



(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 201315475 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：100137219

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 14 日

(51)Int. Cl.：

A61K35/74 (2006.01)

A61P37/08 (2006.01)

(71)申請人：景岳生物科技股份有限公司 (中華民國) GENMONT BIOTECH INC. (TW)

臺南市善化區南科七路 8 號

(72)發明人：呂英震 LU, YING CHEN (TW)；謝豐欽 HSIEH, FENG CHING (TW)

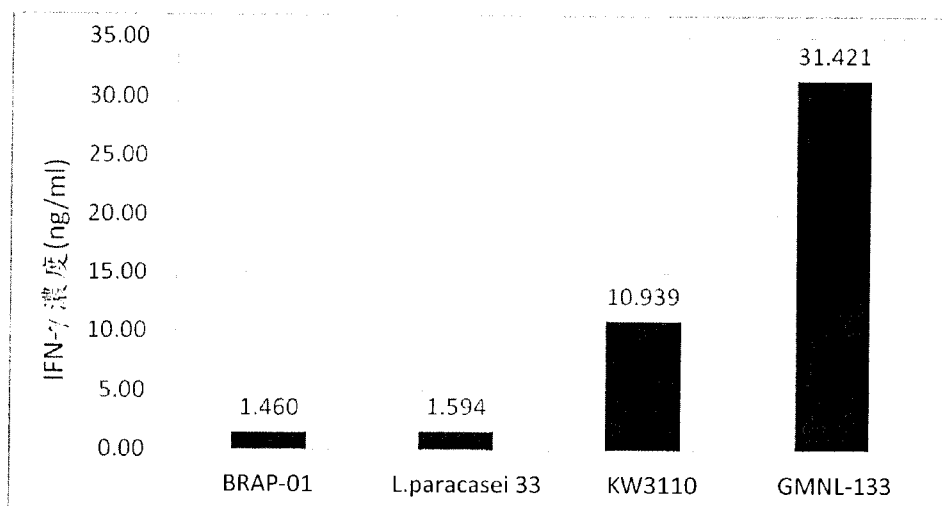
申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：6 共 32 頁

(54)名稱

副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 用於改善異位性皮膚炎或其他過敏疾病之組合物及其用途  
COMPOSITION AND USE OF LACTOBACILLUS PARACASEI STRAIN GMNL-133 IN TREATING  
ATOPIC DERMATITIS OR OTHER ALLERGIC DISEASES

(57)摘要

一種經分離之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，寄存於台灣新竹食品工業研究發展研究所(Food Industry Research and Development Institute，FIRDI)，寄存編號為 BCRC 910520。前述副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 可用於製造治療異位性皮膚炎或其他過敏疾病之組合物。以及，一種包括前述副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之組合物，且副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效治療異位性皮膚炎或其他過敏疾病。



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100131219

A61K35/74 (2006.01)

※申請日：

※IPC 分類：

A61P37/08 (2006.01)

100. 10. 1 4

5 一、發明名稱：(中文/英文)

副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 用於改善異位性皮膚炎或其他過敏疾病之組合物及其用途

COMPOSITION AND USE OF *LACTOBACILLUS PARACASEI* STRAIN GMNL-133 IN TREATING ATOPIC DERMATITIS OR  
10 OTHER ALLERGIC DISEASES

二、中文發明摘要：

一種經分離之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，寄存於台灣新竹食品工業研究發展研究所(Food Industry Research and Development Institute， FIRDI)，寄存編號為 BCRC  
15 910520。前述副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 可用於製造治療異位性皮膚炎或其他過敏疾病之組合物。以及，一種包括前述副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之組合物，且副乾酪  
0 乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效治療異位性皮膚炎或其他過敏疾病。

20 三、英文發明摘要：

An isolated *Lactobacillus paracasei* strain GMNL-133 deposited in the Biosource Collection and Research Center (BCRC) of the Food Industry Research and Development Institute (FIRDI) under the accession number of BCRC 910520 is disclosed. The isolated  
25 *Lactobacillus paracasei* strain GMNL-133 is used for preparing a composition for use in treating the atopic dermatitis or other allergic diseases in an effective amount. And a composition for use in

treating the atopic dermatitis or other allergic diseases comprising an effective amount of the *Lactobacillus paracasei* strain GMNL-133 is also disclosed.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 ( 3 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

5

10

15

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

20

25

30

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於一種乳酸桿菌株及其用途，特別是有關於一種副乾酪乳酸桿菌株及其用於改善過敏疾病之組合物及用途。

### 【先前技術】

過敏係指一種後天獲得的對正常無害物質產生免疫上的不良反應。過敏反應引起之症狀有瘙癢、咳嗽、氣喘、噴嚏、淚眼、發炎及疲乏等。人們認為過敏反應包括早期專一性免疫反應及晚期炎症反應。據報導，過敏原(如花粉及塵蟎)藉由刺激高親和力免疫球蛋白 E(Immunoglobulin E, IgE)中介早期之過敏反應。具體而言，當肥大細胞及嗜鹼性粒細胞受到過敏原刺激時，會釋放組織胺及細胞激素。細胞激素隨後藉由聚集發炎細胞中介晚期之過敏反應。亦有報導指出嗜酸性粒細胞、巨噬細胞、淋巴細胞、嗜中性粒細胞和血小板之滙集開啟晚期惡性的炎症反應循環。晚期之過敏反應增強最初的免疫反應，轉而促使釋放更多的發炎細胞。

現已有多種療法用於治療過敏症狀，包含使用抗過敏劑及組織胺 H-受體拮抗劑(抗組織胺)。抗組織胺可減輕由組織胺作用於目標組織所引起之充血、瘙癢及腫脹等症狀，並且可預防或緩和諸多由肥大細胞去顆粒引起的症狀。但是，同時亦有報導，指出抗組織胺會產生一些副作用，例如警覺性降低、反應遲鈍及嗜睡。

異位性皮膚炎係兒童最常見的一種過敏症。治療異位性皮膚炎之傳統方法為局部類固醇療法，但其實異位性皮膚炎症狀很難根除，且停藥後經常復發。再者，長期使用類固醇療法容易產生副作用，例如皮膚萎縮變薄、皮膚色素改變、長毛、長痘痘等。因此，副作用少且安全性高，可以放心使用之藥劑成為病人和臨床上所切望。

益生菌近年來被醫界和科學界認定有助人體健康，且無副作用。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，例如乳酸桿菌屬(Lactobacillus)、雙叉桿菌屬(Bifidobacterium)、乳球菌屬(Lactococcus)、腸球菌屬(Enterococcus)、酵母菌屬(yeasts)、鏈球菌屬(Streptococcus)等等。

乳酸桿菌屬是一群革蘭氏陽性的兼性厭氧菌，普遍存在於人類的胃腸道與陰道內，能夠發酵糖類並以乳酸為主要代謝產物。有許多的研究以及臨床試驗皆陸續證實乳酸桿菌與健康之間存在有重要的相關性。目前，乳酸桿菌已被發現的功效包括：(1)增進腸道微生物群的菌相平衡；(2)預防腹瀉(diarrhea)；(3)降低結腸癌(colon cancer)的危險性；(4)刺激胃腸上皮黏膜系統(gastrointestinal epithelial mucosal system)的正常發展與功能；(5)產生各種維生素(vitamins)與營養素(nutrients)；以及(6)預防與治療陰道炎

(vaginosis)。

【發明內容】

綜上所述，本發明之一態樣在於提供一種經分離之副  
5 乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，其係寄存於台灣新竹食品工  
業研究發展研究所 (Food Industry Research and  
Development Institute, FIRDI)，寄存編號為 BCRC 910520。

本發明之另一態樣在於提供一種副乾酪乳酸桿菌株  
GMNL-133 之用途，係用於製造治療異位性皮膚炎之組合  
10 物。

根據本發明之上述態樣，提出一種用於治療異位性皮  
膚炎之組合物，包括副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，且該  
副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效改善異位性皮  
膚炎。

15 本發明之又一態樣在於提供一種副乾酪乳酸桿菌株  
GMNL-133 之用途，係用於製造治療過敏疾病之組合物。

根據本發明之上述態樣，提出一種用於治療過敏疾病  
之組合物，包括副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，且副乾酪  
乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效改善過敏疾病。

20 根據本發明一實施例，副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133  
可為活菌或是經過熱處理之死菌。而治療異位性皮膚炎或  
過敏疾病之組合物可為醫藥組合物或食品組合物。

根據本發明另一實施例，治療異位性皮膚炎或過敏疾  
病之組合物更可包含至少一其他菌株，該其他菌株係選自  
25 於由嗜酸性乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳酸

桿菌(*Lactobacillus plantarum*)、長雙歧桿菌(*Bifidobacterium longum*)、發酵乳酸桿菌(*Lactobacillus fermentum*)、保加利亞乳酸桿菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜熱鏈球菌(*Streptococcus thermophilus*)、乳酪乳酸桿菌(*Lactobacillus cremors*)、鼠李糖乳酸桿菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、羅伊氏乳酸桿菌(*Lactobacillus reuteri*)及上述之任意組合所組成之一族群。

### 【實施方式】

10 目前有報導指出藉由調節細胞激素可治療過敏。其中， $\gamma$ -干擾素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )可抑制第2類輔助型T細胞(Th2)之細胞激素的過度表現，特別是抑制介白素-4(Interleukin-4, IL-4)之分泌，進而降低B淋巴細胞之增殖。此外，IFN- $\gamma$ 還可刺激第1類輔助型T細胞(Th1)之免  
15 疫反應，抑制IgE之合成。因此，咸信IFN- $\gamma$ 對於治療過敏有效。

因此，本發明提供一新穎副乾酪乳桿菌株GMNL-133，具刺激小鼠之脾臟細胞分泌IFN- $\gamma$ 之能力，可用於製造治療過敏疾病之組合物。副乾酪乳桿菌株  
20 GMNL-133於2011年7月5日寄存於台灣新竹食品工業研究發展研究所(Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)，寄存編號為BCRC 910520。並且，依據布達佩斯條約(Budapest Treaty)的規定，副乾酪乳桿菌株GMNL-133也於2011年9月26日寄存於中國典型培養物  
25 保藏中心(China Center for Type Culture Collection,

CCTCC)(武漢，武漢大學，430072，中華人民共和國)，保藏號為 CCTCC M 2011331。此副乾酪乳桿菌株 GMNL-133 (BCRC 910520)可包含至少一藥學上可接受的賦型劑及/或稀釋劑等其它成分，例如葡萄糖、麥芽糊精、嬰兒奶粉、果寡糖、硬脂酸鎂、優格香料、其它難以分離的成分、或其上述之任意組合，且此其它成分以及配製方法為本發明技術領域之技藝人士所熟知。另外，副乾酪乳桿菌株 GMNL-133 (BCRC 910520)之用量可為每公克約  $1 \times 10^6$  至約  $1 \times 10^{11}$  菌落形成單位(colony-forming unit; CFU)(CFU/g)。

所謂「過敏疾病」係指異位性皮膚炎、過敏性鼻炎與氣喘、以及一些特定的食物與昆蟲叮咬引起的過敏。這些疾病會導致相當程度的發炎反應，造成皮膚、黏膜組織或是血管的慢性發炎。

根據本發明一實施例，治療過敏疾病之組合物包含副乾酪乳桿菌株 GMNL-133，且副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效改善過敏疾病。

上述副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 可為活菌或是經過熱處理之死菌。治療過敏疾病之組合物可為口服組合物，例如醫藥組合物或食品組合物。

根據本發明另一實施例，治療過敏疾病之組合物更可包含至少一其他菌株。其他菌株係選自於由嗜酸性乳酸桿菌(*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳酸桿菌(*Lactobacillus plantarum*)、長雙歧桿菌(*Bifidobacterium longum*)、發酵乳酸桿菌(*Lactobacillus fermentum*)、保加利亞乳酸桿菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜熱鏈球菌(*Streptococcus*

*thermophilus*)、乳酪乳酸桿菌(*Lactobacillus cremors*)、鼠李糖乳酸桿菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、羅伊氏乳酸桿菌(*Lactobacillus reuteri*)及上述之任意組合所組成之一族群。一般而言，其它菌株之菌量可为约  $1\times10^7$  CFU/g 或以上。

實施例 1. 菌株之分離、篩選及鑑定

本案發明人自健康人體胃腸道檢體分離百餘株乳酸桿菌，並建立一分離株菌種庫。為尋找具有減緩治療過敏相關疾病潛力之乳酸桿菌，分別將菌種庫中之各乳酸桿菌與小鼠脾臟細胞共培養，進行小鼠脾臟細胞 IFN- $\gamma$  分泌量之分析，進而從中篩選出分離株 GMNL-133 為一可刺激小鼠脾臟細胞分泌大量 IFN- $\gamma$  之乳酸桿菌。

將此分離株 GMNL-133 進行各項菌種鑑定分析。第 1 圖為分離株 GMNL-133 於顯微鏡下之型態圖。分離株 GMNL-133 初步試驗結果顯示為革蘭氏陽性桿菌，不具觸酶、氧化酶及運動性，好氧及厭氧環境下皆會生長。

再進一步以 16S rDNA 序列及 API 50 CHL 鑑定系統分析。分離株 GMNL-133 之 16S rDNA 部分序列如 SEQ ID No: 1 所示。表一為分離株 GMNL-133 以 API 50CHL 鑑定系統分析之結果。

表一 分離株 GMNL-133 之 API 50CHL 鑑定系統分析結果

| API Test | 分離株<br>GMNL-133 | <i>Lactobacillus</i><br><i>paracasei</i><br><i>subsp.</i><br><i>paracasei</i> | <i>Lactobacillus</i><br><i>paracasei</i><br><i>subsp.</i><br><i>tolerans</i> |
|----------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|----------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|

|                                     |   | BCRC 12248 | BCRC 14628 |
|-------------------------------------|---|------------|------------|
| 甘油(Glycerol)                        | - | -          | -          |
| 赤紫蘇醣醇(Erythritol)                   | - | -          | -          |
| D-阿拉伯糖(D-Arabinose)                 | - | -          | -          |
| L-阿拉伯糖(L-Arabinose)                 | - | -          | -          |
| D-核糖(D-Ribose)                      | + | +          | -          |
| D-木糖(D-Xylose)                      | - | -          | -          |
| L-木糖(L-Xylose)                      | - | -          | -          |
| D-核醣醇(D-Adonitol)                   | - | -          | -          |
| 甲基-βD-木糖苷<br>(Methyl-βD-xyloside)   | - | -          | -          |
| D-半乳糖(D-Galactose)                  | + | +          | +          |
| D-葡萄糖(D-Glucose)                    | + | +          | +          |
| D-果糖(D-Fructose)                    | + | +          | +          |
| D-甘露糖(D-Mannose)                    | + | +          | +          |
| L-山梨糖(L-Sorbose)                    | - | -          | -          |
| L-鼠李糖(L-Rhamnose)                   | - | -          | -          |
| 衛茅醇(Dulcitol)                       | - | -          | -          |
| 肌醇(Inositol)                        | - | -          | -          |
| D-甘露醣醇(D-Mannitol)                  | + | +          | -          |
| D-山梨糖醇(D-Sorbitol)                  | + | -          | -          |
| 甲基-αD-甘露糖苷<br>(Methyl-αD-mannoside) | - | -          | -          |
| 甲基-αD-葡萄糖苷<br>(Methyl-αD-glucoside) | + | -          | -          |
| N-乙醯葡萄糖胺<br>(N-Acetylglucosamine)   | + | +          | +          |
| 苦杏仁苷(Amygdalin)                     | + | -          | -          |
| 熊果素(Arbutine)                       | + | +          | -          |
| 七葉苷(Exculine)                       | + | +          | -          |
| 水楊素(Salicine)                       | + | +          | -          |
| D-纖維雙糖(D-Cellobiose)                | + | +          | -          |
| D-麥芽糖(D-Maltose)                    | + | -          | -          |
| D-乳糖(D-Lactose)                     | + | +          | +          |
| D-蜜二糖(D-Melibiose)                  | - | -          | -          |
| 蔗糖<br>(D-Saccharose(sucrose))       | + | -          | -          |
| D-海藻糖(D-Trehalose)                  | + | +          | -          |
| 菊糖(Inulin)                          | - | -          | -          |
| D-含松三糖(D-Melezitose)                | + | +          | -          |
| D-蜜三糖(D-Raffinose)                  | - | -          | -          |
| 澱粉(Amidon(starch))                  | - | -          | -          |
| 肝糖(Glycogen)                        | - | -          | -          |

|                               |   |    |    |
|-------------------------------|---|----|----|
| 木糖醇(Xylitol)                  | - | -  | -  |
| 龍膽二糖(Gentiobiose)             | + | +  | -  |
| D-松二糖(D-Turanose)             | + | +  | -  |
| D-來蘇糖(D-Lyxose)               | - | -  | -  |
| D-塔格糖(D-Tagatose)             | + | +  | +  |
| D-岩藻糖(D-Fucose)               | - | -  | -  |
| L-岩藻糖(L-Fucose)               | - | -  | -  |
| D-阿拉伯糖醇(D-Arabitol)           | - | -  | -  |
| L-阿拉伯糖醇(L-Arabitol)           | - | -  | -  |
| 葡萄糖酸(Gluconate)               | W | W  | W  |
| 2-酮-葡萄糖酸<br>(2-ketogluconate) | - | -  | -  |
| 5-酮-葡萄糖酸<br>(5-ketogluconate) | - | -  | -  |
| 分離株 GMNL-133 與各標準菌株符合項目       |   | 44 | 34 |

-：負反應；+：正反應；W：微弱正反應

綜合上述鑑定結果顯示，分離株 GMNL-133 為副乾酪乳酸桿菌。

5

## 實施例 2. 副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品之副乾酪乳酸桿菌之差異分析

將副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與市售優酪乳(例如統一 LP33 優酪乳，內含副乾酪乳酸桿菌株 LP33)、優格(例如日本麒麟公司大人之元氣優格，內含副乾酪乳酸桿菌株 KW3110)、益生菌保健食品(例如百晟生技威敏益生菌，內含副乾酪乳酸桿菌株 BRAP-01)等含有副乾酪乳酸桿菌之產品中的菌株進行差異分析，包含隨機擴增多型性 DNA (RAPD, Random Amplification of Polymorphic DNA) 電泳分析與 API 50 CHL 鑑定系統分析。

10

15

RAPD 電泳分析利用序列為 5'-CCGCGACGTT-3'(SEQ

ID No：2)之引子進行聚合酶鏈鎖反應，以分析副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與市售產品中之副乾酪乳酸桿菌株隨機擴增多型性 DNA 間之差異。聚合酶鏈鎖反應條件為 93℃，10 分鐘將雙股 DNA 變性分離為單股。接著進行以下循環 35 次：93℃，1 分鐘；36℃，1 分鐘；74℃，1 分鐘。最後以 74℃ 進行 5 分鐘來擴增 DNA 片段。反應完成後以 1.5% 洋菜膠進行 DNA 電泳分析。

第 2 圖係為副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品中副乾酪乳酸桿菌株之 RAPD 電泳圖。其中泳道 (lane)M 為分子量標誌(maker)，泳道 1 至 4 分別為 LP33、KW3110、GMNL-133 與 BRAP-01 之 RAPD 圖譜。由第 2 圖結果可知，GMNL-133 與 KW3110、LP33、BRAP-01 的 RAPD 圖譜皆不同。

副桿酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品之副乾酪乳酸桿菌株之 API 50 CHL 鑑定系統分析之結果如表二所示。

表二 副桿酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品之副乾酪乳酸桿菌株之 API 鑑定系統分析之結果

| API Test                      | GMNL-133 | LP33 | BRAP-01 |
|-------------------------------|----------|------|---------|
| 甘油(Glycerol)                  | -        | -    | -       |
| 赤紫蘇醣醇(Erythritol)             | -        | -    | -       |
| D-阿拉伯糖(D-Arabinose)           | -        | -    | -       |
| L-阿拉伯糖(L-Arabinose)           | -        | -    | +       |
| D-核糖(D-Ribose)                | +        | +    | -       |
| D-木糖(D-Xylose)                | -        | -    | -       |
| L-木糖(L-Xylose)                | -        | -    | -       |
| D-核醣醇(D-Adonitol)             | -        | -    | -       |
| 甲基-βD-木糖苷(Methyl-βD-xyloside) | -        | -    | +       |

|                                     |   |   |   |
|-------------------------------------|---|---|---|
| D-半乳糖(D-Galactose)                  | + | + | + |
| D-葡萄糖(D-Glucose)                    | + | + | + |
| D-果糖(D-Fructose)                    | + | + | + |
| D-甘露糖(D-Mannose)                    | + | + | + |
| L-山梨糖(L-Sorbose)                    | - | + | - |
| L-鼠李糖(L-Rhamnose)                   | - | - | + |
| 卫茅醇(Dulcitol)                       | - | - | - |
| 肌醇(Inositol)                        | - | - | + |
| D-甘露糖醇(D-Mannitol)                  | + | + | + |
| D-山梨糖醇(D-Sorbitol)                  | + | + | - |
| 甲基-αD-甘露糖苷<br>(Methyl-αD-mannoside) | - | - | - |
| 甲基-αD-葡萄糖苷<br>(Methyl-αD-glucoside) | + | - | + |
| N-乙酰葡萄糖胺<br>(N-Acetylglucosamine)   | + | + | + |
| 苦杏仁苷(Amygdalin)                     | + | - | + |
| 熊果素(Arbutine)                       | + | + | + |
| 七叶苷(Exculine)                       | + | + | + |
| 水杨素(Salicine)                       | + | + | + |
| D-纤维双糖(D-Cellobiose)                | + | + | + |
| D-麦芽糖(D-Maltose)                    | + | + | + |
| D-乳糖(D-Lactose)                     | + | + | - |
| D-蜜二糖(D-Melibiose)                  | - | - | + |
| 蔗糖<br>(D-Saccharose(sucrose))       | + | + | + |
| D-海藻糖(D-Trehalose)                  | + | + | + |
| 菊糖(Inulin)                          | - | - | + |
| D-含松三糖(D-Melezitose)                | + | - | - |
| D-蜜三糖(D-Raffinose)                  | - | - | - |
| 淀粉(Amidon(starch))                  | - | - | - |
| 肝糖(Glycogen)                        | - | - | - |
| 木糖醇(Xylitol)                        | - | - | - |
| 龙胆二糖(Gentiobiose)                   | + | + | + |
| D-松二糖(D-Turanose)                   | + | + | - |
| D-来苏糖(D-Lyxose)                     | - | - | + |
| D-塔格糖(D-Tagatose)                   | + | + | - |
| D-岩藻糖(D-Fucose)                     | - | - | - |
| L-岩藻糖(L-Fucose)                     | - | - | - |
| D-阿拉伯糖醇(D-Arabitol)                 | - | - | - |
| L-阿拉伯糖醇(L-Arabitol)                 | - | - | - |
| 葡萄糖酸(Gluconate)                     | W | + | - |
| 2-酮-葡萄糖酸<br>(2-ketogluconate)       | - | - | - |

|                               |   |   |   |
|-------------------------------|---|---|---|
| 5-酮-葡萄糖酸<br>(5-ketogluconate) | - | - | - |
|-------------------------------|---|---|---|

-：負反應；+：正反應；W：微弱正反應

由表二可知副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133、LP33 與 BRAP-01 的生化反應皆不相同。其中，副乾酪乳酸桿菌株  
5 GMNL-133 與 LP33 對 L-山梨糖、甲基- $\alpha$ D-葡萄糖苷、苦杏仁苷與 D-含松三糖的生化反應完全不同。而副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與 BRAP-01 則對於 L-阿拉伯糖、D-核糖、甲基- $\beta$ D-木糖苷、L-鼠李糖、肌醇、D-山梨糖醇、D-乳糖、D-蜜二糖、菊糖、D-含松三糖、D-松二糖、D-來蘇  
10 糖、D-塔格糖與葡萄糖酸的生化反應完全不同。

綜上所述可知副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133、KW3110、LP33 與 BRAP-01 在基因序列以及生化反應皆不相同，四株副乾酪乳酸桿菌株確實為不同的菌株，證實本發明之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 為一新穎菌株。

15

**實施例 3. 副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他副乾酪乳酸桿菌株於刺激小鼠脾臟細胞產生 IFN- $\gamma$  之分泌量比較**

分別以副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與前述各種市售  
20 產品中之副乾酪乳酸桿菌株，KW3110、LP33 及 BRAP-01，與正常小鼠之脾臟細胞共同培養後，比較小鼠脾臟細胞之 IFN- $\gamma$  分泌量。

以含有 10% 胎牛血清之 RPMI 1640 培養基 (GIBCO/BRL®, Gaithersburg, MD, USA) 培養取自 BALB/c

小鼠之脾臟細胞。將  $4 \times 10^5$  個小鼠脾臟細胞添加至 96 孔盤中，並分別加入  $10^6$  上述各乳酸桿菌菌株，於  $37^\circ\text{C}$ ，含 5% 二氧化碳之環境下培養 48 小時。之後，將細胞培養之上清液以市售 ELISA 試劑套組 (OptEIA Mouse IFN- $\gamma$  Set, BD Biosciences Pharmingen®, San Diego, CA, USA) 測定其中之 IFN- $\gamma$  含量。

第 3 圖為副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品中副乾酪乳酸桿菌株分別刺激小鼠脾臟細胞產生之 IFN- $\gamma$  分泌量。由第 3 圖結果可知，副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 能刺激大量 IFN- $\gamma$  分泌產生，且分泌量約為其他市售產品中之副乾酪乳桿菌株的至少 3 倍以上，顯示本發明之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 較其他副乾酪乳桿菌株對於治療過敏具有較佳的效果。

#### 實施例 4. 副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 對於致敏老鼠之細胞激素分泌的影響

致敏老鼠模式之小鼠為購自台灣樂斯科生物科技之雌性 BALB/c 小鼠。飼育於控制光線及溫度之動物房。BALB/c 小鼠入室一週後，待動物穩定後開始試驗。

將小鼠分為正常組、實驗組與安慰劑組進行實驗。實驗組與安慰劑組小鼠分別在實驗開始第 0 天即利用腹腔注射  $50\mu\text{g}$  卵白蛋白 (ovalbumin, OVA) 與  $4\text{mg}$  之鋁膠佐劑 (aluminum hydroxide adjuvant, alum) 至小鼠體內，並於實驗第 14 及 28 天時，再以  $25\mu\text{g}$  之 OVA 與  $4\text{mg}$  之 alum 重複注射老鼠。

於實驗進行期間，自第 1 天開始即每天餵食正常組及安慰劑組老鼠 0.5 毫升 RO 水，而實驗組老鼠則餵食  $2 \times 10^7$  之副乾酪乳桿菌株 GMNL-133 活菌。實驗共進行 35 天，於第 35 天將小鼠犧牲，並於犧牲前由小鼠尾巴採血，分離出血清供後續進行 IgE 與 IgG2a 分析。

將各組 BALB/c 小鼠以  $\text{CO}_2$  窒息法犧牲後，以無菌操作技術將脾臟取出置於微生物用培養皿，加入 6ml PBS，以玻棒將脾臟擠壓磨碎至懸浮液狀態。吸取懸浮液緩慢加入事先已裝好 6ml 之 Ficoll-Hypaque (17-1400-02, Pharmacia) 的 15ml 離心管，進行梯度離心以將脾臟細胞分離 (720 g, 20 min)，沉澱物為紅血球。自分界面處取出脾臟細胞，以 PBS 清洗二次後，以 RPMI-1640 培養基將細胞濃度調整為  $4 \times 10^6$  cell/ml，將脾臟細胞以每個孔洞  $100 \mu\text{l}$  注入 96 孔盤中。

脾臟細胞於添加 OVA (培養濃度  $30 \mu\text{g/mL}$ ) 培養 48 小時後取上清液，用 ELISA 方式偵測 TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 以及 IL-17 的濃度。

第 4A 至 4B 圖分別為致敏老鼠模式實驗中，各組之血清中 IgE 與 IgG2a 表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異 ( $p < 0.05$ )。由第 4A 至 4B 圖結果可知，實驗組 (餵食副乾酪乳桿菌株 GMNL-133) 的 BALB/c 小鼠血清中的 OVA 特異性 IgE，和安慰劑組相比有顯著的下降。然而，實驗組 (餵食副乾酪乳桿菌株 GMNL-133) 的 BALB/c 小鼠血清中 OVA 特異性 IgG2a，和安慰劑組相比則是顯著的增加。根據文

獻指出，IgG2a 抗體是由 Th1 細胞所分泌。因此，餵食副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 可使得 BALB/c 小鼠的 Th1 細胞活化，進而減少血清中 OVA 特異性 IgE 的產生。

第 5A 至 5D 圖則分別為致敏老鼠模式實驗中，各組之脾臟細胞培養液中的 TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 以及 IL-17 表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖，其中 \* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異( $p < 0.05$ )。由第 5A 至 5D 圖結果可知，餵食副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 後之實驗組和安慰劑組相比，實驗組之脾臟細胞培養液中的 TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 以及 IL-17 濃度均有顯著的增加。

許多過敏性疾病是由於 Th1 細胞與 Th2 細胞之間的免疫反應不平衡，且對過敏原的反應較偏向 Th2 細胞的免疫反應所致。而有文獻指出，藉由改善 Th1/Th2 免疫系統的平衡，將 Th2 細胞反應轉向 Th1 免疫反應，可減緩過敏疾病。當免疫反應偏向 Th1 細胞的免疫途徑時，Th1 細胞會分泌 IFN- $\gamma$ ，幫助 IgG2a 抗體的產生、活化巨噬細胞、天然殺手細胞與毒殺型 T 細胞，強化細胞免疫反應。此外，Th17 細胞會分泌 IL-17，可以作為先天免疫以及後天免疫之間調節的橋樑，也就是說 Th17 細胞是位於細胞免疫與體液免疫之間調節的樞紐位置。

再者，另一群調節型 T 細胞可藉由抑制 Th2 細胞的免疫反應來達到抑制過敏疾病的發生。調節型 T 細胞的特徵是會分泌 IL-10 或 TGF- $\beta$ ，進而抑制標的細胞的活化與增生。

綜上所述，本發明之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 可

以刺激體內免疫系統的 Th-17 細胞，進而使得 Th1/Th2 的免疫反應轉往 Th1 途徑。再者，本發明之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 也可以刺激調節型 T 細胞，進而抑制 Th2 細胞的免疫反應，達到減緩過敏反應。

5

#### 實施例 5. 副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 對於異位性皮膚炎老鼠的改善效用評估

將購自台灣樂斯科生物科技之 6 週大的正常雄性 BALB/c 小鼠。飼育於控制光線及溫度之動物房。BALB/c 小鼠入室一週後，待動物穩定後開始試驗。

將小鼠分為正常組、實驗組與安慰劑組進行實驗。實驗組與安慰劑組小鼠分別在實驗開始第 0 天時，將 10 微升的 0.3% 三硝氯苯溶液塗佈 BALB/c 小鼠右耳內側，之後於實驗進行期間，每週三次於相同部位塗佈相同劑量之三硝氯苯溶液，以誘發小鼠產生異位性皮膚炎，形成異位性皮膚炎小鼠模式。同時，在實驗進行期間，自第 1 天開始即每天餵食正常組及安慰劑組老鼠 0.5 毫升 RO 水，而實驗組老鼠則餵食  $2 \times 10^7$  之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 活菌。

實驗共進行 21 天。於第 22 天將小鼠犧牲，並於犧牲前以厚度規測定小鼠右耳厚度、採集小鼠耳部組織及由小鼠尾巴採血，分離出血清供日後進行免疫球蛋白分析。小鼠耳部組織置於含有蛋白酶抑制劑的 50mM 磷酸緩衝溶液中，進行均質化後，以 18870g 重力離心 30 分鐘，取上清液以酵素免疫測定法測量上清液中腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor-  $\alpha$ ，TNF- $\alpha$ )之含量。

第 6A 圖為異位性皮膚炎老鼠模式實驗中，各組老鼠右耳厚度結果之長條圖。第 6B 至 6C 圖分別為異位性皮膚炎老鼠模式實驗中，各組老鼠血清中的 IgE 以及 IgG1 表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖。第 6D 圖為異位性皮膚炎老鼠模式實驗中，各組老鼠耳部組織中的 TNF- $\alpha$  之表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖。第 6B 至第 6D 圖的結果表示方式為以安慰劑組所測得之含量為 100%，正常組與實驗組所測得之含量分別與安慰劑組比較，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

根據第 6A 至 6D 圖之結果，顯示在異位性皮膚炎老鼠模式下，餵食副乾酪乳桿菌株 GMNL-133 活菌（實驗組）的老鼠其耳朵厚度、血清中 IgE、IgG1 及耳部組織之 TNF- $\alpha$  分泌量，與未餵食副乾酪乳桿菌株 GMNL-133 活菌（安慰劑組）的老鼠比較，皆有顯著下降。因此，本發明之副乾酪乳桿菌株 GMNL-133 菌株可明顯改善異位性皮膚炎的症狀，對於生物體內的過敏反應也具有抑制作用。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖係為分離株 GMNL-133 於顯微鏡下之型態圖。

第 2 圖係為副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品中副乾酪乳酸桿菌株之 RAPD 電泳圖。

第 3 圖係為副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 與其他市售產品中副乾酪乳酸桿菌株分別刺激小鼠脾臟細胞產生之 IFN- $\gamma$  表現量之長條圖。

第 4A 至 4B 圖分別為致敏老鼠模式實驗中，各組之血清中 IgE 與 IgG2a 表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異( $p<0.05$ )。

5 第 5A 至 5D 圖分別為致敏老鼠模式實驗中，各組之脾臟細胞培養液中的 TGF- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10 以及 IL-17 表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異( $p<0.05$ )。

10 第 6A 圖為異位性皮膚炎老鼠模式實驗中，各組老鼠右耳厚度結果之長條圖，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異( $p<0.05$ )。

15 第 6B 至 6C 圖分別為異位性皮膚炎老鼠模式實驗中，各組老鼠血清中的 IgE 以及 IgG1 表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異( $p<0.05$ )。

第 6D 圖為異位性皮膚炎老鼠模式實驗中，各組老鼠耳部組織中的 TNF- $\alpha$ 之表現量以安慰劑組之表現量標準化之長條圖，\* 標記表示與安慰劑組相比具有統計學上之顯著差異( $p<0.05$ )。

20

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 景岳生物科技股份有限公司  
<120> 副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 用於改善異位性皮膚炎或其他過敏疾病之組合物及其用途  
<160> 2  
<210> SEQ ID NO: 1  
<211> 507  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus paracasei*

<400> 1  
ggctcaggat gaacgctggc ggcgtgccta atacatgcaa gtcgaacgag 50  
ttctcgttga tgatcgggtgc ttgcaccgag attcaacatg gaacgagtgg 100  
cggacgggtg agtaacacgt gggtaacctg cccttaagtg ggggataaca 150  
tttggaacaa gatgctaata ccgcatagat ccaagaaccg catggttctt 200  
ggctgaaaga tggcgtaagc tatcgctttt ggatggaccc gcggcgtatt 250  
agctagttgg tgaggtaayg gctcaccaag gcgatgatac gtagccgaac 300  
tgagagggtg atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaactcctac 350  
gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgcaagt ctgatggagc 400  
aacgccgcgt gagtgaagaa ggctttcggg tcgtaaaact ctgttggttg 450  
agaagaatgg tcggcagagt aactgttgtc ggcgtgacgg tatccaacca 500  
gaaagcc 507

<210> SEQ ID NO: 2  
<211> 10  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 化學合成序列

<400> 2  
ccgcgacgtt 10

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，其係寄存於台灣新竹食品工業研究發展研究所(Food Industry Research and Development Institute， FIRDI)，寄存編號為 BCRC 910520。

2. 一種如申請專利範圍第 1 項之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之用途，係用於製造治療異位性皮膚炎之組合物。

3. 一種如申請專利範圍第 1 項之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之用途，係用於製造治療過敏疾病之組合物。

4. 如申請專利範圍第 2 項或第 3 項所述之用途，其中該副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 為活菌。

5. 如申請專利範圍第 2 項或第 3 項所述之用途，其中該組合物為一醫藥組合物或一食品組合物。

6. 一種用於治療異位性皮膚炎之組合物，包括如申請專利範圍第 1 項之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，且該副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效改善異位性皮膚炎。

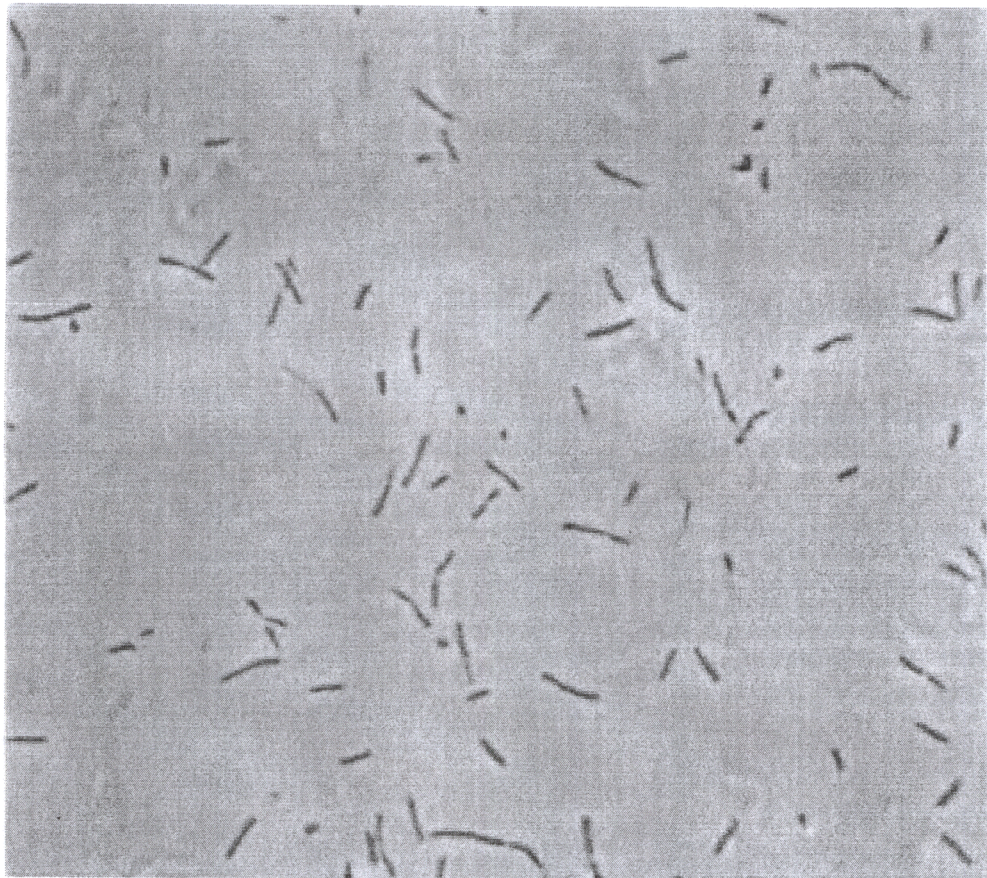
7. 一種用於治療過敏症狀之組合物，包括如申請專利範圍第 1 項之副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133，且該副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 之含量可有效改善過敏疾病。

8. 如申請專利範圍第 6 項或第 7 項所述之組合物，其中該副乾酪乳酸桿菌株 GMNL-133 為活菌。

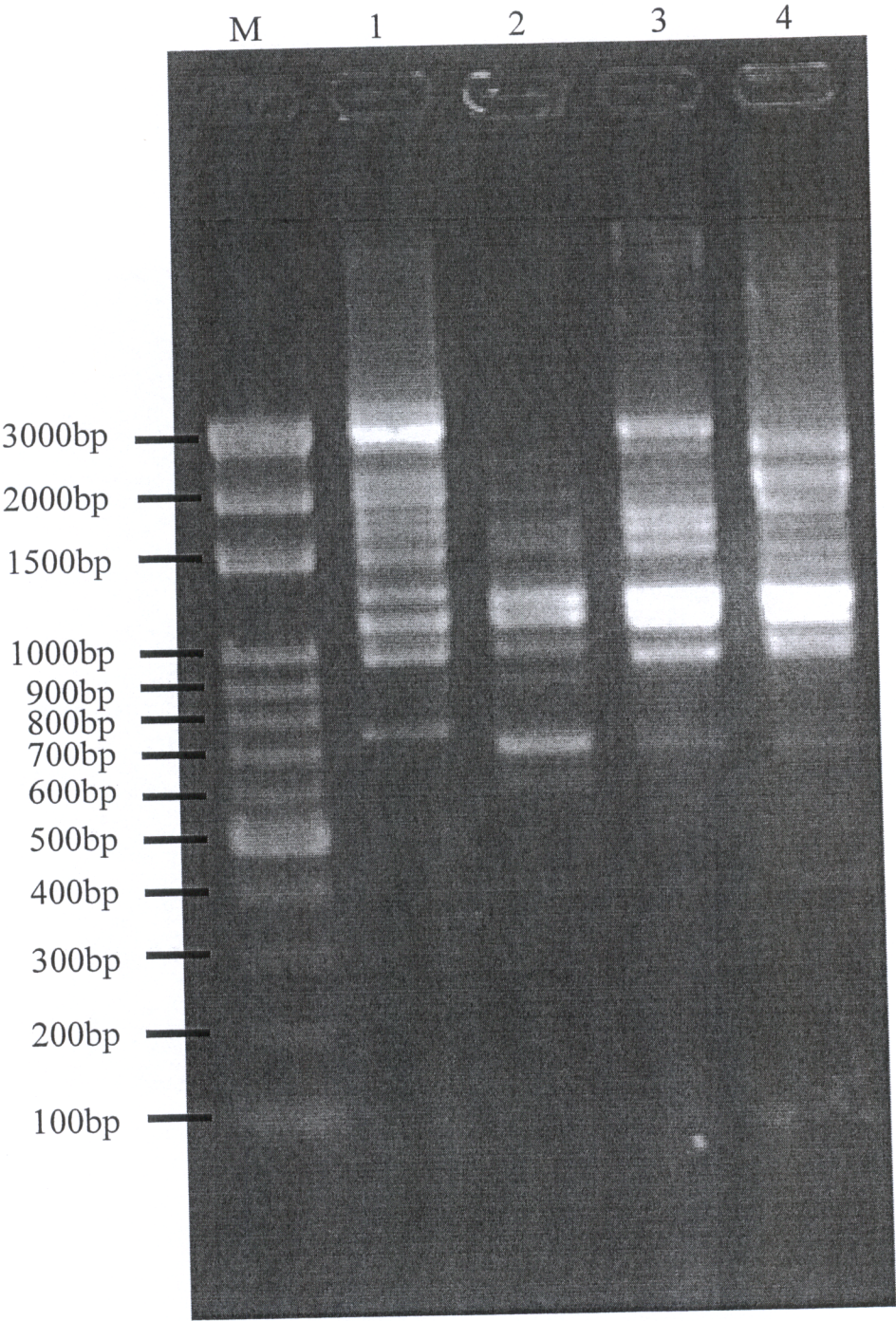
9. 如申請專利範圍第 6 項或第 7 項所述之組合物，其中該組合物為一醫藥組合物或一食品組合物。

10. 如申請專利範圍第 6 項或第 7 項所述之組合物，更包含：

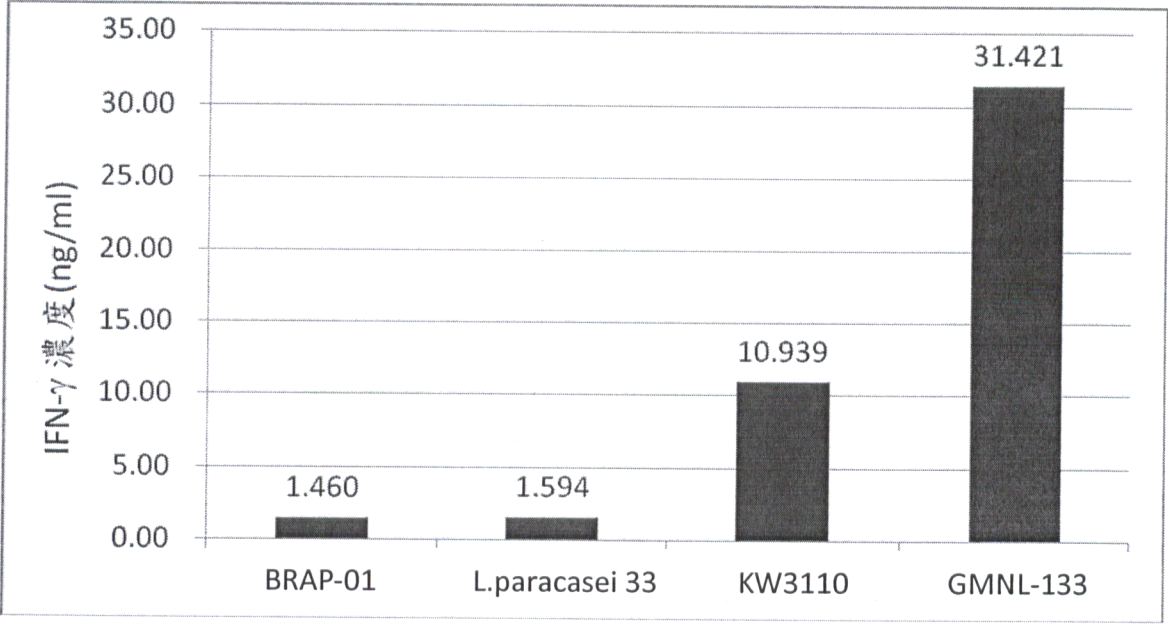
至少一其他菌株，該其他菌株係選自於由嗜酸性乳酸桿菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、植物乳酸桿菌 (*Lactobacillus plantarum*)、長雙歧桿菌 (*Bifidobacterium longum*)、發酵乳酸桿菌 (*Lactobacillus fermentum*)、保加利亞乳酸桿菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophilus*)、乳酪乳酸桿菌 (*Lactobacillus cremors*)、鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、羅伊氏乳酸桿菌 (*Lactobacillus reuteri*) 及上述之任意組合所組成之一族群。



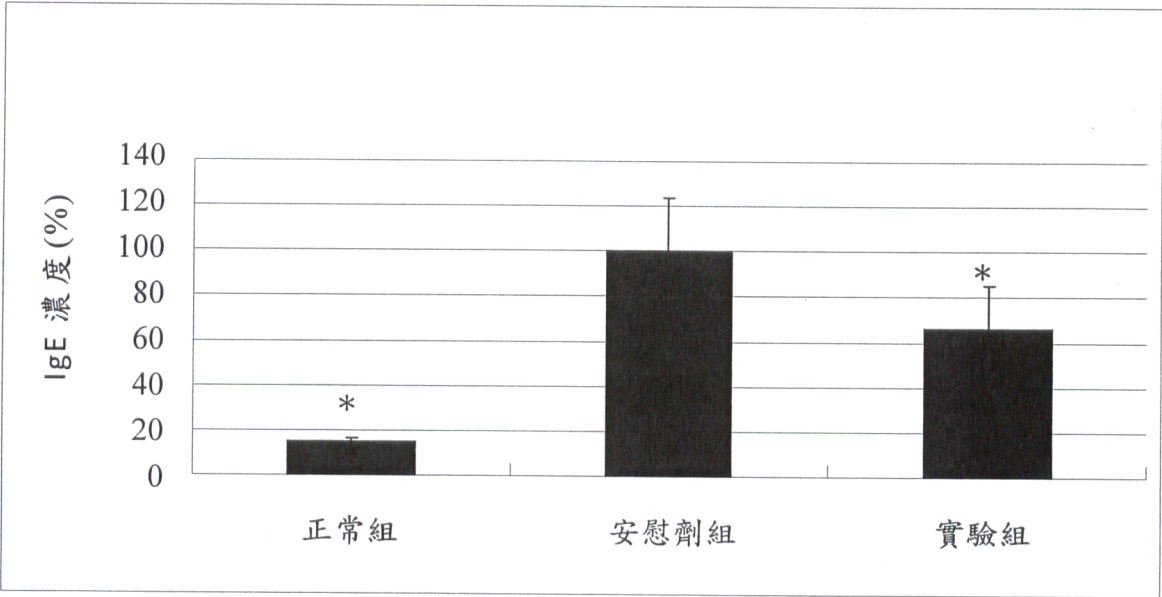
第 1 圖



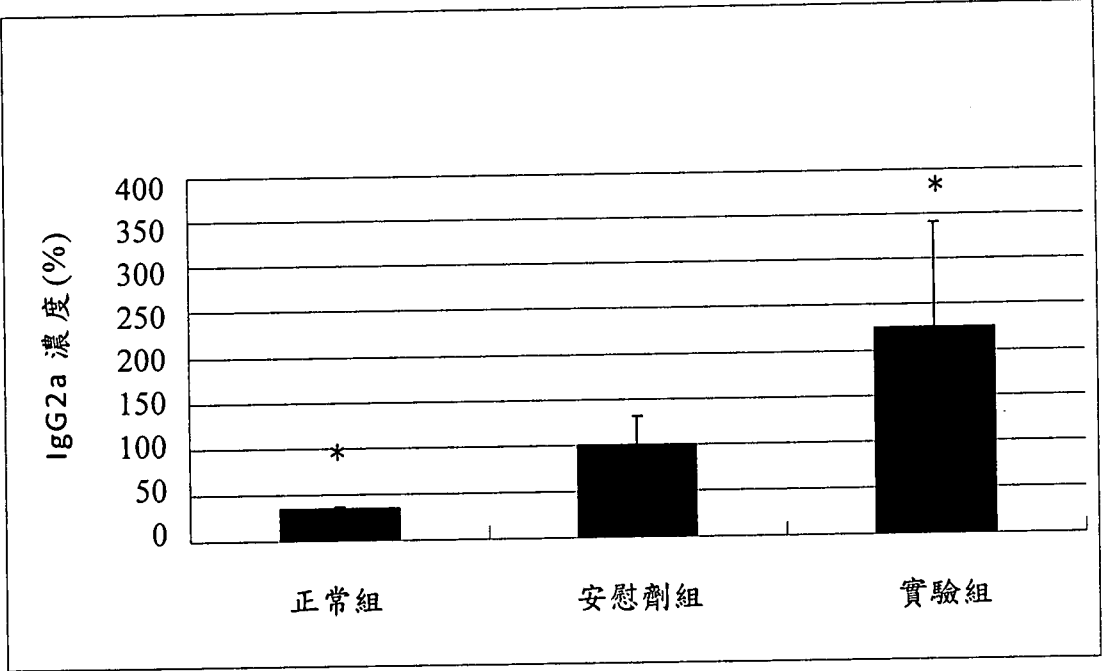
第 2 圖



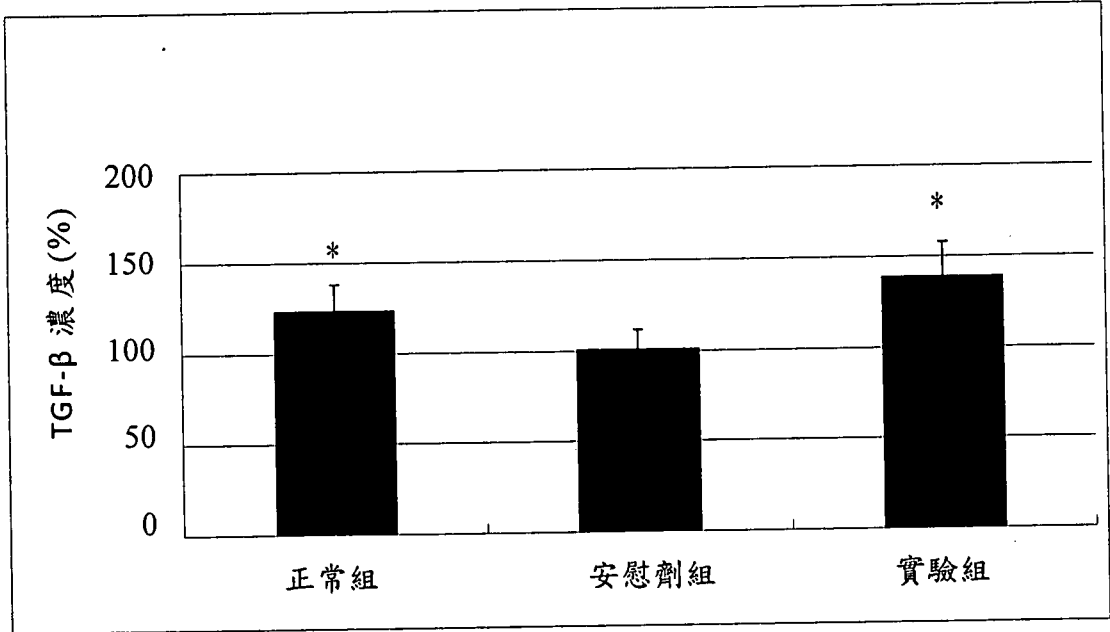
第 3 圖



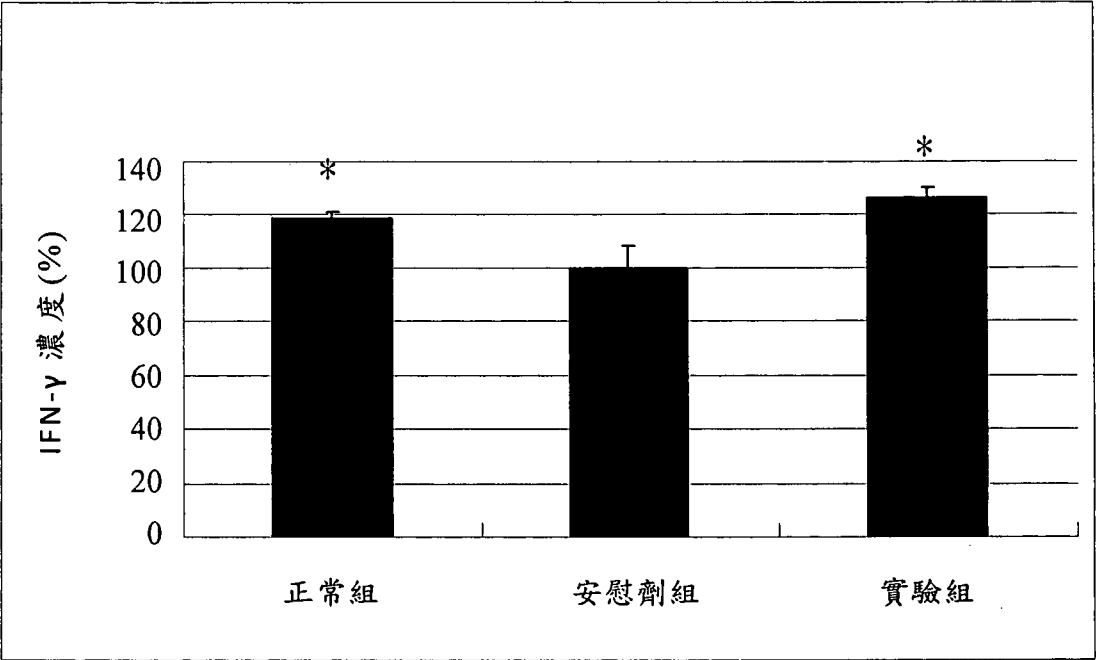
第 4A 圖



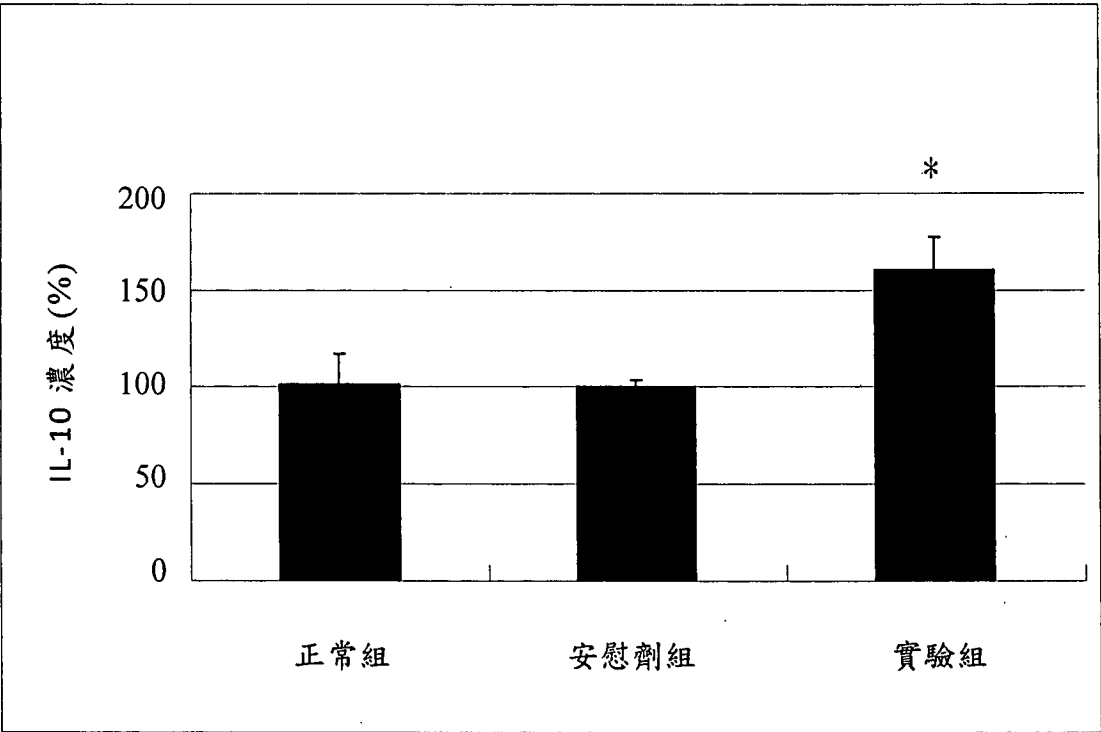
第 4B 圖



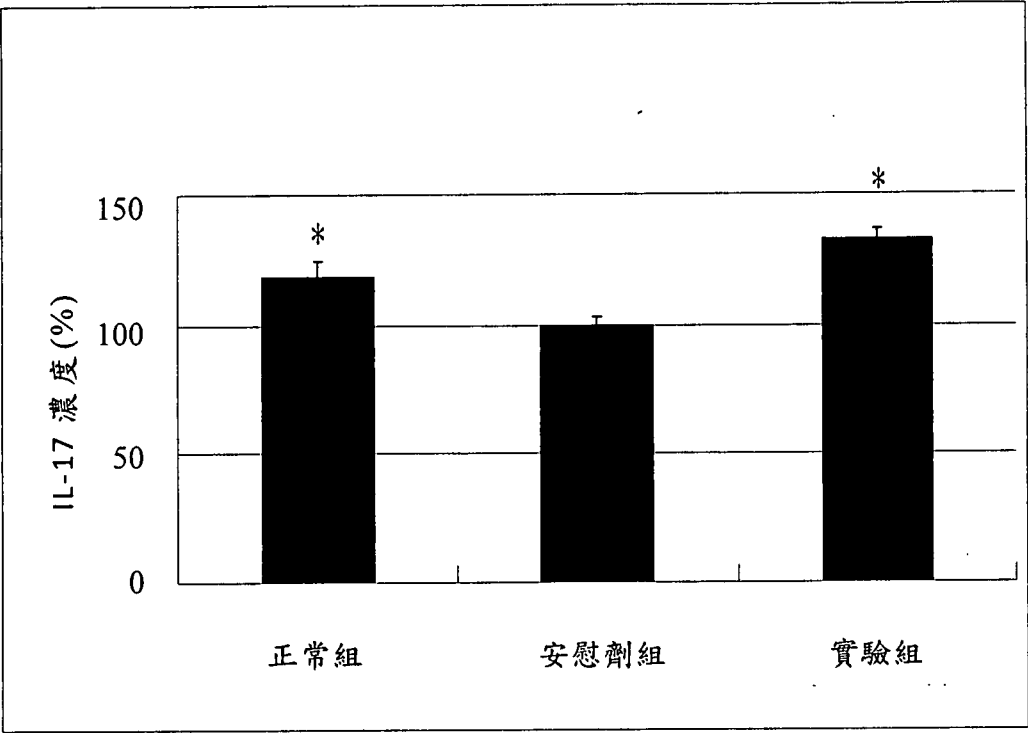
第 5A 圖



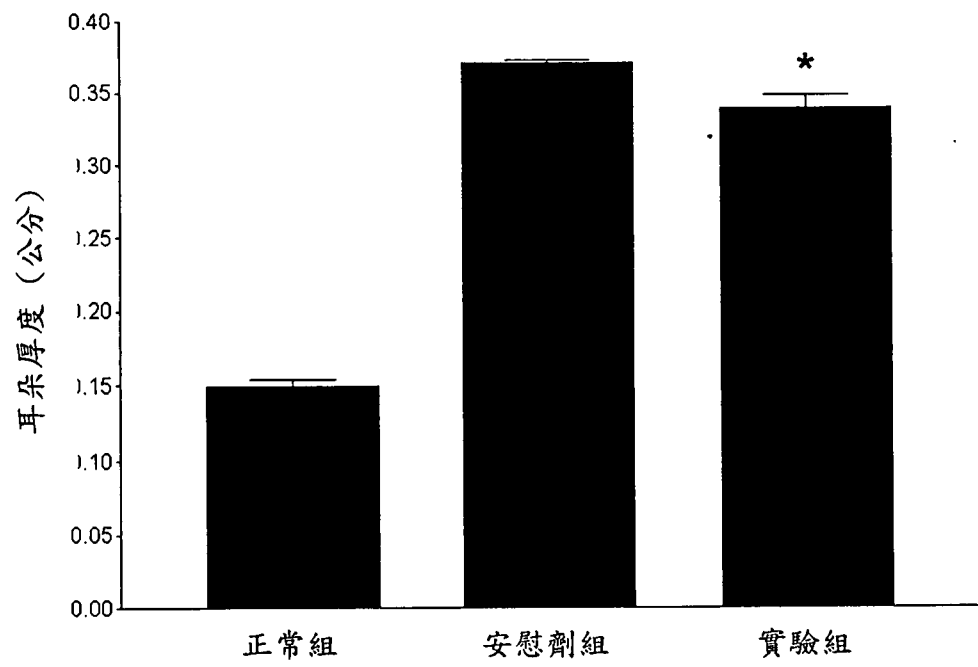
第 5B 圖



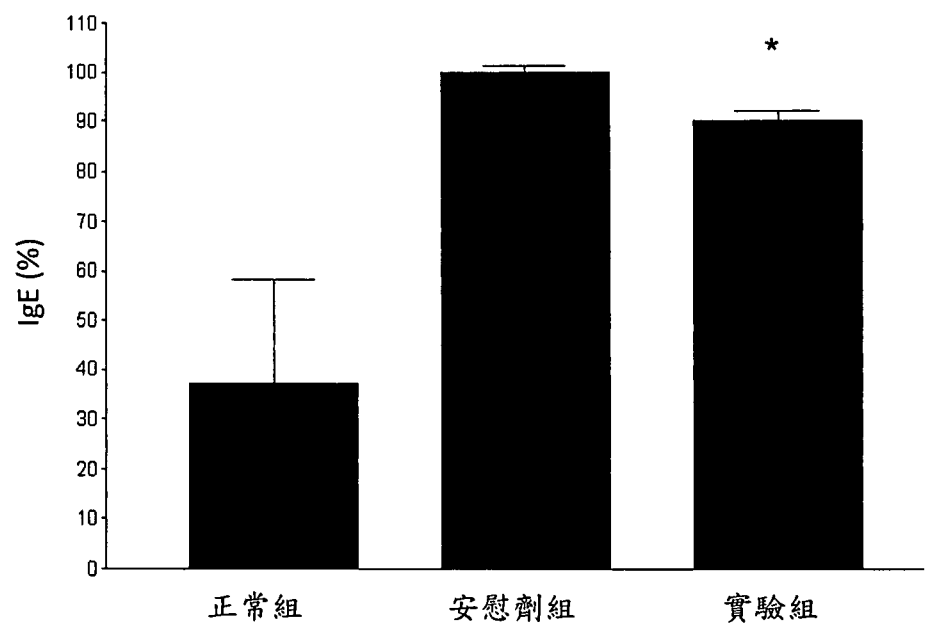
第 5C 圖



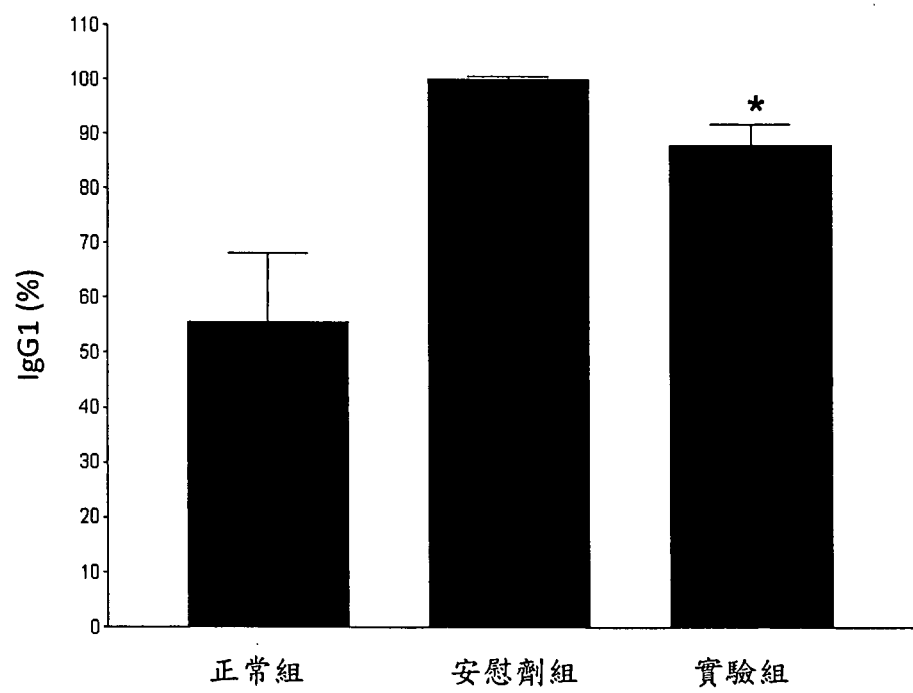
第 5D 圖



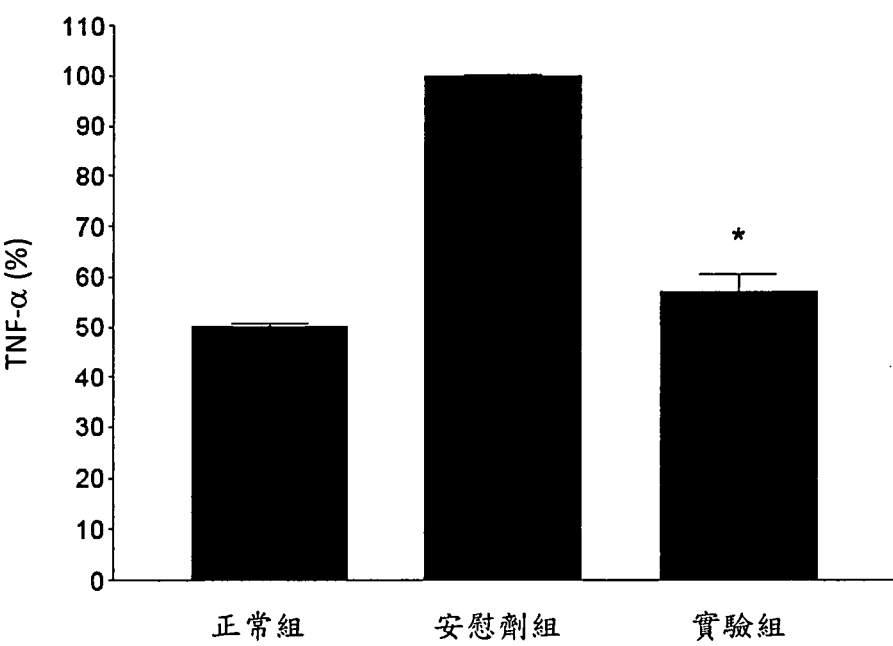
第 6A 圖



第 6B 圖



第 6C 圖



第 6D 圖