

⑯ Int.Cl.⁴
A 61 K 35/74

識別記号
ADZ
ADA

庁内整理番号
8615-4C

⑰ 公開 昭和63年(1988)7月23日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑱ 発明の名称 皮膚用抗菌剤

⑲ 特 願 昭62-9925

⑳ 出 願 昭62(1987)1月21日

㉑ 発 明 者 岡 崎 秀 神奈川県相模原市下九沢767

㉒ 出 願 人 株式会社 アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

皮膚用抗菌剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属又はビフィドバクテリア属に属する微生物の菌体及び／又は水抽出物を有効成分として含有することを特徴とする皮膚用抗菌剤。
- (2) 前記微生物がストレプトコッカス・フェシウム、同デュランス、同エビウム、同フェカーリス、ラクトバチルス・プレビス、同サリヴァリウス、ビフィドバクテリウム・アドレセンテス、同プレベ、同ロンガムであることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の皮膚用抗菌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は有効成分としてストレプトコッカス

属に属する微生物、ラクトバチルス属に属する微生物／又はビフィドバクテリウム属に属する微生物の菌体及び／又は水抽出物を含有する皮膚用抗菌剤、特に抗痤疮剤、皮膚疾患改善剤乃至皮膚保護剤に関する。

主たる痤疮(にきび acne)原因菌であるプロピオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes又はCorynebacterium parvum)に対する抗菌性物質としては、hexachloropheneなどがあるが、人体ならびに腸内細菌に対する影響等の副作用につき実質的に未解明であり、皮膚塗布による皮膚吸収及び経口による体内への侵入に対し、必ずしも安全であるとはなし難いものである。

上記に鑑み本発明者らは鋭意研究の結果、健康人腸内細菌由来の乳酸菌であるストレプトコッカス属、ラクトバチルス属、又はビフィドバクテリウム属に属する微生物の菌体乃至その水抽出物が、プロピオニバクテリウム・アクネスに対し強い抗菌活性を有すること、及びこれら乳

酸菌菌体乃至水抽出物は腸内細菌や皮膚に対する影響を含めて、経口投与或いは皮膚塗布実験の結果、実質的に全然無毒性であることを知見し、本発明に到達したものである。

以下、本発明に於いて使用され得る微生物の種類と菌学的性質、スクリーニング方法、菌体調製法、及び薬理作用等につき詳細に分説する。

微生物

ストレプトコッカス属、ラクトバチルス属又はピフィドバクテリウム属に属する微生物であり、糞中、ストレプトコッカス・フェシウム (*Streptococcus faecium*)、同デュランズ (*S. durans*)、同エビウム (*S. avium*)、同フェカリス (*S. faecalis*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus brevis*)、同サリヴァリウス (*L. salivarius*)、ピフィドバクテリウム・アドレセンテス (*Bifidobacterium adolescentis*)、同ブレベ (*B. breve*)、同ロンガム (*B. longum*) 等を好適なものとして例示し得る。ここで本発

-3-

菌学的性質

本発明微生物のスクリーニング法、同定など菌学的性質につき要約して示せば次の通りである。

1. スクリーニング方法

Watanabe, T., et al., Studies on streptococci, I. Distribution of fecal streptococci in man. Microbiol. Immunol. 25, 257-269 (1981)に記載の方法に準ずる。すなわち、上記文献に記載の通り、健康人の糞便を下記の組成(第2表)の希釈液で希釈し、ストレプトコッカスはKMN agar [vander Weil-Korstanje, J. A. A., and K. C. Winkler: J. Med. Microbiol. 8, 491(1975): 第3表]、ラクトバチルスはLBS agar [BBL, 第4表]、ピフィドバクテリウムはMPN agar [Tanaka, R. et al., Appl. Environ. Microbiol. 40, 866-869(1980), 第5表]に塗沫、37℃、好氣的乃至嫌氣的条件下で48-72時間培養し、生成コロニーをカウント、無作為に

-5-

明に於いて特に有用な菌株を微工研受託番号と共に表示すれば下記の第1表の通りである。

第1表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i>	AD1005 FERM P-8697
<i>Streptococcus avium</i>	AD2001 FERM P-8698
<i>Streptococcus durans</i>	AD3003 FERM P-8699
<i>Streptococcus faecalis</i>	AD9002 FERM P-8696
<i>Lactobacillus brevis</i>	AD0012 FERM P-8695
<i>Lactobacillus salivarius</i>	AD0013 FERM P-8694
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	AD0053 FERM P-8693
<i>Bifidobacterium breve</i>	AD0054 FERM P-8692
<i>Bifidobacterium longum</i>	AD0057 FERM P-8691

-4-

ひろい、コロニー形、カタラーゼ活性(陰性)、グラム染色陽性球菌及び桿菌を分離し、生理的、生化学的性状を検査して分類同定した。

第2表

希釈液の組成

KH ₂ PO ₄	4.5g
Na ₂ HPO ₄	6.0g
L-システイン塩酸塩	0.5g
ツイーン80	0.5g
寒天	1.0g
精製水	1000ml

第3表

KMNagar (Red-Kanamycin-milk agar) の組成

トリプトース	15g	
肉エキス	3g	
アジ化ナトリウム	0.2g	pH6.8
食塩	5g	121℃ 10分間
寒天	18g	
精製水	800ml	

-6-

スキムミルク	16g		
B ニュートラルレッド	40mg	100℃	1時間
精製水	200ml		
C カナマイシン	24mg		

A, B, Cを別滅菌後、合し、平板とする。

第4表

LBSagarの組成(BBL)

トリプトース	10g		
肉エキス	5g		
KH ₂ PO ₄	6g		
クエン酸三アンモニウム	2g		
グルコース	20g		
無水酢酸ナトリウム	15g		
ツイーン80	1g		
MgSO ₄ ・7H ₂ O	575mg		
MnSO ₄ ・2H ₂ O	120mg		
FeSO ₄ ・7H ₂ O	34mg		
寒天	15g		
精製水	100ml	pH5.5	

121℃ 15分間 加熱滅菌

-7-

3% L-システイン塩酸塩	1ml		
ナリジクス酸	10mg		
1.6% ブロムクレゾールパープル	0.1ml		
寒天	2g		
精製水	100ml	pH6.8	

100℃ 30分間 圧力なし加熱殺菌

2. 分離乳酸菌の同定

本発明微生物の一般的菌学的性質は同一分類につき、公知各文献の示すものと同一の諸性質を有する。

すなわち、ストレプトコッカス属細菌の選択培地KMNagar培地、ラクトバチルス属細菌の選択培地LBSagar培地、そしてピフィドバクテリウム属細菌の選択培地MPNagar培地上のコロニー形状、グラム染色性、形態、生理生化学的性状により下記文献1)~4)を参照して同定した。

参考文献

- 1) 光岡知足：日本細菌学雑誌、24(6)、261-280(1969)

-9-

第5表

MPNagarの組成

ラクトース	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.1g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	20mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	1mg
MnSO ₄ ・2H ₂ O	0.8mg
食塩	1mg
0.1% リサズリン	0.1mg
ビオチン	0.01mg
パントテン酸カルシウム	0.2mg
リボフラビン	0.1mg
アデニン	0.1mg
グアニン	0.1mg
キサンチン	0.1mg
ウラシル	0.1mg
ツイーン80	0.1g
10% ビルビン酸	0.1ml
8% Na ₂ CO ₃	5ml

-8-

- 2) Poupard, J. A., Husain, I. and Norris, R. F., : Bacteriol. Rev., 37 136-165 (1973)
- 3) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. 490-676(1974)
- 4) 光岡知足：臨床と細菌、2(3)、55(197)-97(239), (1975)

ここで同定の根拠としたその主な菌学的性状を要約して示せば、第6乃至第8表の通りである。

(以下余白)

第6表

	S. faecium AD1005	S. avium AD2001	S. durans AD3003	S. faecalis AD9002
グラム染色(陽性+)	+	+	+	+
カタラーゼ(煮沸血液存在下)	-	-	-	-
10℃での増殖	+	+	+	+
45℃での増殖	+	+	+	+
pH9.6での増殖	+	+	+	+
6.5%NaClでの増殖	+	+	+	+
40%胆汁における増殖	+	+	+	+
1/4000亜テレル酸での増殖	-	-	-	-
0.1%メチレンブルーミルクでの増殖	+	UD	+	+
炭水化物発酵				
アラビノース	+	+	-	-
グリセリン	-	+	-	+
ラフィノース	-	+	-	-
ソルビット	-	+	-	+
キシロース	+	+	-	+
マンニット	+	+	UD	+
エスクリン加水分解	+	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	+	+

注) + ; 陽性, - ; 陰性, UD ; 不定

第7表

	L. brevis AD0012	L. salivarius AD0013
グラム染色	+	+
カタラーゼ	-	-
ガス産生	+	-
15℃での増殖	+	+
45℃での増殖	-	-
炭水化物発酵		
アラビノース	+	-
キシロース	+	-
リボース	+	-
マンノース	-	+
セロビオース	-	-
ラフィノース	+	+
メレチトース	-	-
スターチ	-	+
マンニット	-	+
サリシン	-	+
アミグダリン	-	-
ラムノース	-	+

注) + ; 陽性, - ; 陰性

第8表

	B. adolescentis AD0053	B. breve AD0054	B. longua AD0057
グラム染色	+	+	+
グルコースからのガス生成	-	-	-
炭水化物発酵			
アラビノース	+	+	+
キシロース	+	+	+
マンノース	+	+	+
セロビオース	+	+	+
ラフィノース	+	+	+
メレチトース	+	+	+
マンニット	+	+	+
ソルビット	+	+	+
サリシン	+	+	+
アミグダリン	+	+	+
イヌリン	+	+	+
トレハロース	+	+	+
リボース	+	+	+

注) + ; 陽性, - ; 陰性, ± ; 疑陽性, - ; 疑陰性

3. 培養方法

これらの微生物の培養は前出各文献に示す通りの常法によるものであるが、例えばストレプトコッカス属の微生物とラクトバチルス属の微生物はロゴサ(Rogosa)液体培地(注1)、ビフィドバクテリウム属の微生物はGAM液体培地(注2)にて、ストレプトコッカス属及びラクトバチルス属は好氣的又は嫌氣的に、そしてビフィドバクテリウム属は嫌氣的に培養し、得られた培養液を遠心分離して、その菌体が採集される。

(注1) ロゴサ液体培地の組成

蒸留水 1ℓ中に	
トリプチケース	10.0g
酵母エキス	5.0g
トリプトース	3.0g
K ₂ HPO ₄	3.0g
KH ₂ PO ₄	3.0g
酢酸ナトリウム (*)	1.0g
クエン酸三アンモニウム	2.0g
ツイーン80	1.0g

グルコース	20.0g
L-システイン塩酸塩	0.2g
塩類溶液 (**)	5.0ml
(pH7.0, 121°C 15分間 加熱滅菌)	

(*) 酢酸ナトリウムはストレプトコッカスの場合は不要

(**) 塩類溶液 蒸留水100ml中に

MgSO ₄ · 7H ₂ O	11.5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.68g
MnSO ₄ · 2H ₂ O	2.4g

(注2) GAM 液体培地組成

GAMブイオン「日水製薬株式会社」コード05422	59.0g(1l分)
ペプトン	10.0g
グイズペプトン	3.0g
プロテオースペプトン	10.0g
消化血清末	13.0g
酵母エキス	5.0g

-15-

るものであるが、その典型的調製方法の幾つかにつき例示すれば次の通りである。

1. 熱水抽出処理

採集された菌体を80~130°C(より好ましくは100~120°C)、数分~数時間滅菌を兼ねた加圧乃至非加圧熱水抽出処理に付し、遠心分離処理等により、水不溶固形分を除去して目的活性成分である水溶性画分が得られる。尚、抽出溶媒としては通常の生理食塩水(0.9% NaCl水溶液等)のみならず、所定pH値に調製された各種緩衝液、各種塩類溶液、水/アルコール>1/2(重量比)の程度の水:アルコール(メタノールとエタノール)混合溶媒等、各種水性溶媒、水のみも又同様に使用され得る。

更に採集菌体を前記滅菌熱水抽出処理に付した全体を、遠心分離等の固形分除去処理に更に付することなくそのまま凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥粉末等としたものも又、本発明皮膚用抗菌剤として有用なものであることが付言される。

-17-

肉エキス	2.2g
肝臓エキス末	1.2g
グルコース	3.0g
KH ₂ PO ₄	2.5g
塩化ナトリウム	3.0g
溶性デンプン	5.0g
L-システイン塩酸塩	0.3g
チオグリコール酸ナトリウム	0.3g
(pH7.3±0.1, 115°C 15分間 加熱滅菌)	

得られた菌体は生菌体又は加熱処理等による死菌体として、いずれもそのまま薬剤として利用することができるが、超音波処理等により破壊菌体として利用に供されてもよい。したがって、本発明に於ける「死菌体」とはこれら破壊菌体の全部又は一部分をも包含するものである。

皮膚用抗菌剤の調製

本発明皮膚用抗菌剤は前記各微生物の各種滅菌処理菌体又はその水抽出画分を有効成分とす

-16-

2. 滅菌処理

採集菌体を噴霧乾燥等の加熱滅菌処理し、或いは超音波破壊処理(例えば、15kc, 60分)した各種滅菌処理菌体も又、本発明皮膚用抗菌剤の有効成分として使用され得る。更に、これら滅菌処理菌体を水抽出処理に付し、その水溶性成分とし、目的活性画分を得るようにしてもよい。

抗菌活性

1. 抗菌活性

後記実験例に示す通り、本発明皮膚用抗菌剤はプロピオニバクテリウム属中の瘡瘡症の原因菌となる菌の増殖を極めて効果的に抑制乃至阻害する。他方、腸内細菌の主要乳酸菌(ストレプトコッカス・フェッカーリス、同フェシウム、ラクトバチルス・アシドフィルス、同サリヴァリウス、同プレビス、ピフィドバクテリウム・アドレセンテス、同プレベ)には実質的に阻害効果を有しないという選択特異的抗菌スペクトルを示す。

2. 毒性

経口では実質的に全然無毒性であり、そのLD₅₀値は熱水抽出物乃至滅菌体として約5mg/マウス以上であった。

3. 使用態様

本発明皮膚用抗菌剤は沐浴剤乃至浴用化粧剤、洗顔料、日焼け止めクリーム、整髪・頭皮料、口紅・頬紅等々の各種化粧品、皮膚塗布用組成物として、或いは皮膚消毒剤に添加されて皮膚疾患改善乃至皮膚保護性塗布粉末或いはクリーム状の形態で好適に使用され得るものであるが、その使用量は処理菌体乃至水抽出物として通常0.001~10重量%(乾燥重量換算)程度である。

以下、実験例により本発明をより詳細に説明する。

実験例1

プロピオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes: 1640001, 阪大微研菌株保存施設より分与)の増殖阻害作用

ロゴサ(Rogosa)液体培地或いはCAM液体培地に、生菌数濃度およそ10⁶/mlとなるように、本発明各乳酸菌を接種し、好氣的或いは嫌氣的条件下で15~24時間37℃で培養した。培養後、遠心分離により集菌し、集菌菌体を約10容の生理食塩水に懸濁し、再び集菌する事を2回繰り返し、洗浄菌体を集めた。これを1容の蒸留水中に懸濁し、110~120℃で10~15分間オートクレープで加熱した。次いで遠心分離を行い、その上清そのまま或いはその凍結乾燥を試料とした。上記、試料を含有するCAM agar培地(注)を嫌気状態にして、嫌気下にプロピオニバクテリウム・アクネスを約10³接種し培養した。48時間後の生成したコロニー数をカウントし、試料を含まないコントロールと比較して抑制率を測定した。その結果を第9表に示した。

(以下余白)

以上の結果より明らかなように、S.フェシウム、S.デュランス、B.アドレセンテスの3種はP.アクネスの増殖を強力に抑制し、他の6種も増殖を阻害した。

これら9種のうち、特にS.フェシウムAD1005は、コントロール(すなわち菌体抽出液のうちの溶媒である水のみ添加群である)はプレート当たり441個のP.アクネスコロニーを生ずるのに対し、プレート当たり1個とほぼ100%、P.アクネスの増殖を抑える程の制菌能をも示した。

実験例2

P.アクネス増殖過程に及ぼすストレプトコッカス属の抑制作用比較

実験例1と同様に調製した試料を含有するCAM液体培地を嫌気状態にして、嫌気下にP.アクネスを10⁶/ml接種し培養した。そして、0, 6, 12, 24, 30時間後の生菌数(/ml)を測定した。その結果は第1図に示した。S.フェシウム、S.デュランス、S.エビウム、S.フェカ

第9表

菌種	菌数/プレート	抑制率
Control	441	-
Streptococcus faecium AD 1005	1	99.8%
Streptococcus faecium AD 1006	40	90.9%
Streptococcus avium AD 2001	178	59.6%
Streptococcus durans AD 3003	56	87.3%
Streptococcus faecalis AD 9002	293	33.6%
Lactobacillus brevis AD 0012	181	59.0%
Lactobacillus salivarius AD 0013	108	75.5%
Bifidobacterium adolescentis AD 0053	72	83.7%
Bifidobacterium breve AD 0054	244	44.7%
Bifidobacterium longum AD 0057	114	74.1%

ーリスの順でP.アクネスの増殖を抑制した。
S.フェシウムAD1005においては30時間近くの
間、P.アクネスの増殖を抑制した。そして12
~15時間は0時の数より減少させ、制菌能をも
示した。

ここで省略したが、B.アドレセンテスAD0053
にも、S.デュランスとほぼ同様な結果を示す
ことをつけ加えておく。

実験例 3

S.フェシウムAD1005によるプロピオニバクテ
リウム・アクネスの増殖阻害作用

S.フェシウムAD1005について、実験例1と
同様に調製した菌体水抽出液を乾燥菌体重量に
おいて3段階濃度別にしてCAM液体培地に含有
させ、実験例2と同様な方法で行った。その結
果を第2図に示した。

図に示す通り、濃度(蛋白量)に比例してP.
アクネスの増殖を抑制し、培養12時間位まで抑

制能が著明であった。

抗菌スペクトル

前記各熱水抽出物を添加した常法によりヒト
腸内細菌(各種乳酸菌及び大腸菌)への影響を試
験した結果を下記第10表に要約して示す。表か
ら、当該熱水抽出物は主要な腸内細菌に対して
不活性であると認められる。

(以下余白)

第10表

試験菌株	抽出株
S.フェシウム	S.フェシウム AD1005
S.デュランス	S.エビウム AD2001
S.エビウム	S.デュランス AD3003
S.フェカーリス	S.フェカーリス AD9002
S.ミティス	B.アドレセンテス AD0053
L.アシドフィルス	L.サリヴァリウス AD0013
L.ファーマンタム	
B.アドレセンテス	
B.プレベ	
大腸菌	

注) - ; 阻害なし, + ; 阻害あり

急性毒性

① ICR系マウス(雄6週令、平均体重33.0±
0.5g)を使用し、前記熱水処理抽出物の製法
に従って調製した熱水抽出物をマウス当り9
×10⁹、9×10⁸、9×10⁷個の3段階の出発
菌数(各群10匹)に相当量でその生理食塩水
0.5ml懸濁液を腹腔内投与し、14日間マウス
の生死を観察した。

Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値
(mg/マウス)を第11表に示す。尚、連日経口
投与、皮膚塗布では、いずれの場合でも全然
無毒性であった。

第11表

菌株名	LD ₅₀ (mg/マウス)
S.フェシウム AD1005	7.4mg
S.エビウム AD2001	7.3mg
S.デュランス AD3003	6.8mg
S.フェカーリス AD9002	7.0mg
L.プレビス AD0012	6.6mg
L.サリヴァリウス AD0013	6.0mg
B.アドレセンテス AD0053	7.2mg
B.プレベ AD0054	6.5mg
B.ロンガム AD0057	5.1mg

② ICR系マウス(雄6週令、平均体重30.5±0.6g)を使用し、前記加熱滅菌体調製例に従って得られた滅菌体をマウス当り 9×10^9 、 9×10^8 、 9×10^7 個の3段階の菌体相当(各群10匹)でその生理食塩水0.5ml懸濁液を腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Behrens-Kärber法に従って算出したLD₅₀値(菌体個数/マウス)は、いずれの菌にあっても 6×10^9 個/マウス以上(腹腔内投与)であり、且つ経口投与、皮膚塗布ではいずれの場合でも実質的に全然無毒性であった。

使用例

1. 洗顔クリーム

脂肪酸	36
オレイルアルコール	1.5
ラノリン誘導体(E.O.付加物)	1.0
グリセリン	18.0
水酸化カリウム	6.0

-27-

3. 液状塗布剤

乳酸エチル	10ml
グリセリン	5~10ml
本発明水抽出物	1~5g
エタノール	全量で100ml

4. 軟膏剤

レゾルシン	6g
酸化亜鉛	6g
次硝酸ビスマス	6g
杜松モクタール	2g
ミツロウ	10g
黄色ワセリン	27g
精製ラノリン	26g
グリセリン	13g
本発明水抽出物	4g

-29-

本発明水抽出物	0.1-1.0
香料	0.5
防腐剤	適量
精製水	36-36.9
	100重量%

2. 沐浴剤

ラウリル硫酸トリエタノールアミン	40
ラウリル硫酸ナトリウム	5
ラウロイルサルコシン酸ナトリウム	3
ラウリルイミダゾリンジカルボン酸ナトリウム	10
ラウリル酸ジエタノールアミド	5
エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム	0.3
ヘキサメタリン酸ナトリウム	1
プロピレングリコール	10
本発明水抽出物	1-5
香料、色素、防腐剤	適量
精製水	31-35
	100重量%

-28-

4. 図面の簡単な説明

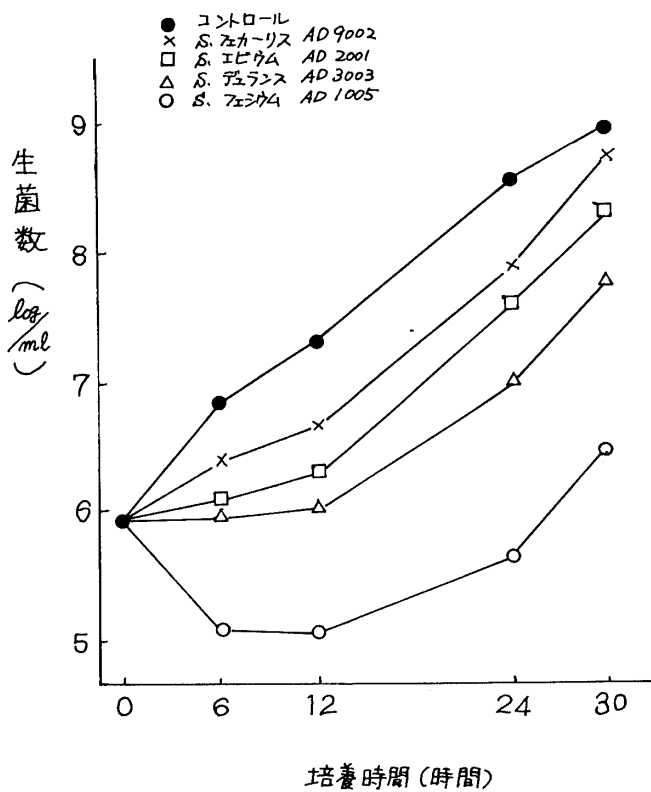
第1図は、P.アクネス増殖過程に及ぼすトレプトコッカス属の抑制作用を比較したもので、横軸は培養時間、縦軸はP.アクネスの生菌数(log/ml)を示す。

第2図は、S.フェシウムAD1005によるP.アクネスの増殖阻害作用を調べたもので、横軸は培養時間、縦軸はP.アクネスの生菌数(log/ml)を示す。

特許出願人 株式会社アドバンス

-30-

第 1 図



第 2 図

