



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102604854 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201110404611. 9

C12R 1/225(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 12. 07

(56) 对比文件

(66) 本国优先权数据

CN 101328468 A, 2008. 12. 24, 全文.

201010578754. 7 2010. 12. 08 CN

WO 2009/122042 A2, 2009. 10. 08, 全文.

(83) 生物保藏信息

刘颖等. 鼠李糖乳杆菌 LT22 对小鼠免疫功能的影响. 《食品科技》. 2010, 第 35 卷 (第 3 期), 19-22.

DSM24230 2010. 11. 19

DSM24229 2010. 11. 19

(73) 专利权人 益擎生技术有限公司

Yueh-Ting Tsai et al. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain

地址 中国台湾新北市中和区景平路 200 号 9 楼之 3

lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101. 《International Journal of Food Microbiology》. 2008, 第 128 卷 (第 2 期), 219-225.

专利权人 财团法人食品工业发展研究所

(72) 发明人 陈庆源 邱雪惠 宋璧君 庄雅惠

(74) 专利代理机构 北京连和连知识产权代理有限公司 11278

审查员 李影

代理人 贺小明

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

A23L 1/30(2006. 01)

A61K 35/74(2006. 01)

A61P 37/02(2006. 01)

A61P 37/08(2006. 01)

A61P 11/06(2006. 01)

A61P 11/02(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书25页

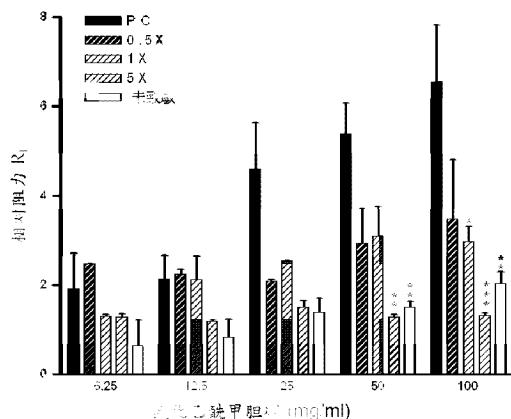
序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

新颖乳酸菌株及其调节免疫反应的用途

(57) 摘要

本发明是关于新颖乳酸菌株 MP137 及 MP108, 及其调节免疫反应的用途。特定而言, 本发明的乳酸菌株可促进 Th1 反应及抑制 Th2 反应。



1. 一种经分离的乳酸菌株,其中该乳酸菌株具有以下菌株的特性:MP137 菌株,寄存于德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ),寄存编号为 DSM24230。

2. 一种组合物,其包括如权利要求 1 的乳酸菌株。
3. 如权利要求 2 所述的组合物,其中该乳酸菌株为活菌或死菌。
4. 如权利要求 2 所述的组合物,其为粉末或胶囊形式。
5. 如权利要求 2 所述的组合物,其用于调节个体的免疫反应。
6. 如权利要求 2 所述的组合物,其用于调节个体的细胞激素的产生。
7. 如权利要求 6 所述的组合物,其用于提升个体的 IL-12 或 IFN- $\gamma$  的产生。
8. 如权利要求 6 所述的组合物,其用于提升个体的 IL-10 的产生。
9. 如权利要求 6 所述的组合物,其用于抑制个体的 IL-4、IL-5 或 IL-13 的产生。
10. 如权利要求 2 所述的组合物,其用于调节个体的免疫球蛋白(Ig)的产生。
11. 如权利要求 10 所述的组合物,其用于提升个体的 IgG2a 的产生。
12. 如权利要求 10 所述的组合物,其用于提升个体的 IgA 的产生。
13. 如权利要求 10 所述的组合物,其用于抑制个体的 IgE 的产生。
14. 如权利要求 2 所述的组合物,其用于提升个体的肠道免疫力。
15. 如权利要求 2 所述的组合物,其用于抑制个体的过敏反应。
16. 如权利要求 2 所述的组合物,其用于对抗肠道致病菌感染。
17. 如权利要求 16 所述的组合物,其中该肠道致病菌为沙门氏菌或大肠杆菌。
18. 如权利要求 2 所述的组合物,其为食品。
19. 如权利要求 2 所述的组合物,其为口服形式。

## 新颖乳酸菌株及其调节免疫反应的用途

### 技术领域

[0001] 本发明是关于新颖乳酸菌株及其用于调节免疫反应的用途。

### 背景技术

[0002] 免疫系统是身体用来抵抗外来微生物或毒素的防御系统。在免疫系统中, T 细胞受刺激后可能分化成第 1 型辅助 T 细胞 (Th1)、第 2 型辅助 T 细胞 (Th2)、以及调控型 T 细胞 (Treg)。其中, Th1 细胞主导细胞调节的免疫反应, 可分泌干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 以及促进树突细胞和巨噬细胞分泌细胞激素-12 (IL-12) 与细胞毒杀 T 淋巴细胞的增生, 有助于对抗病毒感染及癌细胞。Th2 细胞则主导体液免疫反应, 可分泌细胞激素-4 (IL-4)、细胞激素-5 (IL-5) 及细胞激素-13 (IL-13), 促使 B 细胞增生及刺激免疫球蛋白 E (IgE) 的产生, 可对抗游离的病菌; 但过度的 Th2 反应可能导致发炎及过敏反应, 例如, 气喘、过敏性鼻炎、湿疹、荨麻疹、及胃肠疾病等。另, 调控型 T 细胞是负责调节 Th1 及 Th2 细胞的平衡, 可透过分泌 TGF- $\beta$  或 IL-10 来执行此调节能力。已有报导指出调控型 T 细胞可抑制自体免疫与过敏或气喘反应, 目前认为可用于过敏疾病的预防与治疗。

[0003] 许多研究显示乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) 具免疫调节功效, 可抑制发炎或缓和异位性皮肤炎、过敏性鼻炎或气喘等过敏疾病, 其作用机制包括调节细胞激素的分泌、控制 Th1 与 Th2 反应的平衡及影响抗体的产生等。然而, 乳酸菌功效具有菌株特异性 (strain-specific effects), 根据菌株种类的不同而有不同表现, 且自然界尚有许多乳酸菌株尚未被发现或予以充分地研究。

### 发明内容

[0004] 本发明是从台湾健康幼儿粪便检体分离出新颖乳酸菌株 MP137 及 MP108, 其与现有已知的菌株不同。本发明的新颖乳酸菌株具有免疫调节功效, 特别是使个体的免疫反应趋向于 Th1 免疫反应, 抑制 Th2 免疫反应, 有助于对抗细菌感染及降低过敏反应。

[0005] 因此, 在一方面, 本发明提供一种经分离的乳酸菌株, 其中该乳酸菌株具有选自以下所组成的群的菌株的特性: MP137 菌株, 寄存于中华民国财团法人食品工业发展研究所, 寄存编号为 BCRC910484; 以及 MP108 菌株, 寄存于中华民国财团法人食品工业发展研究所, 寄存编号为 BCRC910483。特定而言, 本发明提供新颖的乳酸菌株 MP137 及 MP108。

[0006] 在另一方面, 本发明提供一种包含前述乳酸菌株的组合物。该组合物可为药物或食品, 可用于调节个体的免疫反应, 特别是促使个体的免疫反应趋向于 Th1 免疫反应, 避免 Th2 免疫反应, 更特别是降低个体的过敏反应。本发明的组合物具治疗气喘或过敏性鼻炎或对抗肠道致病菌感染的功效。

[0007] 在又一方面, 本发明亦提供一种此处所描述的乳酸菌株的用于制备用于调节个体的免疫反应、治疗气喘或过敏性鼻炎或对抗肠道致病菌感染的药物或食品的用途。

[0008] 本发明亦包括一种于所需个体调节免疫反应、提升肠道免疫力、抑制免疫反应、治疗气喘或过敏性鼻炎、或对抗肠道致病菌感染的方法, 其包括将有效量的所述乳酸菌株投

与至该个体中。

[0009] 本发明的各个具体实施例的细节说明如后。本发明的其他特征将会经由以下各个具体实施例中的详细说明及申请专利范围而清楚呈现。

[0010] 无须进一步的阐述,皆相信本发明所属技术领域技术人员基于前述说明即可利用本发明至最广的程度。因此,可以理解以下的说明仅仅是作为例示说明的用,而非以任何方式限制其余的揭露内容。

#### 附图说明

[0011] 为说明本发明的目的,图式中显示的具体实施例是目前最佳的。然而,应理解的是本发明不限于所示的具体实施例。

[0012] 图 1 系本发明分离株 MP137 在显微镜下观察到的型态。

[0013] 图 2 系本发明分离株 MP108 在显微镜下观察到的型态。

[0014] 图 3 显示实施例 3.2 的小鼠试验流程。

[0015] 图 4A 和图 4B 显示经本发明的 MP108 菌株及 MP137 处理的小鼠呼吸道阻力变化测定的结果。

[0016] 图 5 显示小鼠的肺冲洗液中发炎细胞种类分析结果,Mon 表示单核细胞、Eos 表示是酸性白血球、Neu 表示是中性白血球以及 Lym 表示淋巴球细胞。

[0017] 图 6A 和图 6B 显示实施例 4 的排除实验结果,其中图 4A 针对沙门氏菌的实验结果,以及图 4B 是针对大肠杆菌的实验结果。

[0018] 图 7A 和图 7B 显示实施例 4 的置换实验结果,其中图 7A 针对沙门氏菌的实验结果,以及图 7B 是针对大肠杆菌的实验结果。

#### 具体实施方式

[0019] 除非另有说明,否则此处使用的全部技术和科学名词与本发明所属技术领域技术人员通常所了解的意义相同。

[0020] 此处所使用的冠词“一”是指该冠词的一或一个以上(即,至少一个)的语法受词。

[0021] 本发明提供新颖乳酸菌株 MP137 及 MP108,其具免疫调节功效。MP137 菌株于 2010 年 11 月 19 日寄存于德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstraße 7B, 38124 布伦瑞克市,德国),寄存编号为 DSM24230。MP108 菌株于 2010 年 11 月 19 日寄存于德国微生物保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, Inhoffenstraße 7B, 38124 布伦瑞克市,德国),寄存编号为 DSM24229。

[0022] 本发明的乳酸菌株 MP137 及 MP108 系由台湾健康幼儿粪便来源经分离取得。经初步试验,此等菌株为革兰氏阳性杆菌(图 1 及 2),且不具触酶、氧化酶活性及运动性,不产生内生孢子,于好氧及厌氧环境下皆会生长,再进一步进行 16S rDNA 序列分析及 API 50CHL 系统鉴定,结果如 SEQ ID NO:3 及 SEQ ID NO:4 以及表 1 及表 2(实施例 2)所示。综合鉴定结果,MP137 确认为一种新颖的酪乳杆菌副干酪亚种(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) 菌株,而 MP108 确认为一种新颖的鼠李糖乳酸杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) 菌株。

[0023] 本发明的MP137及MP108菌株可以任何方式存在,包括活菌或死菌形式,亦包括具有相同特征的等同菌株及由该等菌株衍生所得的菌体或产物。

[0024] 本文所使用的“免疫调节”一词,当用于形容一物质时,是指该物质具有改变或调整至少一种免疫系统的功能的能力,包括但不限于,改变或调整免疫系统的成员细胞或作用分子(例如,细胞激素及抗体)的数量(或含量)及/或活性。相关领域已发展各种测试方法,评估一种物质的免疫调节功能。

[0025] 本文所使用的“治疗”一词包括为了治愈、愈合、减轻、舒缓、改变、矫正、改善、改进或影响该疾病、该疾病的症状、该疾病引起的残疾或罹患该疾病的倾向的目的,而将包含一或多种活性剂的组合物施用或投与至患有该疾病、该疾病的症状或有罹患该疾病的倾向的个体,或对该等个体进行其他处理。例如,根据本发明,治疗气喘或过敏性鼻炎包括施予需要的个体一活性成分,以达到降低或减缓气喘或过敏性鼻炎的症状,例如,降低呼吸道收缩现象、减少肺部发炎及改善鼻部症状(如流鼻水、鼻塞、鼻子痒、打喷嚏等)或非鼻部症状(如眼睛或耳朵痒、喉咙痒、眼睛红、流眼泪等)。

[0026] 本发明的乳酸菌株具免疫调节功效。在一具体实施例中,本发明的乳酸菌株可调节细胞激素的产生,例如,提升个体的IL-12、IL-10或IFN- $\gamma$ 的产生,以及抑制个体的IL-4、IL-5或IL-13的产生。在另一具体实施例中,本发明的乳酸菌株可调节个体的免疫球蛋白的产生,例如,提升个体的IgG2a及抑制IgE的产生。本领域具通常知识者可了解细胞激素IL-12及IFN- $\gamma$ 与免疫球蛋白IgG2a的产生代表Th1免疫反应;细胞激素IL-4、IL-5及IL-13与免疫球蛋白IgE的产生代表Th2免疫反应;以及细胞激素IL-10的产生代表调节型T细胞的活化,其负责调节Th1及Th2反应的平衡,可用于过敏疾病的预防与治疗。

[0027] 因此,本发明的乳酸菌株可促使个体的免疫反应趋向于Th1免疫反应,抑制Th2免疫反应,有助于对抗细菌感染及降低过敏反应。

[0028] 又在本发明的特定实施例中,本发明的乳酸菌株可提升个体的IgA的产生。本领域具通常知识者已知IgA在肠道免疫系统扮演重要角色,其会被分泌至肠道黏膜外,与抗原形成免疫复合物(immune complex),以此种方式防止细菌侵入。因此,本发明的乳酸菌株可提升个体肠道免疫力。

[0029] 在又一具体实施例中,本发明的乳酸菌株可对抗肠道致病菌的感染,包括但不限于沙门氏菌及大肠杆菌。在特定实施例中,本发明的乳酸菌株可抑制或取代肠道致病菌吸附于肠道上,因此,具有预防或治疗肠道致病菌感染的功效。

[0030] 此外,在另一具体实施例中,本发明的乳酸菌株可降低呼吸道阻力的产生及/或降低肺部发炎。因此,本发明的乳酸菌株尚可用于治疗气喘。气喘是一种呼吸道发炎疾病,支气管因发炎细胞及黏液增加,且管壁水肿,因此,造成呼吸道阻力增加,病患呼吸困难、胸闷,严重时造成猝死。本领域已发展出标准动物模式测试呼吸道阻力,可参见以下实施例。

[0031] 再者,本领域技术人员已知,过敏性鼻炎呈现Th2细胞增多的趋势,而且,近年来Th1/Th2免疫调节剂已为预防与治疗过敏性鼻炎的重点研究之一。根据本发明,此处所描述的乳酸菌株尚可用于对抗过敏性鼻炎。

[0032] 在一具体实施例中,本发明的乳酸菌株可与其他抗过敏药物并用。此处所述抗过敏药物可为此领域已知可用于治疗过敏的药物,特别是治疗过敏性鼻炎药物,包括但不限于抗组织胺、去充血剂及抗发炎药物(如,白三烯素拮抗剂、类固醇、肥大细胞稳定剂、色甘

酸钠、酮替芬等)。在一特定实施例中,本发明的乳酸菌株与抗组织胺并用。本发明的乳酸菌株可视需要与抗过敏药物同时使用或依序先后使用。

[0033] 在另一方面,本发明亦提供一种包含前述乳酸菌株的组合物。在一实施例中,本发明的组合物包括 MP137 菌株。在另一实施例中,本发明的组合物包括 MP108。

[0034] 特定而言,本发明的组合物可用于调节个体的免疫反应。在一具体实施例中,本发明的组合物可调节细胞激素的产生,例如,提升个体的 IL-12、IL-10 或 IFN- $\gamma$  的产生,以及抑制个体的 IL-4、IL-5 或 IL-13 的产生。在另一具体实施例中,本发明的组合物可调节个体的免疫球蛋白的产生,例如,提升个体的 IgG2a 及抑制 IgE 的产生。因此,本发明的组合物可促使个体的免疫反应趋向于 Th1 免疫反应,抑制 Th2 免疫反应,有助于对抗细菌感染及降低过敏反应。

[0035] 另,本发明的组合物尚可抑制个体呼吸道阻力的产生及 / 或降低肺部发炎,可用于治疗气喘。本发明的组合物也可用于治疗过敏性鼻炎。

[0036] 在又一具体实施例中,本发明的组合物可提升个体的 IgA 的产生,具提升个体肠道免疫力的功效。

[0037] 本发明的组合物还可用于对抗肠道致病菌的感染,包括但不限于沙门氏菌及大肠杆菌。

[0038] 典型地,本发明的组合物包含有效量的乳酸菌株,以达此处所述功效。该有效量可视各种因素而变动,例如,投用途径、个体的体重及种类,以及投予目的。技术人员可根据此处的揭示及此现有技术已建立的方法依经验决定个案的剂量。较佳地,本发明的组合物含有  $10^8$ cfu 以上的乳酸菌株。在一具体实施例中,本发明的组合物含有  $10^9$ - $10^{12}$ cfu 的乳酸菌株;特定而言,本发明的组合物含有  $2.5 \times 10^9$ - $5 \times 10^{11}$ cfu 的乳酸菌株;更特定而言,本发明的组合物含有  $5 \times 10^9$ cfu 的乳酸菌株 (cfu 代表菌落形成单位 (colony-forming unit))。

[0039] 为有利于达到所述功效及 / 或传输目的,本发明的组合物可进一步与生理上可接受的载剂调配成所需形式。此处“生理上可接受的载剂”系指该载剂与本发明组合物内所含有效成分兼容,其较佳为能稳定该活性成分并且对欲投予的个体或欲施用的环境无害。本发明的组合物可利用各种已知的常规方法与适当载剂调配成所需形式。

[0040] 生理上可接受的载剂的实施例包括但不限于赋形剂或稀释剂,例如,羧甲基纤维素钠、山梨糖醇、滑石、葡聚糖、乳糖、蔗糖、甘露醇及其类似物;黏结剂,例如,阿拉伯胶、海藻酸钠、乙基纤维素、洋菜、明胶、淀粉、羟纤维素、羟丙基纤维素及其类似物;润滑剂,包括硬脂酸、硬脂酸钙、硬脂酸镁、滑石、氢化油、蜡及其类似物;湿润剂;乳化和悬浮剂等。

[0041] 本发明组合物的形式可为锭剂、丸剂、粉末、糖锭、片剂、悬浮液、乳剂、溶剂、糖浆及软和硬明胶胶囊。在一特定实施例中,本发明的组合物系粉末形式。在另一特定实施例中,本发明的组合物系胶囊形式。此外,本发明组合物较佳以口服方式投予。

[0042] 本发明的组合物可被制成药物或食品,例如,优格、奶酪及乳酸菌粉等。本发明的组合物亦可包括其他添加物,包括但不限于,抗氧化剂,例如,生育醇、二丁基羟基甲苯、丁基羟基甲氧苯、抗坏血酸;甜味剂,例如,甜菊糖、代糖、糖精;着色剂,例如,甜菜红、栀子蓝、姜黄素;以及防腐剂,例如,钠苯酸盐、亚硫酸盐、苯甲酸、己二稀酸等。

[0043] 在一具体实施例中,本发明的组合物进一步包括一或多种其他抗过敏药物,包括但不限于抗组织胺、去充血剂及抗发炎药物(如,白三烯素拮抗剂、类固醇、肥大细胞稳定

剂、色甘酸钠、酮替芬等)。

[0044] 本发明亦提供一种套组,其包括一或多个第一剂量单位,其包括有效量的本发明的乳酸菌株,以及一或多个第二剂量单位,其包括有效量的其他抗过敏药物。特定而言,其中的乳酸菌株可与抗过敏药物同时使用或依序先后使用。

[0045] 本发明亦包括一种于所需个体调节免疫反应、提升肠道免疫力、抑制免疫反应、治疗气喘或过敏性鼻炎、或对抗肠道致病菌感染的方法,其包括将有效量的所述乳酸菌株投与至该个体中。在一实施例中,所述乳酸菌株是 MP137 菌株。在另一实施例中,所述乳酸菌株是 MP108。较佳地,所述乳酸菌株系以口服投与至所需个体中。在本发明的方法中,服用剂量可视需要予以调整。较佳地,服用剂量为每日  $10^8$ cfu 以上的乳酸菌株。在一具体实施例中,服用剂量为每日  $10^9$ - $10^{12}$ cfu 的乳酸菌株;在另一具体实施例中,服用剂量为每日  $2.5 \times 10^9$ - $5 \times 10^{11}$ cfu 的乳酸菌株;在又一具体实施例中,服用剂量为每日  $5 \times 10^9$ cfu 的乳酸菌株。

[0046] 本领域的技术人员可基于本文揭示的内容,使用任何公知方法及技术依需要调配本发明的组合物。

[0047] 本发明将由下列实施例做进一步的说明,但实际发明并不局限于此说明书所陈述的实施例。

[0048] 现在将参考下列作为说明而非限制目的的具体实施例而更明确地描述本发明。

[0049] 实施例 1 :菌株的分离及培养

[0050] 采集台湾健康幼儿粪便检体,于  $37^\circ\text{C}$  下,以乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 选择性培养基的 Rogosa 平板培养基培养 48 至 72 小时,培养得乳酸杆菌疑似菌株的各菌落。取该培养物涂布于 MRS 平板上,于  $37^\circ\text{C}$  下厌氧培养 48 至 72 小时,挑选生长于平板上的单一菌落进一步纯化,并依实施例 2 的叙述进行菌株鉴定,获得分离菌株 MP137 及 MP108。

[0051] 将分离菌株接种于 MRS 平板上,厌氧培养 48 至 72 小时后,挑取单一菌落接种至新鲜 MRS 培养液中,待菌株生长状况良好(肉眼可判断的浊度),再取 1% 菌液转移至另一新鲜 MRS 培养液中,于适合温度培养 18 至 24 小时,重复该步骤活化菌体二次,培养所得菌液供进行后续试验。

[0052] 实施例 2 :菌株鉴定

[0053] 2.1 初步分析

[0054] 依标准方式进行初步分析,结果显示本发明的分离菌株 MP137 及 MP108 为革兰氏阳性杆菌(图 1 及 2),且不具触酶、氧化酶及运动性,不产生内生孢子,于好氧及厌氧环境下皆会生长。

[0055] 2.2 16SrDNAPCR 分析

[0056] 针对本发明的分离菌株 MP137 及 MP108 进行 16S rDNAPCR 分析。使用商业套组 (AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit, Anxygen Bioscience) 抽取菌株的基因组 DNA 作为模版,在 PCR 离心管中添加正反引子 (16S-F :GGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO :1); 及 16S-R2 :AAGGAGGTGAT CCAGCCGCA (SEQ ID NO :2))、DNA 聚合酶、缓冲液、dNTPs 等试剂,含量如下 :

[0057]

基因组 DNA	1-2	L (100ng)
Taq DNA 聚合酶(Takara Co.)	0.5	L
10x 缓冲液	10	L
dNTP 混合物(2.5mM)	8	L
正向引子 16S-F (100 M)	1	L
反向引子 16S-R2 (100 M)	1	L
H <sub>2</sub> O	77.5	L
总体积	100	L

[0058] 16S rDNAPCR 反应条件包括步骤 1 :95℃, 3 分钟 ;步骤 2 :95℃, 30 秒 ;60℃, 30 秒, 72℃, 45 秒, 进行 30 个循环 ;以及步骤 3 :72℃°, 10 分钟, 最后置于 4℃ 终止反应。PCR 反应结束后, 以琼脂胶体电泳分析 PCR 产物, 再将含有预测大小的 PCR 产物片段的胶体切下, 以商业套组 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit(Geneaid Co.) 纯化, 再进行定序分析。

[0059] 将由定序所得 DNA 序列, 经由商业上可获得的计算机程序 (Vector NTI 的 config 程序, Invitrogen Co.) 整理组合, 得到正确的 DNA 序列, 再传送到 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上, 以核苷酸 BLAST 程序进行比对分析, 选取 16S rDNA 序列比对相似度最高的菌种名称做为菌株的初步鉴定结果。

[0060] SEQ ID NO :3 及 SEQ ID NO :4 为分离菌株 MP137 及 MP108 的 16SrDNA 部分序列。比对结果显示, 分离株 MP108 最接近鼠李糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、玉米乳杆菌 (*Lactobacillus zeae*)、凯氏乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、酪乳杆菌副干酪亚种 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) 与类干酪乳杆菌坚韧亚种 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*), 相似性达 98% 以上 ;而分离株 MP137 最接近酪乳杆菌副干酪亚种、类干酪乳杆菌坚韧亚种、玉米乳杆菌、凯氏乳杆菌与鼠李糖乳酸杆菌, 相似性达 98% 以上。

[0061] 2. 3API 50CHL 系统鉴定

[0062] 此外, 亦针对本发明的分离菌株 MP137 及 MP108 进行 API 50CHL 系统鉴定, 表 1 及 2 分别显示分离菌株 MP137 及 MP108 的生理生化测试结果。

[0063] 根据 API 鉴定系统分析结果, 在 49 个测试项目中, 分离菌株 MP137 与标准菌株酪乳杆菌副干酪亚种 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) BCRC 12248<sup>T</sup> 接近, 符合的项目有 43 项 (表 1)。

[0064] 表 1 分离菌株 MP137 的 API 鉴定系统分析结果

[0065]



API 50 CHL	MP137	酪乳杆菌副干酪亚种 ( <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> ) BCRC 12248 <sup>T</sup>
1. 甘油	—	—
2. 赤藓糖醇 (Erythritol)	—	—
3. D-阿拉伯糖	—	—
4. L-阿拉伯糖	—	—
5. D-核糖	+	+
6. D-木糖	—	—
7. L-木糖	—	—
8. D-侧金盏花醇 (Adonitol)	—	—
9. β-甲基-木糖苷	—	—
10. D-半乳糖	+	+
11. D-葡萄糖	+	+
12. D-果糖	+	+
13. D-甘露糖	+	+
14. L-山梨糖	+	—
15. L-鼠李糖	—	—
16. 卫矛糖醇 (Dulcitol)	—	—
17. 肌醇	—	—

[0066]

18. D-甘露醇	+	+
19. D-山梨醇	+	—
20. $\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷	—	—
21. $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷	—	—
22. N-乙酰葡萄糖胺	+	+
23. 苦杏仁苷 (Amygdalin)	—	+
24. 熊果素 (Arbutin)	+	+
25. 七叶苷 (Esculin)	+	+
26. 水杨苷	+	+
27. D-纤维双糖	+	+
28. D-麦芽糖	+	+
29. D-乳糖	+	+
30. D-蜜二糖	—	—
31. D-蔗糖	+	—
32. D-海藻糖	+	+
33. 菊糖	+	—
34. D-松三糖 (Melezitose)	+	+
35. D-棉子糖 (Raffinose)	—	—
36. 美沙酮 (Amidon)	—	—
37. 肝糖	—	—
38. 木糖醇	—	—
39. 龙胆二糖 (Gentiobiose)	+	+
40. D-松二糖 (Turanose)	+	+
41. D-来苏糖 (Lyxose)	—	—
42. D-太格糖 (Tagatose)	+	+
43. D-岩藻糖	—	—
44. L-岩藻糖	—	—
45. D-阿拉伯糖醇	—	—
46. L-阿拉伯糖醇	—	—

[0067]

47. 葡萄糖酸	—	+
48. 2-酮基-葡萄糖酸	—	—
49. 5-酮基-葡萄糖酸	—	—
49 项试验中符合的项目	43	

[0068] 此外,根据 API 鉴定系统分析结果,在 49 个测试项目中,分离株 MP108 与标准菌株鼠李糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)BCRC10940<sup>T</sup> 接近,符合的项目有 44 项(表 2)。

[0069] 表 2 分离株 MP108 的 API 鉴定系统分析结果

[0070]

API 50 CHL	MP108	鼠李糖乳酸杆菌 ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ) BCRC 10940 <sup>T</sup>
1. 甘油	—	—
2. 赤藓糖醇 (Erythritol)	—	—
3. D-阿拉伯糖	—	—
4. L-阿拉伯糖	—	—
5. D-核糖	+	+
6. D-木糖	—	—
7. L-木糖	—	—
8. D-侧金盏花醇 (Adonitol)	—	—
9. $\beta$ -甲基-木糖苷	—	—
10.D-半乳糖	+	+
11.D-葡萄糖	+	+
12.D-果糖	+	+
13.D-甘露糖	+	+
14.L-山梨糖	+	+
15.L-鼠李糖	+	+
16.卫矛糖醇 (Dulcitol)	—	—
17.肌醇	—	—
18.D-甘露醇	+	+

[0071]

19.D-山梨醇	+	+
20.α-甲基-D-甘露糖苷	—	—
21.α-甲基-D-葡萄糖苷	+	+
22.N-乙酰葡萄糖胺	+	+
23.苦杏仁苷 (Amygdalin)	—	+
24.熊果素 (Arbutin)	+	+
25.七叶苷 (Esculin)	+	+
26.水杨苷	+	+
27.D-纤维双糖	—	+
28.D-麦芽糖	+	+
29.D-乳糖	+	+
30.D-蜜二糖	—	—
31.D-蔗糖	+	—
32.D-海藻糖	+	+
33.菊糖	—	—
34.D-松三糖 (Melezitose)	—	+
35.D-棉子糖 (Raffinose)	—	—
36.美沙酮 (Amidon)	—	—
37.肝糖	—	—
38.木糖醇	—	—
39.龙胆二糖 (Gentiobiose)	+	+
40.D-松二糖 (Turanose)	+	+
41.D-来苏糖 (Lyxose)	—	—
42.D-太格糖 (Tagatose)	+	+
43.D-岩藻糖	—	—
44.L-岩藻糖	—	—
45.D-阿拉伯糖醇	—	—
46.L-阿拉伯糖醇	—	—
47.葡萄糖酸	+	—

[0072]

48.2-酮基-葡萄糖酸	—	—
49.5-酮基-葡萄糖酸	—	—
49 项试验中符合的项目	44	

[0073] 综合上述结果显示,本发明的分离株 MP108 属于鼠李糖乳酸杆菌,分离株 MP137 则为酪乳杆菌副干酪亚种。

[0074] 综合上述结果显示,本发明的分离株 MP108 属于鼠李糖乳酸杆菌,分离株 MP137 则为酪乳杆菌副干酪亚种。

[0075] 实施例 3:免疫调节分析

[0076] 3.1 细胞实验

[0077] 3.1.1 热杀死菌体液的制备

[0078] 取前述分离株 MP108 及 MP137 的培养菌液,装入离心管中,置于水浴锅煮沸加热 30 分钟,制备成热杀死菌体液。菌体液浓度为  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml,置于 4°C 供后续实验使用。

[0079] 3.1.2 CD3+T 细胞的纯化

[0080] 收集健康人体的静脉血液约 100ml,取 25ml 稀释后血液缓慢加入装有 20ml 聚蔗糖-泛影葡胺 (Ficoll-Hypaque) 的离心管,离心 400xg、40 分钟,利用密度差异,将周边血液单核球细胞分离出来,再用磷酸缓冲液清洗,并计算细胞数量。将人类周边血液分离出的周边血液单核白血球 (PBMCs) 依适当比例加入 MACS 缓冲液及 CD3+ 微珠,4°C 静置 15 分钟后,加入 10-20ml MACS 缓冲液离心 300xg,10 分钟,洗去多余微珠,最后,用少量 MACS 缓冲液回溶细胞,准备开始纯化。先以 MACS 缓冲液 3ml 润湿 MACS 管柱,待缓冲液滴干后,加入需纯化的细胞,滴干后再用 3ml MACS 缓冲液冲洗管柱,可分别得到 CD3- 及 CD3+ 的细胞,其中 CD3+ 的细胞用含 2% 血清的 RPMI-1640 培养液回溶,加入 10% DMSO 将细胞冻在液态氮中保存、CD3- 的细胞则可继续用在树突细胞的培养。

[0081] 3.1.3 人类树突细胞的培养

[0082] 将纯化 T 细胞剩下的 CD3- 细胞使用含有 10% 血清的 RPMI-1640 培养液来培养,并另外加入 800U/ml 重组人类粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 和 400U/ml 重组人类 IL-4 来促使单核球分化成未成熟树突细胞。将细胞培养在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培养箱 6 到 7 天,然后将这些悬浮细胞自培养盘冲下,可得到纯度约 95% 的树突细胞。

[0083] 3.1.4 菌体样本对于人类树突细胞免疫功能的调节

[0084] 收集前述树突细胞,计算细胞数。调整菌体样本和树突细胞的细胞数比例为 1 : 1、10 : 1 或 100 : 1,并以脂多糖 (LPS) 100ng/ml 当作阳性对照组,培养 48 小时后收下培养液,以酵素免疫分析法 (ELISA, eBioscience 商业试剂) 测量树突细胞所分泌的 IL-10 及 IL-12 含量。使用其他乳酸菌作为对照,包括加氏乳酸杆菌 (*L. gasseri*)、约氏乳酸杆菌-1 (*L. johnsonii-1*) 及约氏乳酸杆菌-2 (*L. johnsonii-2*)。

[0085] 结果以平均值样本分布的标准偏差 (Mean ± SEM) 表示, \*p < 0.05 表示有显著差异, \*\*p < 0.01 表示有非常显著的差异。统计方式为非成对 t 检定。

[0086] 表 3:菌体样本刺激树突细胞分泌的 IL-12 量

[0087]

菌株	IL-12 (pg/ml)		
	1:1	10:1	100:1
MP137	502±283	3402±996**	8310±3276*
MP108	79±30*	1186±509*	6346±3411
加氏乳酸杆菌	3±1	69±50	1888±1048
约氏乳酸杆菌-1	7±5	43±31	692±318*
约氏乳酸杆菌-2	8±8	105±70	374±193
NC	0±0		
LPS	4001±941**		

[0088] NC 表示培养液对照组,与 NC 比较,若 \*p < 0.05,\*\*p < 0.01 代表有统计上意义。

[0089] 表 4:菌体样本刺激树突细胞分泌的 IL-10 量

[0090]

菌株	IL-10 (pg/ml)		
	1:1	10:1	100:1
MP137	228±306	695±293**	1171±356**
MP108	139±195	457±311*	1063±355**
加氏乳酸杆菌	66±93	233±368	795±435*
约氏乳酸杆菌-1	64±50	101±149	834±381*
约氏乳酸杆菌-2	37±19	256±148	862±268**
NC	11±1		
LPS	687±318*		

[0091] NC 表示培养液对照组,与 NC 比较,若 \*p < 0.05,\*\*p < 0.01 代表有统计上意义。

[0092] 表 5:菌体样本刺激树突细胞产生 IL-12 与 IL-10 分泌量的比值

[0093]

菌株	IL-12/IL-10 比例		
	1:1	10:1	100:1
MP137	2.19±0.68**	5.18±1.91*	12.07±6.22*
MP108	1.01±0.38*	2.08±0.95*	6.41±2.94*
加氏乳酸杆菌	0.04±0.02	0.32±0.11*	2.54±0.81**
约氏乳酸杆菌-1	0.11±0.09	0.16±0.05**	1.01±0.50*
约氏乳酸杆菌-2	0.07±0.07	0.32±0.10**	0.50±0.18*
NC	0.00±0.00		
LPS	13.71±7.35*		

[0094] NC 表示培养液对照组,与 NC 比较,若 \*p < 0.05,\*\*p < 0.01 代表有统计上意义。

[0095] 如表 3 至 5 显示,本发明的分离株 MP137 及 MP108 可刺激树突细胞产生较多 IL-12 及 IL-10,显示可促成 Th1 反应及诱发调节性 T 细胞 (Treg) 的生成,且 IL-12/IL-10 的比值较高,表示 Th1 反应强于 Treg 反应。

[0096] 3.1.5 菌株藉由树突细胞影响 T 细胞的免疫功能

[0097] 接着,进一步确认菌株藉由树突细胞影响 T 细胞的免疫功能,分析 IFN- $\gamma$ 、IL-10 及 IL-4 的分泌量。

[0098] 树突细胞与各菌株共同刺激 48 小时,将这些树突细胞利用  $\gamma$ -射线处理以停止其增生能力,将细胞数调整为  $1 \times 10^4$  细胞 / 槽,同时将先前准备好的 CD3+T 细胞数调整为  $1 \times 10^5$  细胞 / 槽,将两种细胞共同培养 48 小时,收集细胞的上清液,利用酵素免疫分析套组 (ELISA,eBioscience 商业试剂) 来测定细胞激素 IFN- $\gamma$ 、IL-10 及 IL-4 的分泌量,其中以丝裂原 (植物血球凝集素, PHA 10g/ml) 的刺激作为对照组,亦使用其他乳酸菌作为对照组,包括加氏乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌 -1 及约氏乳酸杆菌 -2。统计方式与前述相同。

[0099] 表 6 :菌株影响的树突细胞刺激 T 细胞产生 IFN- $\gamma$  的情形

[0100]

菌株	IFN- $\gamma$ (pg/ml)	
	1:1	10:1
MP137	37 $\pm$ 16*	212 $\pm$ 160
MP108	27 $\pm$ 6**	38 $\pm$ 13*
加氏乳酸杆菌	8 $\pm$ 1*	6 $\pm$ 2
约氏乳酸杆菌-1	10 $\pm$ 4	7 $\pm$ 2
约氏乳酸杆菌-2	3 $\pm$ 2	12 $\pm$ 9
NC	2 $\pm$ 1	
T	7 $\pm$ 6	
DC	2 $\pm$ 1	
T+PHA	43 $\pm$ 21*	

[0101] NC 表示培养液对照组, T 表示只有 T 细胞, DC 表示树突细胞, T+PHA 表示 T 细胞加上植物血球凝集素。与 NC 比较, 若 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  代表有统计上意义。

[0102] 表 7 : 菌株影响的树突细胞刺激 T 细胞产生 IL-10 的情形

[0103] 菌株	IL-10 (pg/ml)	
	1:1	10:1
MP137	43 $\pm$ 2*	33 $\pm$ 14
MP108	21 $\pm$ 3**	16 $\pm$ 1**
加氏乳酸杆菌	8 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
约氏乳酸杆菌-1	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1
[0104] 约氏乳酸杆菌-2	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
NC	7 $\pm$ 2	
T	5 $\pm$ 1	
DC	6 $\pm$ 1	
T+PHA	34 $\pm$ 12*	

[0105] NC 表示培养液对照组, T 表示只有 T 细胞, DC 表示树突细胞, T+PHA 表示 T 细胞加上植物血球凝集素。与 NC 比较, 若 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  代表有统计上意义。

[0106] 表 8 : 菌株影响的树突细胞刺激 T 细胞产生 IL-4 的情形



菌株	IL-4 (pg/ml)	
	1:1	10:1
MP137	1±1	1±1
MP108	1±1	1±1
加氏乳酸杆菌	2±2	1±1
[0107] 约氏乳酸杆菌-1	3±3	5±3
约氏乳酸杆菌-2	1±1	1±1
NC	2±2	
T	4±4	
DC	1±1	
T+PHA	12±3*	

[0108] NC 表示培养液对照组, T 表示只有 T 细胞, DC 表示树突细胞, T+PHA 表示 T 细胞加上植物血球凝集素。与 NC 比较, 若 \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 代表有统计上意义。

[0109] 表 9: 菌株影响树突细胞刺激 T 细胞产生 IFN- $\gamma$  与 L-10 分泌量的比值

[0110]

菌株	IFN- $\gamma$ /IL-10 比例	
	1:1	10:1
MP137	3.76±1.75*	7.61±5.02
MP108	1.54±0.31**	2.61±0.94*
加氏乳酸杆菌	1.01±0.24*	0.87±0.36
约氏乳酸杆菌-1	1.18±0.53	0.77±0.26
约氏乳酸杆菌-2	0.42±0.28	1.78±1.36
NC	0.31±0.15	
T	0.22±0.13	
DC	0.23±0.15	
T+PHA	2.39±1.28*	

[0111] NC 表示培养液对照组, T 表示只有 T 细胞, DC 表示树突细胞, T+PHA

[0112] 表示 T 细胞加上植物血球凝集素。与 NC 比较, 若 \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 代表有统计上意义。

[0113] 如表 6 至 9 显示, 本发明的分离株 MP137 及 MP108 可影响树突细胞刺激 T 细胞分

泌 IFN- $\gamma$  及 IL-10, 但 IL-4 表现量都很低, 表示可促成 T 细胞走向 Th1 反应及刺激 IL-10 分泌, 抑制 Th2 反应。

### [0114] 3.2 动物实验

#### [0115] 3.2.1 菌粉的制备

[0116] 将测试菌的培养菌液予以离心后, 去掉上清液, 留下菌体部分, 加入适当保护剂, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  预冻隔夜。再将样本置入冻干机进行冷冻干燥, 获得菌粉, 包括本发明的 MP137 菌粉 ( $3.2 \times 10^{11} \text{cfu/g}$ ) 与 MP10<sup>8</sup> 菌粉 ( $1.8 \times 10^{11} \text{cfu/g}$ )。

#### [0117] 3.2.2 动物来源及管喂处理

[0118] 选用 Balb/c 雌鼠, 于台北医学大学动物房代养。共分 10 组小鼠, 每组小鼠分开饲养于笼中, 自由摄食饮水及饲料。以管喂方式额外给予菌粉样本, 每周五天; 管喂六周后则予以牺牲, 以进行各项调节过敏免疫反应的功效性评估试验。

[0119] 依据实验动物与人体表面积比等效剂量换算出小鼠所需管喂剂量为  $2.6 \times 10^8 \text{cfu/次/小鼠}$ , 一天喂食一次, 此剂量为 1 倍的剂量, 称为 1 倍剂量组, 亦进行 0.5 倍剂量组、5 倍剂量组以及对照组, 各剂量组说明如下:

[0120] 0.5 倍剂量组: 每天管喂 0.2ml 含  $1.3 \times 10^8 \text{cfu}$  的菌量的菌粉 (相当于成人剂量  $5 \times 10^{10}$ );

[0121] 1 倍剂量组: 每天管喂 0.2ml 含  $2.6 \times 10^8 \text{cfu}$  的益生菌量的菌粉 (相当于成人剂量  $1 \times 10^{11}$ );

[0122] 5 倍剂量组: 每天管喂 0.2ml 含  $1.3 \times 10^9 \text{cfu}$  的益生菌量的菌粉 (相当于成人剂量  $5 \times 10^{11}$ ); 及

[0123] 对照组: 每天同样以管喂操作, 管喂同体积 0.2ml 的无菌蒸馏水。

[0124] \* 小鼠与人体表面积的比值为 0.0026, 70 公斤体重的成人每日摄食 1

[0125] 公克的试验物质, 相当于 20 公克小鼠每日喂食 0.0026 公克的剂量。

#### [0126] 3.2.3 建立对卵白蛋白 (OVA) 过敏的气喘动物模式

[0127] 每隔两周对小鼠进行腹腔注射, 给予 OVA 抗原以及佐剂所混合的溶液。期间会进行眼角采血, 将血液离心 12,000rpm、5 分钟后收集血清, 保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  以进行后续抗体的酵素免疫分析法分析。管喂菌粉样本六周后, 给予小鼠吸入性 OVA 抗原刺激。之后牺牲小鼠采集肺冲洗液及脾脏细胞, 并进行肺冲洗液中细胞激素以及脾脏的细胞激素的分泌量等检测。

[0128] 图 3 显示小鼠试验流程。

#### [0129] 3.2.4 体重检测

[0130] 在动物试验期间, 每隔两周记录小鼠体重增减状况, 以评估喂食益生菌对小鼠生长的影响。表 10 为记录结果。

[0131] 表 10: 小鼠体重测量结果

[0132]

	第 0 周	第 2 周	第 4 周	第 6 周
对照组	$19.31 \pm 0.23$	$19.12 \pm 0.54$	$20.15 \pm 0.15$	$21.42 \pm 0.35$

[0133]

0.5 倍	18.89 ± 0.33	19.00 ± 0.34	20.82 ± 0.16	22.83 ± 0.40
1 倍	19.98 ± 0.47	20.17 ± 0.53	21.65 ± 0.54	23.08 ± 0.40
5 倍	19.93 ± 0.23	20.00 ± 0.45	21.42 ± 0.35	22.83 ± 0.36

*MP137*

0.5 倍	19.01 ± 0.43	19.42 ± 0.52	21.02 ± 0.48	22.00 ± 0.41
1 倍	19.53 ± 0.34	19.92 ± 0.33	21.73 ± 0.33	22.33 ± 0.48
5 倍	19.15 ± 0.48	19.50 ± 0.37	21.13 ± 0.30	21.92 ± 0.35

[0134] 结果显示,与对照组相较,喂食本发明的分离株的菌粉不会影响

[0135] 小鼠体重,无影响小鼠食欲或导致体重减轻之虞。

[0136] 3.2.5 血液中特异性免疫球蛋白浓度测定

[0137] 于建立小鼠动物模式的过程中在不同的时间点分别进行眼角采血,测量血清中抗 OVA 抗原的 IgA、IgE、IgG2a 的抗体效价。抗体的测定将以 ELISA 试剂来做检测,以 ELISA 测读仪测吸光值计算出各抗体浓度。表 11 至 13 显示测定结果。

[0138] 表 11 :小鼠血清中抗 OVA 抗原的 IgA 含量测定结果

[0139]

	第 0 周	第 1 周	第 3 周	第 5 周
对照组	0.046 ± 0.005	0.062 ± 0.008	0.145 ± 0.046	0.345 ± 0.078

*MP108*

0.5 倍	0.045 ± 0.004	0.113 ± 0.011	0.666 ± 0.146 <sup>a</sup>	0.873 ± 0.044 <sup>b</sup>
1 倍	0.042 ± 0.001	0.098 ± 0.002	0.717 ± 0.214 <sup>b</sup>	1.150 ± 0.146 <sup>b</sup>
5 倍	0.047 ± 0.010	0.084 ± 0.003	0.463 ± 0.053	0.710 ± 0.056

*MP137*

0.5 倍	0.047 ± 0.003	0.089 ± 0.005	0.648 ± 0.119 <sup>a</sup>	0.798 ± 0.215 <sup>a</sup>
1 倍	0.049 ± 0.004	0.100 ± 0.008	0.554 ± 0.101	0.730 ± 0.072
5 倍	0.047 ± 0.006	0.086 ± 0.019	0.378 ± 0.046	0.697 ± 0.057

[0140] a、b 及 c 表示与对照组相比有统计上的意义 (a,  $p < 0.05$ ; b,  $p < 0.01$ ; c,  $p < 0.001$ )。

[0141] 由表 11 可知,小鼠在喂食本发明的分离株的菌粉后,体内对于 OVA 抗原的特异性 IgA 抗体的产量有显著增加,表示有提升肠道免疫力的效果。

[0142] 表 12 :小鼠血清中抗 OVA 抗原的 IgE 含量测定结果

[0143]

	第 0 周	第 1 周	第 3 周	第 5 周
对照组	0.001 ± 0.0005	0.045 ± 0.005	0.057 ± 0.007	0.348 ± 0.126
<i>MP108</i>				
0.5 倍	0.002 ± 0.0004	0.043 ± 0.005	0.014 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.082 ± 0.026 <sup>b</sup>
1 倍	0	0.030 ± 0.005	0.017 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.065 ± 0.017 <sup>b</sup>
5 倍	0	0.016 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.017 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.057 ± 0.023 <sup>b</sup>
<i>MP137</i>				
0.5 倍	0.0002 ± 0.0002	0.023 ± 0.006	0.021 ± 0.003 <sup>b</sup>	0.115 ± 0.038 <sup>a</sup>
1 倍	0	0.020 ± 0.008	0.013 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.128 ± 0.062 <sup>a</sup>
5 倍	0.0002 ± 0.0002	0.012 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.014 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.105 ± 0.039 <sup>a</sup>

[0144] a、b 及 c 表示与对照组相比有统计上的意义 (a,  $p < 0.05$ ; b,  $p < 0.01$ ; c,  $p < 0.001$ )。

[0145] 由表 12 可知,小鼠在喂食本发明的分离株的菌粉后,体内对于 OVA 抗原的特异性 IgE 抗体的产生受到抑制,表示有抑制过敏反应的效果。

[0146] 表 13:小鼠血清中抗 OVA 抗原的 IgG2a 含量测定结果

[0147]

	第 0 周	第 1 周	第 3 周	第 5 周
对照组	0.002 ± 0.0005	0.003 ± 0.0007	0.134 ± 0.102	0.232 ± 0.090
<i>MP108</i>				
0.5 倍	0.001 ± 0.0005	0.209 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.695 ± 0.033 <sup>b</sup>	0.604 ± 0.043 <sup>b</sup>
1 倍	0.002 ± 0.0004	0.180 ± 0.028	0.797 ± 0.070 <sup>b</sup>	0.690 ± 0.056 <sup>b</sup>
5 倍	0.003 ± 0.0005	0.192 ± 0.074	0.692 ± 0.063 <sup>b</sup>	0.697 ± 0.066 <sup>b</sup>
<i>MP137</i>				
0.5 倍	0.002 ± 0.0006	0.221 ± 0.080 <sup>a</sup>	0.692 ± 0.073 <sup>b</sup>	0.605 ± 0.038 <sup>b</sup>
1 倍	0.003 ± 0.0002	0.175 ± 0.041	0.692 ± 0.063 <sup>b</sup>	0.499 ± 0.080 <sup>a</sup>
5 倍	0.002 ± 0.0005	0.182 ± 0.064	0.578 ± 0.112 <sup>b</sup>	0.571 ± 0.076 <sup>b</sup>

[0148] a、b 及 c 表示与对照组相比有统计上的意义 (a,  $p < 0.05$ ; b,  $p < 0.01$ ; c,  $p < 0.001$ )。

[0149] 由表 13 可知,小鼠在喂食本发明的分离株的菌粉后,体内对于 OVA 抗原的特异性 IgG2a 抗体的产量有显著增加,表示有促进小鼠体内 Th1 细胞免疫反应的效果。

[0150] 3.2.6 小鼠肺冲洗液中 IL-13 含量测定

[0151] 收集肺冲洗液以 ELISA 检测肺冲洗液中的 IL-13 含量。分别取抗细胞激素的抗体溶于缓冲液中,置于室温隔夜,隔天用洗涤缓冲液冲洗,加入填充缓冲液在室温下静置 2 小时,然后用洗涤缓冲液冲洗,加入待测的肺冲洗液在室温下作用,接着用洗涤缓冲液冲洗,加入生物素联结的抗细胞激素的抗体,室温下静置 2 小时后,用洗涤缓冲液冲洗,再加入酵素于室温下作用,之后用洗涤缓冲液冲洗,最后加入呈色剂呈色,以 ELISA 测读仪测特定波长吸光值来换算出待测液所含的浓度。表 14 显示测定结果。

[0152] 表 14 :小鼠肺冲洗液中 IL-13 含量测定结果

		IL-13(pg/ml)
	对照组	676.2±75.06
	<i>MP108</i>	
	0.5 倍	413.8±42.0 <sup>b</sup>
[0153]	1 倍	330.6±49.8 <sup>c</sup>
	5 倍	488.4±21.0 <sup>a</sup>
	<i>MP137</i>	
	0.5 倍	519.3±46.88
	1 倍	517.8±16.78
	5 倍	405.2±107.14 <sup>c</sup>

[0154] a、b 及 c 表示与对照组相比有统计上的意义 (a,  $p < 0.05$ ; b,  $p < 0.01$ ; c,  $p < 0.001$ )。

[0155] 由表 14 可知,小鼠在喂食本发明的分离株的菌粉后,可显著降低肺冲洗液中 IL-13 的分泌量,表示 Th2 反应受到抑制。

[0156] 3.2.7 小鼠脾脏细胞的细胞激素分泌测定

[0157] 牺牲小鼠后将脾脏取出并制备成单一细胞悬浮液,更进一步利用缓冲液将红血球去除,而白血球则利用 HBSS 溶液清洗后再进行下一步的实验。将分离出的细胞调好适当的浓度后,置于培养盘中,利用已经定量过的过敏原来刺激这些淋巴球。经过 96 小时的培养后将上层液离心下来以测定其细胞激素 IL-5 制造的量。

[0158] 表 15 :小鼠脾脏细胞 (PHA 刺激) 的细胞激素分泌含量测定结果

		IL-5 (pg/ml)
	对照组	76.8±10.46
	<i>MP108</i>	
	0.5 倍	59.2±5.71
[0159]	1 倍	47.2±7.09 <sup>a</sup>
	5 倍	19.2±4.27 <sup>c</sup>
	<i>MP137</i>	
	0.5 倍	39.33±7.55 <sup>a</sup>
	1 倍	40.8±12.09
	5 倍	36.0±9.88 <sup>a</sup>

[0160] a、b 及 c 表示与对照组相比有统计上的意义 (a,  $p < 0.05$  ; b,  $p < 0.01$  ; c,  $p < 0.001$ )。

[0161] 由表 15 可知,小鼠在喂食本发明的分离株的菌粉后,脾脏细胞的 IL-5 分泌量显著降低,表示 Th2 反应受到抑制。

[0162] 3.2.8 小鼠呼吸道阻力变化测定

[0163] 小鼠喂食 MP108 菌粉,喂食剂量如 3.2.2 段落所示。小鼠在六周后麻醉,以气切方式插管,经由管路给予小鼠吸入含有不同浓度氯化乙酰甲胆碱 (methacholine) 的雾化气体引发气喘,并同时记录呼吸阻力变化情形。结果以相对阻力表示如下:

[0164] 相对阻力 = (氯化乙酰甲胆碱的阻力 - 管壁阻力) / (食盐水的阻力 - 管壁阻力)

[0165] 结果如图 4A 所示,喂食生理食盐水致敏小鼠的呼吸道阻力随着吸入氯化乙酰甲胆碱剂量增加而上升,喂食 1 倍剂量的 MP108 菌粉的小鼠的呼吸道阻力在 100mg/ml 氯化乙酰甲胆碱刺激下与喂食生理食盐水组比较显著较低,喂食 5 倍剂量 MP108 菌粉的小鼠其呈现出来的呼吸道阻力则是非常显著地较低,甚至低于未被致敏 (naïve) 的小鼠的呼吸道阻力 (\*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

[0166] 另以 MP137 菌粉进行小鼠呼吸道阻力测试,喂食剂量如下:

[0167] 0.5 倍剂量组:每天管喂 0.2ml 含  $6.5 \times 10^6$  cfu 的菌量的菌粉 (相当于成人剂量  $2.5 \times 10^9$ ) ;

[0168] 1 倍剂量组:每天管喂 0.2ml 含  $1.3 \times 10^7$  cfu 的益生菌量的菌粉 (相当于成人剂量  $5 \times 10^9$ ) ;

[0169] 5 倍剂量组:每天管喂 0.2ml 含  $6.5 \times 10^7$  cfu 的益生菌量的菌粉 (相当于成人剂量  $2.5 \times 10^{10}$ ) ;及

[0170] 对照组:每天同样以管喂操作,管喂同体积 0.2ml 的无菌蒸馏水。

[0171] \* 小鼠与人体表面积比值为 0.0026,70 公斤体重的成人每日摄食 1 公克的试验物质,相当于 20 公克小鼠每日喂食 0.0026 公克的剂量。

[0172] 此实验利用 Buxco 系统以非侵入性的操作下,测量小鼠呼吸道的阻力变化。阻力

变化由计算机分析并根据收集小鼠呼吸道变化的测量数据作数学运算而得,结果以指标(Penh 值)表示:Penh 值=间隔(pause)×PIF/PEF;间隔=(Te-Tr)/Tr(PIF:最高吸气流速(peak inspiratory flow);PEF:最大呼气流速(peak expiratory flow rate))。刺激小鼠呼吸道的方式为先使小鼠接受生理食盐水的刺激,再依序接受浓度由低往高的氯化乙酰甲胆碱(6.25、12.5、25、50 以及 100mg/mL),各浓度刺激 3 分钟后记录呼吸道生理变化,以及平均 Penh 值。

[0173] 结果如图 4B 所示,在水对照组小鼠的呼吸道功能指针数值随着吸入氯化乙酰甲胆碱剂量增加而上升。与水对照组的过敏小鼠相较发现喂食 0.5 倍、1 倍及 5 倍剂量的小鼠,其 Penh 值较低,表示呼吸道受阻情况获得改善,尤其可显著降低给受到 50 以及 100mg/mL 刺激下对小鼠所造成的呼吸道受阻情况。

#### [0174] 3.2.9 肺冲洗液中发炎细胞种类分析

[0175] 此实验分析喂食 MP137 菌粉对小鼠冲洗液中发炎种类分布的影响,喂食剂量如 3.2.8 段落所示。在接受呼吸道过敏原刺激后,牺牲小鼠进行肺冲洗液的收集。将肺冲洗液离心,上清液取出置于 -20℃ 保存。冲洗出来的细胞则用以 cytopspine 仪器将细胞打在波片上后风干,接着进行刘氏染色,将染剂冲洗后风干玻片,之后由显微镜计数细胞。依据染色结果及细胞形态判断,将细胞分为四大类:单核球(monocyte)、淋巴球细胞(lymphocyte)、嗜酸性白血球(eosinophil)及嗜中性白血球(neutrophil)。图 5 显示分析结果。

[0176] 结果显示,在未致敏的小鼠(naïve 组),其肺中因无发炎现象,所以多存在单核球细胞,几乎无嗜酸性白血球与嗜中性白血球的聚集。而在致敏的小鼠(水对照组),其肺中因有 Th2 细胞主导造成的发炎现象,所以会有明显的酸性白血球与嗜中性白血球的聚集。将实验组与水对照组作比较,观察到在有喂食本发明的菌粉的小鼠,嗜酸性白血球与嗜中性白血球浸润肺中的情形有减少的趋势,尤其在 1 倍剂量组有显着的差异,表示肺部发炎现象获得改善。

#### [0177] 3.3 临床实验(MP108 合并抗组织胺 Zyrtec 疗法)

##### [0178] 3.3.1 观察族群

[0179] 观察族群为 100 位至基层医疗诊所就医,患有一年以上过敏性鼻炎且鼻塞、流鼻水、咳嗽或喉咙痒的严重度在中度以上的 6-13 岁儿童,但排除以下病症:

[0180] (1) 患有严重气喘;

[0181] (2) 过去三个月内有急性气喘发作;

[0182] (3) 患有急性或慢性鼻窦炎;

[0183] (4) 过去 10 天内曾用过长效型抗组织胺;

[0184] (5) 过去 3 天用过鼻内或全身性作用的短效型抗组织胺;

[0185] (6) 过去 7 天内用过白三烯素拮抗剂;

[0186] (7) 过去 1 个月内用过鼻内、吸入性或全身性作用的类固醇药物;

[0187] (8) 过去 3 天内用过去鼻充血剂;及

[0188] (9) 过去 3 个月内用抗敏益生菌。

##### [0189] 3.3.2 MP108 抗敏益生菌胶囊

[0190] MP108 菌粉依前上述方式产生并制成胶囊,剂量为  $5 \times 10^9$  cfu/cap。

##### [0191] 3.3.2 试验设计

[0192] 疗程首月（第 0-30 天，治疗期）：每日一颗抗组织胺 10mg Zyrtec 加上一颗 MP108 抗敏益生菌胶囊；以及

[0193] 疗程第 2 至 3 个月（30 至 90 天，维持期）：停用抗组织胺，服用每日一颗抗敏益生菌胶囊。

[0194] 3.3.3 评估项目

[0195] 病患的评估包括：

[0196] (1) 全症状分数，分为鼻部症状：流鼻水、鼻塞、鼻子痒、打喷嚏；以及非鼻部症状：眼睛或耳朵痒、喉咙痒、眼睛红、流眼泪。分为 4 个等级如下：

[0197] 0 = 症状完全消失。

[0198] 1 = 轻微（有症状出现，但不影响个人）。

[0199] 2 = 中度（症状明显，影响个人，但不影响睡眠或生活起居）。

[0200] 3 = 严重（干扰生活起居或睡眠，甚至无法作息）。

[0201] (2) 鼻道阻力测试：左侧和右侧。

[0202] (3) 自觉改善程度评估。分为 5 个等级如下：

[0203] 0 = 大有改善。

[0204] 1 = 有些改善。

[0205] 2 = 没有改善。

[0206] 3 = 有些恶化。

[0207] 4 = 明显恶化。

[0208] 病患于第 30、60 及 90 天进行上述 (1) 全症状分数及 (2) 鼻道阻力测试，其中第 60 及 90 天额外进行 (3) 自觉改善程度评估。

[0209] 3.3.4 试验结果

[0210] 本试验共有 100 名儿童参加，最后共有 59 名完成 3 个月试验并纳入评估。

[0211] 表 16：

[0212]



	平均	标准偏差 (S.D.)
年龄	8.76	2.23
	病患数目	%
性别		
女性	18	30.51
男性	41	69.49
诊断		
具有一年以上过敏性鼻炎病史	59	100
气喘	16	27.12
异位性皮肤炎	11	18.64

[0213] 表 17 :全症状分数

[0214]

	改善幅度	改善人数
<i>鼻部症状</i>		
第 30 天	37%	48
第 60 天	33%	44
第 90 天	39%	45
<i>非鼻部症状</i>		
第 30 天	47%	44
第 60 天	44%	42
第 90 天	48%	40
<i>鼻部+非鼻部</i>		
第 30 天	41%	50
第 60 天	37%	48
第 90 天	43%	48

[0215] 表 17 显示,在 59 名纳入分析的儿童中,参加本试验三个月后鼻部症状分数减少 39%,非鼻部症状分数减少 48%,总症状分数(鼻部+非鼻部)减少 43%。

[0216] 表 18 :鼻道阻力分数

[0217]

	改善幅度	改善人数
左侧鼻道阻力		
第 30 天	8%	32
第 60 天	26%	42
第 90 天	34%	46
右侧鼻道阻力		
第 30 天	24%	39
第 60 天	30%	42
第 90 天	45%	46
平均鼻道阻力		
第 30 天	16%	38
第 60 天	28%	43
第 90 天	39%	49

[0218] 表 18 显示,在 59 名纳入分析的儿童中,参加本试验三个月后平均鼻道阻力改善近 40%。

[0219] 实施例 4 :对抗肠道致病菌感染的测定分析

[0220] 本实施例以排除 (exclusion) 及置换 (displacement) 实验测定本发明的分离菌株 MP108 及 MP137 对抗肠道致病菌感染的功效。本实施例测试的肠道致病菌包括沙门氏菌 (*Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, BCRC10744), 以及大肠杆菌 (*Escherichia coli*, BCRC15372), 并以市售乳酸菌株 (*Lactobacillus casei* variety *rhamnosus*, Lcr35 以及 *Lactobacillus acidophilus*, L. a) 作为对照组。

[0221] 在排除实验中,将肠道细胞株 Caco-2 细胞 (BCRC 60182) 于培养基 (Dulbecco' s modified Eagle' s Medium, DMEM) 中培养稳定后,加入待测乳酸菌,其中乳酸菌与 Caco-2 细胞的比例为 10 : 1 (10MOI, multiplicity of infection)。于 37°C 下共同培养 1.5 个小时后,以磷酸缓冲液 (PBS) 洗去未附着的乳酸菌。接着,加入致病菌感染 Caco-2 细胞,两者比例为致病菌 : Caco-2 细胞为 10 : 1。继续于 37°C 下共同培养 1.5 个小时,以 PBS 洗去未附着的菌株后,进行革兰氏染色,计数附着于 Caco-2 细胞上的致病菌菌数。图 6A 和图 6B 显示排除实验的结果,其中图 6A 针对沙门氏菌的实验结果,以及图 6B 是针对大肠杆菌的实验结果。

[0222] 另,在置换实验中,培养条件与前述排除实验相同,但先加入致病菌感染肠道细胞株 Caco-2 细胞 (比例为致病菌 : Caco-2 细胞 = 10 : 1), 于 37°C 下共同培养 1.5 个小时后,以 PBS 洗去未附着的致病菌;然后再加入乳酸菌 (比例为入乳酸菌 : Caco-2 细胞 = 10 : 1), 继续于 37°C 下共同培养 1.5 个小时,以 PBS 洗去未附着的菌株后,进行革兰氏染

色,计数附着于 Caco-2 细胞上的致病菌菌数。图 7A 和图 7B 显示置换实验的结果,其中图 7A 针对沙门氏菌的实验结果,以及图 7B 是针对大肠杆菌的实验结果。符号“#”表示相较于对照组有显著差异  $P < 0.05$ ,符号“\*”表示两组比较有显著差异  $P < 0.05$ 。

[0223] 如图 6A-6B 及图 7A-7B 显示,本发明的分离菌株 MP108 及 MP137 可成功抑制或取代肠道致病菌吸附于肠道上,因此具有对抗肠道致病菌感染的功效。

[0224] 由以上结果证实,本发明分离株 MP108 及 MP137 具有调节免疫功能,可促进 Th1 反应、抑制 Th2 反应、减低过敏、诱发调节性 T 细胞反应、提升肠道免疫力、及降低气喘个体的呼吸道阻力等效果,亦具有对抗肠道致病菌感染的功效。

[0225] 本领域技术人员将可在不背离本发明精神下,根据实施例进行改变和修改。要注意的是,本发明并不受限于说明书中实施例所揭示的范围,而涵盖于其他根据权利要求揭示的所有变化的形式。

- <110> 台湾东洋药品工业股份有限公司  
财团法人食品工业发展研究所
- <120> 新颖乳酸菌株及其调节免疫反应的用途
- <130> 11P05027-TW
- <150> CN201010578754.7
- <151> 2010-12-08
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 1  
ggagtttgat cctggctcag 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 引物
- <400> 2  
aaggaggtgat ccagccgca 20

<210>	3	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	酪乳杆菌副干酪亚种( <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> )	
<400>	3	
	tcgaagcaac gcaagaacc ttaccaggtc ttgacatctt ttgatcacct gagagatcag	60
	gtttcccctt cgggggcaaa atgacaggtg gtgtatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga	120
	gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttatga ctagttgcca gcatttagtt	180
	gggcactcta gtaagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca	240
	tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtacaa cgagttgcga	300
	gaccgcgagg tcaagctaatt ctcttaaagc cattctcagt tcggactgta ggctgcaact	360
	cgcttacacg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag cacgccgcgg tgaatacgtt	420
	cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt tgtaacaccc gaagccggtg	480
	gcgtaaccct ttagggagc	500

<210>	4	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	鼠李糖乳酸杆菌( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> )	

<400>	4	
	tggagtttga tcctggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa	60
	cgagttctcg ttgatgatcg gtgcttgcac cgagattcaa catggaacga gtggcggacg	120
	ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta agtgggggat aacatttgga aacagatgct	180
	aataccgcga tagatccaag aaccgcatgg ttcttggctg aaagatggcg taagctatcg	240

---

cttttgatg gacccgcggc gtattagcta gttggtgagg taatggctca ccaaggcgat	300
gatacgtagc cgaactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact	360
cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc acaatggacg caagtctgat ggagcaacgc	420
cgcgtgagtg aagaaggctt tcgggtcgta aaactctgtt gttggagaag aatggtcggc	480
agagtaactg ttgtcggcgt	500

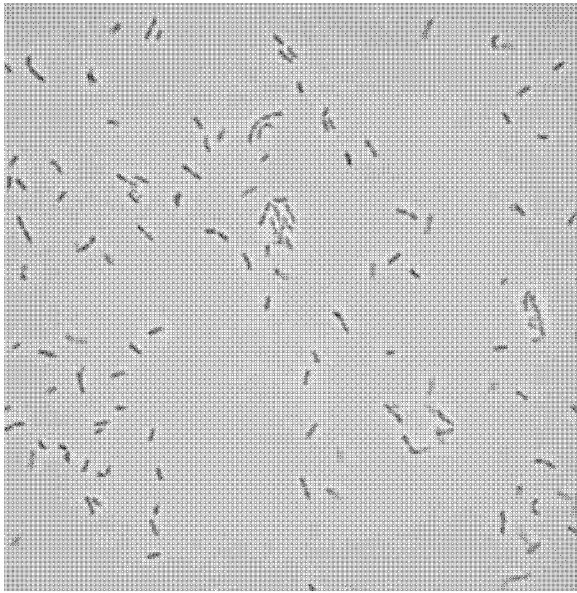


图 1

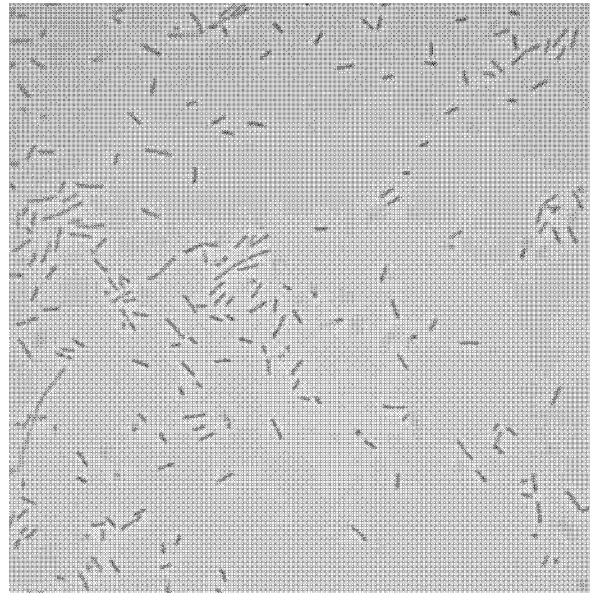


图 2

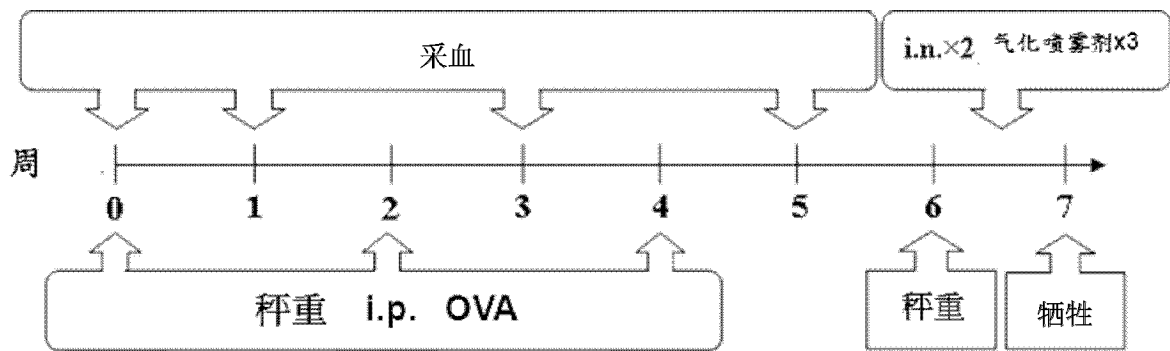


图 3

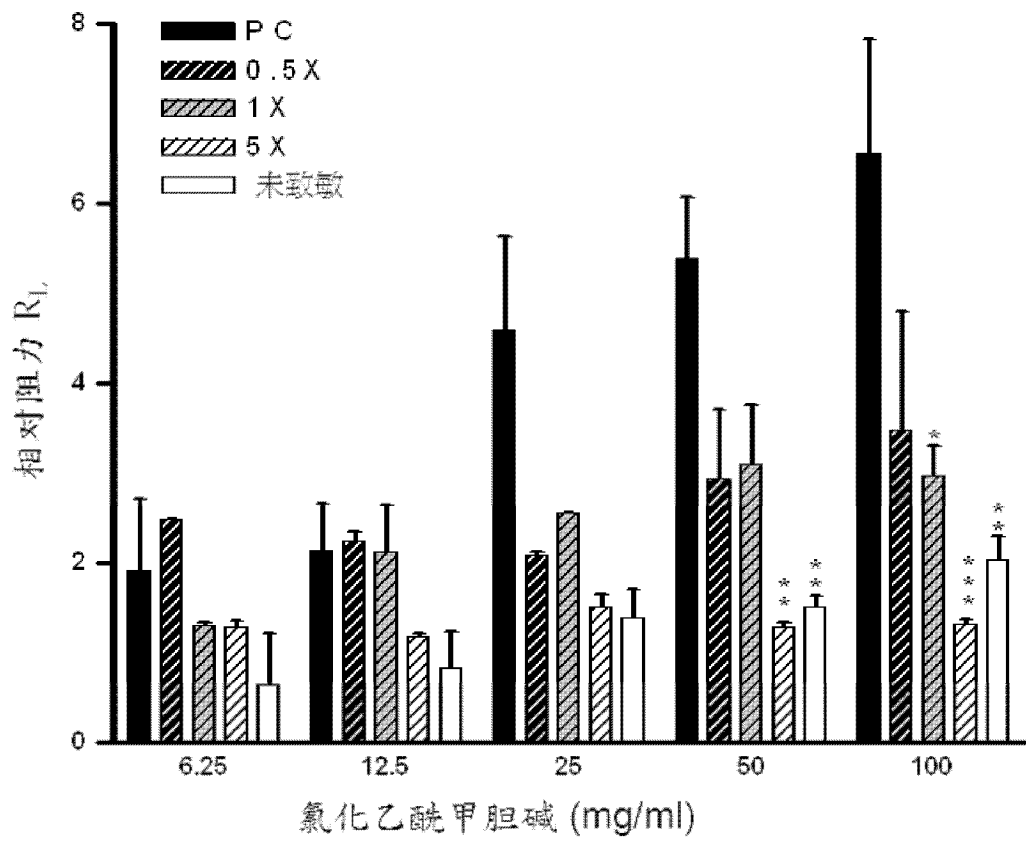


图 4A



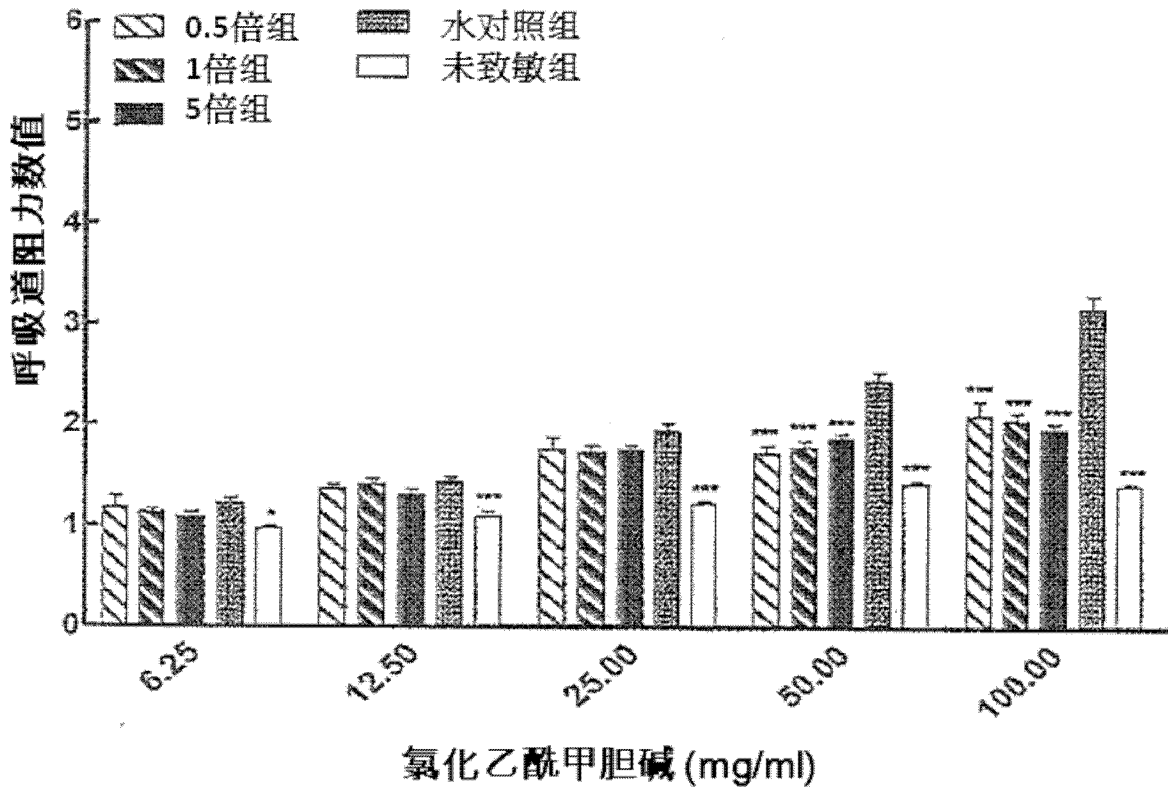


图 4B

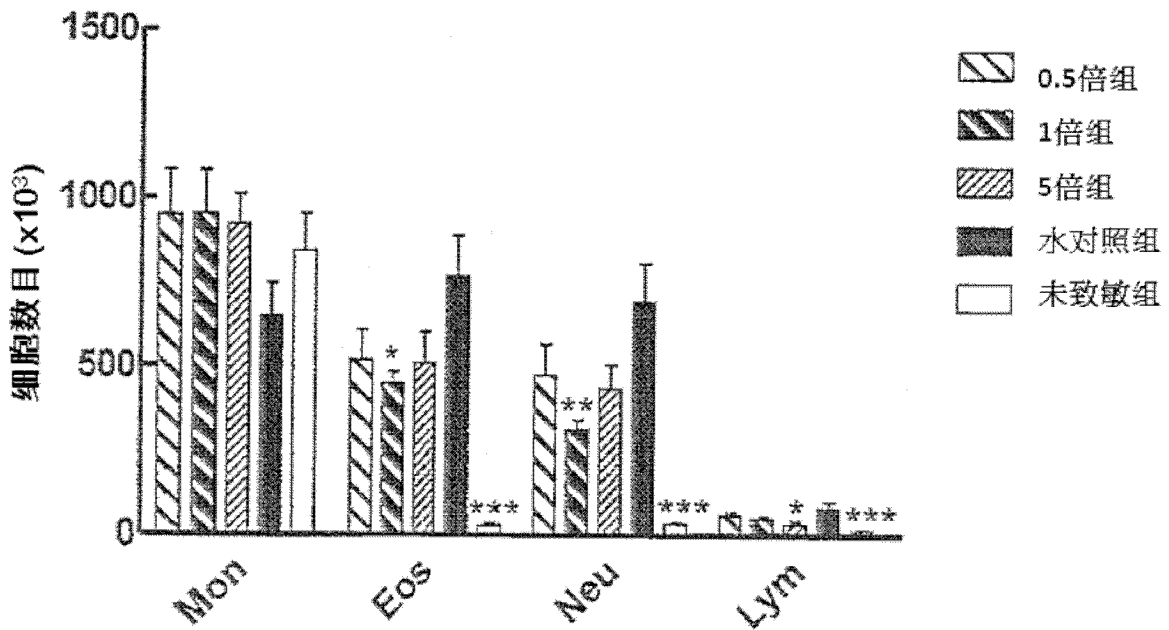


图 5

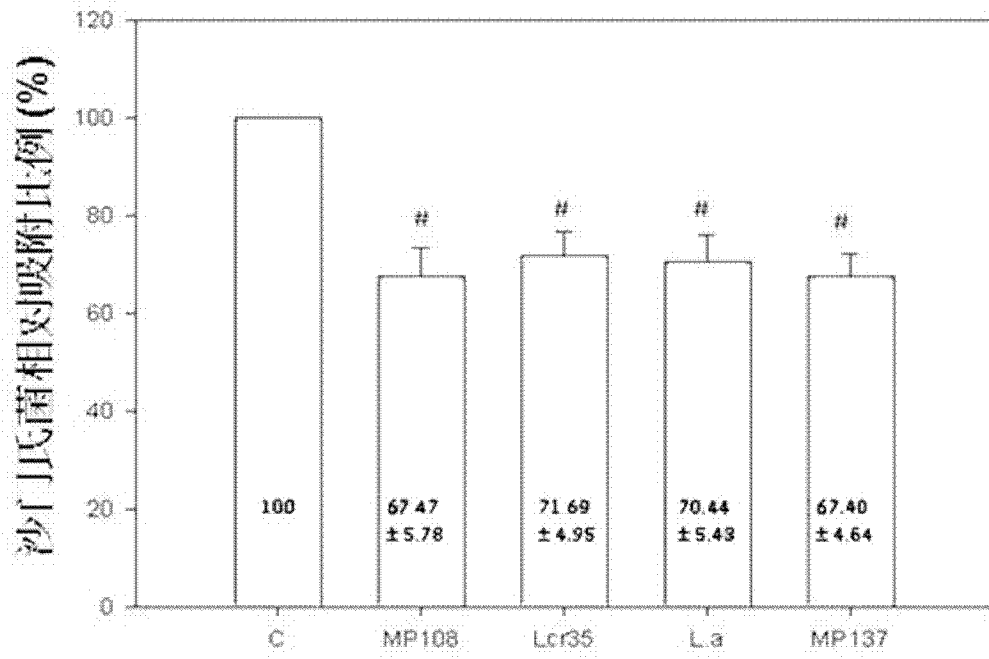


图 6A

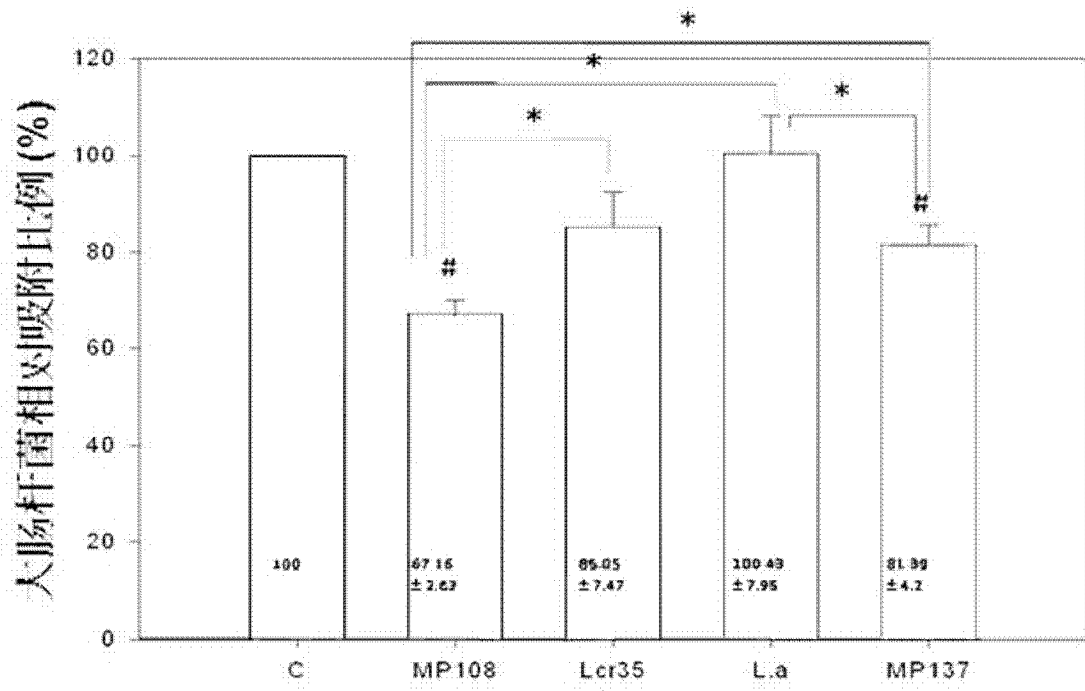


图 6B

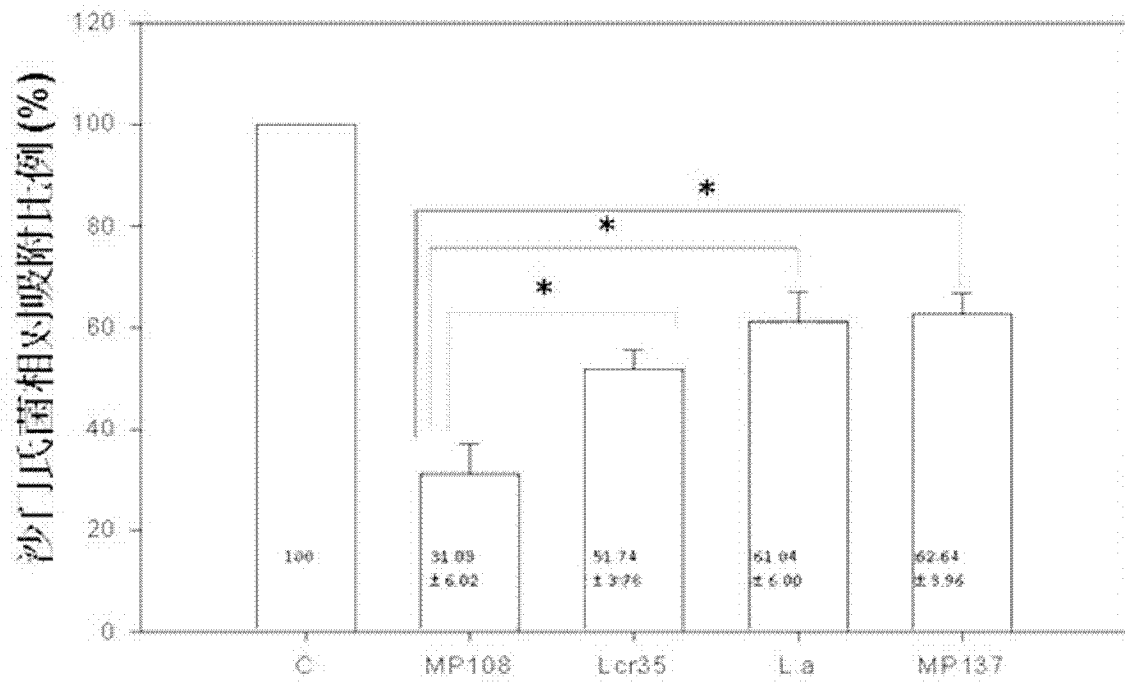


图 7A

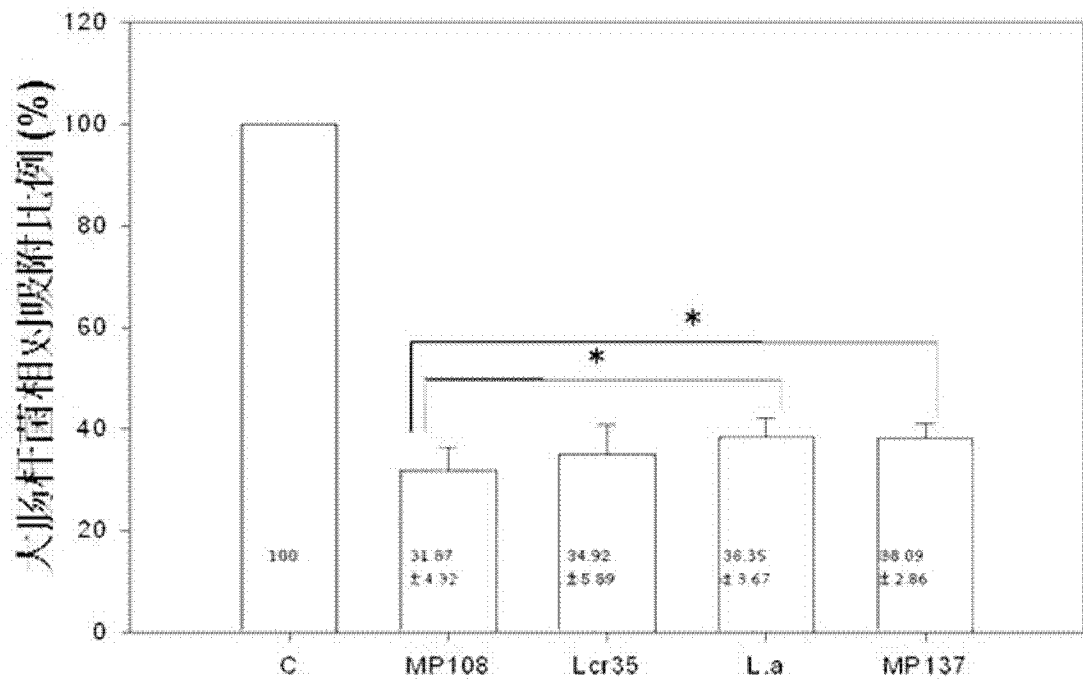


图 7B