

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-145026

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 35/74

識別記号 庁内整理番号  
ADU 7138-4C  
7138-4C

⑭ 公開 昭和62年(1987)6月29日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 抗発癌剤

⑯ 特 願 昭60-284329

⑰ 出 願 昭60(1985)12月19日

⑱ 発 明 者	河 合	康 雄	厚木市毛利台2-8-12
⑲ 発 明 者	末 柄	信 夫	神奈川県津久井郡城山町川尻3256-6
⑳ 発 明 者	岡 崎	秀	相模原市下九沢767
㉑ 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

抗発癌剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属、及びラクトバチルス属のいずれかに属する微生物の菌体を有効成分として含有することを特徴とする抗発癌剤。
- (2) 前記微生物が、ストレプトコッカス・フェシウム、同フェカリス、同エビウム、同ミティス、同サリヴァリウス、同ボービス、同エクイナス、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス、同プレベ、同ロンガム、ラクトバチルス・アシドフィルス、同ブランタルム、同プレビス、同カゼイ、同ファーマンタム、同サリヴァリウス、同ヘルペティクスより成る群から選択される1種又は2種以上であることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の抗発癌剤。
- (3) 前記微生物がストレプトコッカス・フェシウム AD1008(FERM P-8569)、同フェカリス AD9005(FERM P-8572)、同エビウム AD2007(FERM P-8570)、ビフィドバクテリウム・プレベ AD0055(FERM P-8573)、同アドレ

センティス AD0052(FERM P-8574)及び/又はラクトバチルス・アシドフィルス AD0006(FERM P-8563)、同サリヴァリウス AD0009(FERM P-8566)であることを、更に特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の抗発癌剤。

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、ビフィドバクテリウム属に属する微生物/又はラクトバチルス属に属する微生物の菌体を含有する抗発癌剤に関する。

今日、日本人の死亡率の第1位は病による死亡であり、とくに消化器癌が多い。これら癌の治療・予防薬としては、免疫賦活剤を初めとして幾つかが提案されているが、死亡の減衰はなく増えつつづけている現状である。これらは薬理効果及び副作用等の点で必ずしも充分満足し得るものとは言い難く、より効果的な薬剤の希求が一段と高まっている。上記に鑑み、本発明者らは、鋭意研究の結果、ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属又はラクトバチルス属に属する微生物の生菌体及び死菌体が、消化器癌の原因物質である強力発癌物質ジメチルニトロソアミンを効果的に低下せしめ得るものであり、且つ、その起源が所謂腸内細菌であるこれら菌体は、経口では実質的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、本発明に係わ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、ビフィドバクテリウム属又はラクトバチルス属に属する微生物であり、就中、ストレプトコッカス・フェシウム(*Streptococcus faecium*)、同フェカーリス(*faecalis*)、同エビウム(*avium*)、同ミティス(*mitis*)、同エクイナス(*equinus*)、同サリヴァリウス(*salivarius*)、同ボービス(*bovis*)、同デュランス(*durans*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス(*Bifidobacterium adolescentis*)、同ブレベ(*breve*)、同ロンガム(*longum*)、同インファンティス(*infantis*)、同ビフィダム(*bifidum*)、同サーモフィラム(*thermophilum*)、同シュードロンガム(*pseudo-longum*)、同コリネフォルム(*coryneforme*)、同アステロイデス(*asteroides*)、同インディカム(*indicum*)、同スイス(*suis*)、同ラクトバチルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、同ファーマンタム(*fermentum*)、同サリヴァリウス(*salivarius*)、同プランタルム(*plantarum*)、同カゼイ(*casei*)、同ブレビス(*br-evis*)、同ブルガリクス(*bulgaricus*)、同ヘルベティクス(*helve-ticus*)等が使用され得る。

#### 菌学的性質

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、本発明微生物の一般的菌学的性質及び培養法等に関しては、下記諸文献が参照される。

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed, 490-676 (1974)
- 2) Int. J. Syst. Bact. 16, 114 (1966)
- 3) Poupard, J. A., Husain, I, and Norris, R. F.: Bacteriol. Rev. 37, 136-165 (1973)
- 4) 光岡知足、日本細菌誌 24, 261-280 (1969)

ここで前出菌株につきその主な菌学的性状を要約して第2乃至第4表に示す。

以下余白

これらのうち特に有用な菌株を微工研受託番号と共に表示すれば、下記の通りである。

第1表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i> AD1008	FERM P-8569
<i>Streptococcus avium</i> AD2007	FERM P-8570
<i>Streptococcus mitis</i> AD7002	FERM P-8571
<i>Streptococcus faecalis</i> AD9005	FERM P-8572
<i>Bifidobacterium breve</i> AD0055	FERM P-8573
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> AD0052	FERM P-8574
<i>Bifidobacterium longum</i> AD0056	FERM P-8562
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AD0006	FERM P-8563
<i>Lactobacillus fermentum</i> AD0007	FERM P-8564
<i>Lactobacillus casei</i> AD0008	FERM P-8565
<i>Lactobacillus salivarius</i> AD0009	FERM P-8566
<i>Lactobacillus plantarum</i> AD0010	FERM P-8567
<i>Lactobacillus brevis</i> AD0011	FERM P-8568

第2表

	<u>S. faecium</u> A D 1008	<u>S. faecalis</u> A D 9005	<u>S. avium</u> A D 2007
グラム染色	+	+	+
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亜テルル酸での増殖	-	+	-
0.1%メチレンブルーミルクでの増殖	+	+	-
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	-	+	+
エスクリン加水分解	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	-

第3表

	<u>B. adolescentis</u> A D 0052	<u>B. brevis</u> A D 0055
グラム染色	+	+
グルコースからのガス生成	-	-
15℃以下45℃での増殖	-	-
カタラーゼ	-	-
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	+/S <sup>+</sup>	-
フルクトース	+	-
シュクロース	+	-
マルトース	+	+
ラクトース	+	-
トレハロース	V <sup>+</sup>	-
イリビトース	+	V <sup>+</sup>
ラフィノース	+	+
メルトロース	-/+S <sup>+</sup>	V <sup>+</sup> 検性
デキストリン	V <sup>+</sup>	まれに凝れて固性
デンプン	V <sup>+</sup>	に反応
グリコーゲン	V <sup>+</sup>	
イヌリン	V <sup>+</sup>	
マンニト	V <sup>+</sup>	
ソルビット	V <sup>+</sup>	
イノシトール	-	+
エスクリン	+	+
アミグダリン	+	+
セロビオース	+/S <sup>+</sup>	+
サリシン	+	V <sup>+</sup>
α-D-グルコロン酸	+	+

“ おくれて反応  
まれに陰性

“ 検性  
まれに凝れて固性  
に反応

“ S<sup>+</sup> “ S: おくれて反応  
+S<sup>+</sup> “ V: 不定  
+S<sup>+</sup>  
V<sup>+</sup>

## 第4表

		<i>L. acidophilus</i> AD0006
グラム染色		+
グルコースからのガス生成		-
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		-
ラムノース		-
リボース		-
マンノース		+
フルクトース		+
ガラクトース		+
シュクロース		+
マルトース		+
セロビオース		+
ラクトース		+
レハロース		-
ノリビオース		+
ラフィノース		-
メレトトース		-
デキストリン、デンプン	V・	V = 不定
マンニット		-
ソルビット		-
エスクリン		+
サリシン		-
アミグダリン		+

これらの微生物の培養は上記の通り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、その菌体が採取される。

注1)

## ロゴサ液体培地の組成

蒸留水1ℓ中に	
トリブチケース	10g
酵母エキス	5g
トリプトース	3g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g
酢酸ナトリウム <sup>(*)</sup>	1g
クエン酸三アンモニウム	2g
ツイーン80	1g
グルコース	20g
L-システイン塩酸塩	0.2g
塩類溶液 <sup>(**)</sup>	5ml
(pH 7.121℃ 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に	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	11.5g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.68g
MnSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.4g

注2)

## GAM 液体培地の組成

GAMブイヨン

「日水製薬株式会社」コード05422

	59.0g(1ℓ分)
ペプトン	10.0g
ダイズペプトン	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
肉エキス	2.2g
肝臓エキス末	1.2g
ブドウ糖	3.0g
リン酸二水素カリウム	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
(pH 7.3 ± 0.1)	

121℃ 15分間加熱滅菌

得られた菌体は生菌体または加熱処理等による死菌体としていづ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。

## スクリーニング方法

光岡(1971): 感染症学会雑誌, 45, 406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の希釈液で10倍に希釈し、ストレプトコッカスはKMNAgar(van der Wiel-Korstanje, J. A. A., and K. C. Winkler; J. Med. Microbiol. 8, 491(1975)、ラクトバチルスはLBS agar(BB L)、ビフィドバクテリウムはMPN agar(Tanaka, R. et al. Appl. Environ. Microbiol. 40, 866-869(1980);これらの培地組成は下記の通り)に塗抹、37℃ 48-120時間培養し、生成コロニーをカウント、無作為にひろい、コロニー形、カタラーゼ活性、グラム染色性、菌体の形状を観察し、生理的、生化学的及び血清学的性状を検査して分類同定した。

希釈液

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0g
L-システイン塩酸塩	0.5g
ツィーン80	0.5g
寒天	1.0g
精製水	1,000ml

KMN agarの組成

NaN <sub>3</sub>	0.2g
トリプトース	15.0g
肉エキス	3.0g
NaCl	5.0g
スキムミルク	16.0g
ニュートラルレッド	4.0mg
カナマイシン	2.4mg
寒天	1.8g
pH7.0、1000ml処方	

MnSO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.4g	0.5ml
NaCl	0.5g	
蒸留水	250ml	

0.1% リサズリン	0.1ml
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
キサントシン	0.1mg
ウラシル	0.1mg
ツィーン80	0.1g
10% ビルビン酸	0.1ml
8% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5.0ml
3% L-システイン塩酸塩	1ml
ナリジクス酸	10mg
1.6%プロムクレゾールパープル	0.1ml
寒天	2g
pH=6.8、1000ml処方	

LBS agarの組成

トリプトース	10g
肉エキス	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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
ツィーン80	1g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	575mg
MnSO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	120mg
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	34mg
寒天	15g
pH5.5、1000ml処方	

MPN agarの組成

ラクトース	2g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1g
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	10g
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5g

菌体調製

抗発癌乃至抗変異原剤等として使用の本発明微生物の生菌体及び死菌体の各調製法の1例を示せば次の通りである。

## 1. 生菌体調製例

前記各微生物等の菌株を前述のロゴサ液体培地(Lactobacillusの場合)若しくはGAM液体培地(Bifidobacteriumの場合)5ℓに接種し、37℃にて8時間前者は好氣的又は嫌氣的に静置培養し、後者は嫌気培養して生菌数10<sup>9</sup>/mlの培養液をつくり、得られた培養液を12,000rpmの連続遠心分離に付し菌体を集め、生理食塩水で洗浄した後、生理食塩水に懸濁して菌液50ml(10<sup>11</sup>/ml)を得る。

## 2. 死菌体(加熱処理菌体)調製例

上記1の生菌体調製例に従って得られた菌体を生理食塩水で2回洗浄した後、生理食塩水(0.85%NaCl水溶液)に懸濁して得られる菌液50ml(10<sup>11</sup>/ml)を121℃で10分間加熱し、死菌体懸濁液を得る。

## 薬理作用

## 1. 薬理効果

後記実験例に示す通り、本発明の抗発癌剤は、ジメチルニトロソアミンの体内レベルを極めて効果的に低下せしめるものであり、したがって、消化器癌(とくに胃癌、肝臓癌)を初めとする癌の予防薬として有用なものといえる。

本発明剤は又、経口、静注等の手段で適用され得、その用量は通常0.1mg~10g/kg体重、より好ましくは1mg~1g/kg体重程度であり、その剤型としては、生理食塩水等への懸濁液剤、凍結乾燥等による粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤等々、通常の剤型を適当なキャリア、増量剤、希釈剤等と共に適宜選択使用し得る。

## 2. 急性毒性

後記実験例に示す通り、本発明剤のLD<sub>50</sub>値は生菌体より成るもの場合3.9~7.2mg/マウス(腹腔内投与)、死菌体より成るもの場合はいずれの菌にあっても50mg/マウス(腹腔内投与)以上である。

又、経口投与の場合は生菌体、死菌体とも実質的に無毒性である。

## 実験例 2

B. adolescentis A D 0052、B. breve A D 0055、B. longum A D 0056の前記死菌体調製例に従って得た死菌体懸濁液について、前記実験例1と同様の方法でジメチルニトロソアミン減少量及び減少率(%)を測定した。

その結果を第6表に示す。

## 第6表

菌体名	ジメチルニトロソアミン減少量	減少率
	( $\mu$ g)	(%)
<u>B. adolescentis</u> A D 0052	57.6	72.0
<u>B. breve</u> A D 0055	43.4	54.3
<u>B. longum</u> A D 0056	40.8	50.1

なお同重量の生菌体懸濁液についても前記第6表と同様な結果を得る。

## 実験例 1

S. faecium A D 1008、S. faecalis A D 9005、S. avium A D 2007を前記死菌体調製例に従って、加熱処理菌体懸濁液を得、これを死菌体試料(菌体湿重量8mg/ml)とした。これらの試料にジメチルニトロソアミン80 $\mu$ gを添加し、37℃にて1時間反応させた後、遠心分離し、その上清につき、紫外吸収(225nm)を測定した。ジメチルニトロソアミン80 $\mu$ g添加のみの紫外吸収を100として、死菌体試料添加による減少量、及び減少率(%)を計算した。その結果を第5表に示す。

## 第5表

菌体名	ジメチルニトロソアミン減少量	減少率
	( $\mu$ g)	(%)
<u>S. faecium</u> A D 1008	53.4	66.8
<u>S. faecalis</u> A D 9005	37.9	47.1
<u>S. avium</u> A D 2007	36.8	46.0

なお同重量の生菌体懸濁液についても前記第5表と同様な結果を得る。

## 実験例 3

L. acidophilus A D 0006、L. fermentum A D 0007、L. salivarius A D 0009、L. brevis A D 0011の前記死菌体調製例に従って得た加熱処理菌体懸濁液について、前記実験例1と同様の方法でジメチルニトロソアミン減少量及び減少率(%)を測定した。

その結果を第7表に示す。

## 第7表

菌体名	ジメチルニトロソアミン減少量	減少率
	( $\mu$ g)	(%)
<u>L. acidophilus</u> A D 0006	28.2	35.2
<u>L. fermentum</u> A D 0007	24.2	30.3
<u>L. salivarius</u> A D 0009	27.3	34.1
<u>L. brevis</u> A D 0011	24.6	30.8

なお同重量の生菌体懸濁液においても前記第7表と同様な結果を得る。

## 実験例4

ICR系マウス(雄6週令、平均体重31.0±0.5g)を使用し、前記生菌体調製例に従って得られた生菌体をマウス当り10mg、1mg、0.1mgの3段階の生菌体(各群10匹)を含む生理食塩水懸濁液0.5ml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LD<sub>50</sub>値(菌体重量/マウス)を第8表に示す。

尚、死菌体の場合は、いずれの菌にあってもLD<sub>50</sub>値は50mg/マウス以上(腹腔内投与)であり、且つ経口投与ではいずれの場合でも実質的に無毒性であった。

## 第8表

<u>S. faecium</u> A D 1008	7.1 mg
<u>S. avium</u> A D 2007	7.2 mg
<u>B. adolescentis</u> A D 0052	4.4 mg
<u>B. longum</u> A D 0056	3.9 mg
<u>L. acidophilus</u> A D 0006	6.6 mg
<u>L. casei</u> A D 0008	5.0 mg

## 製剤例

1. 前記生菌体調製例に従って得られたB. adolescentis A D 0052生菌体又は死菌体の凍結乾燥物50mg(菌体数 $5 \times 10^{10}$ 個に相当)を精製でんぷん末950mgと均一に混合、打錠して経口投与用錠剤とした。この錠剤は体重50kgの成人における用量 $10^{10}$ 個/kgに相当する。
  2. 上記凍結乾燥物500mgを精製でんぷん末500mgと混合、打錠したものは、同様に用量 $10^{10}$ 個/kgに相当する。
- このように、本発明剤は前記標準用量等に基づいて、菌体と薬学的に許容され得る担体とを混合して所定の活性を有する所望の剤型とすることができる。

特許出願人 株式会社アドバンス開発研究所