

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03820372.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/03 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年12月9日

[11] 授权公告号 CN 100567489C

[22] 申请日 2003.6.26 [21] 申请号 03820372.3

[30] 优先权

[32] 2002.6.26 [33] JP [31] 185897/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/008094 2003.6.26

[87] 国际公布 WO2004/002501 日 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.28

[73] 专利权人 卡尔皮斯株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 山本直之 石田优 板东出树

[56] 参考文献

WO01/37865 A1 2001.5.31

WO2000/078322 2000.12.28

审查员 韩 宁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹 雯 王景朝

权利要求书1页 说明书13页 附图6页

[54] 发明名称

抗变态反应剂及其制药用途

[57] 摘要

本发明提供了一种抗变态反应剂，所述抗变态反应剂包含选自属于嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 及其组合的乳酸菌作为有效成分。该抗变态反应剂能够通过减少与 I 型变态反应相关的 IgE 抗体改善变态反应性体质，其易于服用且安全性高。本发明还提供减弱变态反应的抗变态反应剂的应用，以及利用该抗变态反应剂使变态反应减弱的方法。

1. 一种抗变态反应剂，其包含保藏于特许生物寄托中心、保藏号为 FERM BP-4981 的嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 菌株 CL92 作为有效成份。
2. 保藏于特许生物寄托中心、保藏号为 FERM BP-4981 的嗜酸乳杆菌菌株 CL92 在制备减弱变态反应的药剂中的应用。
3. 权利要求 2 所述的应用，其中，所述的变态反应是 IgE 依赖性的 I 型变态反应。
4. 权利要求 2 所述的应用，其中，所述的变态反应是变态反应性鼻炎。

抗变态反应剂及其制药用途

技术领域

本发明涉及抗变态反应剂。本发明也涉及抗变态反应剂在减弱变态反应中的用途，以及减弱变态反应的方法。

背景技术

在日本等许多国家，变态反应患者数量逐年递增，据说在日本每三个成年人中就有一个是变态反应性疾病患者。根据其作用的机制，变态反应性疾病分为四大类，即类型 I 到 IV。某些类型的花粉病等变态反应性鼻炎、支气管性哮喘以及特异反应性皮炎被称为免疫球蛋白 E(IgE)依赖性的 I 型变态反应，血液中抗原特异性 IgE 抗体的增多使引发变态反应症状的危险性提高。

引发 I 型变态反应的机制如下。花粉、屋尘或螨等抗原侵入身体产生特异于这些抗原的 IgE 抗体，并结合到肥大细胞或在嗜碱粒细胞表面上的 $Fc\epsilon$ 受体以使受试者致敏。此后抗原一旦侵入体内即与 IgE 抗体结合，形成一种复合物由此引发脱颗粒作用，颗粒中的组胺和 $\text{I}\text{C}\text{O}\text{T}\text{R}\text{I}\text{E}\text{N}$ 等化学介质释放出来，由此表现出变态反应症状。

目前，主要以抗组胺剂为代表的化学介质的拮抗剂，和用作抗炎药类固醇剂来治疗变态反应性疾病。但是，这两种药剂都仅仅提供对症治疗，并且类固醇抑制整体免疫反应，因此伴有副反应。此外，也使用通过抑制脱颗粒而抑制化学介质释放的药剂，但是还没有特异性减少引起发病的主要因素，即 IgE 抗体的根本性治疗药剂。

而且，当必需将抗变态反应剂长期给药时，期待一种易于服用且安全性高的抗变态反应剂。因此，需要具有这些特性的新型抗变态反应剂。

发明概述

本发明的目的在于提供一种能够减少与引发 I 型变态反应相关的 IgE 抗体量、改善变态反应性体质的易于服用且安全性高的抗变态反应剂，和减弱变态反应的方法。

为了解决上述问题，本发明人构建了一种小鼠模型，其中抗原特异性的 IgE 水平显著升高，但 IgG 水平没有大量增长。在这一模型中，

对可能影响肠免疫系统的各种乳酸菌菌株的 IgE 量阻抑作用进行了研究，发现在各种受试的乳酸菌中，某些细菌对于 IgE 的产生具有特别好的抑制作用，从而完成了本发明。

根据本发明，提供包含以选自属于嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 的乳酸菌、属于发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 的乳酸菌，及其组合的乳酸菌作为有效成分的抗变态反应剂。

本发明还提供所述乳酸菌是选自属于嗜酸乳杆菌的嗜酸乳杆菌菌株 CL0062(保藏于特许生物寄托中心，保藏号 FERM BP-4980)、CL92(保藏于特许生物寄托中心，保藏号 FERM BP-4981)，及其组合的抗变态反应剂。

本发明还提供所述乳酸菌是属于发酵乳杆菌的发酵乳杆菌菌株 CP34(保藏于特许生物寄托中心，寄托编号 FERM BP-8383)的抗变态反应剂。

此外，本发明提供具备下述特征的抗变态反应剂，即在小鼠鼻炎模型中，对鼻部持续进行抗原刺激使得血液中的抗原特异性 IgE 抗体增多，经口服施用本发明的抗变态反应试剂可以使血液中抗原特异性的 IgE 抗体减少。

本发明还提供所述特定的乳酸菌在制备减弱变态反应的药物中的应用。

本发明进一步提供一种减弱变态反应的方法，其包括对需要此种减弱的受试者施用有效剂量的所述抗变态反应剂。

附图简述

图 1 是显示实施例 1 中高 IgE 小鼠血液中免疫球蛋白水平变化的图。

图 2 是显示实施例 2 中，对高 IgE 小鼠施用发酵乳抑制 OVA-IgE 水平的实验结果图。

图 3 是显示实施例 3 中，对高 IgE 小鼠施用发酵乳抑制 OVA-IgE 水平的实验结果图。

图 4 是显示实施例 4 中，对高 IgE 小鼠施用发酵乳抑制 OVA-IgE 水平的实验结果图。

图 5 是显示在实施例 5 中，对人施用发酵乳抑制 OVA-IgE 水平的实验结果图。

图6是显示在实施例5中,对人施用发酵乳抑制OVA-IgE水平的实验结果图。

发明的实施方案

本发明的抗变态反应剂包含作为有效成分的、选自属于乳酸菌的嗜酸乳杆菌和发酵乳杆菌,及其组合的乳酸菌。

作为属于嗜酸乳杆菌的乳酸菌优选嗜酸乳杆菌菌株 CL0062(1994年3月4日保藏于特许生物寄托中心(日本国茨城县筑波东1-1-1中央6号),保藏号 FERM BP-4980)、嗜酸乳杆菌菌株 CL92(1994年3月4日保藏于特许生物寄托中心,保藏号 FERM BP-4981)或其组合。此外,作为发酵乳杆菌优选发酵乳杆菌菌株 CP34(2002年5月23日保藏于特许生物寄托中心,保藏号 FERM BP-8383)。这三种菌株已经根据国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约进行了保藏。一旦专利权被授予,对公众获得发酵乳杆菌菌株 CP34 的限制将全部去除。此外,嗜酸乳杆菌菌株 CL0062 和嗜酸乳杆菌 CL92 目前已经是公众可获得的了。

嗜酸乳杆菌菌株 CL0062 具有下列细菌学特性:

(形态学特性)

- 1) 细胞形状: 杆菌,
- 2) 运动性的有无: 无,
- 3) 有无芽孢: 无,
- 4) 革兰氏染色: 阳性,

(生理学特性)

- 1) 过氧化氢酶: 阴性,
- 2) 吲哚生产: 阴性,
- 3) 硝酸盐还原: 阴性,
- 4) 对氧气的要求: 兼性厌氧,
- 5) 于15℃的生长: 无,
- 6) 通过同型乳酸发酵由葡萄糖形成 DL-乳酸, 而无气体形成,
- 7) 是否由糖类形成酸

葡萄糖: +

蜜二糖: +

乳糖: +

棉子糖: +

甘露糖: +	甘露醇: -
果糖: +	山梨糖醇: -
半乳糖: +	七叶苷: +
蔗糖: +	水杨苷: +
阿拉伯糖: -	N-乙酰氨基葡萄糖胺: +
麦芽糖: +	苦杏仁苷: +
木糖: -	龙胆二糖: +
鼠李糖: -	松三糖: -
纤维二糖: +	糊精: +
海藻糖: +	淀粉: -

嗜酸乳杆菌菌株 CL92 具有下列细菌学特性:

(形态学特性)

- 1) 细胞形状: 杆菌,
- 2) 运动性: 无,
- 3) 芽孢形成: 无,
- 4) 革兰氏染色: 阳性,

(生理学特性)

- 1) 过氧化氢酶: 阴性,
- 2) 吲哚的生产: 阴性,
- 3) 硝酸盐还原: 阴性,
- 4) 对氧气的要求: 兼性厌氧,
- 5) 于 15℃ 的生长: 无,
- 6) 通过同型乳酸发酵由葡萄糖形成 DL-乳酸, 而无气体形成,
- 7) 是否由糖类形成酸

葡萄糖: +	蜜二糖: -
乳糖: +	棉子糖: +
甘露糖: +	甘露醇: -
果糖: +	山梨糖醇: -
半乳糖: +	七叶苷: +
蔗糖: +	水杨苷: +
阿拉伯糖: -	N-乙酰氨基葡萄糖胺: +

麦芽糖: +	苦杏仁苷: +
木糖: -	龙胆二糖: +
鼠李糖: -	松三糖: -
纤维二糖: +	糊精: -
海藻糖: +	淀粉: -

发酵乳杆菌菌株 CP34 具有下列细菌学特性:

(形态学特性)

- 1) 细胞形状: 杆菌,
- 2) 运动性: 无,
- 3) 芽孢形成: 无,
- 4) 革兰氏染色: 阳性,

(生理学特性)

- 1) 过氧化氢酶: 阴性,
- 2) 对氧气的需求: 兼性厌氧,
- 3) 由葡萄糖形成 DL-乳酸, 有气体产生 (+),
- 4) 由糖类形成酸

阿拉伯糖: -	纤维二糖: -
木糖: -	乳糖: +
蜜二糖: -	海藻糖: -
鼠李糖: -	苦杏仁苷: -
核糖: +	棉子糖: -
葡萄糖: +	松三糖: -
甘露糖: -	甘露醇:
果糖: +	山梨糖醇: -
蔗糖: +	七叶苷: -
麦芽糖: +	水杨苷: -

在本发明的抗变态反应剂中, 上述乳酸菌的含量没有特别的限制, 可以根据便于生产或优选的每日剂量等进行适当地调整, 例如对于液体剂型优选 1×10^7 细胞/ml 到 1×10^{10} 细胞/ml.

本发明的抗变态反应剂除了乳酸菌之外可以包含其它成分. 这些

其它成分的例子可以包括赋形剂等添加剂，和后面讨论的培养基的成分。

本发明的抗变态反应剂可以通过在培养基中培养乳酸菌来制备。

对于培养用培养基，只要所述乳酸菌可以在其中生长，均可使用，可以使用动物乳、脱脂乳、乳清、MRS 培养基、GAM 培养基、BL 培养基、Briggs 肝脏肉汤培养基等合成的培养基。培养的温度可以是 25℃ 到 50℃、优选 35℃ 到 42℃。培养时间可以是 3 小时到 48 小时，优选 8 小时到 12 小时。培养过后的培养基，或根据需要进行了处理的培养基可以用作本发明的抗变态反应剂。例如，通过离心或过滤从培养过的培养基中收获的菌体、其冻干产品、经热处理菌体或磨碎的菌体均可以用作本发明的抗变态反应剂。而且，以上述形式存在的菌体可以进一步制剂化，或掺入各种食物材料如饮料、片剂、糊剂或面包中，用作本发明的抗变态反应剂。

本发明的抗变态反应剂的施用方法没有特定的限定，但优选口服施用。例如每天人口服施用时，所述的剂量菌体数可以是 2×10^9 个/天或以上，优选 2×10^{10} 个/天，另外，这些剂量可以一日一次的施用方式或是一日多次施用。

通过下述实施例中可表明，本发明的抗变态反应剂有效地抑制了 IgE 抗体量，另一方面由于以可食用菌体作为有效成分，它被认为是高安全性的。

本发明的减弱变态反应的方法包括对需要此种减弱的受试者施用有效剂量的上述抗变态反应剂的步骤。受试者可以是，例如人或其它哺乳动物等动物。

本发明的抗变态反应剂可有效地抑制活体中的 IgE 抗体量，易于服用且安全性高。因而，该药剂对于抑制涉及过度 IgE 抗体量的变态反应是有用的。

实施例

下面结合实施例详细描述本发明，但本发明不受这些实施例的限制。

实施例 1

(高 IgE 小鼠的制备)

雄性 BALB/c 小鼠购自日本 Charles River 公司，并在随意取食

CE-2(日本 CLEA 公司制)作为饲料的条件下进行饲养。将 10 μ g 卵清蛋白(下文中缩写为 OVA, 由 SIGMA CHEMICAL CO.生产)和 2mg 作为佐剂的氢氧化铝(WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES,LTD.)在 300 μ l 生理盐水中悬浮。在致敏作用的第一天和第四天对 10 只以上六周龄的小鼠腹腔内注射这种悬浮液, 进行首次免疫。对于第二次致敏作用, 将每只小鼠的鼻子浸在溶解于生理盐水形成的 25mg/ml OVA 抗原溶液中三秒钟, 重复这种浸入操作三次作为一个周期。每天进行两次, 从第 10 天到 16 天进行每日浸入, 以制备高 IgE 小鼠。

在致敏作用的第 1 天和第 17 天从高 IgE 小鼠的眼底静脉中部分采血, 由所采血液获得血清样品。根据下文记载的方法, 测量血清样品中的 OVA 特异性 IgE(下文缩写为 OVA-IgE)、总 IgE 以及总 IgG。结果如在图 1(a)到 1(c)所示。

由图 1(a)到 1(c)中所示的结果可知, 通过致敏作用在血液中总 IgE 和 OVA-IgE 的增加量显著大于 IgG 的增加量。这样, 构建出一种整体的免疫机能没有变化, 血液中的 IgE 和抗原特异性 IgE 增加的小鼠变态反应模型。

(血液 OVA-IgE 的测量)

通过夹心 ELISA 进行测定。将含有 10 μ g/ml 的羊抗小鼠 IgE 多克隆抗体的 100 μ l 生理盐水溶液(商品名 AAM11, 大日本制药株式会社生产)加入到 96 孔免疫板(CORNING INCORPORATED 生产)的各孔中, 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。将板用磷酸缓冲液(含有 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄ 以及 1.5mM KH₂PO₄, 下文中缩写为 PBS)洗涤三次, 将含有 0.5% 酪素的 PBS 将各孔加满, 并在室温下温育 3 小时, 然后用 PBS 洗涤三次。向各孔中加入用 PBS 进行 1/10 稀释的血清样品 100 μ l, 并在 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。以 PBS 洗板四次后, 向各孔中加入含有 10 μ g/ml 生物素化 OVA(生物素标记的 OVA)的 100 μ l 0.5%-酪素-PBS, 并于室温反应 2 小时, 其中所述生物素化 OVA 是利用 Biotinylation 试剂盒(AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL INC. 生产)标记的。以 PBS 将板洗涤五次后, 向各孔中加入 100 μ l 含有 1 μ g/ml 链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶(SIGMA CHEMICAL CO. 生产)和 0.5% 酪素的 PBS 溶液, 并于室温反应 1 小时。以含有 0.1% Tween

20 的 PBS 将板洗涤五次后, 向各孔中加入 100 μ l 含有 600 μ g/ml 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸) (下文中缩写为 ABTS, 由 BOEHRINGER MANNHEIM 生产) 和 0.006% 双氧水的 0.2M 柠檬酸缓冲液 (通过混合 0.2M 柠檬酸和 0.2M 柠檬酸钠并调节 pH 到 5 而制备), 于 37 $^{\circ}$ C 遮蔽 3 小时进行显色。反应完成后, 测量 OD₄₀₅ 和 OD₄₉₂, 通过 OD₄₀₅ 值-OD₄₉₂ 值获得真实的显色值。

一方面, 从已用含 25mg/ml OVA 的生理盐水进行腹腔内注射五次 (一周一次) 的小鼠采集血液样品。由该血液样品制备的血清作为标准血清。以 PBS 将这种标准血清进行 1/10 稀释, 然后用未免疫的血清将其逐步稀释两倍, 从而配制成绘制检测曲线用的稀释液。根据上面的方法所得稀释液进行显色值的测定, 以获得检测曲线。基于这种检测曲线, 获得血清样品中 OVA-IgE 量, 以标准血清中的 OVA-IgE 量为 1, 求得相对量。

(血液中总 IgE 的测量)

将含有 10 μ g/ml 的羊抗小鼠 IgE 多克隆抗体 (商品名 AAM11, 大日本制药株式会社生产) 的 50 μ l 生理盐水溶液加入到 96 孔免疫板 (CORNING INCORPORATED 生产) 的各孔中, 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。将板用 PBS 洗涤三次, 用含 0.5% 酪素的 PBS 将各孔加满, 室温下温育 3 小时, 用 PBS 将板洗涤三次。然后向各孔中加入 50 μ l 用含 0.5% 酪素的 PBS 进行 1/25 稀释的血清样品, 并在 4 $^{\circ}$ C 反应过夜。以 PBS 将板洗涤四次后, 向各孔中加入 50 μ l 含有 2 μ g/ml 的生物素标记的抗小鼠 IgE 抗体 (YAMASA CORPORATION 生产) 和 0.5% 酪素的 PBS 溶液, 并在室温下反应 2 小时。以含有 0.1% Tween 20 的 PBS 将板洗涤五次后, 向各孔中加入 50 μ l 含有 1 μ g/ml 链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶和 0.5% 酪素的 PBS 溶液, 并于室温反应 1 小时。以含有 0.1% Tween 20 的 PBS 将板洗涤五次后, 向各孔中加入 50 μ l 含有 300 μ g/ml ABTS 和 0.006% 双氧水的 0.2M 柠檬酸缓冲液 (pH5), 于室温下遮蔽反应 20-30 分钟。随后测量 OD₄₀₅。

另一方面, 用小鼠抗-DNP-IgE (YAMASA CORPORATION 生产) 替代血清样品以各种浓度溶于含 0.5% 酪素的 PBS 中, 并进行与上面相同的操作以获得检测曲线。基于这个检测曲线, 计算在血清样品中

的总 IgE 量。

(血液中总 IgG 的测量)

将含有 $1\ \mu\text{g/ml}$ 的山羊抗小鼠 IgG(H+L)抗体 (商品名 62-6500, ZYMED LABORATORIES, INC. 生产) 的 $50\ \mu\text{l}$ 生理盐水溶液加入到 96 孔免疫板 (CORNING INCORPORATED 生产) 的各孔中, 并在 $4\ ^\circ\text{C}$ 温育过夜。将板用 PBS 洗涤三次, 向各孔中加满含 0.5% 的酪素的 PBS, 并在室温下温育 3 小时, 用 PBS 将板洗涤三次。向各孔中加入 $50\ \mu\text{l}$ 用含 5% 酪素的 PBS 1/1000 稀释的血清样品, 并在 $4\ ^\circ\text{C}$ 反应过夜, 以 PBS 将板洗涤四次。向各孔中加入 $50\ \mu\text{l}$ 含有 $2\ \mu\text{g/ml}$ 的过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG(γ) 抗体 (CAPPEL LABORATORIES, INC. 生产) 和 0.5% 酪素的 PBS 溶液, 并在室温反应 2 小时。用含有 0.1% Tween 20 的 PBS 将板洗涤五次后, 向各孔中加入 $50\ \mu\text{l}$ 含有 $300\ \mu\text{g/ml}$ ABTS 和 0.006% 双氧水的 0.2M 柠檬酸缓冲液 (pH5), 于室温遮蔽反应 20-30 分钟。随后测量 OD_{405} 。

另一方面, 用纯化的小鼠 IgG (CAPPEL LABORATORIES 生产) 替代血清样品以各种浓度溶于含 0.5% 酪素的 PBS 中, 并进行与上面相同的操作以获得检测曲线。基于这个检测曲线, 计算在血清样品中的总 IgG 量。

实施例 2

(各种乳酸菌效果的比较)

在表 1 中显示的每一种乳酸菌菌株都在 MRS 培养基中于 $37\ ^\circ\text{C}$ 过夜预培养, 通过于 3000 转/分钟离心 10 分钟收集细胞。收集的细胞经添加 9% (W/V) 还原脱脂乳 (包含 0.1% (W/V) 酵母提取物 (DIFCO 生产)) 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 发酵, 直到乳凝结。发酵后, 测量每一种发酵乳的总菌数。结果示于表 1 中。

表 1

菌株	总菌数 (细胞/ml)
嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) CL92(BP-4981)	1.9×10^8
保加利亚乳杆菌(<i>Lactobacillus bulgaricus</i>)CP1812	1.5×10^8
发酵乳杆菌(<i>Lactobacillus fermentum</i>)CP34	5.3×10^8
瑞士乳杆菌(<i>Lactobacillus helveticus</i>)CP790	2.4×10^8
约氏乳杆菌(<i>Lactobacillus johnsonii</i>)CP2551	2.7×10^8
植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)CP2172	5.9×10^8
鼠李糖乳杆菌(<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) ATCC53103	1.0×10^8

随后，通过与实施例 1 中相同的方式制备高 IgE 的小鼠，通过与实施例 1 中相同的方式测量致敏作用第 18 天的血液中 OVA-IgE。将小鼠分成每组 10 只小鼠的组，各组血液中 OVA-IgE 量均等。从致敏作用的第 19 天到 21 天，将上述各种发酵乳，未发酵的 9% (W/V) 还原脱脂乳或包含 750 μ g 环磷酸胺的未发酵的 9% (W/V) 还原脱脂乳对每组小鼠以 1ml 每天的剂量通过胃管强制施用三天。在致敏作用的第 22 天，从眼底静脉采集小鼠的血液样品，并制备血清样品。测量血液 OVA-IgE 和总 IgG 的水平。作为对照，以同样的方式采集已经通过同样的方式进行致敏但没有给与发酵乳或类似物的小鼠的血液样品，测量血液 OVA-IgE 和总 IgG 量。结果示于图 2 中。

如在图 2 中所示，与给与未发酵脱脂乳的组相比，在给与嗜酸乳杆菌或发酵乳杆菌发酵乳的小鼠组中，观察到对 OVA-IgE 量的显著阻抑效果 ($p < 0.01$)。在血液的总 IgG 水平上没有观察到显著的差异 (未显示)。

实施例 3

除了使用在表 2 中所示的乳酸菌菌株之外，均遵循实施例 2 中的方法。在每种发酵乳中总菌数测定的结果示于表 2 中。血液 OVA-IgE 的测定结果显示于图 3 中。

表 2

菌株	总菌数 (细胞/ml)
嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) CL0062(BP-4980)	4.40×10^8
加氏乳杆菌(<i>Lactobacillus gasseri</i>)CP2209	4.30×10^8
罗伊乳杆菌(<i>Lactobacillus reuteri</i>)ATTCC23272	9.60×10^8
短双歧杆菌 (<i>Lactobacillus breve</i>) CP2425	1.30×10^8

如在图 3 中所示, 与给与未发酵脱脂乳的组相比, 在给与嗜酸乳杆菌发酵乳的小鼠组中, 观察到对 OVA-IgE 量的显著的阻抑效果 ($p < 0.01$)。在血液中的总 IgG 水平上没有观察到显著的差异 (未显示)。

实施例 4

(较低剂量效果的比较)

嗜酸乳杆菌菌株 CL92 和发酵乳杆菌菌株 CP34 分别在 MRS 培养基中于 37℃ 过夜预培养, 通过于 3000 转/分钟离心 10 分钟收集菌体。收集的菌体添加 MRS 培养基于 37℃ 过夜培养, 通过于 3000 转/分钟离心 10 分钟收集菌体。测定每一种菌株的细胞数, 将菌体用 9% 的脱脂乳以 1×10^6 细胞/ml 的浓度进行悬浮以获得悬浮液。

随后, 通过与实施例 1 中相同的方式制备高 IgE 小鼠, 通过与实施例 1 中相同的方式测量致敏作用第 18 天的血液 OVA-IgE。将小鼠分成每组 10 只小鼠的组, 各组血液 OVA-IgE 量均等。从致敏作用的第 19 天到 21 天, 将上面的悬浮液对每组小鼠以 1ml 每天的剂量通过胃管强制施用三天。在致敏作用的第 22 天, 从眼底静脉中采集小鼠的血液样品, 并制备血清样品。测量血液中 OVA-IgE 和总 IgG 量。结果示于图 4 中。

如在图 4 中所示, 与给与未发酵脱脂乳的组相比, 在给与嗜酸乳杆菌菌株 CL92 和发酵乳杆菌菌株 CP34 的小鼠组中, 观察到对 OVA-IgE 量的显著阻抑效果 ($p < 0.01$)。在血液的总 IgG 水平上没有观察到显著的差异 (未显示)。

通过公式 $d = 1 - (b/a)$ 得到当施用每一种悬浮液时, OVA-IgE 的降低率 d , 其中 a 代表当饲以未发酵的脱脂乳时 OVA-IgE 的标准比率,

b 代表当饲以每一种悬浮液时 OVA-IgE 的标准比率。通过公式 $x=(s \times 0.5)/d$ 得到在这个实验系统中对于 OVA-IgE 降低一半所必需的悬浮液中细胞的数目 x (细胞/ml)，其中 s (细胞/ml)表示施用于小鼠的悬浮液的菌浓度，并且假定 s 与降低率 d 成比例。利用这个公式，获得在实施例 2 和 3 中所用的每一种菌株的菌数 x 。结果显示于表 3 中。

表 3

菌株	所需细胞数目 (细胞/ml)
嗜酸乳杆菌 CL92(BP-4981)	1.0×10^6
保加利亚乳杆菌 CP1812	2.0×10^8
发酵乳杆菌 CP34	1.4×10^6
瑞士乳杆菌 CP790	3.3×10^8
约氏乳杆菌 CP2551	3.5×10^8
植物乳杆菌 CP2172	7.0×10^8
鼠李糖乳杆菌 ATCC53103	2.9×10^8
嗜酸乳杆菌 CL0062(BP-4980)	5.0×10^8
加氏乳杆菌 CP2209	3.1×10^9
罗伊乳杆菌 ATCC23272	3.3×10^9
短双歧杆菌 CP2425	1.1×10^9

实施例 5

(对于人类的临床效果)

对 13 位患有常年性变态反应性鼻炎的受试者 (平均年龄 22.9 ± 6.1 岁, 6 位女性和 7 位男性) 进行 2 星期的观察期后, 给与含有嗜酸性乳杆菌菌株 CL92 8.0×10^8 到 1.3×10^9 细胞/ml 的发酵乳 100ml/天, 持续 4 星期。在其间发出对于自觉症状的问卷表, 在应答的基础上根据日本变态反应学学会所提供的“变态反应性鼻炎的严重性分类法”对症状进行评分。每隔一段时间根据日本变态反应学学会的指标对鼻炎的症状进行诊断。另外, 每隔一段时间采血, 测定血液中 IgE 抗体效价。而且, 在试验期间记录当天的最低温度。在试验期间受试者鼻充血严重性、擤鼻涕的频率以及最低温度显示于图 5 和 6 中。

在试验期间, 当天的最低温度波动很大, 从摄入第 1 天 (11 月 15 日) 的 14°C 降到摄入最后 1 天 (12 月 13 日) 的 3.7°C 降低了超过 10°C 。即使在这样易于使鼻炎症状恶化的条件下, 鼻充血还是在摄入开

始两周后显示改善的趋势 (Wilcoxon 检验: $p < 0.1$)，并且在开始四周后观察到显著的改善 (Wilcoxon 检验: $p < 0.05$)。擤鼻涕的频率在摄入开始三周后显示下降的趋势 (Wilcoxon 检验: $p < 0.1$)。在摄入期间，观察到打喷嚏频率的下降趋势、下鼻甲肿胀的缓解以及血液中总 IgE 抗体滴度的降低。

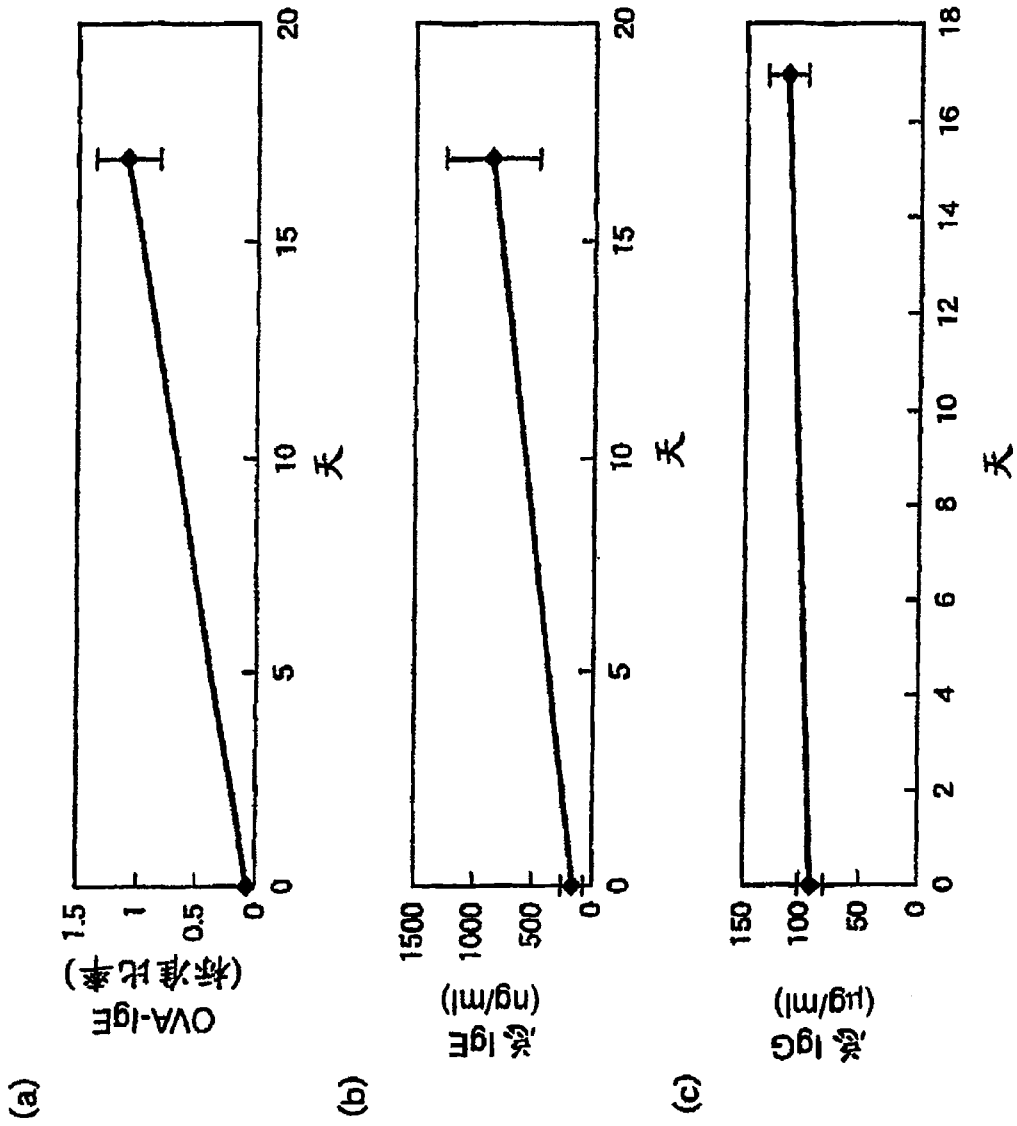
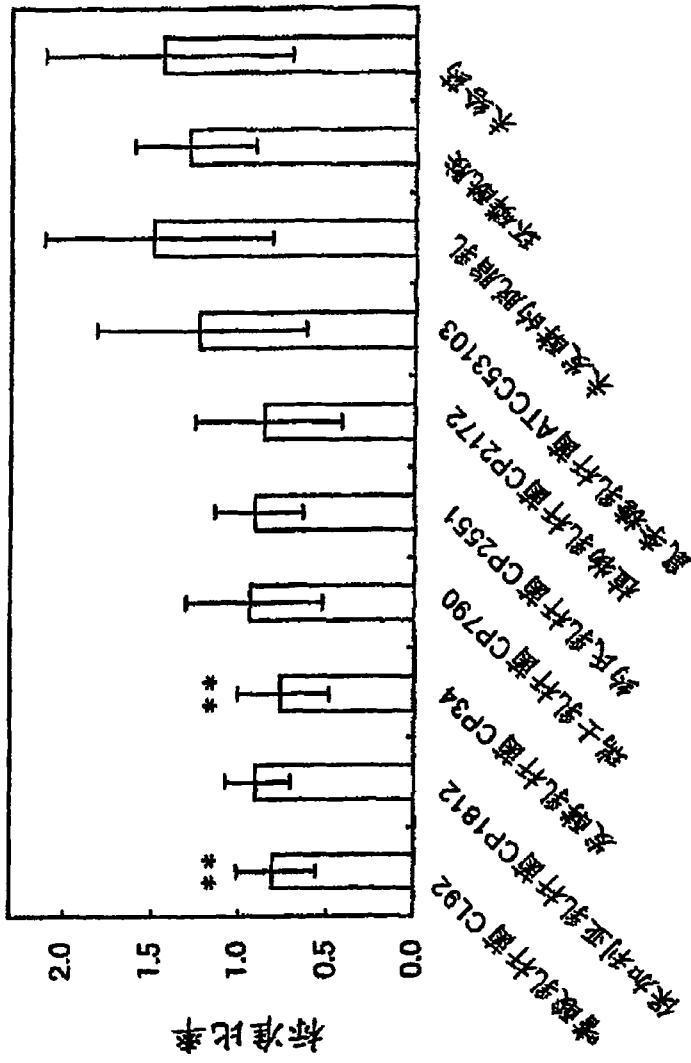
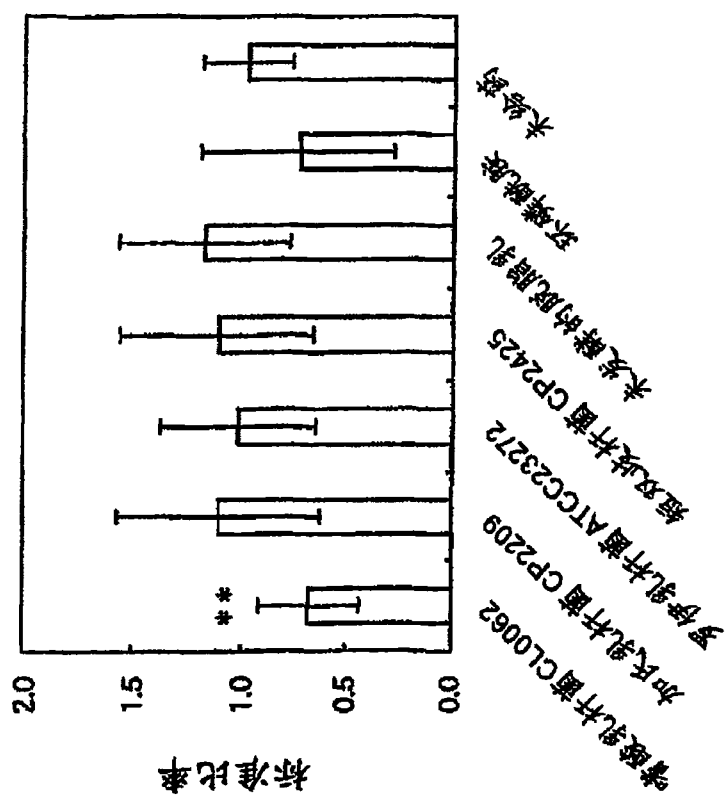


图 1



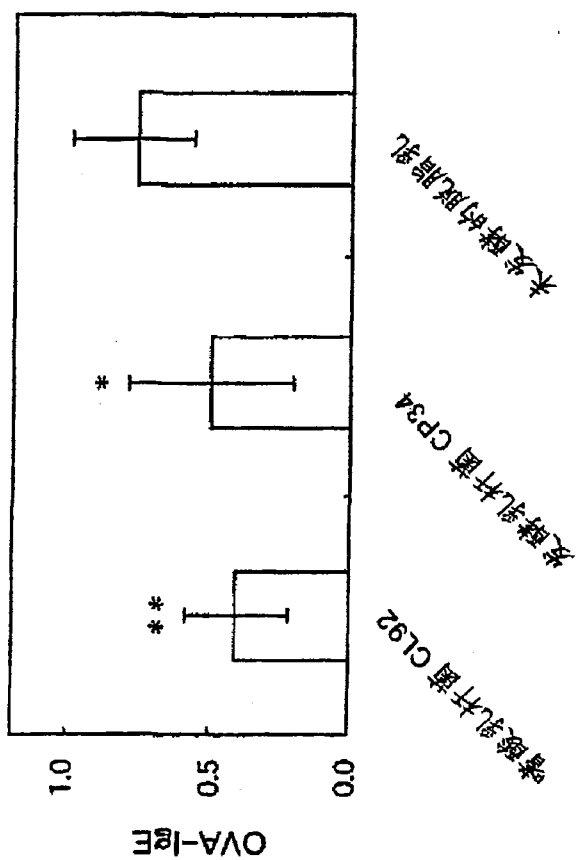
**：p<0.01 相对于未发酵的脱脂乳

图 2



**：p<0.01相对于未发酵的脱脂乳

图 3



*: 相对于未发酵的脱脂乳 $p < 0.05$

** : 相对于未发酵的脱脂乳 $p < 0.01$

图 4

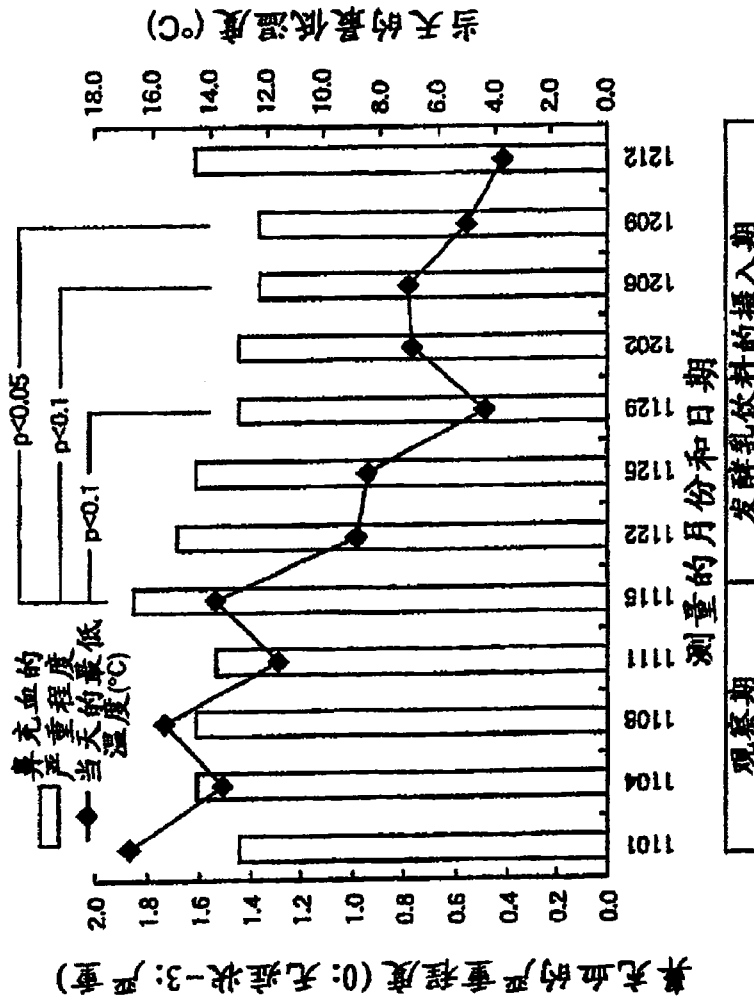


图 5

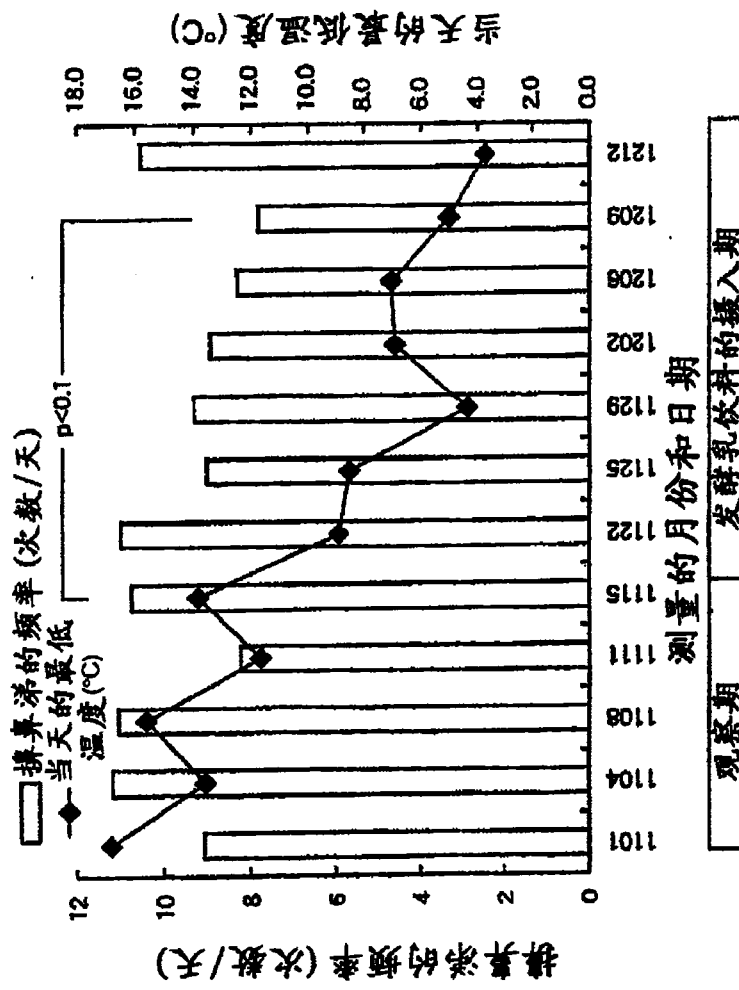


图 6