



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201945016 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 01 日

(21) 申請案號：108110962 (22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 28 日
(51) Int. Cl. : *A61K35/744 (2015.01)* *C12P19/04 (2006.01)*
C12N1/20 (2006.01)
(30) 優先權：2018/04/25 日本 2018-084047
(71) 申請人：日商旭興產股份有限公司 (日本) ASAHI KOHSAN CORPORATION (JP)
日本
(72) 發明人：杉山政則 SUGIYAMA, MASANORI (JP)
(74) 代理人：劉法正；尹重君
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：5 共 40 頁

(54) 名稱

第 I 型過敏用組成物

(57) 摘要

含有屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分之組成物對於預防或改善第 I 型過敏甚是有效，尤其，可供用作用以預防或改善過敏性反應之飲食品、醫藥品、飼料及化妝品。

【發明說明書】

【中文發明名稱】

第I型過敏用組成物

【技術領域】

【0001】本發明關於一種第I型過敏用組成物。更詳言之，本發明關於一種用以預防或改善第I型過敏(尤其是過敏性反應(anaphylaxis))之組成物，其係以屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分。

【先前技術】

【0002】背景技術

近年來，由於飲食生活變化、大氣汙染惡化以及暴露於過敏原物質及金屬飾品等各種原因，已指出花粉症及異位性皮膚炎、接觸性皮膚炎等過敏顯著增加。過敏被視為肇因於免疫反應之對活體之全身或局部性障礙。而，過敏大致分為因血中抗體所致體液性免疫反應而起之第I、II及III型過敏以及因致敏淋巴球所致細胞性免疫反應而起之第IV型過敏。咸認第I型過敏之起因在於，對於入侵體內之花粉等抗原，抗原呈現細胞引發T細胞之分化不均而誘導B細胞產生IgE抗體。過敏性反應(anaphylaxis)係被分類為第I型過敏之全身性疾病，有時會陷於威脅生命之休克狀態(過敏性休克(anaphylaxis shock))。

【0003】對於此種過敏，可用之藥物有抗組織胺劑、類固醇藥等。然而，此等藥物已被指出顯示各種副作用而

未必安全。

【0004】在此種狀況下，近年來，涉入免疫反應且具抗過敏作用之乳酸菌作為高安全性之抗過敏素材而受到矚目。舉例來說，已提出短毛乳酸桿菌(*Lactobacillus brevis*)等可抑制IgE抗體產生之乳酸菌(專利文獻1)、具有組織胺遊離抑制效果之洛德乳酸桿菌(*Lactobacillus reuteri*)(AD0002菌株)之乳酸菌(專利文獻2)、可活化腸道免疫或第I型輔助T細胞之屎腸球菌(*Enterococcus faecium*)乳酸菌(專利文獻3及4)以及具Th1免疫增強作用與Th2免疫抑制作用之副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)KW3110菌株之乳酸菌(非專利文獻1)等。

先行技術文獻

專利文獻

【0005】[專利文獻1]日本特開平09-2959號公報

[專利文獻2]日本特開2000-95697號公報

[專利文獻3]日本特開2006-67881號公報

[專利文獻4]日本特開2006-104107號公報

非專利文獻

【0006】[非專利文獻1]International archives of allergy and immunology 2004; 135: 205-215

【發明內容】

【0007】發明概要

發明欲解決之課題

於此種背景技術下，乃冀望開發出以乳酸菌作為有效

成分之新穎抗過敏用組成物。爰此，本發明之課題即在於，提供一種可有效預防或改善第I型過敏(尤其是過敏性反應)且以乳酸菌作為有效成分之新穎組成物。

用以解決課題之手段

【0008】本案發明人，針對本發明，係以開發出供預防或改善第I型過敏(尤其是過敏性反應)之新穎組成物為目的而精心探討，結果發現，屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌對於小鼠主動皮膚過敏性反應具抑制作用而具有預防或改善第I型過敏(尤其是過敏性反應)之作用，並據此知識見解進一步反覆研究而完成本發明。

【0009】於本發明之一面向中，本發明關於一種用以預防或改善第I型過敏之組成物，係以屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分。

本發明之組成物可適宜地使用於供預防或改善過敏性反應。

就本發明之組成物而言，乳酸菌以源自無花果之乳酸菌為宜，尤以*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68菌株(寄存編號NITE BP-02242)或與其同等之乳酸菌為佳。

本發明之組成物中，乳酸菌之培養物或發酵物以在鳳梨屬植物果汁存在下培養乳酸菌或使其發酵所得之培養物或發酵物為宜。

本發明之組成物中，乳酸菌所產生之多醣類可舉如：

中性多醣體，其具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構；或者，主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體。

本發明之組成物以飲食品組成物為宜，飲食品宜舉如飲料、機能性食品、發酵食品或補充劑(supplement)。

此外，本發明之組成物以醫藥組成物為宜。

進一步來說，本發明之組成物以飼料組成物及化妝品組成物為宜。

發明效果

【0010】 本發明之組成物對小鼠主動皮膚過敏性反應具有抑制作用，可有效預防或改善第I型過敏，尤可使用於預防或改善過敏性反應。本發明之組成物可用作用以預防或改善過敏性反應等第I型過敏之飲食品、醫藥品、飼料及化妝品。此外，由於本發明之組成物係以屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分，安全性甚高而可長期施用，此外，可價廉地大量供給，其有用性及實用性極高。

【圖式簡單說明】

【0011】 圖 1 為 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株之顯微鏡照片。圖1之(A)為革蘭氏染色顯微鏡照片，(B)為掃描型電子顯微鏡(SEM)照片。

圖2為*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株之多醣類利用陰離子交換層析法(TOYOPEARL DEAE-650M 樹脂(TOSOH CORPORATION))之分離分

析圖。以0mM~500mM梯度濃度之NaCl(虛線)使多醣類溶出，再藉酚硫酸法於490nm下監測各分液中多醣類之存在(直線)。

圖3顯示：將以陰離子交換管柱層析法純化 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株之多醣類所得中性多醣體施行質子-NMR及碳-NMR所獲得之各NMR分析圖。圖3之(A)為質子-NMR之NMR分析圖，(B)為碳-NMR之NMR分析圖。

圖4顯示根據NMR分析圖之中性多醣體之結構解析結果。由該結構解析結果明確得知，*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株之中性多醣體具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構。

圖5為圖表，顯示 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株之發酵液對於小鼠主動誘發之皮膚過敏性反應具有抑制作用。

【實施方式】

【0012】用以實施發明之形態

以下，針對本發明所提供，以屬於副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或其所產生之多醣類作為有效成分之用以預防或改善第I型過敏之組成物予以詳細說明。

1.本發明中作為對象之乳酸菌

本發明中作為對象之乳酸菌為屬於副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌，且以源自無花果之

乳酸菌為宜。可具體舉如，依本發明而從無花果葉分離並鑑定之 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株。該菌株係於2016年4月19日以寄存編號NITE P-02242於獨立行政法人製品評價技術基礎機構專利微生物中心(〒292-0818日本國千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)進行國內寄存，之後移管為遵照布達佩斯條約之國際寄存，並於2017年5月26日賦予國際寄存編號為NITE BP-02242。

【0013】 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株係如圖1之照片所示，為過氧化氫酶陰性之革蘭氏陽性桿菌，且具有白色菌落形成性，並具有視條件而定之雜乳酸發酵特性的菌學性質。進一步來說，具有產生多醣體之能力。

【0014】 於本發明中，與 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 株同等之乳酸菌亦視為對象。於此，同等之乳酸菌意指：屬於 *Lactobacillus paracasei* 之乳酸菌，且與 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株同樣地具有抑制第I型過敏(尤其是過敏性反應)之作用的乳酸菌。舉例來說，於其等同等之乳酸菌可藉由對 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株進行突變、基因重組等一般突變處理技術來獲得，此外，也可為藉選擇 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株之自然突變菌株等並育種而成之菌株。

【0015】 2.本發明之有效成分

本發明之組成物包含上述乳酸菌之菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分。

乳酸菌可使用一般使用之MRS培養基及其修正培養基等，藉液體靜置培養等一般使用之培養方法來培養。乳酸菌可藉由在鳳梨屬植物果汁或其萃取物存在下進行培養來促進其增殖(國際公開第WO2011/046194號)，此外，在酒粕、酒粕萃取物或酒粕之酵素分解物存在下進行培養，亦可促進其增殖(日本特開平3-172171號公報、日本特開平5-15366號公報及日本專利第2835548號公報)。培養乳酸菌後，可將所得培養物直接用作有效成分，亦可將所得培養液稀釋或濃縮、粉末化後使用，也可使用回收自培養物之菌體。此外，在不損及本發明效果之前提下，也可於培養後進行加熱及冷凍乾燥等各種追加操作。又，乳酸菌之菌體可為其細胞表層附著有多醣類之活菌體，亦可為死菌體，也可為活菌體及死菌體兩者。死菌體可為破碎物，但宜使多醣類附著於其表層。此外，乳酸菌之發酵物通常使用葡萄糖等作為營養源，且可視需要進一步添加酵母萃、鳳梨屬植物果汁、酒粕、燒酒粕等植物乳酸菌之增殖促進物質並使其發酵來獲得。

【0016】乳酸菌所產生之多醣類可藉一般方法自屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌培養物分離純化來獲得。具體舉例來說，可藉離心分離而從屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌培養物中去除菌體，再使用乙醇及丙酮等，從所得培養物

中使多醣類沉澱來獲得。此外也可藉離子交換層析法進一步進行分離純化來獲得。

【0017】本發明中乳酸菌所產生之多醣類可具體舉如：具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構的中性多醣體，或者，主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體。該中性多醣體係如後述實施例2所載，可藉陰離子交換層析法將得自*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68菌株培養物之多醣體進行分離純化來製得。從圖3所示質子-NMR及碳-NMR之NMR分析圖，可明確得知該中性多醣體具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構。此外，*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68菌株會將主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體分泌至菌體外。更具體來說，酸性多醣體由葡萄糖、甘露糖、半乳糖及鼠李糖構成，且其等之組成比大致上為10:170:2:1。

【0018】3.本發明之組成物

本發明之組成物可以飲食品組成物、醫藥組成物、飼料組成物及化妝品組成物等各種形態作使用。

【0019】飲食品組成物之飲食品並未特別受限，可例示如：清涼飲料、碳酸飲料、營養飲料、果汁飲料、乳酸菌飲料等飲料；該等飲料之濃縮原液、調製用粉末等；冰淇淋、雪果霜、刨冰等冰製點心；糖果、膠質糖、穀物片、口香糖、硬糖、樹膠、巧克力、糖果錠、零食、餅乾、果凍、果醬、鮮奶油及烘焙點心等點心類；加工乳、乳飲料、發酵乳、優酪飲品、奶油等乳製品；麵包；經腸營養食品、

流質食品、育兒用奶粉、運動飲料；蔬果泥(Purée)等食品；其他機能性食品等。此外，飲食品亦可為補充劑，例如，可為顆粒狀、粉末狀、錠狀補充劑。

【0020】如上所述之飲食品可藉由在飲食品原料中添加乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類來製造，或者，可與一般飲食品同樣地製造。乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類之添加可在飲食品製程之任一階段進行。也可經所添加之乳酸菌發酵後再製造飲食品。此種飲食品可舉如乳酸菌飲料、發酵乳等發酵食品等。

【0021】飲食品組成物中乳酸菌菌體、其培養物或發酵物之含量可視飲食品之態樣予以適當設定，但一般來說，以飲食品組成物中所含菌體在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/g 或 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/ml 範圍內之含量為宜，在 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/g 或 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/ml 範圍內更佳。乳酸菌為死菌體時，cfu/g 或 cfu/ml 可替換為個細胞/g 或個細胞/ml。為乳酸菌所產生之多醣類時，飲食品組成物中，多醣類以重量換算計通常含0.001重量%以上，更宜含0.01重量%以上。

【0022】醫藥組成物通常係將乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類摻合至一般使用之生理上可接受之液體或固體製劑載體並製劑化後作使用。醫藥組成物之劑形並未特別受限，具體來說可例示如錠劑、丸劑、粉劑、液劑、懸浮劑、乳劑、顆粒劑、膠囊劑、糖漿劑、

栓劑、注射劑、軟膏劑、貼劑、點眼劑及點鼻劑等。

【0023】本發明之醫藥組成物於製劑時之乳酸菌菌體或其培養或者發酵物之含量可視劑形、用法、對象之年齡、性別、疾病種類、疾病程度及其他條件等予以適當設定，通常以所含菌體在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/g 或 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/ml 範圍內之含量為宜，在 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/g 或 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/ml 範圍內更佳。乳酸菌為死菌體時，cfu/g 或 cfu/ml 可替換為個細胞/g 或個細胞/ml。為乳酸菌所產生之多醣類時，醫藥品組成物中，多醣類以重量換算計通常含 0.001 重量% 以上，更宜含 0.01 重量% 以上。

【0024】本發明醫藥組成物之投予時期並未特別受限，可視施用對象適當選擇投予時期。此外，可作預防性投予，亦可用於維持療法。投予形態宜視製劑形態、投予對象之年齡、性別、其他條件、投予對象之症狀程度等適當決定。本發明之醫藥組成物在任一狀況下皆可 1 天 1 次或分為多數次投予，此外，也可數天或數週投予 1 次。

【0025】飼料組成物之飼料可舉如如寵物食品、家畜飼料、飼育魚飼料等。此種飼料可於一般飼料諸如穀類、粕類、糠類、魚粉、骨粉、油脂類、脫脂奶粉、乳清(whey)、鹽鹵、礦物質飼料、酵母類等中混入乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類來製造。此外，舉例來說，可如青貯料時般，經所添加乳酸菌之發酵步驟後再製造飼料。所製造之飼料可經口頭投予一般哺乳動物、家畜

類、飼育魚類、寵物等。此外，飼育魚類時，也可採用將添加有乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者添加有所產生之多醣體的發酵物撒於養魚場之方法。

【0026】飼料組成物中乳酸菌菌體或其培養物或者發酵物之含量可視飼料態樣及施用對象來適當設定，但以所含菌體在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/g 或 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/ml 範圍內之含量為宜，在 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/g 或 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/ml 範圍內更佳。乳酸菌為死菌體時，cfu/g 或 cfu/ml 可替換為個細胞/g 或個細胞/ml。為乳酸菌所產生之多醣類時，飲食品組成物中，多醣類以重量換算計通常含0.001重量%以上，更宜含0.01重量%以上。

【0027】本發明化妝品組成物之化妝品可舉例如：肥皂、沐浴乳、卸妝乳、洗面乳等洗淨用品；化妝水(lotion)、雪花膏(vanishing cream)、冷霜、潤膚霜(emollient cream)、按摩霜等乳霜；乳液及美容液等。可藉由將本發明之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類添加於一般用於此等化妝品之材料中來獲得本發明之化妝品組成物。

【0028】就本發明之化妝品組成物而言，舉例來說，宜使用乳酸菌之發酵蛋白，該發酵蛋白係將本發明之乳酸菌添加至將雞等鳥類之蛋打破並分離蛋黃所得之液狀蛋白中使其發酵而得者。此種乳酸菌之發酵一般使用葡萄糖等作為營養源，且可視需要添加酵母萃、鳳梨果汁、酒粕、燒酒粕等植物乳酸菌之增殖促進物質，在使其發酵。乳酸

菌之發酵蛋白之型態可視所摻合之化妝品而定，可舉例如液狀、粉末狀、霜狀、膏狀及果凍狀等。

【0029】用於本發明之化妝品組成物之乳酸菌菌體或其培養物或者發酵物之含量可視化妝品之態樣及施用對象予以適當設定，但以所含菌體在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/g 或 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ cfu/ml 範圍內之含量為宜，在 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/g 或 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/ml 範圍內更佳。乳酸菌為死菌體時，cfu/g 或 cfu/ml 可替換為個細胞/g 或個細胞/ml。舉例來說，為乳酸菌之發酵蛋白時，發酵蛋白之含量以換算發酵蛋白乾燥物計，通常為0.001重量%以上，更宜為0.01重量%以上。為乳酸菌所產生之多醣類時，化妝品組成物中，多醣類以換算重量計，通常含0.001重量%以上，且宜含0.01重量%以上。

【0030】 4.本發明之組成物用途

屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類對小鼠主動皮膚過敏性反應具有抑制作用，而具有抑制第I型過敏(尤其是過敏性反應)之作用。因此，屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或其發酵物或者其所產生之多醣類可用於預防或改善花粉過敏、過敏性鼻炎、氣喘、異位性皮膚炎、皮膚搔癢、結膜炎等之第I型過敏。尤其，由於屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類具有過敏性反應抑制作用，而

可用於預防或改善因經口攝取食物等所致之過敏性反應、藥品等經皮膚及黏膜之非侵入性暴露所致之過敏性反應、以及昆蟲叮咬等之侵入性暴露所致之過敏性反應等。此外，由於本發明之組成物對於預防或改善第I型過敏有效，尤可作為健康維持及健康增進用飲食品之素材予以利用。

實施例

【0031】以下藉實施例進一步詳細說明本發明，但本發明不受此等實施例所侷限。

【0032】實施例1

乳酸菌之分離及鑑定

1. 乳酸菌樣本之分離

選擇無花果(品種「豐蜜姬」)之葉、莖及果實，使用已殺菌之鑷子與剪刀使其細破片化至2~3mm後，於已滅菌且裝有MRS液體培養基之試管中分別裝入5~6個細片，於28℃及37℃下靜置培養至乳酸菌之標準培養基即MRS培養基發生混濁(增殖)。亦即，至可目視到乳酸菌候補菌株增殖為止需要2~4天。

將上述乳酸菌候補菌株之各培養液的一部分以拋棄式接種環劃線塗菌於MRS洋菜培養基上後進行靜置培養。形成於洋菜培養基上之菌落中，將「顏色、光澤、形狀不同者」全部拾取，再於新鮮之MRS洋菜培養基上進行劃線塗菌來純化菌落。

對於經純化之各菌落，為了驗證有無過氧化氫酶之產生而進行H₂O₂測試。此係一用以觀察菌體暴露於10%

H₂O₂溶液時若過氧化氫酶存在即會生成氧的現象有無發生的試驗法。順帶一提，乳酸菌不會產生過氧化氫酶。

嘗試從無花果探索分離之結果，從以無花果葉作為分離源者成功獲得顯示過氧化氫酶陰性之乳酸菌候補菌株1株。

【0033】 2.分離菌株之鑑定

將上述乳酸菌候補菌株另以MRS液體培養基培養並利用離心取得菌體。以細胞壁溶解酵素處理後，使用DNAzol試劑抽提出基因組DNA。

按照記載於 Lane, D. J.(1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*、pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley之方法，以基因組DNA為模板，藉由使用27f引子與1525r引子之PCR反應，使16S rDNA部分擴增，並以NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit(MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG製)自瓊脂糖凝膠回收目的斷片。用以決定鹼基序列之dye terminator法所致序列反應係以Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit ver.3.1 (ThermoFisher Scientific公司製)進行，並以ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer(ThermoFisher Scientific公司製)解析。以BLAST program對解析出之16S rDNA的鹼基序列進行相同性檢索，並藉由與DNA data bank (DDBJ/EMBL/GenBank)之資料庫比較來進行分離菌株

之分類學鑑定。

【0034】將分離自無花果葉之乳酸菌候補菌株命名為IJH-SONE68菌株，由於其與已登記在DNA data bank (DDBJ/EMBL/GenBank) 之「*Lactobacillus paracasei* R094」菌株且鹼基序列之accession編號為「NR_025880」的鹼基序列100%一致，而鑑定為*Lactobacillus paracasei*。

該菌株係於2016年4月19日以寄存編號NITE P-02242進行國內寄存於獨立行政法人製品評價技術基礎機構專利微生物中心(〒292-0818日本國千葉縣木更津市上總鎌足2-5-8 122號室)，之後移管為遵照布達佩斯條約之國際寄存，並於2017年5月26日賦予國際寄存編號為NITE BP-02242。

【0035】3.經分離鑑定之乳酸菌的菌學性質

經分離鑑定之上述乳酸菌IJH-SONE68菌株係如圖1之照片所示，為過氧化氫酶陰性之革蘭氏陽性桿菌且具白色菌落形成性，具有視條件而定之雜乳酸發酵特性，同時具有產生多醣類之能力。

【0036】4.經分離鑑定之乳酸菌之醣類同化能力

(1)同化能力之試驗方法

藉下述試驗方法，就IJH-SONE68菌株對49種醣類之同化能力進行調查。

將IJH-SONE68菌株以MRS液體培養基靜置培養至增殖穩定期。將離心所得菌體以適量之懸浮介質

(suspension medium, bioMérieux公司製)洗淨後，最後懸浮於2mL之suspension medium。將其一部分添加到5mL之suspension medium中，求出麥式(McFarland)濁度為2之量(n)。接著，於API 50 CHL培養基(bioMérieux公司製)中加入2n菌液，將其分注到API 50 CHL套組(bioMérieux公司製，各孔底分別塗附了49種醣)之各孔中。最後覆上礦物油層，安裝於已裝有滅菌水之托盤中。於37°C下培養48小時後，觀察各孔中之色調變化，藉此判定有無同化能力。

【0037】5.同化能力之試驗結果

IJH-SONE68菌株對49種醣類之同化能力調查結果係如表1所示。

【0038】[表1]

IJH-SONE68菌株對醣類之同化能力

基質	同化能力
對照組	-
丙三醇	-
赤藻糖醇	-
D-阿拉伯糖	-
L-阿拉伯糖	-
D-核糖	+
D-木糖	-
L-木糖	-
D-核糖醇	+
甲基-β-D-吡喃木糖甙	-
D-半乳糖	+
D-葡萄糖	+
D-果糖	+
D-甘露糖	+
L-山梨糖	+
L-鼠李糖	-
甜醇	-
肌醇	-
D-甘露醇	+
L-山梨醇	-
甲基-β-D-吡喃甘露糖甙	-
甲基-β-D-吡喃葡萄糖甙	-
N-乙酰葡萄糖胺	+
苦杏仁苷	-
熊果苷	-
七葉樹苷+檸檬酸鐵	+
柳苷	+
D-纖維雙醣	+
D-麥芽糖	+
D-乳糖	-
D-蜜二糖	-
D-蔗糖	+
D-繭蜜糖	+
菊糖	-
D-松三糖	+
D-棉子糖	-
澱粉	-
肝醣	-
木糖醇	-
苦杏仁糖	+
D-松二糖	-
D-來蘇糖	-
D-塔格糖	+
D-海藻糖	-
L-海藻糖	-
D-阿拉伯糖醇	-
L-阿拉伯糖醇	-
葡萄糖酸	+
2-酮基葡萄糖酸	-
5-酮基葡萄糖酸	-

表中，+表示可同化，-表示無法同化。

【0039】 實施例2**1. IJH-SONE68 菌株所產生之多醣類的分離純化**

以下述方式分離純化IJH-SONE68菌株所產生之多醣類。

將IJH-SONE68菌株以MRS液體培養基靜置培養至增殖穩定期。將該培養液5mL用作種培養液，植菌至5L之多醣體產生用半合成培養基(其組成後述)後，於37°C下靜置培養120小時。將培養液冷卻至4°C後，使培養液上清中所含蛋白質變性，為了在後續步驟中以沉澱物形式去除，添加202.5mL之100%三氯乙酸水溶液，混合後靜置30分鐘。藉離心去除沉澱物，於回收之上清液中加入等量丙酮並混合後，使其於4°C下靜置一夜，藉此使IJH-SONE68菌株所產生之多醣類沉澱。以離心回收沉澱物後，以250mL之70%乙醇進行沉澱物之洗淨。使沉澱物風乾後，添加75mL之50mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)並混合1小時，藉此使沉澱物溶解。藉離心去除不溶性之夾雜物後，對所回收之上清液分別添加750μL之1mg/mL DNase溶液(Worthington公司)及1mg/mL RNase溶液(Nacalai Tesque公司)，於37°C下使其反應8小時。接著，添加750μL之2mg/mL proteinase K溶液(和光純藥工業社製)，於37°C下使其反應16小時。使反應後之溶液冷卻至4°C後，使所添加之各酵素變性，為了於後續之離心將其作為沉澱物去除，添加8.75mL之100%三氯乙酸水溶液並混合，於4°C下靜置1小時。以離心去除沉澱物，對所得上清液添加

262.5 mL之100%乙醇，確實混合後藉離心將IJH-SONE68菌株所產生之多醣體以沉澱物形式回收。以50 mL之70%乙醇洗淨沉澱物後使其風乾，添加適量(約25 mL)純水並於4°C下靜置一夜，藉此使多醣類溶解。溶解後之多醣類樣本使用10,000 MWCO之超過濾單元(Merck公司)，一邊將溶劑替換為純水，一邊去除所回收樣本中之單醣類等小分子，而製得經純化之多醣類樣本。

【0040】將已純化之多醣類樣本施用到已預先以50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) 平衡化且填充有 TOYOPEARL DEAE-650M 樹脂 (TOSOH CORPORATION)之開放管柱(2.5×22 cm)，進行用以分離純化中性多醣分液與酸性多醣分液之管柱作業。溶液使用相同之緩衝液，固定流速1 mL/min。此外，溶出液每6 mL回收到不同的試管。首先，從開始至240分鐘的期間，以相同緩衝液使其溶出(試管編號1-40)。接著，從240分鐘之時間點至600分鐘之時間點為止，製作出使用相同緩衝液之0-500 mM NaCl的濃度梯度並持續溶出(試管編號41-100)。茲將管柱分離圖譜顯示於圖2。對溶出至試管之全部樣本以酚硫酸法(後述)確認多醣類之存在後，將對應試管內之溶液分別統整為中性多醣分液、酸性多醣分液。各分液使用10,000 MWCO之超過濾單元，一邊將溶劑替換為純水，一邊去除所回收樣本中之單醣類等小分子。

如上述般分離純化出中性多醣分液及酸性多醣分液來作為IJH-SONE68菌株所產生之多醣類。

【0041】多醣類產生用半合成培養基係將載於 Kimmel SA、Roberts RF. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. Int. J. Food Microbiol.,40, 87-92(1998)之培養基變更如下。

【0042】多醣類產生用半合成培養基 [g/L]

葡萄糖	20
Tween 80	1.0
檸檬酸銨	2.0
乙酸鈉	5.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.05
K ₂ HPO ₄	2.0
Bacto酪蛋白腓	10.0
維生素溶液	2mL
微量元素溶液	1mL

【0043】維生素溶液 [g/L]

4-胺基苯甲酸	0.05
生物素	0.001
葉酸	0.025
硫辛酸	0.025
菸鹼酸	0.1
泛酸	0.05
吡哆胺-HCl	0.25

維生素B12	0.05
吡哆醇	0.025
核黃素	0.05
硫胺素	0.1

【0044】微量元素溶液(Trace element Soln.)係載於 Kets EPW, Galinski EA, de Bont JAM. Carnitine: a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*. Arch. Microbiol., 192, 243-248(1994), 其組成如下。

【0045】微量元素溶液	[g/L]
25% HCl	10mL
FeCl ₂ · 4H ₂ O	1.5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.19
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.1
ZnCl ₂	0.07
H ₃ BO ₃	0.006
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.036
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.024
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.002

【0046】酚硫酸法(DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances., Anal. Chem., 28, 350-356(1956))

【0047】將30μL之對象樣本與等量之5w/v%酚水溶液混合後，添加150μL濃硫酸使其混合並開始反應。10分

鐘後立刻冰冷使反應停止。藉由測定反應液於490nm下之吸光度來測定醣類濃度。另，濃度之決定係使用以葡萄糖作為標準品進行相同實驗所製出之檢量線。

【0048】 2.菌體外中性多醣體之結構解析

將上述經陰離子交換管柱層析法(TOYOPEARL DEAE-650M樹脂(TOSOH CORPORATION))純化之菌體外中性多醣施行質子-NMR及碳-NMR，並將所得各NMR分析圖顯示於圖3。茲將得自此等NMR分析圖之菌體外中性多醣體之結構解析結果顯示於圖4。

由該結構解析結果明確得知，IJH-SONE68菌株所產生之菌體外中性多醣體具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構。

【0049】 3.菌體外酸性多醣之醣組成分析

以高速液體層析(HPLC)法測定經上述陰離子交換管柱層析法純化之菌體外酸性多醣，藉此進行醣組成分析。

將經純化之酸性多醣體(7.3mg/mL)10 μ L與水60 μ L混合而調製出7倍稀釋試樣溶液，再採取所調製稀釋試樣溶液20 μ L至試管，減壓乾涸後添加2mol/L三氟乙酸100 μ L使其溶解，進行氦氣沖洗、減壓封管後於100 $^{\circ}$ C下水解6小時，接著減壓乾涸。對所得殘渣添加水200 μ L使其溶解，再以0.22 μ m之濾器過濾而獲得測定用試樣溶液，以水將測定用試樣溶液稀釋10倍而獲得稀釋測定用試樣溶液。分析此等測定用試樣溶液及稀釋測定用試樣溶液50 μ L。分析機器使用HPLC系統：LC-20A system(島津

製作所股份有限公司)及分光螢光光度計M-10AxL(島津製作所股份有限公司)。分析條件如下。

管柱：TSK-gel Sugar AXG 4.6mmI.D.×15cm
(TOSOH CORPORATION)

管柱溫度：70℃

移動相：0.5mol/L硼酸鉀緩衝液，pH8.7

移動相流速：0.4mL/min

柱後標識：反應試劑：1w/v%精胺酸・3w/v%硼酸

反應試劑流速：0.5mL/min

反應溫度：150℃

檢測波長：Ex.320nm Em.430nm

【0050】 求出以菌體外酸性多醣體調製之試樣層析圖譜及各單醣類之檢量線數據，從檢量線求出構成菌體外酸性多醣之構成醣的試料中濃度。茲將所得結果示於表2。

【0051】 [表2]

菌體外酸性多醣體之醣構成

菌體外酸性多醣體		試料中濃度(mg/mL)
單醣類	鼠李糖	0.0204
	核糖	n.d.
	甘露糖	3.43
	阿拉伯糖	n.d.
	半乳糖	0.0384
	木糖	n.d.
	葡萄糖	0.219

表中 n.d.表示未測出。

【0052】 實施例3

IJH-SONE68 菌株對小鼠主動皮膚過敏性反應之抑制作用
依下述方法調查實施例1所得IJH-SONE68菌株之乳酸菌對小鼠主動皮膚過敏性反應之抑制作用。

【0053】 1.試驗方法**(1)小鼠試驗用樣本之調製**

以果汁培養基(鳳梨果汁最終濃度：50%，日本酒萃取物之最終濃度：10%)培養 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株48小時，並以將發酵液濃縮2倍之物用作小鼠試驗用樣本。推定該樣本以約40mg/L之濃度含有實施例2所得IJH-SONE68 菌株產生之多醣類，即，包含中性多醣分液及酸性多醣分液之多醣類。

【0054】 (2)試驗所用試劑

卵白蛋白(OVA)(Cat.A5503-5G, Grade V)及氫氧化鋁(Cat.239186-25G)購自 SIGMA-ALDRICH，KOH、EvansBlue、磷酸及丙酮購自和光純藥工業，蒸餾水及生理食鹽水則購自大塚製藥工場股份有限公司。

【0055】 (3)方法

動物使用雄性BALB/c AnNCr1Cr1j系小鼠(7週齡，CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.：到貨時)。小鼠係以飼育籠飼養1~5隻，並以已調節成溫度：20~25℃、濕度：40~70%、換氣次數：13次以上/小時且照明時間：12小時(7：00至19：00)環境之動物飼育室飼育，食餌則使其自由攝取固體飼料CRF-1(Oriental Yeast Co., Ltd.)。此外，關於飲用水，則使其使自由攝取濾器過濾水。

搬入小鼠後，馴化約1週。馴化飼育後測定小鼠體重，並以各組體重均等之方式進行分組(A組：水投予組；B組：

IJH-SONE68 菌株之鳳梨果汁發酵液投予組)(A群：9隻、B群：9隻)。令該時間點為第0天(Day 0)，且自Day 0起以1次/天的頻率對小鼠進行連續30天經口投予樣本。另，令每日平均投予容量為0.75mL/隻。配合上述作業，於Day 0~30期間對全部小鼠進行每週1次之體重測定。另，體重測定係於樣本投予前進行。

【0056】於第14天(Day 14)，以0.2mL/隻之投予量對全部小鼠施行腹腔內投予OA抗原溶液(OVA 20 μ g + Aluminum hydroxide 2mg)(抗原致敏化)。其後，於Day 30以10 μ L/隻之投予量將1% OVA溶液皮內投予至小鼠之左耳殼，接著以0.25mL/隻之投予量，以尾靜脈投予0.5% 伊凡氏藍(Evans Blue)溶液。30分鐘後，使小鼠頸椎脫臼而安樂死，確認死亡後採取左右耳殼。

將採取之左右耳殼分別裝入試管，添加0.75mL之1N KOH並於37 $^{\circ}$ C下耗費1夜予以溶解。對其添加0.2M磷酸與丙酮以5：13混合而成之混合液9.25mL並振盪。將上清液移至微量盤，於620nm下測定吸光度。色素漏出量係以左右耳殼之伊凡氏藍量之差來算出。另，數據係以平均值 \pm 標準差來顯示，組間之顯著性檢定使用依Welch法之t檢定，危險率(p值)小於0.05時判定具顯著差異。

藉以上方法評價樣本對小鼠主動皮膚過敏性反應(ACA)有無抑制作用。

【0057】 2. 試驗結果

茲將伊凡氏藍色素漏出量之測定結果示於表3。

【0058】 [表3]

用於實驗之各小鼠個體之色素漏出量

個體 No.	A組(對照組)	B組(樣本投予組)
1	3.16	5.87
2	4.06	0.45
3	4.51	0.45
4	2.26	0.90
5	6.77	4.06
6	4.06	3.16
7	4.51	3.16
8	4.96	4.51
9	6.32	1.35
平均	4.51	2.66
S.E.	0.47	0.65

【0059】此外，也將所得結果示於圖5。從各小鼠個體回收左右兩耳殼，將自左耳殼漏出之色素量平均值分組顯示於圖5之圖表中。另，此時將源自右耳殼之色素漏出量用作空白試驗(blank)。

從表3及圖5可以明顯看出，色素漏出量於對照組(A組：水投予組)為 $4.51 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ 、於樣本投予組(B組)為 $2.66 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$ 。已確認與對照組相較下，樣本投予組顯示出約41%之顯著抑制作用($p < 0.05$)。從以上結果得知，於抗原致敏化前後反覆投予IJH-SONE68菌株之鳳梨果汁發酵液，抑制了使用以卵白蛋白為抗原而致敏化之小鼠的ACA反應。可以想見，本樣本於抗原抗體反應(IgE相依性)上有抑制抗體產生之可能性。

【0060】如同上述詳細說明所明示，若依本發明，則可提供下列發明。

[1]一種用以預防或改善第I型過敏之組成物，係以 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株與屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分。

[2]如上述[1]之組成物，其係用以預防或改善過敏性反應。

[3]如上述[1]或[2]之組成物，其中乳酸菌為源自無花果之乳酸菌。

[4]如上述[1]至[3]中任一項之組成物，其中乳酸菌為 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株(寄存編號 NITE BP-02242)或與其同等之乳酸菌。

[5]如上述[1]至[4]中任一項之組成物，其中培養物或發酵物係於鳳梨屬植物果汁存在下培養乳酸菌或使其發酵所得之培養物或發酵物。

[6]如上述[1]至[4]中任一項之組成物，其中多醣類為中性多醣體，該中性多醣體具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構。

[7]如上述[1]至[4]中任一項之組成物，其中多醣類為主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體。

[8]如上述[1]至[7]中任一項之組成物，其中組成物為飲食品組成物。

[9]如上述[8]之組成物，其中飲食品為飲料、機能性

食品、發酵食品或補充劑。

[10]如上述[1]至[7]中任一項之組成物，其中組成物為醫藥組成物。

[11]如上述[1]至[7]中任一項之組成物，其中組成物為飼料組成物。

[12]如上述[1]至[7]中任一項之組成物，其中組成物為化妝品組成物。

[13]一種 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株與屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類的用途，係供用作用以預防或改善第I型過敏之組成物的有效成分。

[14]如上述[13]之用途，其係用以預防或改善過敏性反應之組成物。

[15]如上述[13]或[14]之用途，其中乳酸菌為源自無花果之乳酸菌。

[16]如上述[13]至[15]中任一項之用途，其中乳酸菌為 *Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68 菌株(寄存編號 NITE BP-02242)或與其同等之乳酸菌。

[17]如上述[13]至[16]中任一項之用途，其中培養物或發酵物係於鳳梨屬植物果汁存在下培養乳酸菌或使其發酵所得之培養物或發酵物。

[18]如上述[13]至[16]中任一項之用途，其中多醣類為中性多醣體，該中性多醣體具有N-乙醯葡萄糖胺藉

α -1,6鍵而連結之結構。

[19]如上述[13]至[16]中任一項之用途，其中多醣類為主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體。

[20]如上述[13]至[19]中任一項之用途，其中組成物為飲食品組成物。

[21]如上述[20]之用途，其中飲食品為飲料、機能性食品、發酵食品或補充劑。

[22]如上述[13]至[19]中任一項之用途，其中組成物為醫藥組成物。

[23]如上述[13]至[19]中任一項之用途，其中組成物為飼料組成物。

[24]如上述[13]至[19]中任一項之用途，其中組成物為化妝品組成物。

[25]一種於對象上預防或改善第I型過敏之方法，包含：將包含*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68菌株與屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分之組成物施用於有其必要之對象。

[26]如上述[25]之方法，其預防或改善過敏性反應。

[27]如上述[25]或[26]之方法，其中乳酸菌為源自無花果之乳酸菌。

[28]如上述[25]至[27]中任一項之方法，其中乳酸菌為*Lactobacillus paracasei* IJH-SONE68菌株(寄存編號NITE BP-02242)或與其同等之乳酸菌。

[29]如上述[25]至[28]中任一項之用途，其中培養物或發酵物係於鳳梨屬植物果汁存在下培養乳酸菌或使其發酵所得之培養物或發酵物。

[30]如上述[25]至[28]中任一項之方法，其中多醣類為中性多醣體，該中性多醣體具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構。

[31]如上述[25]至[28]中任一項之方法，其中多醣類為主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體。

[32]如上述[25]至[31]中任一項之方法，其中組成物為飲食品組成物。

[33]如上述[32]之方法，其中飲食品為飲料、機能性食品、發酵食品或補充劑。

[34]如上述[25]至[31]中任一項之方法，其中組成物為醫藥組成物。

[32]如上述[25]至[31]中任一項之方法，其中組成物為飼料組成物。

[33]如上述[25]至[31]中任一項之方法，其中組成物為化妝品組成物。

產業上之可利用性

【0061】如同以上詳細說明，本發明之組成物對於預防或改善第I型過敏甚有效，尤可供用於預防或改善過敏性反應。本發明之組成物可作為用以預防或改善過敏性反應等第I型過敏之飲食品、醫藥品、飼料及化妝品來使用。再者，由於本發明之組成物係以屬於副乾酪乳酸桿菌

(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分，安全性甚高且可長期施用，此外，可價廉地大量供給，其有用性及實用性極高。



201945016

【發明摘要】

【中文發明名稱】

第I型過敏用組成物

【中文】

含有屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分之組成物對於預防或改善第I型過敏甚是有效，尤其，可供用作用以預防或改善過敏性反應之飲食品、醫藥品、飼料及化妝品。

【指定代表圖】(無)

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種用以預防或改善第I型過敏之組成物，係以屬於副乾酪乳酸桿菌(*Lactobacillus paracasei*)之乳酸菌之菌體、其培養物或發酵物或者其所產生之多醣類作為有效成分。

【第2項】 如請求項1之組成物，其係用以預防或改善過敏性反應(anaphylaxis)。

【第3項】 如請求項1或2之組成物，其中乳酸菌係源自無花果之乳酸菌。

【第4項】 如請求項1至3中任一項之組成物，其中乳酸菌為副乾酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus paracasei*) IJH-SONE68菌株(寄存編號NITE BP-02242)或與其同等之乳酸菌。

【第5項】 如請求項1至4中任一項之組成物，其中培養物或發酵物係於鳳梨屬植物果汁存在下培養乳酸菌或使其發酵所得之培養物或發酵物。

【第6項】 如請求項1至4中任一項之組成物，其中多醣類為中性多醣體，其具有N-乙醯葡萄糖胺藉 α -1,6鍵而連結之結構。

【第7項】 如請求項1至4中任一項之組成物，其中多醣類為主要由葡萄糖與甘露糖構成之酸性多醣體。

【第8項】 如請求項1至7中任一項之組成物，其中組成物為飲食品組成物。

【第9項】 如請求項8之組成物，其中飲食品為飲

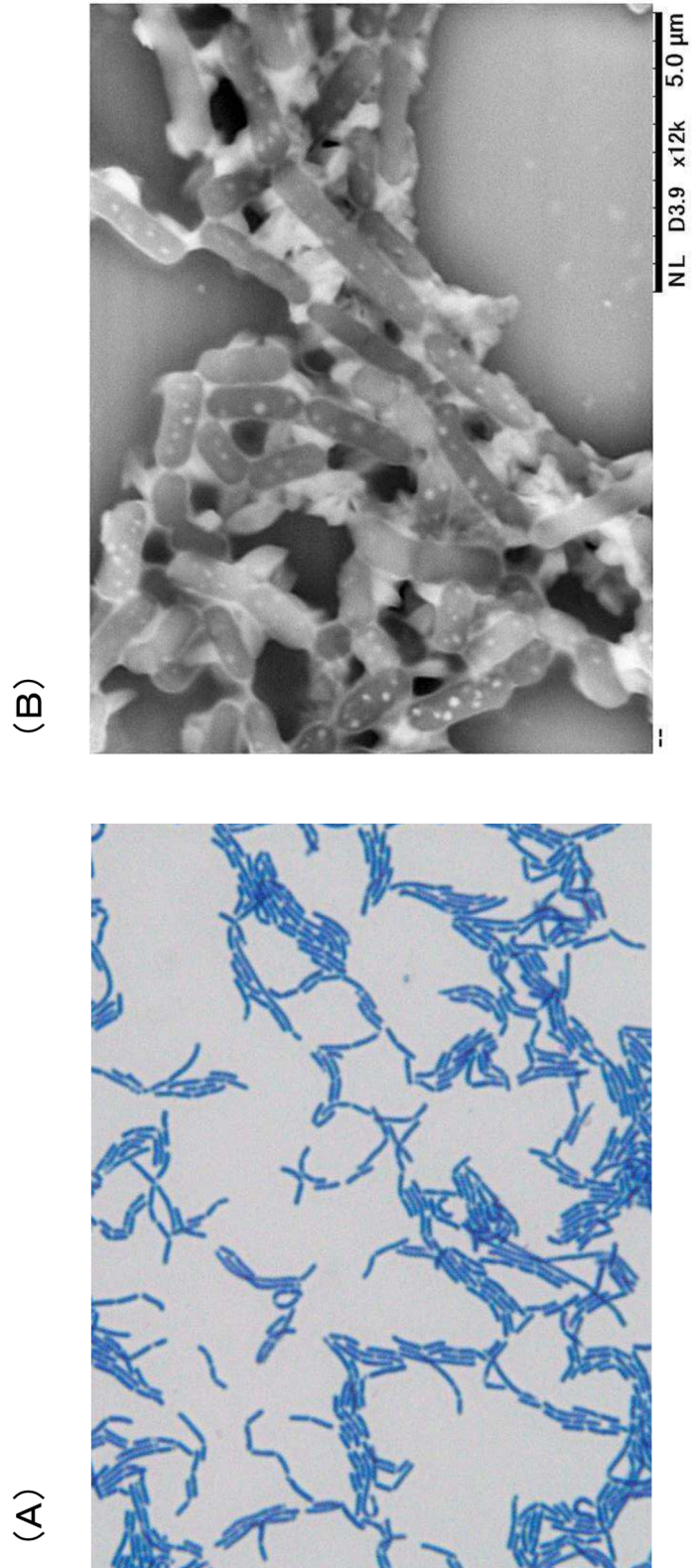
料、機能性食品、發酵食品或補充劑(supplement)。

【第10項】如請求項1至7中任一項之組成物，其中組成物為醫藥組成物。

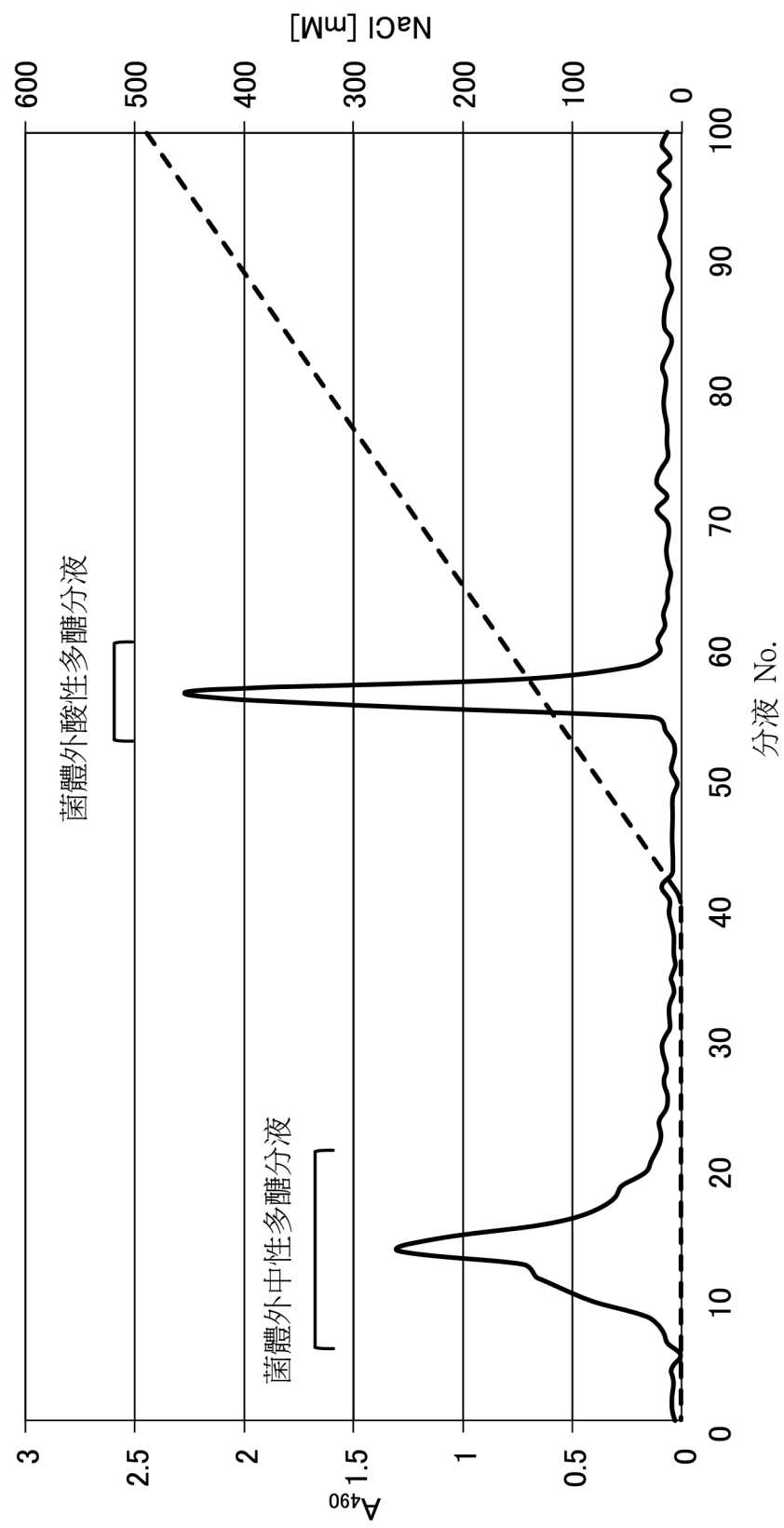
【第11項】如請求項1至7中任一項之組成物，其中組成物為飼料組成物。

【第12項】如請求項1至7中任一項之組成物，其中組成物為化妝品組成物。

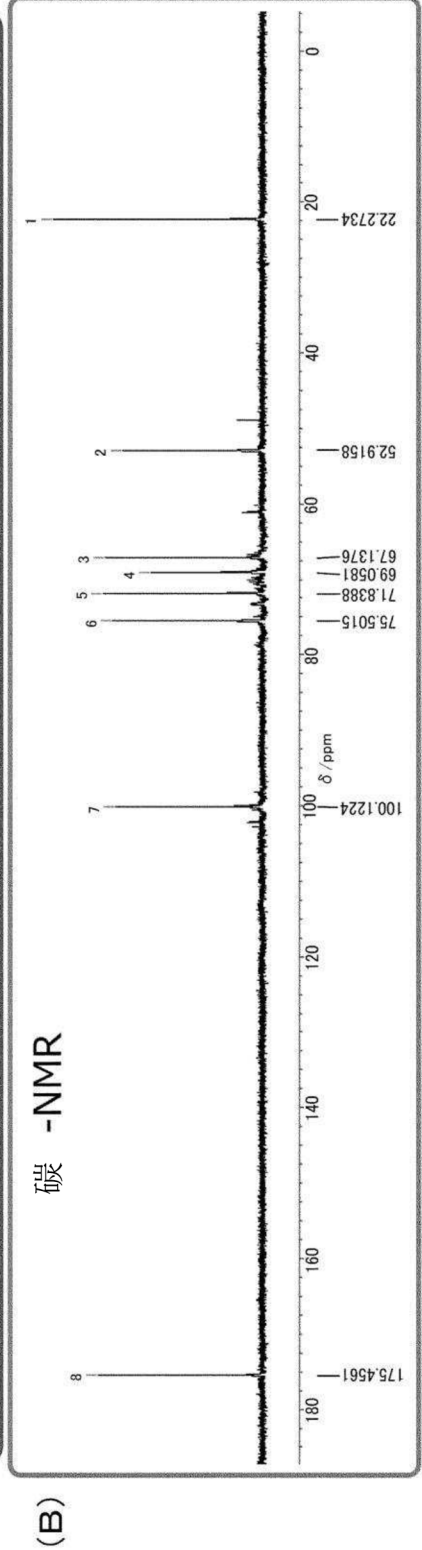
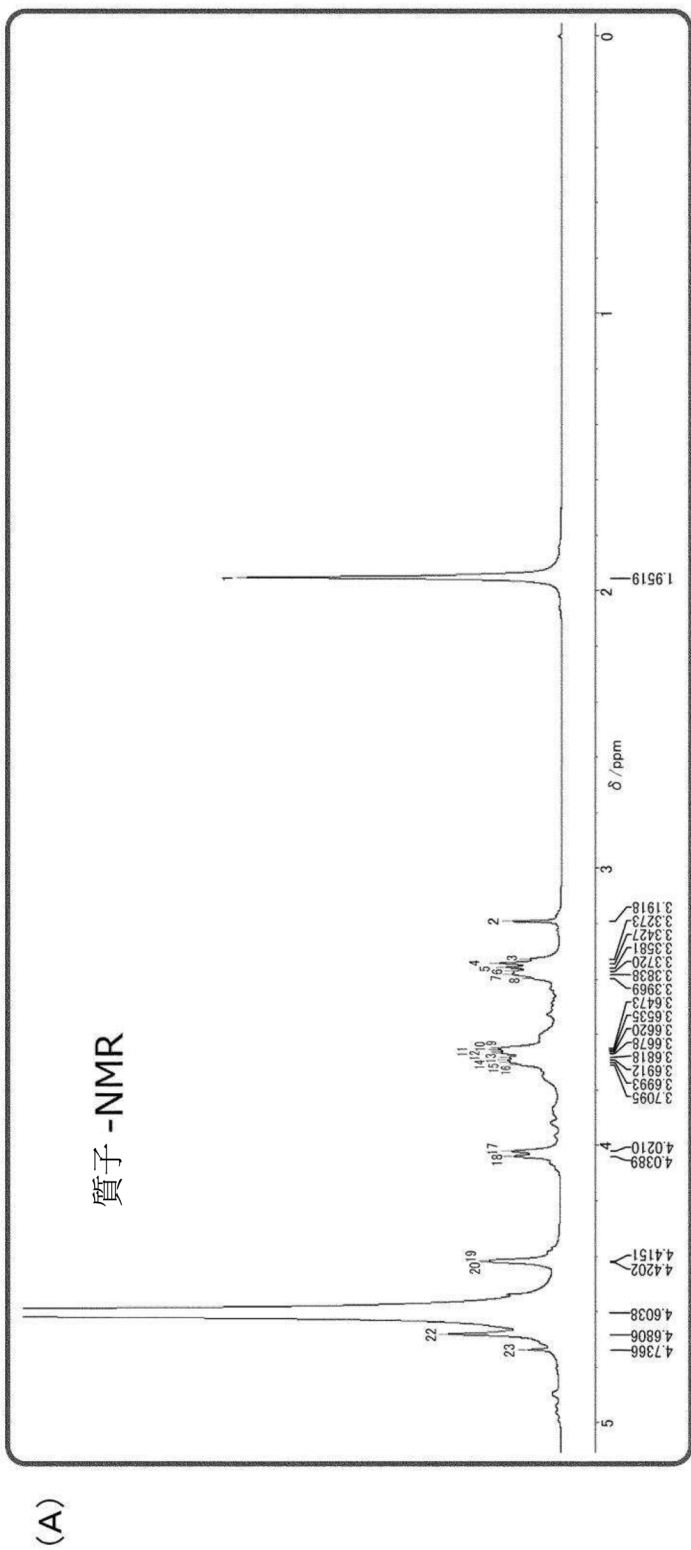
【發明圖式】



【圖1】



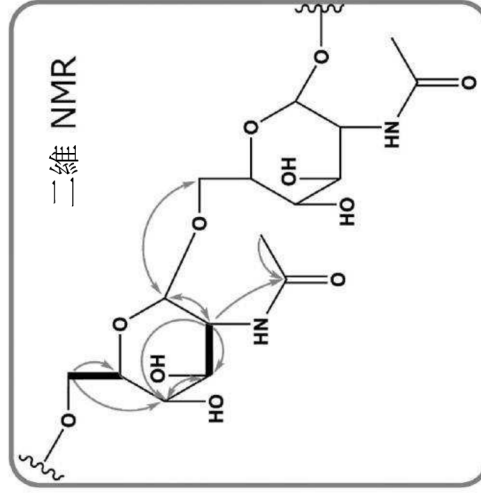
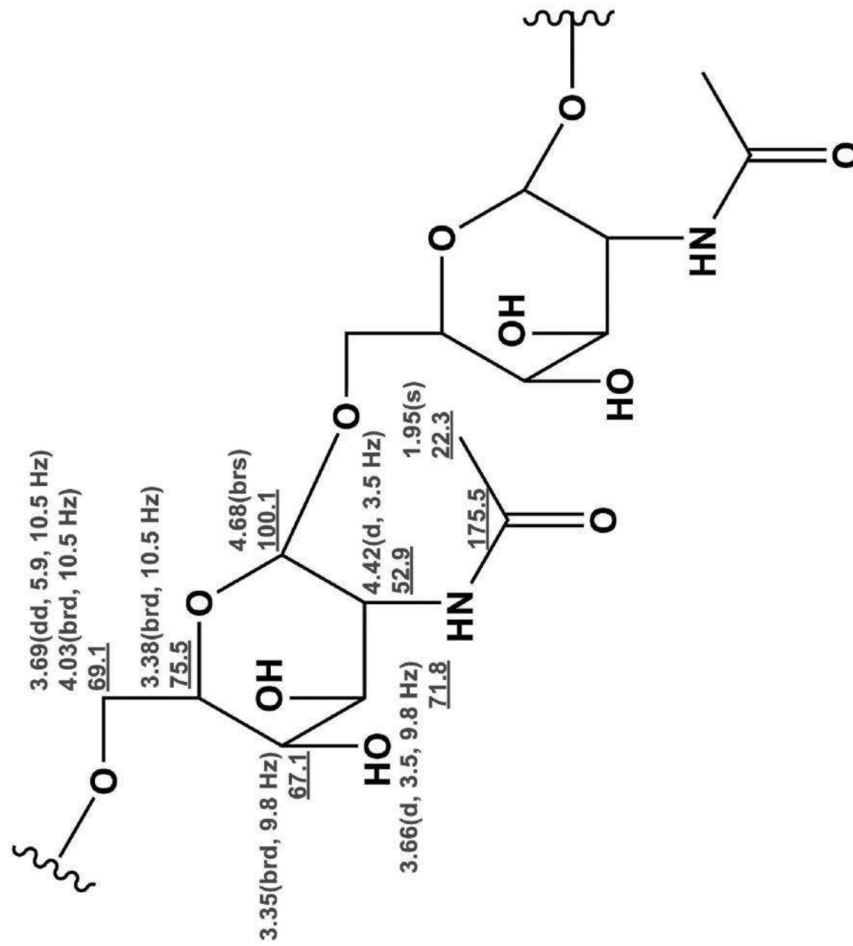
【圖2】



【圖3】

菌體外中性多醣之結構解析

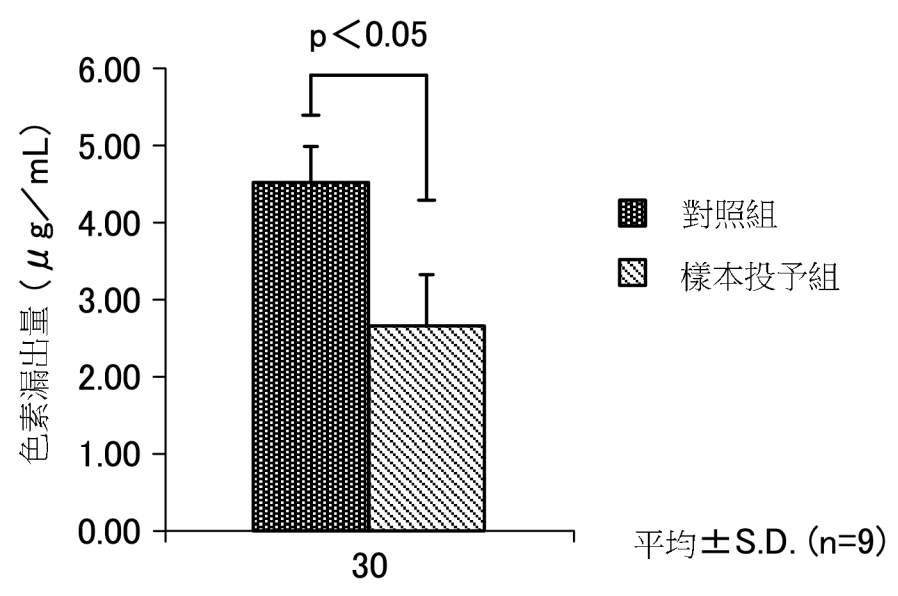
NMR測定 (Bruker Avance- III, 600MHz)
 測定溶劑 D₂O
 測定時間60小時
 測定項目
 一維 NMR (H, C, DEPT)
 二維 NMR (HSQC, HMBC (以箭號表示), COSY (以粗線表示))



數值表示NMR之化學位移值。
 劃底線之數值表示碳-NMR之值，未劃底線之數值表示質子-NMR之值
 可知呈現 α -N-乙酰葡萄糖胺之1位上進一步鍵結 α -N-乙酰葡萄糖胺之6位而成列之結構

【圖4】

因投予樣本所致之源自小鼠耳殼之色素漏出量變化



【圖5】