

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 1/20
A61K 35/74

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97181810. X

[43]公开日 2000年3月1日

[11]公开号 CN 1246144A

[22]申请日 1997.2.14 [21]申请号 97181810. X

[86]国际申请 PCT/JP97/00401 1997.2.14

[87]国际公布 WO98/36050 日 1998.8.20

[85]进入国家阶段日期 1999.8.16

[71]申请人 日宝化学株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 田口信洋

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 谭明胜

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 具有预防及治疗肝脏损害功能的丁酸梭菌,以及由其培养物制成的肝保护剂、食品和饲料

[57]摘要

本发明提供以对肝脏损害具有治疗及预防效果的丁酸梭菌、培养该丁酸梭菌的培养液或者该培养液离心所得的含有该菌的残渣或者该残渣的干燥物为有效成分,并以含有上述物质为特征的肝保护剂;借助于给肝脏损害患者服用该肝保护剂而实施的肝脏损害的治疗及预防方法;以及含有丁酸梭菌培养物的食品和饲料。本发明中的肝保护剂,对于肝脏损害,特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害具有有效的预防或使用效果。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 对肝脏损害具有治疗及预防效果的丁酸梭菌。

2. 权利要求 1 中记载的丁酸梭菌，该丁酸梭菌为保藏编号 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株、保藏编号 FERM BP - 5795 的丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株。

3. 权利要求 2 中记载的丁酸梭菌，该丁酸梭菌为保藏编号 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株。

4. 肝保护剂，其特征在于以培养丁酸梭菌的培养液，或者该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣，或者该残渣的干燥物为有效成分且含有这种有效成分。

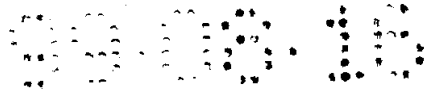
5. 权利要求 4 中记载的肝保护剂，该丁酸梭菌为保藏编号 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株、保藏编号 FERM BP - 5795 的丁酸梭菌 NIP1021 株及 ATCC 19398 株。

6. 权利要求 5 项中记载的肝保护剂，该丁酸梭菌为保藏编号 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株。

7. 权利要求 4 至 6 中任意一项所记载的肝保护剂，用于预防或治疗脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害。

8. 对肝脏损害患者给予权利要求 4 至 6 中任意一项所记载的肝保护剂，治疗或者预防肝脏损害的方法。

9. 将培养丁酸梭菌的培养液，或者该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣，或者该残渣的干燥物，以 10^{-6} ~ 1 重量% 的比例混入的食品或饲料。



说明书

具有预防及治疗肝脏损害功能的丁酸梭菌，以及由其培养物制成的肝保护剂、食品和饲料

5

技术领域

本发明涉及下列发明产物：对肝病具有预防及治疗作用的丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*），以培养该丁酸梭菌的培养液、将该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣或该残渣的干燥物为有效成份的肝保护剂，以及由上述培养液等制成的食品和饲料。具体地说，本发明涉及对肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病以及中毒性肝损害具预防及治疗作用的丁酸梭菌，以培养丁酸梭菌的培养液、该培养液经离心所得的含有丁酸梭菌的残渣或该残渣的干燥物为有效成分，以治疗及预防肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害为目的的肝保护剂，以及由上述培养液等制成的食品和饲料。

15

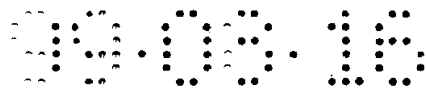
背景技术

被称作酪酸菌的丁酸梭菌是肠内细菌的一种，与其他肠内细菌一样，是一种由体内排泄到粪便中仍然保持活性的菌。此外，丁酸梭菌（下文中同样的情况下省略括号中的英文）经酪酸发酵可由糖类生成大量的酪酸，因此也是一种被应用于工业性酪酸生产的有益菌。众所周知，丁酸梭菌的培养液中可产生抗腐败菌有效因子，因此一直以来，丁酸梭菌作为具有全肠道调理作用的活菌剂，被广泛应用于以改善腹部症状为目的的医药品及饲料成分中。加之近年来在丁酸梭菌的某个菌株中发现了它的抗肿瘤作用，也有人提倡将其作为抗肿瘤免疫赋活剂来利用（特开平 06 - 292597 号）。

25

另一方面，肝脏是位于上腹部右侧、横隔膜直下方的暗褐色脏器，附属于消化道，是人体中最大的腺体，约占总体重的 1/45。此外，肝脏具有脂肪等物质的代谢、解毒、胆汁排泄、各种营养物质的贮存、造血及血液凝固、调节循环血液量等多种功能。因此，一旦肝脏发生病变，就会引起上述机能的低下，最糟糕的情况下，甚至会使生命的维系都陷入困境。肝脏就是一个如此重要的脏器。一般所提到的肝损害的原因，通常可以列举从出由病毒引发的感染、毒物或药物引起的中毒、饮酒和

30



5 饮食过度、营养障碍以及循环障碍到应激反应等比较切身的原因，其原因多种多样。除上述原因之外，近年来，为提高家畜的产量而大量使用的抗生素和营养补剂也会引起肝脏损害。遭受这种损害的肝脏可见肝肿大、边缘钝化、脂肪沉着（脂肪化）、淤血及胆汁淤滞，甚至于可见
10 肝细胞的气球样变性、肝细胞的破坏和坏死等症状。这成为倦怠、疲劳乏力感或成长期发育不良、特别是由抵抗力低下所引起的非特异性感染的原因。上述症状进一步进展，会发展为脂肪肝、肝炎及肝硬化，甚至于肝癌等严重的肝脏疾病，很多最终可能直至死亡。但是，尽管存在如此巨大的损害，由于肝脏具有很强的后备力，即便肝脏发生了一些损
15 害，也难以表现出上述的种种症状。当出现疼痛等症状时，大多病变已经进展到相当严重的地步，多数病例都错过了早期发现。

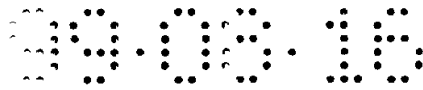
对于这种肝脏损害的治疗方法因引起损害的原因的不同而各异。如：对于酒精性肝病，应中止酒精的摄入以消除病因；对于营养过剩引起的脂肪肝，应减少脂肪的摄入量或消除肥胖；对于病毒性肝炎，应给
20 予抗病毒药物等。虽然可以举出的方法有很多，但是最佳治疗方法仍未确立。尤其是对于由服用治疗原发性疾病的药物而引起的肝脏损害，以及进展性肝脏损害，虽然十分有必要对其进行治疗，但是现在所公知的针对肝脏损害的治疗药物，却具有反应剧烈、大量或长期服用产生副作用等缺点。基于以上安全性的考虑，以现所公知的治疗药物作为保护肝
25 脏的预防药物使用，或者作为维持日常健康的健康食品来利用，这种状况看似理所应当，实际上却存在诸多的问题。

因此，基于上述背景，如果可以开发高效、安全的治疗及预防肝脏损害的肝保护剂，进一步开发借助于这种肝保护剂的治疗及预防肝脏损害的方法，更进一步，能够把具有治疗和预防肝脏损害的效果的物质应
30 用到食品或者饲料中，由此而获得的利益将不可计数。

本发明鉴于上述诸多背景而完成，其目的在于获取一种无严重副作用，具有有效预防及治疗肝脏损害的作用，且安全性高的肝保护剂。

本发明的另一目的在于提供一种无严重副作用，对肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害具有有效预防及治疗作用且安全性
35 高的肝保护剂。

本发明进一步的目的在于提供一种有效预防及治疗肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害的方法。



本发明更进一步的目的在于提供具有有效预防及治疗肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害作用，且不伴有不良反应、易于食用的食品或饲料。

发明描述

5 上述诸项目的，通过对肝脏损害有治疗及预防作用的丁酸梭菌而实现。

本发明是保藏编号为 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株、保藏编号为 FERM BP - 5795 的丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株，也就是前面所提到的丁酸梭菌。

10 本发明还包括保藏编号为 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株，也是前面所提到的丁酸梭菌。

上述诸项目的，还通过以含有丁酸梭菌培养液、或该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣、或该残渣的干燥物等有效成份为特征的肝保护剂来实现。需要说明的是，在本说明书中，凡出现“肝保护剂”的字样，均作“对肝脏损害具有预防和/或治疗作用的制剂”之意使用。

15 本发明所指的丁酸梭菌，是指保藏编号为 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株、保藏编号为 FERM BP - 5795 的丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株，也就是前面所说的肝保护剂。

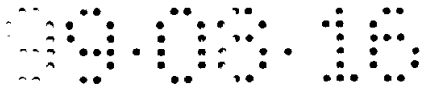
20 本发明所指的丁酸梭菌还包括保藏编号为 FERM BP - 5794 的丁酸梭菌 NIP1020 株，也是前面所说的肝保护剂。

本发明还包括以预防和/或治疗脂肪肝、酒精性肝病和中毒性肝损害为目的而使用的前述肝保护剂。需要说明的是：在本说明书中，凡出现“中毒性肝损害”的字样时，均作“由医药品、毒物及化学物质等引起的肝脏损害”之意使用。

25 上述诸项目的，还通过给肝脏损害患者服用前述的任意一种肝保护剂，由此治疗及预防肝脏损害的方法来实现。

上述诸项目的，还通过将丁酸梭菌的培养液，或该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣，或该残渣的干燥物按重量比 $10^{-6} \sim 1\%$ 加入的食品或饲料来实现。

30 本发明中的培养丁酸梭菌的培养液，或该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣，或该残渣的干燥物（以下简称以“丁酸梭菌的培养物”，或者“培养物”）具有高效的改善肝脏损害及肝保护作用，并且对哺乳



动物具高度安全性，因此在肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害的治疗和/或预防中发挥很大的作用。

5 此外，本发明中的肝保护剂，由于含有上述的丁酸梭菌的培养物，并以之为有效成分，因此对肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病及中毒性肝损害具有高效的治疗和预防作用，并且是对哺乳动物具有高度安全性的制剂。

再者，本发明中的食品及饲料，由上述丁酸梭菌的培养物制成，在确保高度安全性的前提下加入到食品或饲料中，因此是安全而有效的、具有改善肝脏损害和肝保护作用的、并且可以方便食用的食品及饲料。

10 发明的最佳实施方式

本发明的发明者们，为解决上述诸多的问题，对微生物的性质及生产进行了深入细致的研究。首先找到肝脏疾病中所见的肝肿大、脂肪沉着、炎症或胆汁淤滞等肝脏损害在动物身上发生的条件，并发现给这种动物模型服用培养丁酸梭菌的培养液，或者该培养液离心分离所得的含有丁酸梭菌的残渣，或者该残渣的干燥物，可以预防及治疗肝脏损害，从而完成了本发明。

即：本发明中的肝保护剂，其特征在于含有培养丁酸梭菌的培养液，或者该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣，或者该残渣的干燥物，以之为有效成份。

20 作为本发明中所使用的丁酸梭菌，有丁酸梭菌 NIP1019 株、NIP1020 株、NIP1021 株及 NIP1022 株，以及丁酸梭菌 ATCC 19398、ATCC 860 株等等。虽然所有的丁酸梭菌均可使用，但其中优选使用丁酸梭菌 NIP1020 株(以下有时简称以“NIP1020 株”)、丁酸梭菌 NIP1021 株(以下有时简称为“NIP1021 株”)和丁酸梭菌 ATCC 19398 株(以下有时简称为“ATCC 株”)。此外，上述的丁酸梭菌 NIP1021 株与特
25 公昭 37 - 8300 号中记载的丁酸梭菌宫入(ミセイリ)株相同，保藏编号为 FERM BP - 5795 号，于平成 9 年 1 月 23 日保藏在日本国茨城县筑波市东 1 条街 1 号 3 室的通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所。

30 在此说明一下本发明中优选使用的丁酸梭菌 NIP1020 株的细菌学性质。

(a) 形态

1) 细胞形状及大小：直线型或曲线型两端钝圆的杆菌。大小为 $0.6 \sim 1.2\mu\text{m} \times 5 \sim 10\mu\text{m}$ 。芽孢末端为在近末端处呈现卵圆形。

2) 有无运动性：有

5 3) 有无孢子：有

(b) 培养性质

1) 含有 1% 淀粉的肉汁琼脂平板培养：圆形或不规则形菌落，呈乳白色凸状隆起。菌落的大小为在 37°C 经两天培养，直径约 $2 \sim 4\text{mm}$ 。

2) 含有 1% 淀粉的肉汁液体培养：酸及气体显示酸性。

10 3) 含有 1% 淀粉的肉汁明胶琼脂平板培养：未见明胶液化。

4) 石蕊牛乳培养基：酸性、产气、凝固。

(c) 生理学性质

1) 草兰氏染色： +

2) 硝酸盐还原性： -

15 3) 吲哚的生成： -

4) 淀粉加水分解： +

5) 过氧化氢酶： -

6) 是否需氧：厌氧性

7) 生长增殖范围：pH； $5.0 \sim 8.0$

20 温度； $20 \sim 42^\circ\text{C}$

8) 能否从下列糖类生成酸：

纤维二糖： +

D - 果糖： +

D - 半乳糖： +

25 乳糖： +

麦芽糖： +

D - 甘露糖： +

蜜二糖： +

蜜三糖： +

30 鼠李糖： -

水杨苷： +

D - 山梨醇： -

蔗糖：	+
海藻糖：	+
D-木糖：	+

(d) 其他生理学性质

- 5 1) 溶血性： -
 2) 卵磷脂酶： -
 3) 发酵产物： 酪酸、醋酸

10 本菌依照《巴吉氏细菌学分类手册》第9版 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th) 进行分类, 当归属于丁酸梭菌类。关于这种丁酸梭菌, 正如下面实施例中所记载的, 当研究其对肝脏损害的预防和治疗效果时, 可知其与公知的菌株 (丁酸梭菌 NIP1021 株和丁酸梭菌 ATCC 19398 株) 相比较, 对肝脏损害的治疗效果有显著性提高。据此认为上述菌株为新的微生物, 将其命名为丁酸梭菌 NIP1020 株, 平成9年1月23日保藏在日本国茨城县筑波市东1条街1号3室的通商
 15 产业省工业技术院生命工学工业技术研究所, 保藏编号为 FERM BP - 5794。

此外, 丁酸梭菌作为活菌剂、饲料添加剂、甚至于食品在市场上大量销售, 人和家畜等哺乳动物长期服用未见任何副作用, 保证了它的高度安全性。

20 本发明中的丁酸梭菌培养物, 即“培养丁酸梭菌的培养液、该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣、及该残渣的干燥物”, 可以按既知的微生物培养方法获得。例如特愿平 08 - 252088 号所公开的方法。其实施方式如下所示: 将丁酸梭菌按 $10^5 \sim 10^6$ 个/ml 的量接种于由 1.0 (w/v) % 蛋白胨、1.0(w/v) % 酵母浸膏、1.0 (w/v) % 玉米淀粉及
 25 0.2 (w/v) % 碳酸钙制成的培养基中, 经 37°C 48 小时静置培养, 即可得“丁酸梭菌培养液”; 接下来, 将所得的丁酸梭菌培养液离心 ($2000 \sim 6000\text{g} \times 10 \sim 30$ 分钟), 即可分离出“将培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣”; 将该残渣置于 $0 \sim 80^\circ\text{C}$, 优选 $10 \sim 20^\circ\text{C}$, 通过 1 ~ 24 小时优选 5 ~ 18 小时风干等进行干燥处理, 或者置于 0 ~
 30 80°C , 优选 $10 \sim 20^\circ\text{C}$ 、以 0.05 ~ 500 Torr, 优选 1 ~ 100 Torr, 经 1 ~ 24 小时, 优选 2 ~ 15 小时的减压干燥处理, 即可得“该残渣的干燥物”。



本发明中培养丁酸梭菌所使用的培养基，依使用的菌株种类等不同而有所差异，但只要是含有可供所使用的丁酸梭菌生长所需的碳源、适量氮源、无机盐及维生素类等其他营养成分的培养基，无论是合成培养基还是天然培养基都可以。

5 比如，本发明的培养基中所使用的碳源，只要是可使所选用菌株正常生长的碳源，其他并无特殊限制。作为碳源，虽不一定必须是糖，但考虑到菌体的增殖，最好使用细菌可以利用的糖或者含糖的物质。考虑到生长性可以使用的碳源具体有以下几种：纤维二糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蜜二糖、蜜三糖、水杨苷、淀粉、蔗糖、海藻糖、木糖、糊精及糖浆等。这些碳源当中，优选使用淀粉、葡萄糖、果糖、蔗糖及糖浆。将上述列举的碳源结合所使用的丁酸梭菌进行考虑，选择其中的1种或2种以上均可。此时碳源的添加浓度依所选用的丁酸梭菌和碳源的种类以及所使用培养基中除碳源外的其它培养基组分的不同而各异，但通常是0.5~5 (w/v) %，优选2~4 (w/v) %。

15 作为氮源和维生素类，可以列举如下：肉浸膏、蛋白胨、酵母浸膏、化学酱油等大豆和小麦的水解产物、大豆粉、乳酪素、酪蛋白水解产物、各种氨基酸、玉米浸泡液的浓缩液、其他的动物、植物、微生物的水解产物等有机氮化合物及硫酸铵等铵盐。这些氮源中，优选使用蛋白胨、酵母浸膏、肉浸膏、玉米浸泡液的浓缩液及化学酱油。为提高所选用丁酸梭菌的生长增殖，可从上述列举的氮源中选取1种或2种以上。此时氮源的添加浓度，依所选用的菌株和氮源的种类以及所使用的培养基中除氮源以外其它培养基组分的不同而各异，在使用氮源含量较高的蛋白胨时，通常浓度为0.5~4 (w/v) %，优选1~3 (w/v) %。当使用氮源及维生素类含量较高的酱油或玉米浸泡液的浓缩液时，通常为25 0.5~5 (w/v) %，优选1~4 (w/v) %。而且当使用维生素含量较高的酵母浸膏或肉浸膏时，通常浓度为0.5~4 (w/v) %，以1~3 (w/v) %较为理想。

30 作为无机盐，可从镁、锰、钙、钠、钾、钼、锶、硼、铜、铁、锡和锌等的磷酸盐、盐酸盐、硫酸盐、酪酸盐、丙酸盐及醋酸盐等中选用1种或者2种以上。此外，根据需要，培养基中还可适当添加消泡剂、植物油、表面活性剂、血液或血液成分、维生素类、抗生素等药物、植



物和动物激素等等生理活性物质。

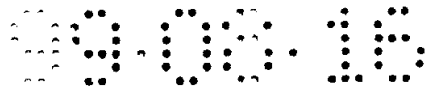
5 本发明中所使用的培养条件，因本发明中所选用的丁酸梭菌的生殖范围（pH值和温度等）等生理学的性质而异，但由于丁酸梭菌为专性厌氧性，因此必须在密闭，或通以氮气或二氧化碳，或在培养基中加入还原剂以使氧化还原电位下降等所造成的厌氧条件下培养。此时的培养条件需据选用菌株的生长增殖范围、培养基的组成和培养方法等进行适宜选择，只要是可使本菌株增殖的条件，并无其他特殊限制。具体地讲，培养温度为20~40℃，优选35~40℃。

10 此外，本发明丁酸梭菌的培养过程中，用碱中和培养中产生的酸可促进细菌的生长，因此，最好预先在培养基中添加碳酸钙。此时碳酸钙的添加量为0.1~4（w/v）%，优选0.2~2.5（w/v）%。另外在上述中和反应过程中，最好使用氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钾和碳酸钾等碱性溶液，使培养基的pH值控制在设定的pH值范围内进行反应。当使用碱性溶液时，所谓“设定的pH值”，是指培养期间预先设定的培养基的pH值；“设定的pH范围”，是指培养期间所容许的pH范围，一般用设定pH值±容许差表示。据本发明，设定的pH值通常为5.0~7.5，优选5.5~6.5；设定的pH范围，为设定pH±0.5，优选设定pH±0.2。

20 本发明中进行培养期间的pH值，在细菌接种时为近中性，优选6.5~7.5。在使用碱性溶液的情况下，为不使氧气混入，最好边缓慢搅拌边维持设定pH范围。如此控制住细菌接种和细菌增殖时的pH值，就可使细菌密度飞速增高。

25 在本发明的培养过程中，丁酸梭菌的初期培养浓度只要在丁酸梭菌的生长增殖范围内即可，并无特殊限制，与通常丁酸梭菌的培养中所使用的浓度相同。具体地讲，一般为 $10^4 \sim 10^7$ 个/ml，优选 $10^5 \sim 10^6$ 个/ml。

30 由以上方法所得的丁酸梭菌的培养物，特别是丁酸梭菌NIP1020株的培养物，对于由于酒精摄入、有机溶剂、药剂、病毒、应激反应、营养不足或营养过剩等因素引起的肝肿大、边缘钝化、脂肪沉积（脂肪化）、淤血及胆汁淤滞、特别是肝细胞的气球样变性、肝细胞的破坏和坏死等肝脏损害，尤其是脂肪肝、酒精性肝病和中毒性肝损害，具体良好的预防及治疗效果。



本发明中的肝保护剂，可以直接以上述丁酸梭菌培养物形态，或者将上述丁酸梭菌培养物配合以制药中允许的载体，以经口给药或非经口给药的组成物的方式给予患者（家畜、家禽和人等哺乳动物，还包括鱼类在内）。本剂经口服用时，将上述丁酸梭菌培养物与适当的添加剂混合，比如：乳糖、蔗糖、甘露糖、玉米淀粉、合成或天然树脂、及结晶纤维素等赋形剂；淀粉、羧甲基纤维素和甲基纤维素等纤维素衍生物；阿拉伯糖胶、明胶、及聚乙烯吡咯烷酮等粘合剂；羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠、淀粉、玉米淀粉、碳酸氢钠及海藻酸钠等崩解剂；滑石粉、硬脂酸镁、硬脂酸钠等润滑剂；以及碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙及磷酸钠等填充剂或稀释剂。可制成片剂、散剂（粉末）、丸剂或颗粒剂等固体剂型。此外，经口给药的肝保护剂可也制成胶束剂的形式，此时所使用的胶束，可选用硬质或者软质的明胶胶束。也可将这些固体制剂用羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸盐、羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯、纤维素乙酸邻苯二甲酸盐和间丙烯酸酯共聚物等包衣材料，进行肠溶性包衣。此外，本发明中的丁酸梭菌培养物，可用纯净水等一般常用的非活性稀释剂；或者三癸酸甘油酯、三醋酸甘油酯等甘油酯类；或者乙醇等醇类溶剂制成混悬液。根据需要，也可在此溶液中适当添加浸润剂、乳化剂、助分散剂或表面活性剂、甜味剂、食用香精或芳香物质等，以制成糖浆或者配剂等液体制剂。

另外，在本发明中的肝保护剂非经口给药的情况下，可将上述的丁酸梭菌培养物与纯净水、磷酸缓冲液等适当的缓冲液、生理盐水、林格溶液和洛克(tocke)溶液等生理性盐类溶液、乙醇、丙二醇、甘油以及惯用的防腐剂、稳定剂和表面活性剂等适当混合，制成无菌水溶液或非水溶液、混悬液、脂质体或乳剂，使之成为液体制剂。此时液体制剂的 pH 值最好在生理学范围内，优选 6~8 范围内的 pH 值。此外，本发明中的肝保护剂，还可采用公知的方法，制成软膏，洗剂或者霜剂等经皮外用制剂。

另外，本发明中的肝保护剂，还可以使用由碳酸氢钠、硼酸等配成的近中性或者 pH 值为 3~7 的缓冲液，根据需要，可加入防腐剂、稳定剂、渗透压调节剂等，制成点眼剂型。

此外，本发明中的肝保护剂，还可以包埋入丸剂，或者使用明胶软胶束等栓剂基质制成栓剂给予患者。

主治医师可从上述的各种给药方式和给药途径中，选择理想的给药方式和给药途径。

5 本发明中的肝保护剂中所含丁酸梭菌培养物的浓度，因给药方式，病变种类和危重程度以及用药目的所决定的给药量等因素的不同而各异，但一般相对于原料的总重量，菌体的重量约为 0.1 ~ 50 重量%，以 1 ~ 10 重量% 的范围内较为优选。尤其是本发明制剂经口给药的情况下，菌体重量占原料总重量的 0.1 ~ 50 重量%，最好是在 1 ~ 10 重量% 的范围内；在非经口给予的情况下，菌体重量占原料总重量的 0.1 ~ 50 重量%，最好是在 1 ~ 10 重量% 的范围内。此时如果丁酸梭菌培养物的浓度超过了上述上限值，就无法得到均匀的给药量，效果不理想；
10 与之相对，如果丁酸梭菌培养物的浓度不满上述下限值，就无法得到利用本发明所应当得到的病变改善效果，效果也不理想。

本发明中肝保护剂的用量，因患者年龄、体重及症状、用药目的所决定的用药方式和方法、治疗效果及用药时间等因素而不同，正确的用量应由医师来决定。具体地讲，在本发明中肝保护剂经口给予的情况下，将丁酸梭菌培养液作为培养物使用时，通常用量为 0.01 ~ 10ml/kg 体重/次，最好是在 0.1 ~ 2ml/kg 体重/次的用量范围内。此外，以该培养液离心所得的菌体、提取物、精制物质或其干燥物作为培养物使用时，通常用量为 0.01mg ~ 1g/kg 体重/次，最好是在 1mg ~ 0.1g/kg 体
20 重/次的用量范围内。分别每日给药 1 ~ 6 次，最好每日给药 1 ~ 3 次。此时当 1 日给药量较大的情况下，也可将每次用量分为几个片剂等制剂分别级药。在本发明中肝保护剂非经口给予的情况下，将菌体重量进行换算，通常为 0.01mg ~ 1g/kg 体重/次，最好在 1mg ~ 0.1g/kg 体重/次的用量范围内，每日给药 1 ~ 6 次，最好分 1 ~ 3 次给药。

25 本发明的其他特征之一，是将培养丁酸梭菌的培养液，或该培养液离心所得的含有丁酸梭菌的残渣，或者该残渣的干燥物，按 10^{-6} ~ 1 重量% 的比例，最好是按 10^{-6} ~ 0.1 重量% 比例混入的食品以及饲料。本发明中上述混入方式有两种：可将预先定量的培养物混入食品、饮用水或者饲料中；也可在摄取时将定量的培养物混入食品、饮用水或者饲料
30 中。

在本发明中，培养物的含量为 10^{-6} ~ 1 重量%。若不满 10^{-6} 重量%，将无法获取理想的肝脏损害改善和保护效果；而超过 1 重量%，作为食

品，又很可能会影响到味觉、风味和口感，效果也不理想。

与本发明相关的食品可举例如下：酸奶、乳酪等乳制品；鱼糕、鱼肉串、鱼肉小芋丸子、油炸鱼丸、海带鱼肉卷、余鱼肉丸子等水产糜制品；鱼肉松等鱼贝类加工品；红肠、法式小香肠、肝酱等肉类加工食品；豆腐、烤豆腐、过油豆腐、油炸豆腐、掺菜油炸豆腐、豆腐渣、冻豆腐、豆腐皮等豆制品；（法式）浓汤等蔬菜加工品；土豆泥、葛粉、粉丝、魔芋、细粉条等薯类加工品；年糕、元宵、白米饭、面筋、米粉、通心粉、意大利细面条、挂面、荞麦面、切面、中式面条、主食面包、面包干、夹心面包等谷类加工品；果酱等甜制品；黄油、人造奶油、蛋黄酱、调味品等油脂类食品；饴糖、糯米炒面甜点、酥脆饼干、烤年糕丁、蛋糕、羊羹、糯米豆馅点心、包子、豆馅年糕、江米团、米粉糕、巧克力、饼干、曲奇饼、多福饼、滤饼、馅饼、冰激淋、布丁、奶油夹心蛋卷、口香糖等点心类食品；豆腐、果冻、魔芋、冻粉和洋粉等凝胶状食品；海带、裙带菜、紫菜、石花菜等海草类食品等。即包括通常所能食用的所有食品。

与本发明相关的饲料，包括猪、牛、绵羊、山羊等家畜；狗、猫、兔和田鼠等宠物；家禽以及鱼类等通常所饲料动物的全部所用饲料。

以下对本发明中的丁酸梭菌 NIP1020 株、丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株进行相关的毒性试验，以确定其安全性：将丁酸梭菌 NIP1020 株、丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株分别以大约 10^6 个/ml 的量接种于由 1.0 (w/v) % 的蛋白胨、1.0 (w/v) % 的酵母浸膏、1.0 (w/v) % 的玉米淀粉及 0.2 (w/v) % 碳酸钙制成的培养基中，经 37 °C 48 小时静置培养，将所得培养液离心 (4,000g × 20 分钟) 分离菌体后，将菌体干燥处理 (15 °C, 20 Torr, 经 12 小时减压处理) 即可得到菌体干燥末。将该菌体干燥末以 1 : 10^5 的重量比混合于小鼠饲料 (东方酵母工业株式会社产生，产品名为：MF) (以下简称“小鼠饲料”) 中，制成调制饲料。将 4 周龄的 ddy 系小鼠 (雄性，体重 17 ~ 20g) 五只为一组事先饲料于同一鼠笼中，给予上述小鼠饲料饲养 3 天后，给予上述经调制后的调制饲料饲养 6 个月。同时设“未给药组”，即除以单纯小鼠饲料代替调制饲料外，其他饲养条件均一致，作为比较对照。所有试验组小鼠的摄食量均为 3 ~ 8g/日/只。结果如下表 1 所示：

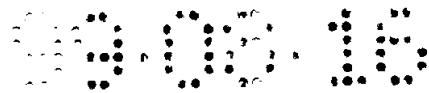


表 1

(n = 5)	NIP1020 株 (给药组)	NIP1021 株 (给药组)	ATCC 株 (给药组)	(未给药组)
开始	18.74±0.70	18.84±0.46	19.02±0.48	18.38±0.36
服用 1 个月	39.74±3.99	39.46±3.77	39.92±1.61	38.48±3.57
服用 2 个月	45.50±2.15	44.30±6.62	44.50±1.93	44.26±4.89
服用 3 个月	47.36±5.10	46.50±3.81	46.68±3.22	46.84±5.47
服用 4 个月	49.69±5.45	48.90±4.50	49.62±3.01	48.68±5.30
服用 5 个月	51.96±5.76	51.12±4.46	52.66±4.76	51.70±4.88
服用 6 个月	54.92±4.08	53.24±4.79	53.86±5.62	53.92±4.63
服用结束后 6 个月	56.80±4.97	57.24±5.23	56.28±4.23	56.32±4.61

5 如表 1 所示, 本发明中优选使用的 3 个菌株, 对小鼠体重及生存状态的影响, 均与未给药组无差异, 因此可以认为, 上述 3 个菌株均具有安全性。

下面结合下述实施例对本发明进行更为具体的说明。需要指明的是, 本发明并不局限于这些实施例。

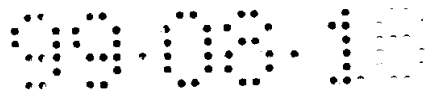
实施例 1

10 将丁酸梭菌 NIP1020 株、丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株, 分别以大约 10^6 个/ml 的量接种于由 1.0 (w/v)% 的蛋白胨, 1.0 (w/v)% 的酵母浸膏、1.0 (w/v)% 的玉米淀粉及 0.2 (w/v)% 的碳酸钙制成的培养基中, 经 37 °C 48 小时 (静置或者振荡) 培养。将所得培养液离心 (4000g × 20 分钟) 分离出菌体后, 将菌体经干燥处理 (15 °C, 20 Torr, 12 小时减压处理), 调制出各株菌体的干燥粉末。

实施例 2

20 进行下述实验, 以观察本发明中的菌株 (NIP1020 株、NIP1021 株和 ATCC 株) 对由乙醇所致肝脏损害的预防效果。

叙利亚仓鼠 (体重 100 ~ 160g, 每组 3 只) 除未给药组 (B 组) 每日 2 次强制以水 0.6ml 灌胃, 同时使动物自由饮水外, 其余各组 (A、



C、D、E及F组)均作如下处理3个月,以制成由乙醇引起的肝脏损害的动物模型:每日2次强制以25(w/v)%乙醇水溶液0.6ml灌胃的同时,使动物自由饮取由5(w/v)%乙醇水溶液制成的饮水。此外,在本实验期间,各动物组分别给予以下各种不同饲料饲养。

5 A组:东方酵母工业株式会社生产,产品名为MF的仓鼠饲料(以下简称“仓鼠饲料”)(阴性对照组)

B组:仓鼠(用)饲料(未处理组)

10 C组:仓鼠饲料每1kg加入实施例1中所调制的NIP1020株干燥粉末10mg,混合得到的调制饲料(NIP1020株给予组)。且试验期间仓鼠的摄食量为每日5~30g左右。

D组:仓鼠饲料每1kg加入实施例1中所调制的NIP1021株干燥粉末10mg,混合得到的调制饲料(NIP1021株给予组)。且试验期间仓鼠的摄食量为每日5~30g左右。

15 E组:仓鼠饲料每1kg加入实施例1中所调制的ATCC株干燥粉末10mg,混合得到的调制饲料(ATCC株给予组)。且试验期间仓鼠的摄食量为每日5~30g左右。

20 F组:熊脱氧胆酸为现所公认的肝功能改善剂,以每1kg仓鼠饲料混入10mg熊脱氧胆酸的量加入熊脱氧胆酸的乙醇溶液(0.1mg/cc99、5%乙醇),充分吸收后风干得到的调制饲料(熊脱氧胆酸给予组)。且试验期间仓鼠的摄食量为每日5~30g左右。

25 3个月的处理结束后,各处理组通过触诊以观察其上腹部的肿块,A组发现肿块,B组和C组虽未发现上腹部肿块,但D组、E组和F组却发现了上腹部的轻度肿块。各组的肝脏病理所见:每100g体重的肝脏容积(ml/100g体重)、边缘钝化程度以及脂肪沉积的观察结果如下表2所示:

表 2

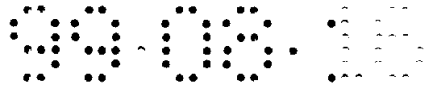
处理 (组)	肝肿大 (肝容积 ml/100g 重量)	边缘钝化 (检出只数/处理只数)	脂肪 (沉积) (检出只数/处理只数)
A	5.74±0.09	2/3	2/3
B	5.05±0.05	0/3	0/3
C	5.09±0.16	0/3	0/3
D	5.25±0.07	2/3	1/3
E	5.30±0.22	1/3	1/3
F	5.54±0.09	2/3	2/3

由表 2 可知，本发明中的 NIP1020 株给予组 (C 组)、NIP1021 株给予组 (D 组) 及 ATCC 株给予组 (E 组) 与阴性对照的 A 组相比较，均可显著抑制肝脏肿大及脂肪沉积，而且其抑制效果与已知的肝功能改善剂熊脱氧胆酸相当或者更佳，由此提示：本发明中的 NIP1020 株、NIP1021 株及 ATCC 株培养物，对于乙醇所引起肝脏损害 (酒精性肝病) 具有有效的预防作用。此外，本实施例所使用的菌株中，特别是 NIP1020 株给予组 (C 组) 抑制肝肿大、边缘钝化及脂肪沉着的效果甚至与未处理组 (B 组) 完全相当，从而预示以本发明中的 NIP1020 株培养物为有效成份，含有这种有效成份的组合物很有可能成为酒精性肝病有效的预防药物。

15 实施例 3

进行下列实验，以观察本发明中的菌株 (NIP1020 株、NIP1021 株和 ATCC 株) 对四氯化碳引起的肝脏损害的预防效果。

叙利亚仓鼠 (体重：100~160g，每组 4 只)，除每周 2 次单独给予石蜡油 0.2ml 皮下注射，共计 6 个月的对照组 (H 组) 外，其余各 20 组 (G、I、J、K 和 L 组) 的叙利亚仓鼠 (100~160g，每组 4 只) 均作如下处理 6 个月，以制成由四氯化碳引起的肝脏损害动物模型：每周 2 次由皮下注射四氯化碳的石蜡油混合液 0.2ml，共计 6 个月。前 4 个月内注射浓度为 2.5mg/0.2ml，接下来 1 个月内注射浓度为 3.2mg/0.2ml，最后 1 个月内注射浓度为 4.0mg/0.2ml。此外本实验期间，



各动物组分别给予以下各种不同的饲料饲养。

G组：仓鼠用饲料（阴性对照组）

H组：仓鼠用饲料（空白对照组）

5 I组：每 kg 仓鼠饲料加入实施例 1 中调制所得的 NIP1020 株干燥粉末 10mg，混合得到的调制饲料（NIP1020 株给予组）。且试验期间仓鼠的摄食量为每日 5～30g 左右。

J组：每 kg 仓鼠用饲料加入实施例 1 中调制所得的 NIP1021 株干燥粉末 10mg，混合得到的调制饲料（NIP1021 株给予组）。且试验期间仓鼠的摄食量为每日 5～30g 左右。

10 K组：每 kg 仓鼠饲料中加入实施例 1 中调制所得的 ATCC 株干燥粉末 10mg，混合得到的调制饲料（ATCC 株给予组）。且试验期间仓鼠的摄食量为每日 5～30g 左右。

15 L组：现所公认的肝功能改善剂熊脱氧胆酸，以每 1kg 仓鼠饲料混入 10mg 的量，加入熊脱氧胆酸的乙醇溶液（0.1mg/cc 99.5%乙醇）、充分吸收后风干得到的调制饲料（熊脱氧胆酸给予组）。且试验期间仓鼠的摄食量为每日 5～30g 左右。

6 个月的处理结束后，观察各处理组动物的肝脏病理所见（上腹部肿块，边缘钝化、肝脏白色化、脂肪沉积、胆汁淤滞及炎症），G 组 6 个月后触诊可见上腹部肿块，还确认出现边缘钝化、肝脏白色化、脂肪沉积、胆汁淤滞及炎症表现，可以确认四氯化碳引起了明显的肝脏损害。此外，I 组和 L 组几乎未见到上腹部肿块，边缘钝化、肝脏白色化、脂肪沉积、胆汁淤滞及炎症表现；但 J 组及 K 组可见上腹部轻微肿块，边缘钝化现象也较多见。详细结果如下表 3 所示：

25

30

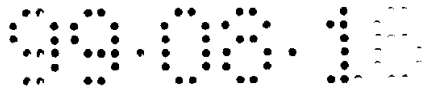


表 3

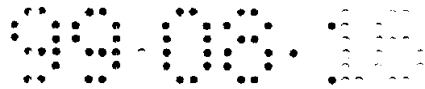
处理(组)	肝肿大 (肝容积 ml /100g 体重)	边缘钝化 (检出只数/ 处理只数)	脂肪沉积 (检出只数/ 处理只数)	胆汁淤滞 (检出只数/ 处理只数)	炎症 (检出只数/ 处理只数)
G	5.70±0.16	4/4	2/4	1/4	3/4
H	5.09±0.05	0/4	0/4	0/4	0/4
I	5.13±0.13	1/4	0/4	0/4	0/4
J	5.29±0.13	2/4	0/4	0/4	0/4
K	5.26±0.24	1/4	0/4	0/4	1/4
L	5.13±0.10	1/4	1/4	0/4	0/4

由表 3 可知, 本发明中的 NIP1020 株给予组 (I 组)、NIP1021 株
5 给予组 (J 组) 和 ATCC 株给予组 (K 组) 与阴性对照的 G 组相比较,
均可显著抑制肝脏肿大、边缘钝化、脂肪沉积、胆汁淤滞及炎症, 而且
虽然 NIP1021 株组 (J 组) 和 ATCC 株 (K 组) 对肝肿大的抑制效果
稍差, 但整体上讲其抑制效果却与已知的肝功能改善剂熊脱氧胆酸相当
或者更佳。由此提示: 本发明中的 NIP1020 株、NIP1021 株及 ATCC
10 株的培养物, 对于四氯化碳引起的肝脏损害 (脂肪肝和中毒性肝损害)
具有有效的预防作用。此外, 本实施例所使用的菌株中, 特别是 NIP1020
株给予组 (I 组), 与空白对照组 (H 组) 和熊脱氧胆酸给予组 (L 组)
相比较, 几乎可见同等的肝肿大、边缘钝化、脂肪沉着、胆汁淤滞及炎
15 症的抑制作用, 从而预示以本发明中的 NIP1020 株培养物为有效成份,
含有这种有效成份的组合物很有可能成为脂肪肝和中毒性肝损害的有效
预防药物。

实施例 4

对实施例 2 和 3 中确认具有特别优良的预防效果的 NIP1020 株进行
20 下述实验, 以观察其对由四氯化碳引起的肝脏损害的治疗效果。

将叙利亚仓鼠 (100 ~ 160g) 进行与实施例 2 中相同的处理, 以
制成由四氯化碳引起的肝脏损害动物模型。给予 6 个月的四氯化碳后,
将腹部出现肿块的仓鼠分为两组 (每组 4 只), 一组单纯给予仓鼠饲料



饲养 1 个月 (M 组: 给予四氯化碳后的正常饲养组); 另一组给予每 1kg 仓鼠饲料加入实施例 1 中调制所得的 NIP1020 株干燥粉末 10mg 混合而成的调制饲料饲养 1 个月 (N 组: 给予四氯化碳后的 NIP 株给予组)。

- 5 此外, 在上述实验中, 四氯化碳给予期间除以每 1kg 仓鼠饲料加入实施例 1 中调制所得的 NIP1020 株的干燥粉末 10mg, 混合成的调制饲料饲养外, 其余重复相同的实验, 进行 6 个月的四氯化碳处理。将处理后的仓鼠分为 2 组(每组 4 只); 一组为 O 组, 单纯以仓鼠饲料饲养 (NIP 处理四氯化碳给予后的正常饲养组); 另一组以每 kg 仓鼠饲料加入实施例 1 调制所得的 NIP1020 株的干燥粉 10mg, 混合而成的调制饲料饲养 (NIP 处理四氯化碳给予后的 NIP 株给予组)。分别饲养 1 个月。

10 按预定时间结束饲养后, 同实施例 3, 观察肝脏的表现。结果如表 4 所示:

15

表 4

处理(组)	肝肿大 (肝容积 ml /100g 体重)	边缘钝化 (检出只数/ 处理只数)	脂肪沉积 (检出只数/ 处理只数)	胆汁淤滞 (检出只数/ 处理只数)	炎症 (检出只数/ 处理只数)
H	5.09±0.05	0/4	0/4	0/4	0/4
M	5.79±0.42	4/4	4/4	3/4	4/4
N	5.38±0.32	2/4	4/4	2/4	4/4
O	5.01±0.14	1/4	2/4	1/4	2/4
P	5.13±0.28	1/4	2/4	0/4	1/4

20 由表 4 可知, M 组与实施例 3 中 G 组的结果相比较, 可见停止给予损伤肝脏的四氯化碳后, 由其引起的肝脏损害症状继续发展; 但从 N 组的结果看, 即便已由四氯化碳引起了肝脏损害之后, 再给予本发明中的 NIP1020 株培养物, 也可见到肝肿大、边缘钝化及胆汁淤滞等症状的减轻, 从而提示给予 NIP1020 株培养物, 即便对高度的肝脏损害也有效果。而且由表 4 O 组及 P 组的结果来看, 若给予四氯化碳的同时给予含有 NIP1020 株培养物的饲料, 那么即便在停止给予四氯化碳的同时停止

NIP1020 株培养物的摄取，M 组与 N 组相比较肝脏也几乎未遭到损害；特别是本实验整个期间每日均给予 NIP1020 株培养物组（P 组），具有彻底的肝脏保护作用。因此，本发明中的 NIP1020 株培养物对于四氯化碳引起的肝脏损害（脂肪肝和中毒性肝损害）具有有效的治疗作用，从而预示，以本发明中的 NIP1020 株培养物为有效成分，含有这种有效成分的组合物很有可能成为脂肪肝和中毒性肝损害的有效治疗药物。

工业实用性

如上所述，本发明中的丁酸梭菌，是具有高度肝损害改善作用和肝保护作用的一种新的微生物。因此，与本发明相关的丁酸梭菌，特别是丁酸梭菌 NIP1020 株、丁酸梭菌 NIP1021 株及丁酸梭菌 ATCC 19398 株的培养物，在治疗和/或预防肝脏损害的制剂以及健康食品及饲料中用途非常广大。

此外，本发明中的肝保护剂，因含有上述丁酸梭菌的培养物，以之为有效成分，具有高度的肝脏损害预防作用以及肝脏损害治疗作用，而且对哺乳动物具有高度安全性，因此在肝脏损害，特别是脂肪肝、酒精性肝病和中毒性肝损害的治疗和/或预防中具有非常有效的使用价值。

再者，本发明中的食品及饲料，因由上述丁酸梭菌的培养物制成，在确保具有高度安全性和肝脏损害改善作用以及肝脏保护作用的前提下，混入公知的食品中，因此其优点是不伴有不快感，可易于食用。