽水)
	第2組：菌體組(UV-，菌體)
於最後之紫外線照射後6小時之後皮	第3組：對照組(UV+，生理鹽水)

膚採集	第4組：菌體組(UV+，菌體)
於最後之紫外線照射後12小時之後皮膚採集	第5組：對照組(UV+，生理鹽水)
	第6組：菌體組(UV+，菌體)
於最後之紫外線照射後24小時之後皮膚採集	第7組：對照組(UV+，生理鹽水)
	第8組：菌體組(UV+，菌體)

自上述所採集之各背部皮膚中純化基因組DNA(QIAamp (註冊商標)DNA小量純化試劑盒)，將固定量之基因組DNA塗抹於96孔培養盤上，使之與環丁烷嘧啶二聚物抗體(TDM-2)結合後，利用生物素標記二次抗體及酶標記抗生蛋白鏈菌素放大訊號，最後加入基質使之著色，測定492 nm之吸光度(ELISA法)。測定結果示於圖1。

如圖1所示，測定最後之紫外線照射後6小時後之皮膚中的CPD量時，於對照組(第3組)與菌體組(第4組)中確認到相同程度之CPD，但測定於24小時後採集之皮膚中的CPD量，則菌體組(第8組)之CPD量與對照組(第7組)相比顯著降低。因此可確認，藉由投予短型雙叉桿菌YIT 4065株(FERM BP-6223)，可促進由紫外線引起之DNA損傷之修復。

實施例2(菌體試樣之製備)

於2 L之燒瓶中，製作使用礦物液(1 w/v%)、酵母萃取物(1 w/v%)、乳糖(3 w/v%)及乳蛋白(5 w/v%)而製備的培養基1.5 L，於121°C下加熱殺菌15分鐘。於該培養基中接種1 v/v%之短型雙叉桿菌YIT 12272株(FERM ABP-11320)，一面用氫氧化鈉將pH值保持為5.5，一面於36°C下厭氧培養約20小時獲得培養液。以15,000×G對該培養液進行離心分

離，收集雙叉桿菌屬細菌之菌體。再者，上述礦物液之組成為：磷酸(I)鉀(10 w/v%)、磷酸(II)鉀(20 w/v%)、乙酸鈉(30 w/v%)及硫酸銨(30 w/v%)。

另一方面，製備分散有乳蛋白 8 w/v%及糖類 4 w/v%之分散液 100 mL，於 121°C 下加熱殺菌 15 分鐘。於該分散液中，以相對於每單位之濕重為 15% 之方式分散上述所收集的雙叉桿菌屬細菌之菌體，然後冷凍乾燥，獲得短型雙叉桿菌 YIT 12272 株 (FERM ABP-11320) 之冷凍乾燥菌體。將該冷凍乾燥菌體以成為 4×10^9 CFU/mL 之方式懸浮於生理鹽水 10 mL 中，獲得菌體試樣。

試驗例 2 (CPD 量測定試驗)

搬入無毛小鼠 Hos:HR-1 (6 週齡) 後馴化 1 週，然後以每組 3 隻分為共計 3 組，分別作為第 1 組~第 3 組。

分別於 9 日內以 0.1 mL/day 對上述小鼠組中的第 1 組及第 2 組經口投予生理鹽水，對第 3 組經口投予實施例 2 所製備之菌體試樣。

另外，不對上述第 1 組照射紫外線，對於第 2 組及第 3 組，於投予開始後第 6 日之後之 4 日內，與上述投予之同時使用紫外線照射裝置 (東芝 SE-FL-20) 以每 1 日 50 mJ/cm² 照射包含 280~400 nm 之紫外線，然後採集背部皮膚。

再者，將上述小鼠組中投予生理鹽水且未經紫外線照射之小鼠組作為空白 (blank) 組，將投予生理鹽水且經紫外線照射之小鼠組作為對照組，將投予菌體試樣且經紫外線照射之小鼠組作為菌體組 (表 2)。下述表 2 中，UV+ 表示經紫

外線照射，UV-表示未經紫外線照射。

[表 2]

第1組	空白組(UV-, 生理鹽水)
第2組	對照組(UV+, 生理鹽水)
第3組	菌體組(UV+, 菌體)

自上述所採集之各背部皮膚中純化基因組DNA(QIAamp(註冊商標)DNA小量純化試劑盒)，將固定量之基因組DNA塗抹於96孔培養盤上，使之與環丁烷嘧啶二聚物抗體(TDM-2)結合後，利用生物素標記二次抗體及酶標記抗生蛋白鏈菌素放大訊號，最後加入基質使之著色，測定492 nm之吸光度(ELISA法)。測定結果示於圖2。

如圖2所示，與空白組相比，於對照組中確認到藉由紫外線照射CPD顯著增加，但與該對照組相比，菌體組之CPD量降低。因此，確認藉由投予短型雙叉桿菌YIT 12272株(FERM ABP-11320)可促進由紫外線引起之DNA損傷之修復。

實施例3(菌體試樣之製備)

於2 L之燒瓶中，製作使用礦物液(1 w/v%)、酵母萃取物(1 w/v%)、乳糖(3 w/v%)及乳蛋白(5 w/v%)而製備的培養基1.5 L，於121°C下加熱殺菌15分鐘。於該培養基中接種1 v/v%之短型雙叉桿菌YIT 4065株(FERM BP-6223)，一面用氫氧化鈉將pH值保持為5.5，一面於36°C下厭氧培養約20小時獲得培養液。以15,000×G對該培養液進行離心分離，收集雙叉桿菌屬細菌之菌體。再者，上述礦物液之組成

為：磷酸(I)鉀(10 w/v%)、磷酸(II)鉀(20 w/v%)、乙酸鈉(30 w/v%)及硫酸銨(30 w/v%)。

另一方面，製備分散有乳蛋白8 w/v%及糖類4 w/v%之分散液100 mL，於121°C下加熱殺菌15分鐘。於該分散液中，以相對於每單位之濕重為15%之方式分散上述所收集的雙叉桿菌屬細菌之菌體，然後冷凍乾燥，獲得短型雙叉桿菌YIT 4065株(FERM BP-6223)之冷凍乾燥菌體。以成為 1.0×10^{10} CFU/mL之方式將該冷凍乾燥菌體懸浮於生理鹽水10 mL中，獲得菌體試樣。

試驗例3(彈性蛋白酶活性抑制試驗)

搬入無毛小鼠Hos:HR-1(6週齡)後馴化1週，然後以每組5隻分為共計3組，分別作為第1組~第3組。

分別於9日內以0.1 mL/day對上述小鼠組中的第1組及第2組經口投予生理鹽水，對第3組經口投予實施例3所製備之菌體試樣。

另外，不對上述第1組照射紫外線，對於第2組及第3組，於投予開始後第6日之後之4日內，與上述投予之同時使用紫外線照射裝置(東芝SE-FL-20)以每1日40 mJ/cm²照射包含280~400 nm之紫外線，然後採集背部皮膚。

再者，將上述小鼠組中投予生理鹽水且未經紫外線照射之小鼠組作為空白組，將投予生理鹽水且經紫外線照射之小鼠組作為對照組，將投予菌體試樣且經紫外線照射之小鼠組作為菌體組(表3)。下述表3中，UV+表示經紫外線照射，UV-表示未經紫外線照射。

[表 3]

第1組	空白組(UV-, 生理鹽水)
第2組	對照組(UV+, 生理鹽水)
第3組	菌體組(UV+, 菌體)

於上述所採集之各背部皮膚中添加 50 mM 之 Tris-HCl(Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, 三羥甲基胺基甲烷鹽酸鹽)(pH值為 7.5)並使用 Polytron 形成均質物, 以 14,000×G 進行離心後, 將上清液以每孔 100 μL 分注於 96 孔培養盤中, 添加作為代替彈性蛋白之人工基質的合成基質即 6.25 mM 之琥珀醯基-L-丙胺醯基-L-丙胺醯基-L-丙胺酸-對硝基苯胺 20 μL, 於 37°C 下培養 24 小時。然後測定 405 nm 之吸光度。使用對硝基苯胺作為標準而表示皮膚均質物中之彈性蛋白酶活性。結果示於圖 3。

如圖 3 所示可知, 比較空白組與對照組, 確認到對照組中藉由紫外線照射而彈性蛋白酶活性顯著增加, 但菌體組與對照組相比彈性蛋白酶活性受到抑制。

實施例 4(菌體試樣之製備)

於 2 L 之燒瓶中, 製作使用礦物液(1 w/v%)、酵母萃取物(1 w/v%)、乳糖(3 w/v%)及乳蛋白(5 w/v%)而製備的培養基 1.5 L, 於 121°C 下加熱殺菌 15 分鐘。於該培養基中接種 1 v/v% 之短型雙叉桿菌 YIT 12272 株(FERM ABP-11320), 一面用氫氧化鈉將 pH 值保持為 5.5, 一面於 36°C 下厭氧培養約 20 小時獲得培養液。以 15,000×G 對該培養液進行離心分離, 收集雙叉桿菌屬細菌之菌體。再者, 上述礦物液之組

成為：磷酸(I)鉀(10 w/v%)、磷酸(II)鉀(20 w/v%)、乙酸钠(30 w/v%)及硫酸銨(30 w/v%)。

另一方面，製備分散有乳蛋白8 w/v%及糖類4 w/v%之分散液100 mL，於121°C下加熱殺菌15分鐘。於該分散液中，以相對於每單位之濕重為15%之方式分散上述所收集的雙叉桿菌屬細菌之菌體，然後冷凍乾燥，獲得短型雙叉桿菌YIT 12272株(FERM ABP-11320)之冷凍乾燥菌體。將該冷凍乾燥菌體以成為 4×10^9 CFU/mL之方式懸浮於生理鹽水10 mL中，獲得菌體試樣。

試驗例4(彈性蛋白酶活性抑制試驗)

搬入無毛小鼠Hos:HR-1(6週齡)後馴化1週，然後以每組6隻分為共計3組，分別作為第1組~第3組。

分別於9日內以0.1 mL/day對上述小鼠組中的第1組及第2組經口投予生理鹽水，對第3組經口投予實施例4所製備之菌體試樣。

另外，不對上述第1組照射紫外線，對於第2組及第3組，於投予開始後第6日之後之4日內，與上述投予之同時使用紫外線照射裝置(東芝SE-FL-20)以每1日50 mJ/cm²照射包含280~400 nm之紫外線，然後採集背部皮膚。

再者，將上述小鼠組中投予生理鹽水且未經紫外線照射之小鼠組作為空白組，將投予生理鹽水且經紫外線照射之小鼠組作為對照組，將投予菌體試樣且經紫外線照射之小鼠組作為菌體組(表4)。下述表4中，UV+表示經紫外線照射，UV-表示未經紫外線照射。

[表 4]

第1組	空白組(UV-, 生理鹽水)
第2組	對照組(UV+, 生理鹽水)
第3組	菌體組(UV+, 菌體)

於上述所採集之各背部皮膚中加入PBS(磷酸緩衝生理鹽水)並使用Polytron形成均質物，以 $14,000\times G$ 進行離心後，將上清液以每孔 $100\ \mu\text{L}$ 分注於96孔培養盤中，添加作為代替彈性蛋白之人工基質的合成基質即 $6.25\ \text{mM}$ 之琥珀醯基-L-丙胺醯基-L-丙胺醯基-L-丙胺酸-對硝基苯胺 $20\ \mu\text{L}$ ，於 37°C 下培養24小時。然後測定 $405\ \text{nm}$ 之吸光度。使用對硝基苯胺作為標準而表示皮膚均質物中之彈性蛋白酶活性。結果示於圖4。

如圖4所示可知，比較空白組與對照組，確認到對照組中藉由紫外線照射而彈性蛋白酶活性顯著增加，但菌體組與對照組相比彈性蛋白酶活性得到抑制。

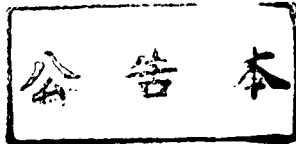
【圖式簡單說明】

圖1係表示藉由經口投予菌體可促進DNA損傷之修復的圖；

圖2係表示藉由經口投予菌體可促進DNA損傷之修復的圖；

圖3係表示藉由經口投予菌體可抑制彈性蛋白酶活性的圖；及

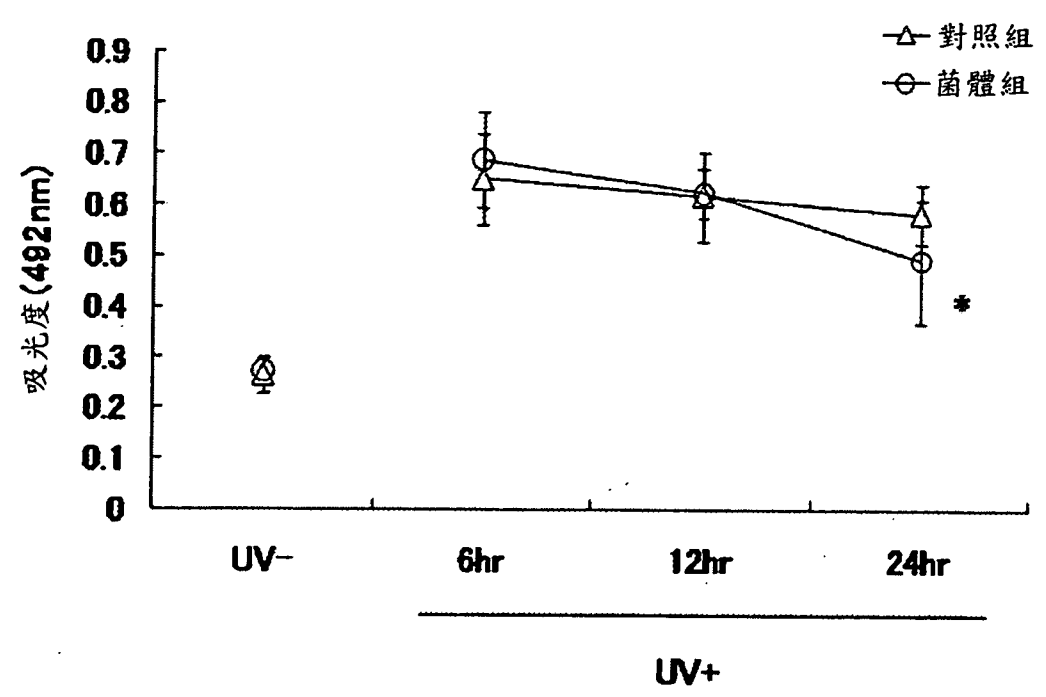
圖4係表示藉由經口投予菌體可抑制彈性蛋白酶活性的圖。



七、申請專利範圍：

1. 一種短型雙叉桿菌 YIT 12272 之用途，其係用於製造含有短型雙叉桿菌 YIT 12272 作為有效成分之經口用 DNA 損傷修復促進劑，該 DNA 損傷修復係針對於因紫外線曝露而引起的皮膚中之 DNA 損傷且使二聚體化之相鄰鹼基恢復為單體之修復。
2. 如請求項 1 之短型雙叉桿菌 YIT 12272 之用途，其中 DNA 損傷修復促進劑含有 1×10^3 CFU 以上之短型雙叉桿菌 YIT 12272 作為 1 日量。
3. 如請求項 1 之短型雙叉桿菌 YIT 12272 之用途，其中 DNA 損傷修復促進劑係至少於紫外線曝露前經口投予者。

八、圖式：



* : $p < 0.05$ (vs各時間之對照組)

圖1

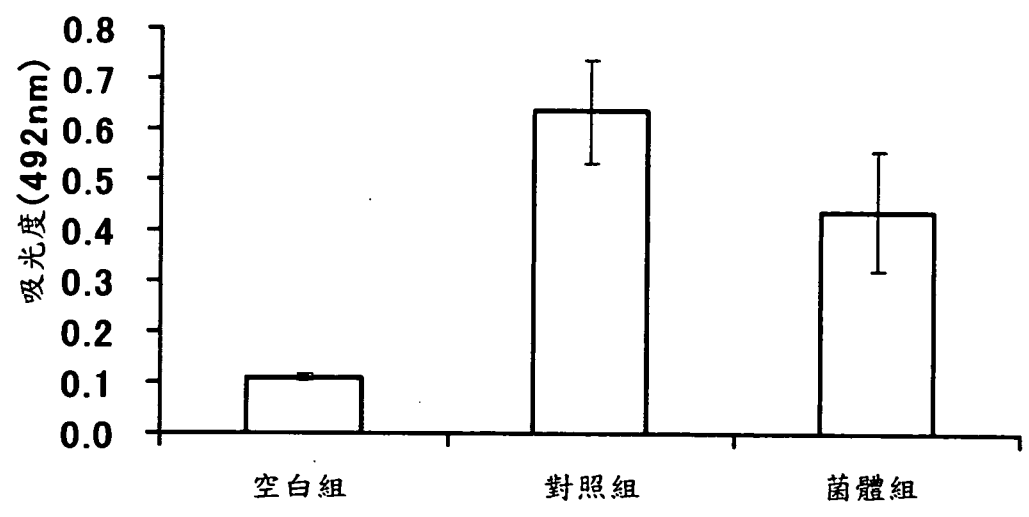


圖2

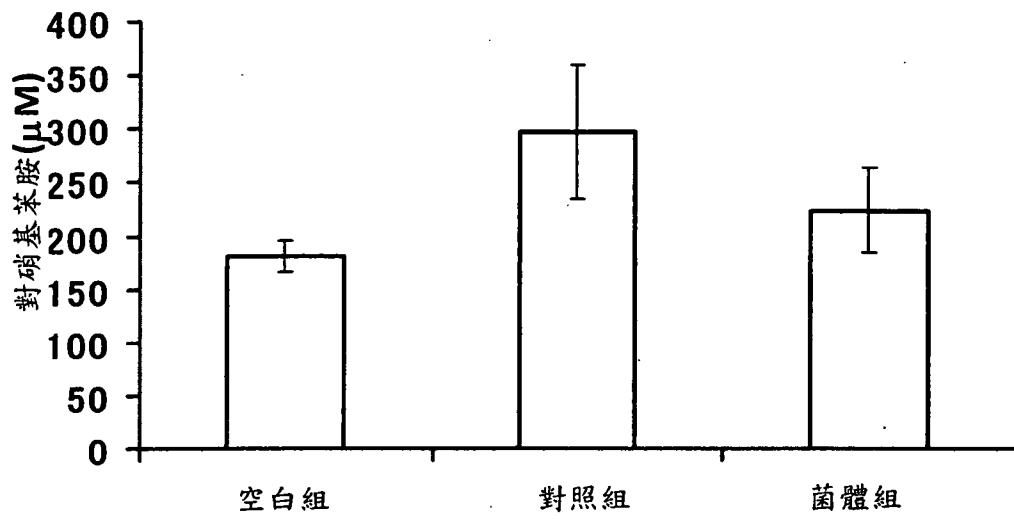


圖3

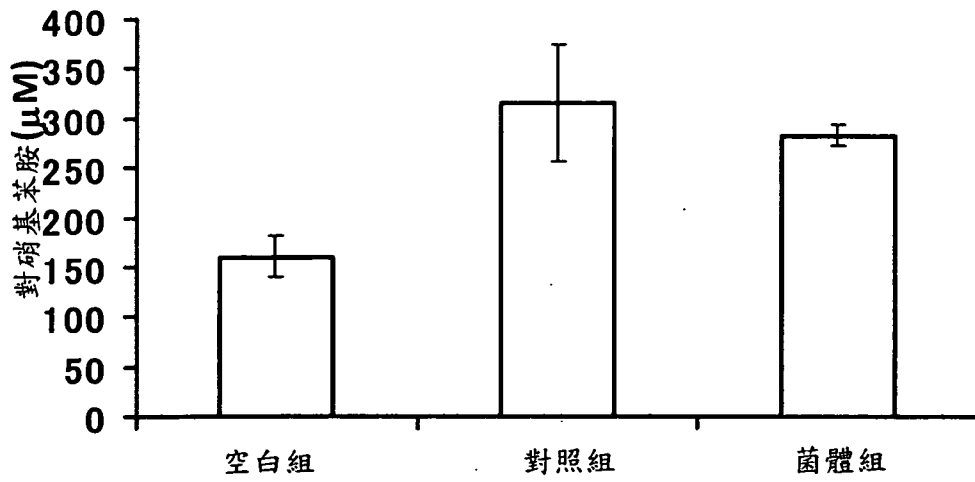


圖4