



(21)申請案號：110134593

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K35/741 (2015.01)

A61K35/744 (2015.01)

A61P11/00 (2006.01)

(71)申請人：創百股份有限公司 (中華民國) (TW)

臺中市北區文心路四段 208 之 1 號 5 樓之 1、5 樓之 2

(72)發明人：林美吟 (TW)；邱鴻濱 (TW)；邱毅恆 (TW)

(74)代理人：高玉駿；楊祺雄

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 910893 2019 年 05 月 08 日

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 910894 2019 年 05 月 08 日

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 911010 2020 年 07 月 23 日

(56)參考文獻：

TW I418355B

期刊 Xifan Wang, et al., "Oral administration of Lactobacillus paracasei L9 attenuates PM2.5-induced enhancement of airway hyperresponsiveness and allergic airway response in murine model of asthma", PLoS ONE, Vol.12, No.2, 無, 15 February 2017, <https://journals.plos.org/plosone/article/comments?id=10.1371/journal.pone.0171721>

期刊 Clifford A. Adams, "The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers", Nutrition Research Reviews, Vol. 23, Issue 1, 無, June 2010, pages 37-46

審查人員：吳思瑩

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：4 共 27 頁

(54)名稱

使用熱致死的乳酸菌菌株來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷

(57)摘要

本發明揭示熱致死的乳酸菌菌株可被用來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷。



I802009

【發明摘要】

【中文發明名稱】 使用熱致死的乳酸菌菌株來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷

【中文】

本發明揭示熱致死的乳酸菌菌株可被用來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷。

【指定代表圖】 圖 1

【發明說明書】

【中文發明名稱】 使用熱致死的乳酸菌菌株來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於使用熱致死的乳酸菌菌株來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷(particulate matter-induced lung injury)。

【先前技術】

【0002】 大氣微粒物質(atmospheric particulate matter)[又被稱為微粒物質(particulate matter, PM)或微粒子(fine particle)]是一種主要的空氣汙染形式，意指懸浮在大氣環境中的微小固體顆粒，可依據氣動直徑(aerodynamic diameter)的大小來進行區分，例如，PM 10與PM 2.5分別表示氣動直徑為 $\leq 10 \mu\text{m}$ 與 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的微粒物質。

【0003】 微粒物質的組成包括芳香烴(aromatic hydrocarbon)、金屬、礦物以及有機毒素等，它們會對人體的呼吸系統(respiratory system)以及循環系統(circulatory system)造成不利的影響，例如，氣動直徑約為5至 $10 \mu\text{m}$ 的微粒物質會積聚於

支氣管中，以及氣動直徑約為1至5 μm 的微粒物質會侵入至肺泡，進而透過肺泡的微血管進入至人體的循環系統中，引起全身性發炎 (systemic inflammation)。而當人體的肺部長時間暴露於微粒物質時，則會造成肺損傷 (lung injury)[包括發炎性損害 (inflammatory damage)]，進而引起支氣管纖維化 (bronchial fibrosis)、呼吸功能的惡化 (worsening of respiratory function) 以及肺部免疫系統的受損 (impairment of lung immune systems) 等嚴重的症狀。

【0004】 聯合國糧食農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 以及世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 將益生菌 (probiotics) 定義為：活的微生物，當它呈適當數量來被投藥時，可賦予宿主一健康益處 (health benefit)。目前可作為益生菌使用的微生物有許多種類，例如乳桿菌屬 (*Lactobacillus*)、雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*)、芽孢桿菌屬 (*Bacillus*)、乳球菌屬 (*Lactococcus*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、酵母菌屬 (*Saccharomyces*) 以及鏈球菌屬 (*Streptococcus*) 等，特別是前兩個菌屬的物種。

【0005】 已有研究指出，腸道微生物的物種以及代謝產物 (metabolites) 的改變與免疫反應和發炎的變化以及肺相關疾病的

進展之間有著密切的關係，例如，腸道微生物的多樣性可藉由調控 Th1/Th2 平衡 (Th1/Th2 balance) 來緩解肺部發炎的症狀。因此，本領域的相關研究人員已嘗試將具有調整腸道菌相特性的益生菌拿來應用於肺相關疾病的治療和/或預防。

【0006】 然而，這些益生菌在口服之後，通常會有一定數量的益生菌會遭受到胃和十二指腸中的胃酸與膽鹽的破壞，且在其發揮效用之前，還需要與腸道中的有害菌群競爭，才能夠順利地於腸道中定殖 (colonize) 與增殖 (proliferation)，因而難以維持發揮效用所需的菌數。另外，由於益生菌作為一種活的微生物成分 (live microbial ingredient)，也存在有不易保存之問題。

【發明內容】

發明概要

【0007】 為發展可有效對抗微粒物質 - 誘發的肺損傷 (particulate matter-induced lung injury) 的藥物，申請人意外地發現到：不同於使用活的微生物之習知技術，本發明熱致死的 (heat-killed) 乳酸菌菌株 [亦即熱致死的乳桿菌屬物種 (*Lactobacillus* spp.) 與雙歧桿菌屬物種 (*Bifidobacterium* spp.) 的菌株] 能夠有效地在帶有微粒物質 - 誘發的肺損傷的小鼠體內降低肺臟組織中的免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 濃度以及提升肺臟組織中的 Th1/Th2 細胞激素分泌率 (Th1/Th2 cytokine

secretion ratios)，進而達到治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷之效用。

【0008】 於是，在第一個方面，本發明提供一種熱致死的乳酸菌菌株供應用於製備一用來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷之醫藥品的用途，其中該乳酸菌菌株是乳桿菌屬物種和/或雙歧桿菌屬物種的菌株。

【0009】 在第二個方面，本發明提供一種用於治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷的方法，其包括對一需要治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷的個體投予(administering)一如上所述的熱致死的乳酸菌菌株。

【圖式簡單說明】

【0010】 本發明的上述以及其它目的、特徵與優點，在參照以下的詳細說明與較佳實施例和隨文檢附的圖式後，將變得明顯，其中：

圖1顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的IgE濃度；

圖2顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的Th1/Th2細胞激素分泌率；

圖3顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的IgE濃度；以及

圖4顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的Th1/Th2細胞激素分泌率。

【實施方式】**發明的詳細說明**

【0011】 要被瞭解的是：若有任何一件前案刊物在此被引述，該前案刊物不構成一個下述承認：在台灣或任何其他國家之中，該前案刊物形成本技藝中的常見一般知識之一部分。

【0012】 為了這本說明書之目的，將被清楚地瞭解的是：文字“包含有(*comprising*)”意指“包含但不限於”，以及文字“包括(*comprises*)”具有一對應的意義。

【0013】 除非另外有所定義，在本文中所使用的所有技術性與科學術語具有熟悉本發明所屬技藝的人士所共同瞭解的意義。一熟悉本技藝者會認知到許多與那些被描述於本文中者相似或等效的方法和材料，它們可被用於實施本發明。當然，本發明決不受到所描述的方法和材料之限制。

【0014】 本發明提供一種熱致死的(*heat-killed*)乳酸菌菌株供應用於製備一用來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷(*particulate matter-induced lung injury*)之醫藥品的用途，其中該乳酸菌菌株是乳桿菌屬物種(*Lactobacillus spp.*)和/或雙歧桿菌屬物種(*Bifidobacterium spp.*)的菌株。

【0015】 較佳地，該乳酸菌菌株是選自於由下列所構成之群組中的乳桿菌屬物種：植物乳桿菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)，以及它們的組合。

【0016】 較佳地，該乳酸菌菌株是選自於由下列所構成之群組中的雙歧桿菌屬物種：長雙歧桿菌(*Bifidobacterium longum*)、乳雙歧桿菌(*Bifidobacterium lactis*)，以及它們的組合。

【0017】 如本文中所使用的，術語“熱致死(heat-killing)”與“熱去活(heat inactivation)”可被交換地使用，並且意指透過歷時一預定的時間的熱處理(heat treatment)來殺死益生菌。

【0018】 依據本發明，該熱致死的乳酸菌菌株可以採用熟習此項技藝者所詳知且慣用的技術而被製得。在此方面，可以參考，例如，Segawa S. *et al.* (2008), *Int. J. Food Microbiol.*, 128: 371-377以及Ben Othman M. *et al.* (2020), *Food Res. Int.*, doi: 10.1016/j.foodres.2019.108792。

【0019】 依據本發明，該熱致死可以藉由在一為60°C至140°C的溫度下加熱歷時1秒鐘至30分鐘來進行。在本發明的一個較佳具體例中，該熱致死是在73±2°C下加熱歷時15秒來進行。

【0020】 依據本發明，該熱致死的乳酸菌菌株可進一步被進行一乾燥處理。該乾燥處理可以採用熟習此項技藝者所詳知且慣用的技術來進行，這包括，但不限於：噴霧乾燥處理(spray-drying

treatment)、冷凍乾燥處理(lyophilization treatment)、真空蒸發處理(vacuum evaporation treatment)，以及它們的組合。在本發明的一個較佳具體例中，該熱致死的乳酸菌菌株被進行一噴霧乾燥處理。

【0021】 依據本發明，該熱致死的乳酸菌菌株在被進行該乾燥處理之前有先經過一分離處理來移除培養基。

【0022】 較佳地，該分離處理是選自於由下列所構成之群組：離心處理(centrifugation treatment)、過濾處理(filtration treatment)，以及它們的組合。在本發明的一個較佳具體例中，該分離處理是離心處理。

【0023】 如本文中所使用的，術語“治療(treating)”或“治療(treatment)”微粒物質-誘發的肺損傷意指該肺損傷的嚴重性(severity)或該肺損傷的症狀(symptom)被減少(reduced)，或是該肺損傷被部分地(partially)或完全地(entirely)消除(eliminated)。

【0024】 如本文中所使用的，術語“預防(preventing)”或“預防(prevention)”微粒物質-誘發的肺損傷意指一個體在還沒有被診斷具有該肺損傷時，消除(eliminate)或減少(reduce)該肺損傷的發生率(incidence)，以及減緩(slow)、延遲(delay)、控制(control)或減少(decrease)該肺損傷的可能性(likelihood)或機率(probability)。

【0025】 如本文中所使用的，術語“微粒物質-誘發的肺損傷”意指生物體的肺部在經過微粒物質暴露之後所造成的損傷(injury)或損害(damage)，這包括，但不限於：發炎細胞浸潤(inflammatory cell infiltration)、間質的增厚(interstitial thickening)、結構變形(structure distortion)、異常的膠原蛋白囤積(abnormal collagen deposition)以及肺部纖維化(pulmonary fibrosis)。

【0026】 依據本發明，該醫藥品可利用熟習此技藝者所詳知的技術而被製造成一適合於口服投藥(oral administration)的劑型(dosage form)，這包括，但不限於：無菌的粉末、錠劑(tablet)、片劑(troche)、口含錠(lozenge)、丸劑(pellet)、膠囊(capsule)、分散性粉末(dispersible powder)或細顆粒(granule)、溶液、懸浮液(suspension)、乳劑(emulsion)、糖漿(syrup)、酏劑(elixir)、濃漿(slurry)以及類似之物。

【0027】 依據本發明，該醫藥品可進一步包含有一被廣泛地使用於藥物製造技術之藥學上可接受的載劑(pharmaceutically acceptable carrier)。例如，該藥學上可接受的載劑可包含一或多種選自於下列的試劑：溶劑(solvent)、緩衝液(buffer)、乳化劑(emulsifier)、懸浮劑(suspending agent)、分解劑(decomposer)、崩解劑(disintegrating agent)、分散劑(dispersing agent)、黏結劑(binding agent)、賦形劑

(excipient)、安定劑(stabilizing agent)、螯合劑(chelating agent)、稀釋劑(diluent)、膠凝劑(gelling agent)、防腐劑(preservative)、潤濕劑(wetting agent)、潤滑劑(lubricant)、吸收延遲劑(absorption delaying agent)、脂質體(liposome)以及類似之物。有關這些試劑的選用與數量是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。

【0028】 依據本發明，該醫藥品可進一步包含有一選自於由下列所構成之群組中的益生菌(probiotics)：乳桿菌屬物種、雙歧桿菌屬物種、芽孢桿菌屬物種(*Bacillus* spp.)、鏈球菌屬物種(*Streptococcus* spp.)、乳球菌屬物種(*Lactococcus* spp.)、營養缺陷菌屬物種(*Abiotrophia* spp.)、氣球菌屬物種(*Aerococcus* spp.)、肉食桿菌屬物種(*Carnobacterium* spp.)、腸球菌屬物種(*Enterococcus* spp.)、腸膜明串珠菌屬物種(*Leuconostoc* spp.)、酒球菌屬物種(*Oenococcus* spp.)、小球菌屬物種(*Pediococcus* spp.)(又被稱為片球菌屬物種)、四聯球菌屬物種(*Tetragenococcus* spp.)、徘徊球菌屬物種(*Vagococcus* spp.)、魏斯氏菌屬物種(*Weissella* spp.)、酵母菌屬物種(*Saccharomyces* spp.)、克魯維酵母菌屬物種(*Kluyveromyces* spp.)、葡萄球菌屬物種(*Staphylococcus* spp.)、丙酸桿菌屬物種(*Propionibacterium* spp.)，以及它們的組合。

【0029】 較佳地，該益生菌是選自於由下列所構成之群組：凝結芽孢桿菌(*Bacillus coagulans*)、副乾酪乳桿菌(*Lactobacillus paracasei*)，以及它們的組合。

【0030】 如本文中所使用的，術語“益生菌”與“益生性微生物 (probiotic microbes)”可被交換地使用，並且意指活性微生物 (live microorganisms) 的製劑 (preparations)，當被一人類或動物攝食 (ingested) 之後，該等微生物可以維持 (remain) 並存活在胃腸道之中，而且能夠發揮所欲的效用 (例如，腸道菌相調整的效用、預防或治療的效用等)。

【0031】 依據本發明，在該醫藥品中，該益生菌與該熱致死的乳酸菌菌株的菌數比可落在 1 : 0.5 至 1 : 5 的範圍內。

【0032】 本發明亦提供一種用於治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷的方法，其包括對一需要治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷的個體投予 (administering) 一如上所述的熱致死的乳酸菌菌株。

【0033】 如本文中所使用的，術語“投予”以及“投藥 (administration)”可被交換地使用，並且意指藉由任何合適的途徑來對一個體導入 (introducing)、提供 (providing) 或遞送 (delivering) 一預定的活性成分以執行其預期的效用。

【0034】 如本文中所使用的，術語“個體(subject)”意指任何感興趣的哺乳類動物，諸如人(humans)、小鼠(mice)以及大鼠(rats)。

【0035】 依據本發明，該熱致死的乳酸菌菌株的投藥劑量與投藥次數會視下列因素而變化：要被改善的疾病之嚴重性，投藥途徑，以及要被改善的個體之體重、年齡、身體狀況與反應。而有關投藥劑量與投藥次數的選擇是落在熟習此項技術之人士的專業素養與例行技術範疇內。

較佳實施例之詳細說明

【0036】 本發明將就下面的實施例來做進一步說明，但應瞭解的是，該等實施例僅是供例示說明用，而不應被解釋為本發明的實施上的限制。

實施例

一般實驗材料：

1. 在下面的實施例中所使用的益生菌菌株是得自於國立中興大學食品暨應用生物科技學系(Department of Food Science and Biotechnology at National Chung Hsing University)的微生物研究室，並且已被整合於下面的表1中。

表1. 各個益生菌菌株

菌屬	菌株
乳桿菌 (<i>Lactobacillus</i>)	植物乳桿菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>) CB102 (BCRC 910893 ; DSM 33894)
	嗜酸乳桿菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) JCM1132
	副乾酪乳桿菌 (<i>Lactobacillus paracasei</i>) JCM8130
雙歧桿菌 (<i>Bifidobacterium</i>)	長雙歧桿菌 (<i>Bifidobacterium longum</i>) CB108 (BCRC 910894 ; DSM 33895)
	乳雙歧桿菌 (<i>Bifidobacterium lactis</i>) JCM10602
芽孢桿菌 (<i>Bacillus</i>)	凝結芽孢桿菌 (<i>Bacillus coagulans</i>) CB85 (BCRC 911010 ; DSM 33893)

【0037】 在該等益生菌菌株中，嗜酸乳桿菌JCM1132、副乾酪乳桿菌JCM8130以及乳雙歧桿菌JCM10602皆已為商業上可購得的。而植物乳桿菌CB102與長雙歧桿菌CB108已於西元2019年5月8日分別以寄存編號BCRC 910893與BCRC 910894被寄存於台灣的食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI) 的生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC)(300新竹市食品路331號, 台灣)，以及凝結芽孢桿菌CB85亦已於西元2020年7月23日以寄存編號BCRC 911010被寄存於台灣的食品工業發展研究所的生物資源保存及研究中心。另外，植物乳桿菌CB102、

長雙歧桿菌CB108與凝結芽孢桿菌CB85亦有依據布達佩斯條約 (the Budapest Treaty) 的規定於西元2021年6月9日分別以寄存編號DSM 33894、DSM 33895與DSM 33893被寄存於德國微生物以及細胞培養物收集中心有限公司 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ)。

2. 活的(viable)乳酸菌菌株的菌液之製備：

【0038】 將上面第1項當中所述的6種益生菌菌株分別接種至MRS肉湯培養基(商品名為BD Difco Lactobacilli MRS Broth，貨號為DF0881-17-5)中，並於37°C下進行培養歷時16小時，藉此而得到各個活的乳酸菌菌株的菌液。

3. 熱致死的(heat-killed)乳酸菌菌株的菌粉之製備：

【0039】 首先，使用高溫短時間殺菌法 (high temperature short time, HTST) 在 $73\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下對在上面第2項當中所得到的植物乳桿菌CB102、嗜酸乳桿菌JCM1132、長雙歧桿菌CB108以及乳雙歧桿菌JCM10602的菌液進行熱致死(heat-killing)歷時15秒，接著在 25°C 下以10,000 rpm來進行離心歷時15分鐘。在倒除上澄液之後，將所得到的沉澱物 (pellets) 拿來進行噴霧乾燥處理 (spray-drying treatment)，藉此而得到各個熱致死的乳酸菌菌株的菌粉。

4. 實驗動物：

【0040】 在下面實施例中所使用的雄性C57BL/6J小鼠(6週大，體重約為 20 ± 1 g)是購自於樂斯科生物科技股份有限公司(BioLasco Taiwan Co., Ltd)。所有的實驗動物被飼養於一個光照與黑暗各為12小時、室溫維持在 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以及相對濕度維持在 $55\pm 5\%$ 的獨立空調的動物房內，而且水分與飼料被充分地供給。有關實驗動物的飼養環境、處理以及一切實驗程序均符合國家衛生研究院(National Institutes of Health, NIH)的實驗動物飼養管理及使用規範(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)。

5. 製備微粒物質(particulate matter, PM)的懸浮液：

【0041】 將適量之購自於Sigma-Aldrich的美國國家標準與技術研究所(National Institute of Standards and Technology, NIST)之沉積有標準參考材料(Standard Reference Material, SRM) NIST[®] SRM[®] 2783的濾膜剪切成碎片並浸泡至磷酸鹽緩衝生理鹽水(phosphate buffered saline, PBS)中，繼而進行超音波處理歷時15分鐘，然後以1,000 rpm來進行離心歷時5分鐘。之後，收取上澄液並將之拿來進行減壓乾燥處理，然後配於PBS中，藉此而得到PM懸浮液。

實施例 1. 熱致死的乳酸菌菌株在對抗 PM-誘發的肺損傷(lung injury)上的效用評估

【0042】 在本實施例中，申請人以免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)以及介白素-4 (interleukin-4, IL-4)的表現量來作為發炎指標，俾以評估熱致死的乳酸菌菌株在對抗PM-誘發的肺損傷上的效用。

實驗方法：

A、熱致死的乳酸菌菌株的投藥以及PM的處理：

【0043】 首先，將雄性 C57BL/6J 小鼠隨機地分成 6 組 (每組 $n=6$)，其中包括 1 個正常對照組、1 個病理對照組以及 4 個熱致死菌組 (亦即熱致死菌組 1 至 4)。接著，透過管餵 (oral gavage) 的方式，將在上面“一般實驗材料”的第 3 項當中所得之熱致死的植物乳桿菌 CB102、長雙歧桿菌 CB108、嗜酸乳桿菌 JCM1132 以及乳雙歧桿菌 JCM10602 的菌粉分別口服投藥給熱致死菌組 1 至 4 的小鼠 (劑量為 1.0×10^7 CFU/天，配於 PBS 中)。每天投藥 1 次，投藥時間總共歷時 14 天。至於正常對照組與病理對照組的小鼠則不作任何處理。

【0044】 在開始投藥之後的第 15 天之時，病理對照組與各個熱致死菌組的小鼠分別被鼻內投藥以 100 μ L 之在上面“一般實驗材料”的第 5 項當中所得到的 PM 懸浮液 (劑量為 0.16 mg PM / 隻)。每天投藥 1 次，投藥時間總共歷時 3 天。至於正常對照組的小鼠則不作任何處理。

B、肺臟組織中 IgE、IFN- γ 以及 IL-4 濃度的測定：

【0045】 在開始投藥之後的第18天之時，藉由CO₂來犧牲各組的小鼠，然後取出各組小鼠的肺臟。接著，將肺臟置於PBS中，繼而於4℃下以超音波處理器進行震盪共計5次，每次歷時10秒，然後置於冰上進行冷卻。之後，在4℃下以1,000 rpm進行離心歷時15分鐘後，收集各組的上澄液，並分別使用IgE ELISA套組(廠牌為BD Biosciences，貨號為555248)、IFN- γ ELISA套組(廠牌為BD Biosciences，貨號為555138)以及IL-4 ELISA套組(廠牌為BD Biosciences，貨號為555232)來進行IgE、IFN- γ 以及IL-4的濃度測定。所測得的各個吸光值分別根據預先以具有不同已知濃度的IgE、IFN- γ 以及IL-4的標準品相對於它們自身的吸光值所作出的標準曲線而分別被換算成其濃度(pg/mg)。

【0046】 之後，將各組的IFN- γ 濃度分別除以各自的IL-4濃度，藉此而計算出各組的Th1/Th2細胞激素分泌率(Th1/Th2 cytokine secretion ratios)，亦被稱為促-/抗-發炎性細胞激素分泌率(pro-/anti-inflammatory cytokine secretion ratios)。

結果：

【0047】 圖1顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的IgE濃度。從圖1可見，與正常對照組相較之下，病理對照組的IgE濃度有明顯的升高，這表示PM成功地誘發小鼠的肺部產生發炎反應。而與病理對照組相較之下，熱致死菌組1至4的IgE濃度皆呈現明顯下降的情形。

【0048】 圖2顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的Th1/Th2細胞激素分泌率。從圖2可見，與正常對照組相較之下，病理對照組的Th1/Th2細胞激素分泌率有明顯的降低，這表示PM成功地誘發小鼠的肺部產生發炎反應。而與病理對照組相較之下，熱致死菌組1至4的Th1/Th2細胞激素分泌率皆呈現明顯升高的情形。

【0049】 這些實驗結果顯示：對小鼠進行乳桿菌屬(*Lactobacillus*)或雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)的熱致死菌株的預處理能夠有效地保護小鼠對抗PM所誘發的肺部發炎。因此，熱致死的乳桿菌屬或雙歧桿菌屬物種的菌株被預期可以達到治療和/或預防PM-誘發的肺損傷的效用。

實施例 2. 熱致死的乳酸菌菌株與活的益生菌菌株的組合在對抗PM-誘發的肺損傷上的效用評估

實驗方法：

【0050】 首先，將雄性C57BL/6J小鼠隨機地分成12組(每組n=6)，其中包括1個正常對照組、1個病理對照組、2個活菌組(亦即活菌組1與2)以及8個混合組(亦即混合組1至8)。接著，依照下面表2所示的劑量來將在上面“一般實驗材料”的第2項當中所得到的活的凝結芽孢桿菌CB85以及副乾酪乳桿菌JCM8130的菌液，以及在上面“一般實驗材料”的第3項當中所得到的熱致死的植物乳桿菌CB102、長雙歧桿菌CB108、嗜酸乳桿菌JCM1132以及乳雙歧桿菌

JCM10602的菌粉配於PBS中並透過管餵的方式口服投藥給各個活菌組與各個混合組的小鼠。每天投藥1次，投藥時間總共歷時14天。至於正常對照組與病理對照組的小鼠則不作任何處理。

表2. 各組小鼠被口服投藥的益生菌菌株以及劑量(CFU/天)

組別	活的乳酸菌菌株		熱致死的乳酸菌菌株			
	凝結芽孢桿菌 CB85	副乾酪乳桿菌 JCM8130	植物乳桿菌 CB102	長雙歧桿菌 CB108	嗜酸乳桿菌 JCM1132	乳雙歧桿菌 JCM10602
正常對照組	—	—	—	—	—	—
病理對照組	—	—	—	—	—	—
活菌組 1	6.8×10^6	—	—	—	—	—
活菌組 2	—	6.8×10^6	—	—	—	—
混合組 1	3.4×10^6	—	5.0×10^6	—	—	—
混合組 2	—	3.4×10^6	5.0×10^6	—	—	—
混合組 3	3.4×10^6	—	—	5.0×10^6	—	—
混合組 4	—	3.4×10^6	—	5.0×10^6	—	—
混合組 5	3.4×10^6	—	—	—	5.0×10^6	—
混合組 6	—	3.4×10^6	—	—	5.0×10^6	—
混合組 7	3.4×10^6	—	—	—	—	5.0×10^6
混合組 8	—	3.4×10^6	—	—	—	5.0×10^6

【0051】 在開始投藥之後的第15天之時，病理對照組、各個活菌組與各個混合組的小鼠分別被鼻內投藥以100 μ L之在上面“一般實驗材料”的第5項當中所得到的PM懸浮液(劑量為0.16 mg PM / 隻)。每天被投藥1次，投藥時間總共歷時3天。至於正常對照組的小鼠則不作任何處理。

【0052】 接著，依照上面實施例1的第B項當中所述的方法來進行肺臟組織中IgE、IFN- γ 以及IL-4濃度的測定以及Th1/Th2細胞激素分泌率的計算。

結果：

【0053】 圖3顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的IgE濃度。從圖3可見，與正常對照組相較之下，病理對照組的IgE濃度有明顯的升高，這表示PM成功地誘發小鼠的肺部產生發炎反應。而與病理對照組相較之下，活菌組1與2以及混合組1至8的IgE濃度皆呈現明顯下降的情形。特別地，混合組1至8的IgE濃度是近似於正常對照組所具者。

【0054】 圖4顯示各組小鼠的肺臟組織所測得的Th1/Th2細胞激素分泌率。從圖4可見，與正常對照組相較之下，病理對照組的Th1/Th2細胞激素分泌率有明顯的降低，這表示PM成功地誘發小鼠的肺部產生發炎反應。而與病理對照組相較之下，活菌組1與2以及混合組1至8的Th1/Th2細胞激素分泌率皆呈現明顯升高的情形。特

別地，混合組1至8的Th1/Th2細胞激素分泌率的升高情形又更為顯著。

【0055】 此外，從圖3與圖4的實驗結果亦可觀察到，混合組1、3、5以及7相較於病理對照組之IgE濃度的下降幅度以及Th1/Th2細胞激素分泌率的升高幅度皆是明顯高於活菌組1相較於病理對照組之所具者，以及混合組2、4、6以及8相較於病理對照組之IgE濃度的下降幅度以及Th1/Th2細胞激素分泌率的升高幅度皆是明顯高於活菌組2相較於病理對照組之所具者，這表示：使用熱致死的乳酸菌菌株來替代相似用量的活菌菌株能夠大幅提升活菌菌株在抑制小鼠的肺部發炎上的效用。

【0056】 這些實驗結果顯示：熱致死的乳酸菌菌株(亦即熱致死的乳桿菌屬或雙歧桿菌屬物種的菌株)與活的菌株的組合的預處理能夠有效地保護小鼠對抗PM所誘發的肺部發炎。因此，該組合亦被預期可以達到治療和/或預防PM-誘發的肺損傷的效用。

【0057】 於本說明書中被引述之所有專利和文獻以其整體被併入本案作為參考資料。若有所衝突時，本案詳細說明(包含界定在內)將佔上風。

【0058】 雖然本發明已參考上述特定的具體例被描述，明顯地在不背離本發明之範圍和精神之下可作出很多的修改和變化。因此意欲的是，本發明僅受如隨文檢附之申請專利範圍所示者之限制。

【生物材料寄存】

【0059】 TW 中華民國；食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC of FIRDI)；2019/05/08；BCRC 910893。

【0060】 TW 中華民國；食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC of FIRDI)；2019/05/08；BCRC 910894。

【0061】 TW 中華民國；食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(BCRC of FIRDI)；2020/07/23；BCRC 911010。

【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】 一種熱致死的乳酸菌菌株供應用於製備一用來治療和/或預防微粒物質-誘發的肺損傷之醫藥品的用途，其中該乳酸菌菌株是選自於由下列所構成之群組：植物乳桿菌 (*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、長雙歧桿菌 (*Bifidobacterium longum*)、乳雙歧桿菌 (*Bifidobacterium lactis*)，以及它們的組合。
- 【請求項2】 如請求項1的用途，其中該醫藥品進一步包含有一選自於由下列所構成之群組中的益生菌：凝結芽孢桿菌 (*Bacillus coagulans*)、副乾酪乳桿菌 (*Lactobacillus paracasei*)，以及它們的組合。
- 【請求項3】 如請求項1的用途，其中該醫藥品進一步包含有一藥學上可接受的載劑。
- 【請求項4】 如請求項1的用途，其中該醫藥品是呈一供口服投藥的劑型。

【發明圖式】

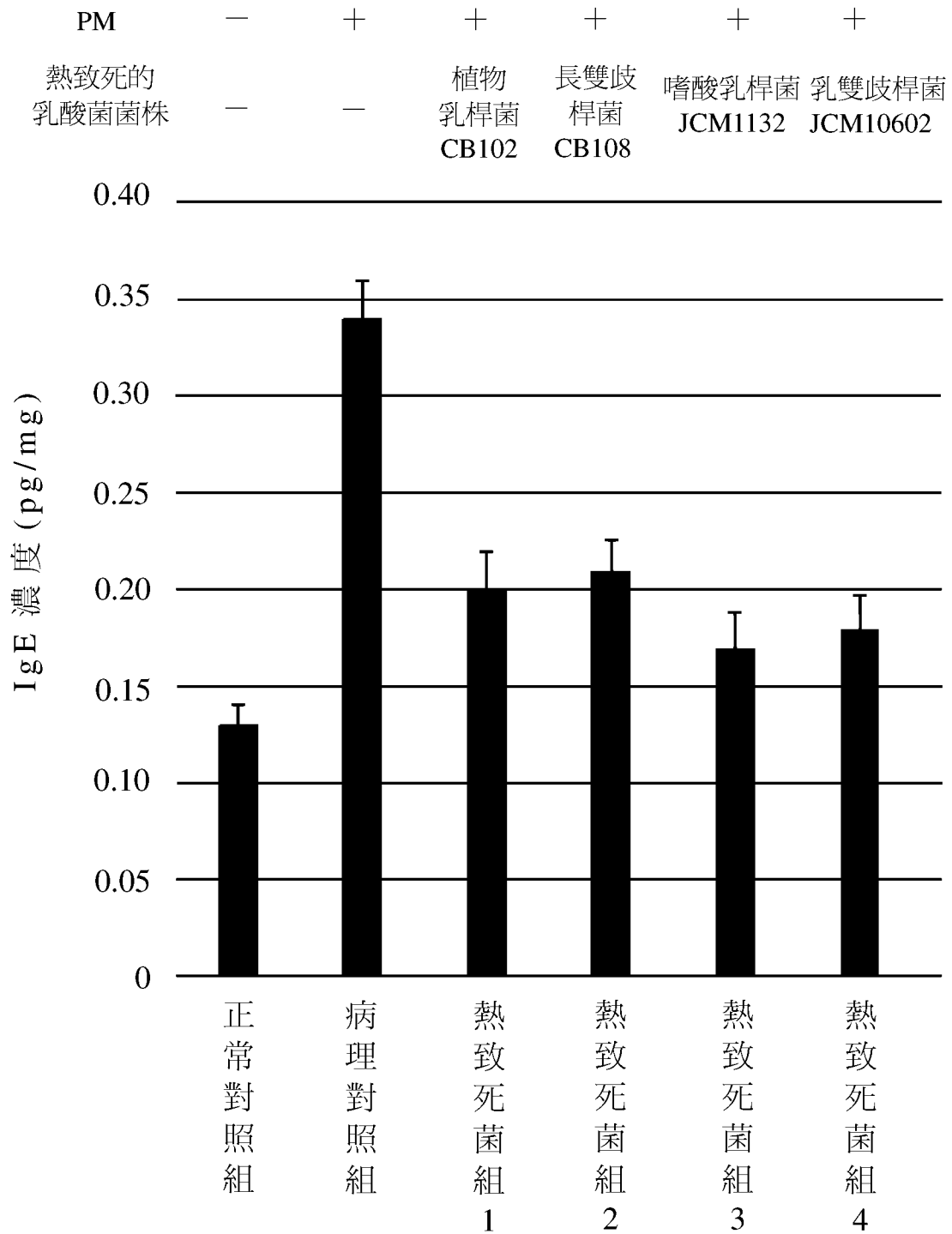


圖 1

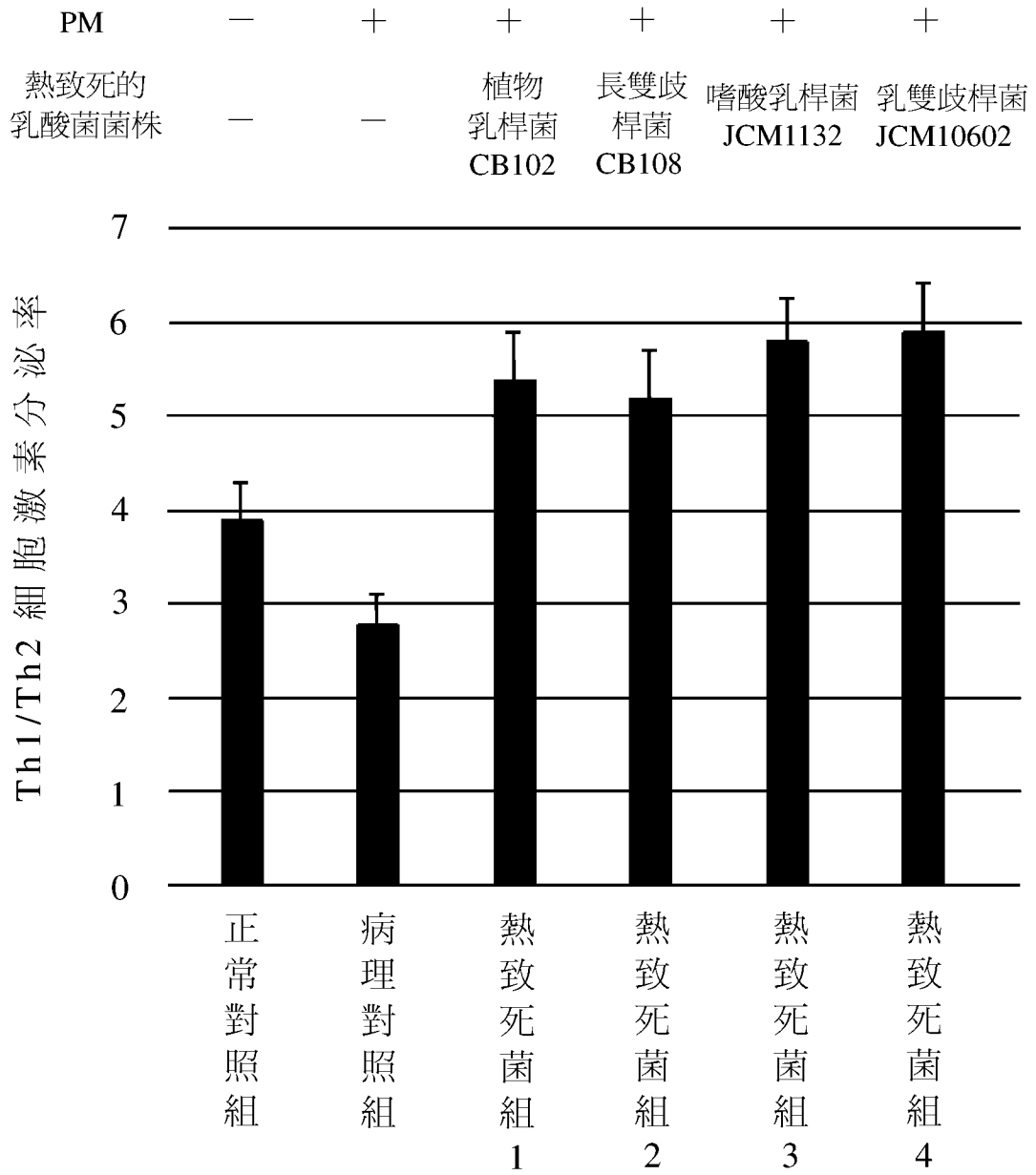


圖 2

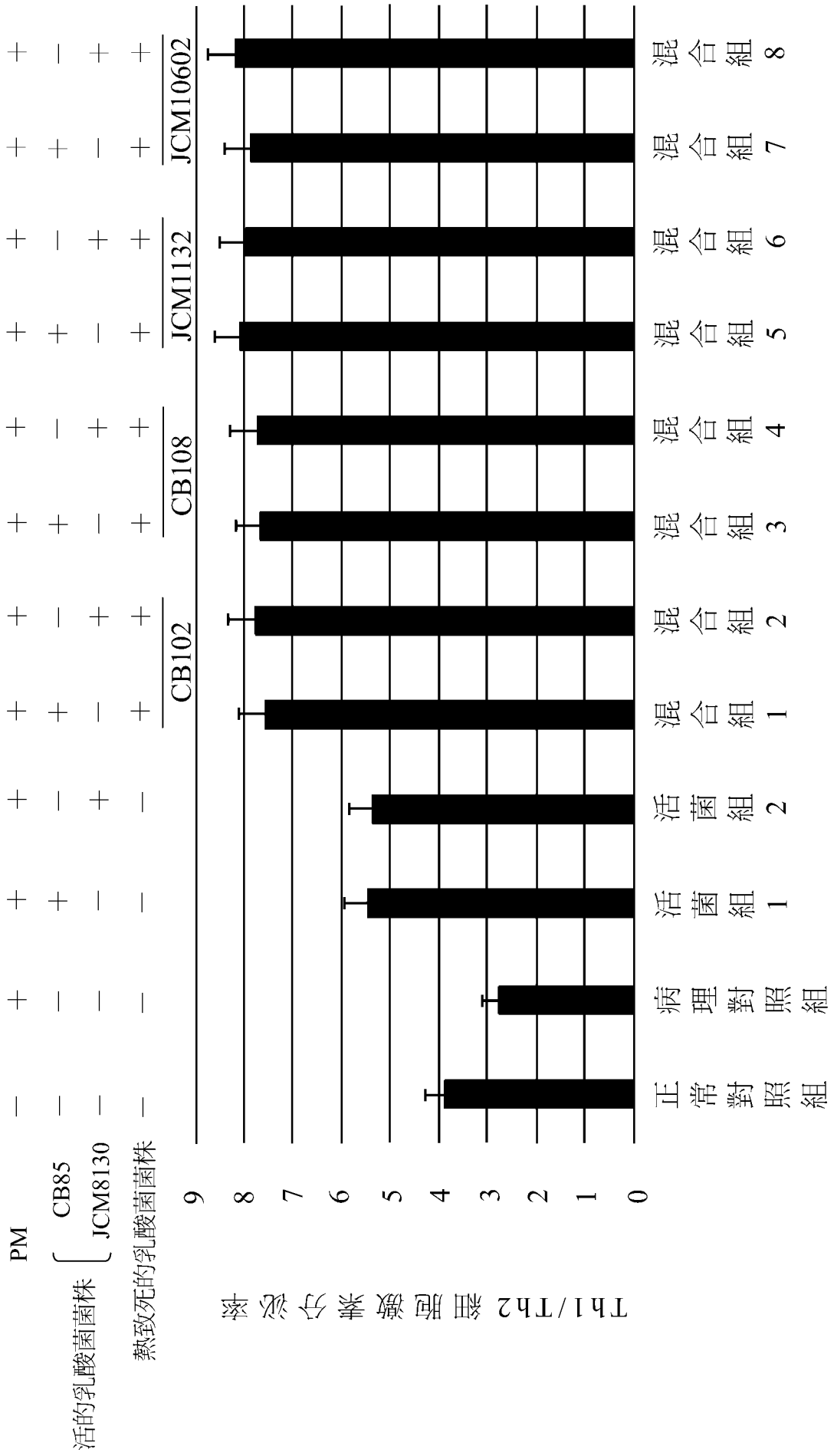


圖 4