

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於過敏預防及/或治療劑，亦關於含有前述成分之過敏預防及/或治療用食品組成物。

【先前技術】

支氣管氣喘、過敏性鼻炎、異位性皮膚炎等過敏疾病患者於近數十年間劇增。目前，過敏疾病患者至少佔了約1/5的人口。現今的過敏治療藥物多半為病徵治療(symptomatic therapy)，由於患者數量的增加以及長期使用產生的副作用，需要一種更有效果的治療方式(非專利文獻 1)。

乳酸菌由於含有宜人的香味物質，並能產生乳酸或細菌素(bacteriocin)等抗菌性物質，自古以來被製成發酵乳等食品於世界各地廣泛的被食用，是一種安全性極高的微生物。近年，於一雙盲安慰劑試驗中顯示，投與一種名為Lactobacillus rhamnosus GG株的乳酸菌(Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103 株)具有抑制約五成高風險兒童之過敏疾病發作的功效(非專利文獻 2)，說明乳酸菌的使用為一種不具副作用又能預防及/或治療過敏之簡易又有效的方法。

目前有使用各種乳酸菌之過敏預防及/或治療劑被提出。然而，舉例而言，專利文獻 1 所揭露的乳酸菌(Lactobacillus plantarum CCRC 12944 株、Lactobacillus

acidophilus CCRC 14079 株)，雖然其菌株篩選是針對培養細胞的干擾素- γ (interferon- γ) 產生能來進行評估，不過對於實際動物攝取時是否具有過敏預防及/或治療效果並未作評估。再者，益生菌(probiotics)由於安全性的考量，較佳為收集自人類體內(非專利文獻 3)，不過於專利文獻 2 以及專利文獻 3 中所記載的乳酸菌(Lactococcus lactis subspecies lactis G50 株、Lactobacillus paracasei KW3110 株)，在菌株篩選時並未考慮到收集自人類的 Lactobacillus 屬乳酸菌。專利文獻 2 以及專利文獻 4 所記載的乳酸菌(Lactococcus lactis subspecies lactis G50 株、Lactobacillus acidophilus CP 1613 株、Lactobacillus acidophilus L92 株、Lactobacillus Fermentum CP 34 株)，在菌株篩選時並未考量到對於胃內的低 pH 值或腸道內膽汁酸的耐受性(專利文獻 2、專利文獻 4)。另外，專利文獻 3 所揭示的乳酸菌(Lactobacillus paracasei KW3110 株)，是藉由將抗原投與至小鼠腹腔內誘導出全身性免疫後篩選出能產生抗原專一性 IgE 抗體之乳酸菌(專利文獻 3)。然而，由於為全身性免疫所產生的抗體，因此並不適合用來評估食物性過敏的治療效果。原因是經口攝取的食物，在腸道吸收的同時，會被一種名為腸道附屬淋巴組織(gut-associated lymphatic tissue; GALT)，與全身性免疫系統相異、腸道獨自的免疫系統所辨識，通常會誘導經口免疫耐受性，不過也有可能誘導產生 IgE 抗體，因而發生食物過敏反應。雖然，有些原本應該

會產生免疫耐受性的食物卻誘發過敏的發病機構尚未十分明確，不過將腸道免疫系與全身免疫系解釋成均和食物過敏發病有關，因而利用全身免疫系的過敏預防效果來評估食物過敏的治療效果，是不合宜的作法。

猶如前述目前既存的乳酸菌，不論是作為過敏預防及/或治療劑，或是調製成過敏預防及/或治療用的食品組成物，均仍有許多尚待改良之處。

專利文獻 1：特開 2004-91491 號公報

專利文獻 2：特開 2004-18469 號公報

專利文獻 3：特許第 3585487 號公報

專利文獻 4：特開 2004-26729 號公報

非專利文獻 1：赤星光輝，玉利真由美，白川太郎，「過敏患者的最近話題」，最新醫學 58(2)，pp.7-14(2003)

非專利文獻 2：Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E, 「Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial.」, Lancet, 357(9262), pp.1076-1079(2001)

非專利文獻 3：Naidu AS, Bidlack Wr, Clemens RA, 「Probiotic spectra of lactic acid bacteria(LAB).」 Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39(1), pp.13-126(1999)

非專利文獻 4：伊勢涉，「食物過敏控制研究的進展 認識腸道免疫系中的食品過敏原」，農林水產技術研究誌，

24(5), pp. 9-14(2001)

【發明內容】

本發明欲解決之課題

本發明欲解決之課題在於篩選出一種具有對抗包括食物過敏等過敏疾病之活性，投與後存活性高的人類腸內乳酸菌，並提供利用該乳酸菌及/或該乳酸菌的處理物之過敏預防及/或治療劑，或是含有前述成分之過敏預防及/或治療用食品組成物。

用以解決課題的手段

為解決上述課題，本發明之作者群為了篩選出可以作為過敏預防及/或治療劑的乳酸菌，重新設定以下基準，致力於篩選作業。具體而言，本發明之作者群將獨自分離自成人糞便的 *Lactobacillus* 屬乳酸菌 273 菌株中，精心挑選符合(1)具有高度胃酸、膽汁酸耐受性；(2)具有促進小鼠脾臟細胞產生 IL12 之活性及改善 Th1/Th2 平衡之效果；(3)具有高度抑制 BALB/c 小鼠卵白蛋白 (ovalbumin) 腹腔投與時誘導產生抗原專一 IgE 之功效；(4)具有高度抑制對於 C57BL/6N 小鼠經口投與食物抗原 (casein) 時誘導產生抗原專一 IgE 之功效；(5)具有高度活化自然殺手 (nature killer) 細胞的能力；(6)具有促進卵白蛋白免疫的小鼠脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞之 IL-12 產生的活性，以及改善 Th1/Th2 平衡之效果；(7)能高度抑制杉樹花粉萃取抗原

OLL 2809 菌株或前述[16]所記載的乳酸菌處理物之食品組成物或飲料；

[18]含有前述[15]所記載的 *Lactobacillus gasseri* OLL 2809 菌株或前述[16]所記載的乳酸菌處理物之藥劑。

本發明之功效

本發明之過敏預防及/或治療劑，正如以下實施例所證實的，具有低 pH 值及膽汁酸耐受性，促進 IL-12 之產生之活性、改善 Th1/Th2 平衡之效果、阻礙血清中食物抗原專一 IgE 的產生、活化自然殺手細胞，以及抑制嗜酸性白血球的增生等功效，因此可以作為預防及/或治療包括食物過敏等各種過敏疾病之新穎而有效的過敏預防及/或治療劑，或是含有前述成分的過敏預防及/或治療用食品組成物。

【實施方式】

本發明之最佳實施態樣

以下詳細說明本發明。

本發明提供一種含有乳酸菌作為有效成分之過敏預防及/或治療劑。本發明之過敏預防及/或治療劑含有乳酸菌 *Lactobacillus gasseri*。本發明雖可使用任何具有過敏預防及/或治療效果的 *Lactobacillus gasseri*，較佳為體內投與後存活性高的種類。可使用於本發明之 *Lactobacillus gasseri* 之具體範例包括 *Lactobacillus gasseri* OLL 2809

促進效果，以及 Th1/Th2 平衡改善效果評估試驗、IgE 產生抑制效果評估試驗（腹腔投與、經口投與抗原）、自然殺手細胞活化能力評估試驗、嗜酸性白血球增加抑制的功效評估試驗等試驗來確認其過敏預防及/或治療效果。更具體的，可以藉由實施例所示的方法來進行確認。關於 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 之培養也可利用上述同樣方法進行。

本發明之過敏預防及/或治療劑，可包含該 *Lactobacillus gasseri* 於多種狀態下，例如乳酸菌旋濁液、乳酸菌培養物（菌體、培養上清液（包含培養基成分））、乳酸菌發酵物（乳酸菌飲料、酸奶、優格等）。

本發明之過敏預防及/或治療劑，可直接包含前述 *Lactobacillus gasseri*，亦可包含將 *Lactobacillus gasseri* 進行任何處理後的乳酸菌處理物。可用於本發明之過敏預防及/或治療劑之乳酸菌處理物包括，例如乳酸菌、乳酸菌含有物、發酵乳的濃縮物、膏化物、乾燥物（選自噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物至少一種）、液狀物、稀釋物、破碎物等。此外，乳酸菌也可適當使用生菌體、濕潤菌、乾燥菌等。也可使用進行殺菌後的死菌，例如加熱殺菌處理、放射線殺菌處理，或破碎處理。亦可添加奶粉等具有生物學規格的醫藥品及/或飲食品，不須拘泥於該醫藥品及/或飲食品的形態，可應用於各種醫藥品及/或飲食品。

本發明之過敏預防及/或治療劑，可以單獨或與一般使

用於醫藥品或食品的成分混合後經口投與，或是與其他含有抗過敏活性的化合物或微生物併用，以在人類或動物身上達到過敏預防及過敏症狀減輕(治療)的功效。異位性皮膚炎或過敏性鼻炎等過敏疾病的原因之一被認為是 Th1/Th2 的平衡偏向 Th2 的緣故(Hopkin, J.M. 2002. The rise of atopy and links to infection. Allergy 57:5-9. Prescott, S.L., C. Macaubas, T. Smallacombe, B. J. Holt, P.D. Sly, and P.G. Holt. 1999. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. Lancet 353:196-200. Shirakawa, T., T. Enomoto, S. Shimizu, and J.M. Hopkin. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. Science 275:77-79)。本發明之過敏預防及/或治療劑為取自過敏模型動物的細胞，(1)由樹狀細胞產生，可分化成 Th1 助手細胞，提高 IL-12 的產生，(2)由於可抑制 Th2 細胞激素(IL-4)的產生，因此具有修正 Th1/Th2 的平衡偏向 Th2 的效果。再者，雖然 NK 細胞為 Th1 細胞激素(IL-2)及 IL-12 所活化，本發明之過敏預防及/或治療劑顯示具有活化 NK 細胞的作用，由此點也證實了 Th1/Th2 的平衡改善效果。更進一步，由本發明之過敏預防及/或治療劑具有抑制嗜酸性白血球增加的效果來看，也說明其具有過敏預防及/或治療之效果。嗜酸性白血球為炎症細胞之一，於第 I 型過敏時數目增加的白血球，寄生蟲感染時也會增加。會造成嗜酸性白血球值偏高的疾病包

括，過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、支氣管氣喘、異位性皮膚炎、食物過敏、外來蛋白質造成的過敏、寄生蟲感染症、突發性肺嗜酸性白血球增加症候群等(Howanitz JH, Howanitz PJ 編著者，河野均也監譯，「Laboratory Medicine 臨床檢查的選擇與解釋」，醫齒藥出版，pp583(1995))。另外，第 I 型過敏時 IgE 的產生也提高，而本發明具有抑制嗜酸性白血球值增加以及 IgE 產生的功效，因此可以期待具有減輕過敏性鼻炎、過敏性結膜炎、支氣管氣喘、異位性皮膚炎、食物過敏、外來蛋白質造成的過敏、過敏反應(anaphylactic reaction)等的症狀。本發明之之過敏預防及/或治療劑並無限定可適用的過敏種類、症狀、疾病等，包括，例如第 I~IV 型過敏、食物過敏、花粉症、異位性皮膚炎、支氣管氣喘、過敏性結膜炎、過敏性鼻炎、過敏性腸胃炎、過敏反應(anaphylactic reaction)、藥物過敏、蕁麻疹、血清病、溶血性貧血、接觸性皮膚炎、重肌無力症、肺出血腎炎症候群、腎絲球體腎炎等。過敏原並無特別限定，包括，例如食品(小麥、大麥、燕麥、黑麥、蕎麥、蛋、奶、起士、落花生、米、玉米、小米、黍、稗、大豆、馬鈴薯、山芋、蒜、洋蔥、胡蘿蔔、荷蘭芹、芹菜、蕃茄、橘子、桃子、蘋果、奇異果、哈密瓜、草莓、香蕉、核桃、芝麻、松茸、鮑魚、烏賊、鮭魚卵、蝦子、螃蟹、鮭魚、鯖魚、竹筴魚、沙丁魚、鱈魚、墨魚、章魚、干貝、牛肉、雞肉、豬肉、明膠等)、動物(狗、貓、小鼠、大鼠、鴿子等或其皮膚、體毛、糞、羽毛等)、昆蟲(蛾、蝶、搖

蚊(chironomid)、黃蜂(vespid)等、及該類昆蟲的分泌物、鱗粉)、壁蝨、寄生蟲(線蟲(anisakis)、蛔蟲等)、草木(杉樹、豬草、稻科植物、蒿屬植物(artemisia)、漆樹、榛樹等及該類草木的花粉、樹液)、黴、塵土、灰塵、橡膠、金屬、化學物質、醫藥品等。

本發明之過敏預防及/或治療劑，可以直接使用培養終了後的乳酸菌，或是將其濃縮成為濃縮物，亦可將濃縮物進一步乾燥使用。菌體濃度並無特定限制，濃縮液較佳為 4×10^{10} 個/克以上，乾燥物較佳為 5×10^{11} 個/克以上。

本發明之過敏預防及/或治療劑與醫藥品或飲食品的配合量可以隨著形態、劑型、症狀、體重、用途的不同而調整，並無特別限制，例如可以為 0.001~100%(w/w)的含量配合，較佳為 0.01~100%(w/w)，更佳為 0.1~100%(w/w)。

本發明之過敏預防及/或治療劑的醫藥品或飲食品，每日的攝取量可以隨著年齡、症狀、體重、用途的不同的調整，並無特別限制，例如可以為 0.1~10000 毫克/公斤的攝取量，較佳為 0.1~1000 毫克/公斤的攝取量。

本發明之過敏預防及/或治療劑，可以為醫藥品或飲食品任一種型態。例如，可以作為醫藥品直接投與，或是作為特定保健用食品等特別用途食品或營養機能食品直接攝取，而達到期望的過敏預防及/或治療的效果。另外也可以添加於各種飲食品(牛乳、加工乳、乳飲料、清涼飲料、發酵乳、優格、起士、麵包、餅乾、鹹餅乾、披薩餅皮、冰淇淋、糖果、調製奶粉、流質食物、病患用食品、幼兒用

奶粉等食品、哺乳婦女用奶粉等食品、營養食品等)中攝取。

含有本發明過敏預防及/或治療劑的飲食品，可以與水、蛋白質、糖質、脂質、維他命類、礦物質類、有機酸、有機鹽基、果汁、調味料類等混合使用。蛋白質類包括，例如全脂奶粉、脫脂奶粉、部分脫脂奶粉、酪蛋白、乳清奶粉、乳清蛋白質、乳清蛋白質濃縮物、乳清蛋白質分離物、 α -酪蛋白、 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白、乳鐵蛋白、大豆蛋白質、雞蛋蛋白質、肉類蛋白質等動植物性蛋白質、前述物質的加水分解物；奶油、乳性礦物質、乳脂、乳清、非蛋白態氮、唾液酸(sialic acid)、磷脂質、乳糖等各種取自乳類的成分。糖類、加工澱粉(糊精之外、可溶性澱粉、英式澱粉(British starch)、氧化澱粉、澱粉酯、澱粉醚等)、食物纖維等。脂質包括，例如豬油、魚油等、前述脂質的分類油、氫化油、酯類交換油等動物性油脂；棕櫚油、葵花油、玉米油、菜油、椰子油、前述脂質的分類油、氫化油、酯類交換油等植物性油脂。維他命類包括，例如維他命 A、胡蘿蔔素類、維他命 B 群、維他命 C、維他命 D 群、維他命 E、維他命 K 群、維他命 P、維他命 Q、菸鹼素(niacin)、菸鹼酸(nicotinic acid)、泛酸(pantothenic acid)、生物素、肌醇(inositol)、膽鹼(choline)、葉酸等。礦物質類包括，例如鈣、鉀、鎂、鈉、銅、鐵、錳、鋅、硒等。有機酸包括，例如蘋果酸、檸檬酸、乳酸、酒石酸等。製造含有本發明過敏預防及/或治療劑的飲食品時，可將前述成分，不

論是合成或天然由來的成分，及/或含有多量前述成分的食品作為原材料。另外前述成分亦可兩種以上組合使用。

當將本發明過敏預防及/或治療劑製造成食品組成物或藥劑使用時，其製造方法可以使用本技術領域者所熟知的方法製造。本技術領域者應當可以將本發明之 *Lactobacillus gasseri* 菌體或其處理物與其他成分混合之工程、成形工程、殺菌工程、發酵工程、燒成工程、乾燥工程、冷卻工程、造粒工程、包裝工程等工程適當組合，製作出所欲的食品或藥劑。

當將本發明過敏預防及/或治療劑製造成各種乳製品使用時，其製造方法可以使用本技術領域者所熟知的方法製造。以優格為例，使用本發明之 *Lactobacillus gasseri* 進行起始物(starter)調製工程、將起始物加入前處理過的牛奶進行培養、冷卻工程、調味工程、充填工程等，經過前述工程而製造出優格。以起士為例，可以藉由將本發明之 *Lactobacillus gasseri* 作為起始物，添加至殺菌等前處理過後的牛奶進行乳酸發酵工程、加入凝乳酶(rennet)製作起士塊工程、起士塊切斷工程、乳清排出工程、加鹽工程、熟成工程等過程而製得。或者，於製造前述各種乳製品時，亦可使用非本發明 *Lactobacillus gasseri* 的其他乳酸菌作為起始物，再於製造過程中加入本發明之 *Lactobacillus gasseri* 或其處理物。

本發明過敏預防及/或治療劑作為醫藥品使用時，可以多種型態投與，包括，例如錠劑、膠囊、顆粒、散劑、糖

漿等經口投與的型態。前述各種製劑可以遵循習知方法，主劑配合使用賦形劑、結合劑、崩壞劑、潤滑劑、消臭劑、溶解補助劑、懸濁劑、包覆劑等醫藥製劑技術領域中常用的習知補助劑而進行製劑。

另外，本說明書中引用的所有先前技術文獻均引入本說明書中做為參考。

實施例

以下列舉實施例說明本發明，惟本發明之範疇不受到實施例的侷限。

[實施例 1](胃酸耐性試驗及膽汁酸耐性試驗)

以分離自人類糞便的 *Lactobacillus* 屬乳酸菌 273 菌株進行試驗。

1) 胃酸耐性試驗

將試驗用的乳酸菌菌體以生理食鹽水沖洗 2 次後，取 1 毫升乳酸菌懸濁液加入 9 毫升過濾滅菌過的人工胃液 [NaCl (0.2%)、胃蛋白酶 (1:5000，東京化成工業)(0.35%)](pH2)。於有氧狀態 37°C 培養 2 小時。取 1 毫升含有該乳酸菌的人工胃液，加入 9 毫升的磷酸緩衝液(67 毫莫耳濃度，pH6.5)使反應停止。使用 *Lactobacillus* MRS Agar(DIFCO)計算與人工胃液接觸前以及接觸後的生菌數，計算出存活率(%)作為胃酸耐性。

2) 膽汁酸耐性試驗

將於 *Lactobacillus* MRS Broth 中經過兩次賦活培養(37°C，18 小時)的乳酸菌接種 10 微升至含有 5ml 的

0.9%Bacto-Oxgall(DIFCO)的 *Lactobacillus* MRS Broth，於 37°C 下進行無氧培養。培養 18 小時後，以波長 650 奈米 (OD650) 測定培養基濁度，將測得的值作為膽汁酸耐性的指標。

胃酸耐性試驗及膽汁酸耐性試驗的結果如表 1 所示。273 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌的胃酸耐性及膽汁酸耐性的調查結果顯示，胃酸耐性高的菌株則膽汁酸耐性低，膽汁酸耐性高的菌株則胃酸耐性低，以菌種別來看，胃酸耐性以 *Lactobacillus gasseri* (以下稱作 *L. gasseri*) 為較高，膽汁酸耐性以 *Lactobacillus plantarum* (以下稱作 *L. plantarum*) 為較高。多數的菌株膽汁酸耐性為 1.0 以下。膽汁酸耐性高的菌株選出 *L. plantarum* 6 株，*Lactobacillus crispatus* (以下稱作 *L. crispatus*) 2 株，*Lactobacillus amylovorus* (以下稱作 *L. amylovorus*) 2 株，*Lactobacillus casei* (以下稱作 *L. casei*) 1 株，*Lactobacillus brevis* (以下稱作 *L. brevis*) 1 株。另外，多數的菌株胃酸耐性為 0.5% 以下，胃酸耐性高 (0.5% 以上) 的菌株中，選出膽汁酸耐性比較高 (0.1 以上) 的 *L. gasseri* 菌株 8 株。

[表 1]

	胃酸耐性(%)	膽汁酸耐性(OD650)
<i>L. plantarum</i> MEP170401	0.14	9.31
<i>L. plantarum</i> MEP170402	0.15	10.79
<i>L. plantarum</i> MEP170403	0.02	8.7
<i>L. plantarum</i> MEP170404	0.03	6.55
<i>L. plantarum</i> MEP170405	0.03	4.42

L. plantarum MEP170406	0.39	7.45
L. gasseri MEP170407	22.41	0.13
L. gasseri MEP170408	24.91	0.12
L. gasseri MEP170409(OLL 2809)	0.86	0.31
L. gasseri MEP170410	2.10	0.24
L. gasseri MEP170411	20.78	0.45
L. gasseri MEP170412	0.80	0.43
L. gasseri MEP170413	6.21	0.12
L. gasseri MEP170414	0.53	0.14
L. crispatus MEP170415	0.12	1.76
L. crispatus MEP170416	0.12	3.69
L. amylovorus MEP170417	0.06	2.71
L. amylovorus MEP170418	0.04	2.49
L. brevis MEP170419	0.00	1.48
L. casei MEP170420	0.00	1.31

表 1 顯示選出的 20 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌的胃酸耐性(%)以及膽汁酸耐性(OD650)結果。

[實施例 2](調製凍結乾燥乳酸菌體)

將實施例 1 中所選出的 20 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌於 *Lactobacillus* MRS Broth 中經過兩次賦活培養(37℃, 18 小時)。於相同的培養基中接種 1%賦活培養後的菌體, 於 37℃ 下培養 18 小時。收集菌體後, 以生理食鹽水沖洗 2 次, 滅菌蒸餾水沖洗 1 次。於 75℃ 下加熱 60 分中進行滅菌後凍結乾燥。將凍結乾燥菌末進行以下的活體外(in vitro)實驗或動物投與試驗。

[實施例 3](促進小鼠脾臟細胞產生 IL-12 之效果, 以及改善 Th1/Th2 平衡之效果評估試驗)

將實施例 1 中所選出的 20 株胃酸耐性, 膽汁酸耐性 *Lactobacillus* 屬乳酸菌利用以下方法進行評估。

將 20 微克的卵白蛋白(以下稱作 OVA; 和光純藥工

業)與 2 毫克的氫氧化鋁(aluminum hydroxide, 和光純藥工業)腹腔投與至 6 週齡的雄性 BALB/c 小鼠($n=4$, 日本 SLC), 8 天後取出脾臟。將除去紅血球的脾臟細胞, 加入 1 微克/毫升實施例 2 中調製的乳酸菌加熱處理菌體, 以及含有 100 微克/毫升的 OVA 的 FCS-RPMI 1640 培養基(Gibco), 於 5%CO₂ 培養箱中培養 6 天, 以達到 2.5×10^6 /毫升的懸濁液。比較對照組則使用 *Lactobacillus* 屬乳酸菌的標準株(*L. plantarum* JCM 1149^T、*L. gasseri* JCM 1131^T、*L. crispatus* JCM 1185^T、*L. amylovorus* JCM 1126^T)、以及其他菌的標準株(*Bifidobacterium bifidum* JCM 1255^T(以下稱作 *B. bifidum* JCM 1255^T)、*Bifidobacterium longum* JCM 1217^T(以下稱作 *B. longum* JCM 1217^T)、*Lactococcus delbruckii* subsp. *lactis* JCM 1248^T(以下稱作 *L. delbruckii* subsp. *lactis* JCM 1248^T)、*Enterococcus faecalis* IF0 3971(以下稱作 *E. faecalis* IF0 3971)、*Bacteroides vulgatus* JCM 5826^T(以下稱作 *B. vulgatus* JCM 5826^T)、*Eschericia coli* JCM 1649^T(以下稱作 *E. coli* JCM 1649^T)。上述菌株中, 其中菌株名 JCM 表示由獨立行政法人理化學研究所 Bioresouce center 的微生物材料開發室取得的基準株, 菌株名 IF0 表示由財團法人發酵研究所取得的基準株, 菌株名 MEP 表示由明治乳業股份有限公司所保有的菌株。另外, 對照組則是除了不加入微生物之外, 其他均與前述方法相同。利用 ELISA 法(BD OptEIA™ ELISA set, Becton Dickinson)測定培養上清液的 IFN- γ 、

IL-12 以及 IL-4。藉由 Student t test 統計出與對照組的差異具有 5% 的顯著水準 (significance level)。結果如表 2 所示。

[表 2]

	IL-12(皮克/毫升)		IFN- γ (奈克/毫升)		IL-4(皮克/毫升)	
	平均值	標準差	平均值	標準差	平均值	標準差
對照組	0	0	0.4	0.2	265	75
L. plantarum JCM 1149 ^T	39	26	10.6*	3.4	102*	53
L. plantarum MEP170401	4907*	1160	30.4*	7.0	34*	11
L. plantarum MEP170402	4723*	971	26.9*	10.4	35*	6
L. plantarum MEP170403	4602*	869	20.5*	4.5	36*	11
L. plantarum MEP170404	4748*	950	25.5*	9.3	38*	9
L. plantarum MEP170405	4966*	965	24.4*	4.0	15*	11
L. plantarum MEP170406	3407*	602	27.8*	7.3	27*	9
L. gasseri JCM 1131 ^T	3721*	1338	28.0*	5.2	43*	14
L. gasseri MEP170407	4521*	1101	27.5*	5.8	35*	4
L. gasseri MEP170408	1213*	405	19.5*	6.3	64*	20
L. gasseri MEP170409(OLL 2809)	2990*	617	19.8*	6.5	61*	19
L. gasseri MEP170410	3039*	627	30.9*	3.6	35*	9
L. gasseri MEP170411	1667*	285	29.7*	6.8	46*	14
L. gasseri MEP170412	43	77	7.8*	1.1	140	31
L. gasseri MEP170413	3662*	582	24.8*	3.0	40*	12
L. gasseri MEP170414	557*	147	18.7*	5.4	49*	15
L. crispatus JCM 1185 ^T	41	47	2.7*	0.7	169	43
L. crispatus MEP170415	0	0	0.8	0.5	176	62
L. crispatus MEP170416	0	0	1.6*	0.4	216	80
L. amylovorus JCM 1126 ^T	742*	292	31.0*	6.8	22*	6
L. amylovorus MEP170417	0	0	5.6*	1.2	259	158
L. amylovorus MEP170418	0	0	4.7*	2.4	196	57
L. brevis MEP170419	0	0	2.0	1.1	224	57
L. casei MEP170420	0	0	4.0*	1.7	181	81
B. bifidum JCM 1255 ^T	0	0	0.2	0.2	200	69
B. longum JCM 1217 ^T	0	0	1.8*	0.7	362*	110
L. delbrückii subsp. lactis JCM 1248 ^T	1032*	234	17.1*	2.4	34*	16
E. faecalis IFO 3971	4816*	1324	31.1*	7.4	47*	29
B. vulgatus JCM 5826 ^T	43	50	1.8*	0.7	235	60
E. coli JCM 1649 ^T	225*	120	18.0*	1.6	46*	21

*: $p < 0.05$ (對 對照組, Student' s t-test)

表 2 顯示實施例 1 中選出的 20 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌對於脾臟細胞產生細胞激素 (IL-12、IFN- γ 、IL-4) 的影響。以各測定值的平均值 $\pm$ 標準差表示。*: $p < 0.05$ (vs. 對照組, Student' s t-test)。

30 株中有 13 株對於 IL-12 的產生具有強力促進作用,

檢菌體投與群)2 星期。對照組給予表 3 所示飼料。之後的 7 星期，全部給予 MF 飼料(Oriental 酵母工業)。在這之後的 2 星期，讓被檢菌體投與群自由攝取實施例 2 之方法所製備，含有 0.1%各種乳酸菌凍結乾燥粉末的表 3 所示飼料，對照組給予表 3 所示飼料。飼育終了後，進行全採血，分別將小鼠的血清進行大鼠被動皮下過敏反應(passive cutaneous anaphylaxis，以下稱為 PCA 反應)，比較對照組與被檢菌體投與群的抗酪蛋白專一 IgE 的陽性率。

[表 3]

原料	配合量(重量%)
酪蛋白(ARACID, NZMP 公司)	22.0%
單糖(simple sugar)	5.0%
玉米澱粉	60.3%
纖維素粉末	3.0%
大豆油	5.0%
AIN-76 維他命混合物	1.0%
AIN-76 礦物質混合物	3.5%
重酒石酸膽鹼(choline bitartrate)	0.2%
計	100%

表 3 所記載的 AIN-76 維他命混合物及 AIN-76 礦物質混合物為美國國立營養研究所(AIN)於 1977 年所發表的小鼠或大鼠營養研究用的標準精製飼料 AIN-76 中加入維他命混合物及礦物質混合物。

[根據 PCA 反應判定 IgE 產生之抑制效果]

將 7 週齡的雄性、SD 大鼠(日本 SLC)的背部除毛，每頭皮內注射(endermic injection)25 微升的小鼠血清。皮內注射小鼠血清 24 小時後，將 2 毫克/毫升的酪蛋白及含

有 1% 的埃文斯藍 (Evan's blue) (和光純藥工業) 的溶液 0.5 毫升注射到大鼠的尾靜脈。於酪蛋白及埃文斯藍靜脈注射後 30 分鐘，目測判定背部皮下是否有埃文斯藍色素漏出，若有則 PCA 反應為陽性。求出各群中 PCA 陽性反應的數目，對照組與被檢菌體投與組的 PCA 陽性反應的數目進行卡方檢定 (Chi-square Test)，顯示其差異達到 5% 的顯著水準。結果如表 4 所示。

[表 4]

	PCA 反應陽性數/試驗頭數
對照組	18/20
<i>L. plantarum</i> MEP170401	8/10
<i>L. plantarum</i> MEP170402	7/10
<i>L. plantarum</i> MEP170403	7/10
<i>L. plantarum</i> MEP170404	7/10
<i>L. plantarum</i> MEP170405	8/10
<i>L. plantarum</i> MEP170406	9/10
<i>L. gasseri</i> MEP170407	8/10
<i>L. gasseri</i> MEP170408	10/10
<i>L. gasseri</i> MEP170409 (OLL 2809)	5/10*
<i>L. gasseri</i> MEP170410	10/10
<i>L. gasseri</i> MEP170411	8/10
<i>L. gasseri</i> MEP170412	9/10
<i>L. gasseri</i> MEP170413	6/10
<i>L. gasseri</i> MEP170414	8/10
<i>L. crispatus</i> MEP170415	7/10
<i>L. crispatus</i> MEP170416	7/10
<i>L. amylovorus</i> MEP170417	5/10*
<i>L. amylovorus</i> MEP170418	10/10
<i>L. brevis</i> MEP170419	9/10
<i>L. casei</i> MEP170420	6/10

*: $p < 0.05$ (對 對照組，卡方檢定)

表 4 顯示實施例 1 中選出的 20 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌經口投與食物過敏小鼠對於其 IgE 產生的影響。以 PCA

產業利用性

本發明提供新穎的過敏預防及/或治療劑。本發明亦提供過敏預防及/或治療用的食品組成物，係將有效量之前述過敏預防及/或治療劑添加至乳兒用調製奶粉、保健機能食品、或是患者用食品而製成。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示針對 BALB/c-OVA 腹腔內投與過敏模型，經口投與具有胃酸耐性、膽汁酸耐性 *Lactobacillus* 屬乳酸菌的 IgE 抑制效果。對照組(control)、被檢菌體投與群、比較對照組(*L. crispatus* JCM 1185^T、*L. plantarum* JCM 1149^T、*L. gasseri* JCM 1131^T)之抗 OVA 專一 IgE 抗體濃度(AU)的平均值±標準偏差值(n=10)。P<0.05(vs. 對照組，Fisher's PLSD test)。

第 2 圖顯示具有胃酸耐性、膽汁酸耐性 *Lactobacillus* 屬乳酸菌對於小鼠脾臟細胞的自然殺手細胞活性的影響。對照組、被檢菌體投與、正對照(*L. rhamnosus* ATCC 53103)之脾細胞的細胞毒害活性率(%)之的平均值±標準偏差值(n=4)。*：P<0.05(vs. *L. gsseri* OLL2809，Dunnet 多重比較檢定)。

第 3 圖顯示經口投與 *Lactobacillus* 屬乳酸菌至 BALB/c-OVA 腹腔內投與過敏模型小鼠，其脾細胞及腸間膜淋巴節細胞產生細胞激素(cytokine)。對照組、比較對照

組 (*L. crispatus* JCM 1185T)，及被檢菌體投與群 (*L. gasseri* OLL2809、*L. gasseri* MEP170413) 之各細胞激素的平均值 $\pm$ 標準偏差值 ($n=10$)。*： $P<0.05$ (vs. 對照組，Fisher's PLSD test)。

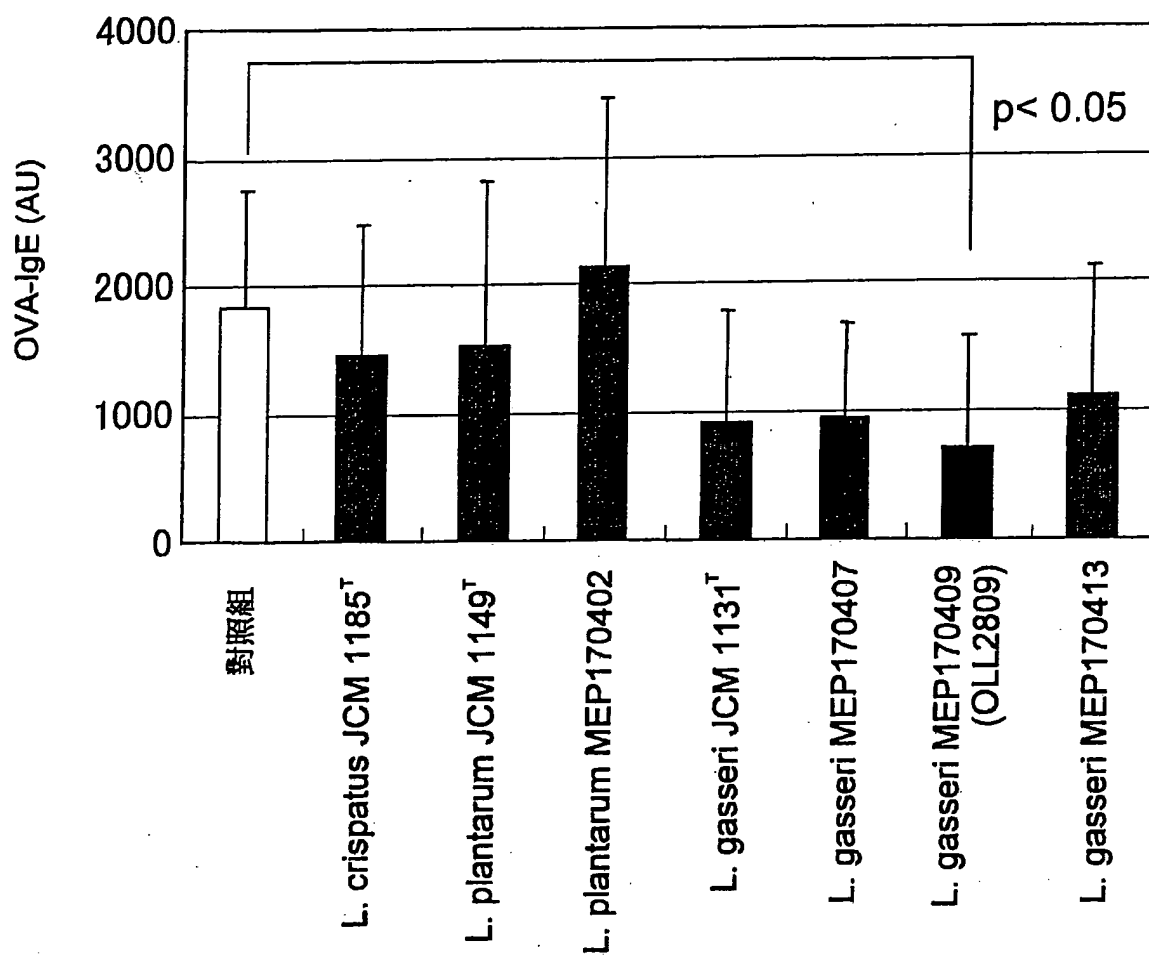
【主要元件符號說明】

無。

五、中文發明摘要：

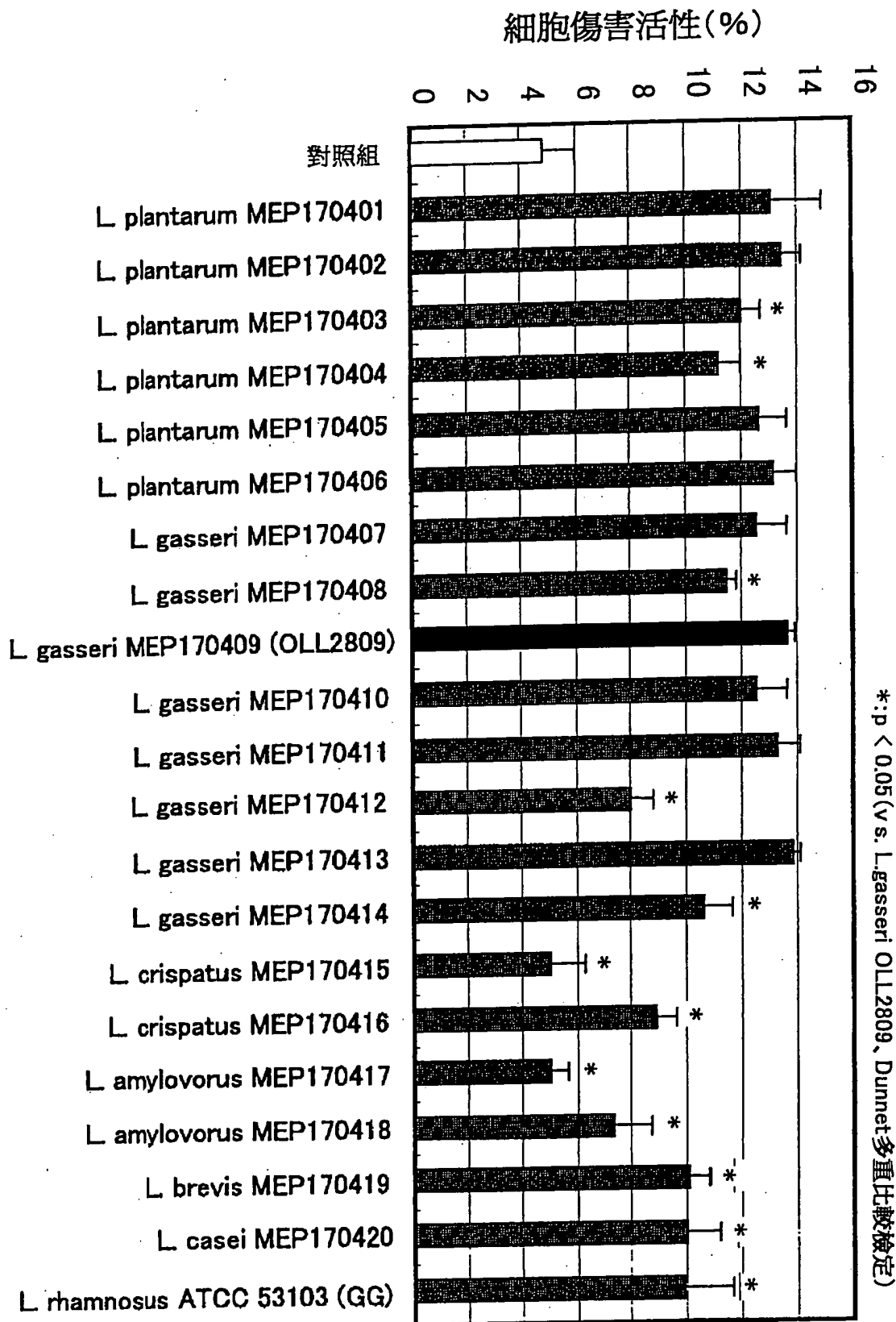
本發明由獨自分離自成人糞便的 *Lactobacillus* 屬乳酸菌中，選拔出符合(1)具有高度胃酸、膽汁酸耐受性；(2)具有促進小鼠脾臟細胞產生 IL-12 之活性及改善 Th1/Th2 平衡之效果；(3)具有高度抑制 BALB/c 小鼠卵白蛋白 (ovalbumin) 腹腔投與時誘導產生抗原專一 IgE 之功效；(4)具有高度抑制對 C57BL/6N 小鼠經口投與食物抗原時誘導產生抗原專一 IgE 之功效；(5)具有高度活化自然殺手 (nature killer) 細胞的能力；(6)具有促進卵白蛋白免疫的小鼠脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞之 IL-12 產生的活性，以及改善 Th1/Th2 平衡之效果；(7)能高度抑制杉樹花粉萃取抗原所誘發增生的嗜酸性白血球 (eosinophil)，等條件的菌株，其結果發現一種益生菌乳酸菌能符合上述所有條件，本發明於是完成。

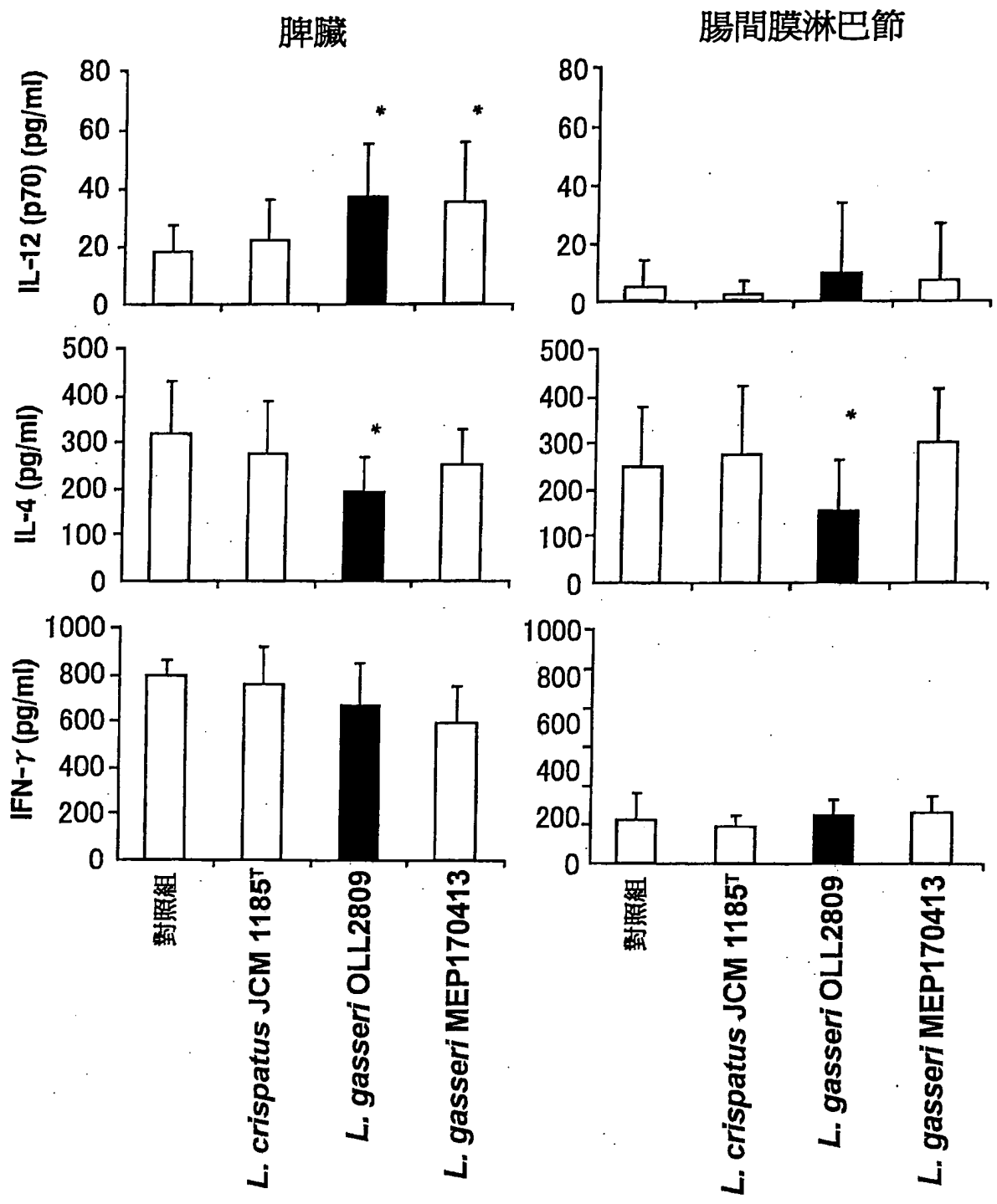
六、英文發明摘要：



第1圖

第2圖





第3圖

七、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。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

公告本

發明專利說明書

100年11月8日修正替換頁

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 95106975

ALIK 35/74 (2006.01)

※ 申請日期： 95.3.2

※IPC 分類：

A23C 9/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

AtIP 3 7/8, 4 3/8 (2006.01)

免疫機能調整劑

AtN 1/2 (2006.01)

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

明治股份有限公司/MEIJI CO, LTD.

代表人：(中文/英文)

淺野茂太郎

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都江東區新砂 1 丁目 2 番 10 號

國 籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

三、發明人：(共 8 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 指原紀宏/SASHIHARA, TOSHIHIRO

2. 山口真/YAMAGUCHI, MAKOTO

3. 中村吉孝/NAKAMURA, YOSHITAKA

4. 池上秀二/IKEGAMI, SHUJI

5. 成島聖子/NARUSHIMA, SEIKO

6. 木村勝紀/KIMURA, KATSUNORI

7. 永淵真也/NAGAFUCHI, SHINYA

8. 寺原正樹/TERAHARA, MASAKI

國 籍：(中文/英文)

1.~8. 日本/JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本、2005/3/3、2005-059460

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☒ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

1. 食品工業發展研究所、2006/5/24、BCRC 910317

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

1. 日本、獨立行政法人產業技術總合研究所 特許生物寄託中心、2006/3/1、FERMBP-10542

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。



所誘發增生的嗜酸性白血球(eosinophil)，等條件的菌株，其結果發現一種加氏乳酸桿菌(Lactobacillus gasseri)OLL 2809 菌株(寄存編號：BCRC 910317)的益生菌乳酸菌能符合上述所有條件，本發明於是完成。

前述(1)記載關於投與後的存活性。於過敏預防及/或治療劑中投與生菌 Lactobacillus gasseri OLL 2809 菌株(寄存編號：BCRC 910317)，於腸道腔中具有高存活率。前述(2)~(7)記載關於生體中的 Th1 反應的增強或是 Th2 反應的抑制。過敏疾病的原因之一被認為是助手 T 細胞(helper T cell)的 Th1 與 Th2 失衡所造成。本發明之過敏預防及/或治療劑，或是過敏預防及/或治療用食品組成物具有前述(2)~(7)之效果，可以改善傾向 Th2 的平衡，維持 Th1/Th2 的整體平衡，具有調整免疫機能的功效。本發明之過敏預防及/或治療劑所使用的 Lactobacillus gasseri OLL 2809 菌株(寄存編號：BCRC 910317)即使於死菌狀態亦保有過敏預防及/或治療之效果，若進一步投與生菌，更具有改善腸內細菌叢等的相乘效果。尤其是前述(4)記載關於食物過敏模型所使用的評價，因此本發明之過敏預防及/或治療劑對於食物過敏具有治療效果。

即，本發明提供

[1]以加氏乳酸桿菌(Lactobacillus gasseri)為有效成分的過敏預防及/或治療劑；

[2]以至少一種加氏乳酸桿菌(Lactobacillus gasseri)的處理物為有效成分的過敏預防及/或治療劑，加

氏乳酸桿菌 (*Lactobacillus gasseri*) 的處理物包括該乳酸菌的培養物、濃縮物、膏化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物、液狀物、稀釋物、破碎物等；

[3] 前述 [1] 或 [2] 中任一項所述之過敏預防及/或治療劑，其中過敏預防及/或治療是藉由抑制抗原專一性 IgE 之產生；

[4] 前述 [1] 或 [2] 中任一項所述之過敏預防及/或治療劑，其中過敏預防及/或治療是藉由促進 IL-12 之產生，以及改善 Th1/Th2 之平衡；

[5] 前述 [1] 或 [2] 中任一項所述之過敏預防及/或治療劑，其中過敏預防及/或治療是藉由活化自然殺手細胞；

[6] 前述 [1] 或 [2] 中任一項所述之過敏預防及/或治療劑，其中過敏預防及/或治療是藉由抑制嗜酸性白血球 (eosinophil) 的增生；

[7] 前述 [1] 或 [2] 中任一項所述之過敏預防及/或治療劑，其中過敏預防及/或治療是藉由抑制抗原專一 IgE 之產生、促進 IL-12 之產生以及改善 Th1/Th2 平衡、活化自然殺手細胞、抑制嗜酸性白血球 (eosinophil) 的增生等其中至少一項而達成；

[8] 前述 [1]~[7] 中任一項所述之過敏預防及/或治療劑，其中加氏乳酸桿菌 (*Lactobacillus gasseri*) 為寄存編號：BCRC 910317 之 *Lactobacillus gasseri* OLL 2809 菌株；

[9]含有有效量之前述[1]~[8]中任一項之過敏預防及/或治療劑之過敏預防及/或治療用食品組成物；

[10]前述[8]所記載之過敏預防及/或治療用食品組成物可為乳兒用調製奶粉、幼兒用奶粉等食品、哺乳婦女用奶粉等食品、保健機能食品、病患用食品或發酵乳；

[11]利用前述[1]~[8]中任一項之過敏預防及/或治療劑來製造預防及/或治療過敏之食品組成物；

[12]使用前述[11]之預防及/或治療過敏之食品組成物製備乳兒用調製奶粉、幼兒用奶粉等食品、哺乳婦女用奶粉等食品、保健機能食品、病患用食品或發酵乳；

[13]一種過敏預防及/或治療方法，其特徵為投與加氏乳酸桿菌(*Lactobacillus gasseri*)或其處理物；

[14]一種過敏預防及/或治療用食品組成物的製造方法，其特徵為使用至少一種處理物，該處理物包括加氏乳酸桿菌(*Lactobacillus gasseri*)或選自其培養物、濃縮物、膏化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物、液狀物、稀釋物、破碎物；

[15]寄存編號：BCRC 910317 之 *Lactobacillus gasseri* OLL 2809 菌株；

[16]寄存編號：BCRC 910317 之 *Lactobacillus gasseri* OLL 2809 菌株的乳酸菌處理物，為選自至少一種該乳酸菌的培養物、濃縮物、膏化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物、液狀物、稀釋物、破碎物；

[17]含有前述[15]所記載的 *Lactobacillus gasseri*

菌株。此次由成人糞便中獨自分離出的 *Lactobacillus* 屬乳酸菌 273 菌株中，進行(1)胃酸、膽汁酸耐受性試驗；(2)促進小鼠脾臟細胞產生 IL12 之活性試驗，以及改善 Th1/Th2 平衡之效果評估試驗；(3)BALB/c 小鼠卵白蛋白腹腔投與時誘導產生抗原專一 IgE 之抑制功效試驗；(4)對於 C57BL/6N 小鼠經口投與食物抗原(casein)時誘導產生抗原專一 IgE 之抑制功效試驗；(5)自然殺手(nature killer)細胞的活化能力評估試驗；(6)促進卵白蛋白免疫的小鼠脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞之 IL-12 產生的效果評估試驗，以及 Th1/Th2 平衡之改善效果評估試驗；(7)抑制杉樹花粉萃取抗原所誘發增生的嗜酸性白血球的功效評估試驗等，選出於各種評估試驗中均顯示優越活性，具有過敏預防及/或治療效果之 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 菌株(寄存編號：BCRC 910317)(以下稱為 *L. gasseri* OLL2809)。因此可使用該乳酸菌，提供一種預防及/或治療包括食物過敏等各種過敏疾病之有效而新穎的過敏預防及/或治療劑，或是含有前述成分的過敏預防及/或治療用食品組成物。

本發明之作者群將該菌株寄存於食品工業發展研究所(寄存編號 BCRC 910317，寄存日期 2006 年 5 月 24 日)與獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生物寄託中心(寄存編號 NITE BP-72，寄存日期 2005 年 2 月 1 日)。以下記載具體寄存內容。

本發明之作者群將 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 菌株寄存於獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許微生

物寄託中心。以下記載具體寄存內容。

(1)寄存機關名：獨立行政法人製品評價技術基盤機構
特許微生物寄託中心

(2)聯絡處：〒千葉縣木更津市上總鎌足 2-5-8

電話號碼 0438-20-5580

(3)寄存編號：NITE BP-72

(4)識別表示：Lactobacillus gasseri OLL2809

(5)原寄存日：平成 17 年(2005 年)2 月 1 日

(6)根據布達佩斯條約的寄存移管日：2006 年 1 月 18
日

(a)寄存機關名：獨立行政法人產業技術總合研究所
特許微生物寄託中心

(b)聯絡處：〒305-8566 茨城縣筑波市東 1 丁目 1 番
地 1 中央第 6

(c)寄存編號：FERM BP-10542

(d)識別表示：Lactobacillus gasseri OLL2809

(e)原寄存日：平成 18 年(2006 年)3 月 1 日

Lactobacillus gasseri OLL2809 株(寄存編號：BCRC 910317)為革蘭氏陽性桿菌，於 Lactobacilli MRS Agar, Difco 上的菌落形態為淡黃色圓形，呈扁平狀。生理學上的特徵包括，同質乳酸發酵(homofermentative)形式，於 45℃ 發育，對於葡萄糖、甘露糖(mannose)、果糖(fructose)、半乳糖(galactose)、蔗糖(sucrose)、纖維二糖(cellobiose)、乳糖(lactose)、海藻糖(trehalose)具有發酵性。

培養 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 株(寄存編號：BCRC 910317)之培養基可使用一般培養乳酸菌的培養基。即只要能適當提供碳源、氮源、無機物其他的營養素之任何一種培養基均可使用。碳源可以配合使用菌的同化性(assimilation)，使用乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、澱粉加水分解物、甘蔗糖蜜(sugarcane molasses)等。氮源可使用酪蛋白(casein)加水分解物、乳清蛋白(whey protein)加水分解物、大豆蛋白加水分解物等有機氮含有物質。其他還包括使用肉類萃取物、魚肉萃取物、酵母萃取物等作為增殖促進劑。

培養較佳於無氧(anaerobic)狀態下進行，也可在一般液體境靜置培養的微嗜氧(microaerobic)狀態下進行。無氧培養可使用習知的碳氣培養方式，使用其他方式亦無妨。培養溫度雖然一般較佳為 30~40℃，但只要為菌可以生長的溫度，亦可於其他溫度條件下培養。培養基的 pH 值較佳維持於 6.0~7.0，但只要為菌可以生長的溫度下，亦可於其他 pH 值培養。另外，也可於批次培養條件下進行培養。培養時間通常較佳為 10~24 小時，但只要為菌可以生長的時間，亦可採用其他培養時間。

可使用於本發明之其他 *Lactobacillus gasseri*，可以是革蘭氏陽性桿菌或其他具有與 *Lactobacillus gasseri* OLL2809 同樣生理學特徵之菌。熟習本領域的人士，可以根據其生理學特徵由人類糞便等分離出此類 *Lactobacillus gasseri*。可以藉由實施例中的 IL-12 產生

以 *L. plantarum* 或 *L. gasseri* 為主，且其差異具有統計上的意義 ($p < 0.05$)。然而同菌種中 IL-12 的誘導活性有的很強，有的則完全沒有，顯示無關乎菌種而在於菌株本身的特異性。另外，IFN- γ 及 IL-4 分別與 IL-12 的產生量呈現正相關性 ($n=31$, $r=0.8047$, $p < 0.01$) 及負相關性 ($n=31$, $r=-0.6544$, $p < 0.01$)。亦即，強烈誘導 IL-12 產生的菌株也具有 IFN- γ 的高產生促進效果以及 IL-4 的高產生抑制效果，可以改善 Th1/Th2 的平衡。從以上結果可以了解，包含 *L. gasseri* MEP170409 (*Lactobacillus gasseri* OLL 2809 (寄存編號：BCRC 910317))，屬於 *L. gasseri* 或 *L. plantarum* 的特定菌株具有強力的 IL-12 產生促進活性以及 Th1/Th2 平衡的改善效果。

如此，選出具有高 IL-12 產生促進活性以及 Th1/Th2 平衡的改善效果的 *L. plantarum* MEP170402、*L. gasseri* MEP170407、*L. gasseri* MEP170409 (*Lactobacillus gasseri* OLL 2809 (寄存編號：BCRC 910317))、*L. gasseri* MEP170413 等 4 菌株。

[實施例 4] (BALB/c 小鼠卵白蛋白腹腔投與時誘導產生抗原專一 IgE 之抑制功效評估試驗)

將實施例 3 選出的 4 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌利用以下方法進行評估。

將 0.2 微克/克-身體質量 ($\mu\text{g/g-body mass}$) 的 OVA (和光純藥工業) 與 0.1 毫克/克-身體質量的氫氧化鋁 (和光純藥工業) 進行腹腔投與至 6 週齡的雄性 BALB/c 小鼠 (各群

n=10，日本 SLC)(一次免疫)。2 週後以同樣條件進行 OVA 及氫氧化鋁的二次免疫。從一次免疫起至二次免疫的一週後的 21 天中，讓小鼠自由攝取實施例 2 之方法所製備，含有 0.1%各種乳酸菌凍結乾燥粉末的 MF 飼料(Oriental 酵母工業)。該乳酸菌以實施例 3 結果中 IL-12 誘導活性低的 *L. crispatus* JCM 1185^T、*L. plantarum* JCM 1149^T 以及 IL-12 誘導活性高的 *L. gasseri* JCM 1131^T 作為比較對照，評估 *L. plantarum* MEP170402、*L. gasseri* MEP170407、*L. gasseri* MEP170409(*Lactobacillus gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317))、*L. gasseri* MEP170413 的抗 OVA 專一 IgE 產生的抑制效果。對照組僅提供 MF 飼料。二次免疫起的一週後進行採血，利用 ELISA 法測定血清中的抗 OVA 專一 IgE 抗體濃度。抗 OVA 專一 IgE 抗體濃度以 20 微克的 OVA 與 2 毫克的氫氧化鋁以兩星期的間隔進行 2 次腹腔投與至 6 週齡的雄性 BALB/c 小鼠(日本 SLC)，投與完一星期後將小鼠血清中所含的抗 OVA 專一 IgE 抗體濃度定義為 10,000AU。抗 OVA 專一 IgE 抗體濃度的方法，為 Ito 等人的方法(Ito, K., K. Inagaki-Ohara, S. Murosaki, H. Nishimura, T. Shimokata, S. Torii, T. Matsuda, and Y. Yoshikai, Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvant., Eur. J. Immunol. 27:3427-3437(1997))經過調整，利用結合生物素(biotin)的大鼠抗小鼠 IgE 單株抗體(BD biosciences)以及

streptavidin horseradish peroxidase(BD biosciences) 進行檢測。將結果進行單因子變異數分析(one way analysis of variance)，進一步利用 Fisher PLSD test 進行多重檢定顯示具有 5%的顯著水準。結果如第 1 圖所示。

與對照組相比，*L. crispatus* JCM 1185^T 與 *L. plantarum* JCM 1149^T 無法看出差異。活體外試驗結果顯示具有高 IL-12 誘導效果的 *L. plantarum* MEP170402 也看不出與對照組的差異。*Lactobacillus gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)為所有試驗菌株中，OVA 抗原專一 IgE 之抑制功效最強，與對照組相較，其抑制功效的差異達到顯著水準($p < 0.05$)。另外，*L. gasseri* JCM 1131^T 及 *L. gasseri* MEP170407 也顯示具有 OVA 抗原專一 IgE 之抑制傾向(分別為 $p = 0.072$ 及 $p = 0.064$)。活體內(in vivo)試驗中，*plantarum* 無 IgE 產生之抑制效果，一般而論 *gasseri* 的效果最佳。由以上結果得知 *Lactobacillus gasseri* OLL 2809 菌株(寄存編號：BCRC 910317)具有強力的 OVA 抗原專一 IgE 產生抑制效果。

[實施例 5](C57BL/6N 小鼠經口投與食物抗原誘導產生抗原專一 IgE 之抑制功效試驗)

將實施例 1 中所選出的 20 株胃酸耐性，膽汁酸耐性 *Lactobacillus* 屬乳酸菌利用以下方法進行評估。

讓 3 週齡的雌性 C57BL/6N 小鼠(對照組 $n = 20$ ，被檢菌體投與群 $n = 10$ 日本 CLEA)自由攝取實施例 2 之方法所製備，含有 0.1%各種乳酸菌凍結乾燥粉末的表 3 所示飼料(被

反應陽性數/試驗頭數表示。*： $p < 0.05$ (vs. 對照組，卡方檢定)。

對照組中 20 頭大鼠有 18 頭為陽性，另外，投與 *L. gasseri* MEP170409(OLL 2809)(寄存編號：BCRC 910317) 及 *L. amylovorus* MEP170417 菌株的陽性數為十頭中有五頭，顯示出具有統計意義的抑制性，投與其他菌株的群組則看不出顯著的效果。

由以上結果得知，藉由經口投與 *L. gasseri* MEP170409(OLL 2809)(寄存編號：BCRC 910317) 菌株，與其他菌株相較，具有抑制酪蛋白經口投與所引起的食物過敏模型小鼠的抗原專一 IgE 產生的效果。

[實施例 6](自然殺手細胞的活化能力評估試驗)

將實施例 1 中所選出的 20 株胃酸耐性，膽汁酸耐性 *Lactobacillus* 屬乳酸菌利用以下方法進行評估。

自 10 週齡的雌性 BALB/c 小鼠(日本 SLC)取出脾臟細胞。以 YAC-1 細胞(對於自然殺手細胞具有高感受性的細胞株)作為標的細胞。每 1×10^6 個/毫升的細胞加入最終濃度為 20 毫墨耳濃度的鈣黃綠素(calcein)(Dojindo 公司)，靜置一小時後洗淨。於 96 孔培養盤的每一孔加入液量 100 微升之 5×10^5 個脾細胞，以及實施例 2 調製的各種乳酸菌的凍結乾燥粉末 0.20 微克配合液量 50 微升(最終濃度為 1.3 微克/毫升)，培養隔夜。之後加入前述螢光標示後的 YAC-1 細胞 1×10^4 個配合液量 50 微升(脾細胞：YAC-1 細胞之比例為 50:1)，培養 3 小時。對照組的培養孔中除了不

加入乳酸菌的凍結乾燥粉末之外，其他均相同。另外，正對照組則使用 rhamnosus ATCC 53103 菌株(*Lactobacillus rhamnosus* GG 菌株)。培養後，測定上清液中的螢光強度(激發光：485 奈米，吸收光：535 奈米)，將測得的值作為試驗測定值(Test)。再者，將脾細胞或 YAC-1 細胞單獨培養的上清液所測得的螢光強度分別作為脾細胞自發測定值(Spontaneous)以及 YAC-1 自發測定值(Spontaneous)。另外，將單獨培養的 YAC-1 細胞加入 Triton X100(和光純藥工業)破壞後，測定螢光強度作為總測定值(Total)。將前述的各值帶入以下算式以計算細胞傷害活性。以 Dunnet 多重比較檢定進行統計，結果顯示 *L. gasseri* MEP170409(OLL 2809)(寄存編號：BCRC 910317)達到 5%的顯著水準。結果如第 2 圖所示。

[算式 1]

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \frac{\text{Test} - Y - S}{\text{Total} - Y} \times 100$$

上式中，Test 為試驗測定值，Total 為總測定值，S 為脾臟細胞的自發測定值，Y 為 YAC-1 的自發測定值。

20 株菌株中，添加 *L. plantarum* 或 *L. gasseri* 屬菌株顯示細胞傷害活性增高。另外，相對於正對照組的檢體，添加 *L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)的檢體其細胞傷害活性提高程度具有統計上的意義($p < 0.05$)。

由以上結果得知，於脾細胞中，*L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)具有高自然殺手細胞活化效

果。

綜合以上(1)胃酸耐性試驗及膽汁酸耐性試驗，(2)促進小鼠脾臟細胞產生 IL-12 之效果，以及改善 Th1/Th2 平衡之效果評估試驗，(3)BALB/c 小鼠卵白蛋白腹腔投與時誘導產生抗原專一 IgE 之抑制功效評估試驗，(4)C57BL/6N 小鼠經口投與食物抗原誘導產生抗原專一 IgE 之抑制功效試驗，(5)自然殺手細胞的活化能力評估試驗等試驗結果可歸納出，*L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)在各試驗中均顯現其高活性。

[實施例 7](使用卵白蛋白腹腔投與的 BALB/c 小鼠進行脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞之 Th1/Th2 平衡改善效果之評估試驗)

將實施例 3 中所選出的 2 株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌利用以下方法進行評估。

將 0.2 微克/克-身體質量($\mu\text{g/g-body mass}$)的 OVA(和光純藥工業)與 0.1 毫克/克-身體質量的氫氧化鋁(和光純藥工業)進行腹腔投與至 6 週齡的雄性 BALB/c 小鼠(各群 $n=10$ ，日本 SLC)(一次免疫)。2 週後以同樣條件進行 OVA 及氫氧化鋁的二次免疫。從一次免疫起至二次免疫的一週後的 21 天中，讓小鼠自由攝取實施例 2 之方法所製備，含有 0.1%各種乳酸菌凍結乾燥粉末的 MF 飼料(Oriental 酵母工業)。二次免疫的一週後，自各群小鼠取得脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞。脾臟細胞將紅血球去除後，以每孔 2.5×10^6 的濃度播種於 24 孔培養盤中，腸間膜淋巴節細胞

則以每孔 1.25×10^6 的濃度播種於 48 孔培養盤中。各細胞以含有 100 微克/毫升 OVA 的 FCS-RPMI1640 培養基(Gibco 公司，每孔 1 毫升)，於 5%濃度二氧化碳，37℃環境下分別培養 2 天或 6 天。利用 ELISA 法(BD OptEIA™ ELISA set, Becton Dickinson)測定培養 2 天組別之培養上清液中的 IL-12(p70)，以及培養 6 天組別之培養上清液中的 IFN- γ 以及 IL-4 濃度。將結果進行單因子變異數分析顯示具有 5%的顯著水準，更進一步利用 Fisher PLSD test 進行多重檢定顯示具有 5%的顯著水準。

使用的乳酸菌為根據實施例 3 結果選出的 *L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)與 *L. gasseri* MEP170413，比較對照組則為 IL-12 誘導活性低的 *L. crispatus* JCM 1185^T。對照組只給予 MF 飼料。結果如第 3 圖所示。

相較於對照組，投與 *L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)的群組，其脾臟細胞的 IL-12(p70)的產生增加，且其差異具有統計上的意義($p < 0.05$)。另外，投與 *L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)的群組，其脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞的 IL-4 的產生量較對照組為少，且其差異具有統計上的意義($p < 0.05$)。

投與 *L. gasseri* MEP170413 的群組，雖然其脾臟細胞的 IL-12(p70)的產生量增加，且其差異具有統計上的意義($p < 0.05$)，然而 IL-4 的產生量不論是在脾臟細胞還是腸間膜淋巴節細胞都沒有看到影響。*L. crispatus* JCM 1185^T

對於前兩種細胞的細胞激素的產生並沒有影響。由上述結果發現，*L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)菌株，當經口投與至 OVA 腹腔投與的 BALB/c 小鼠時，具有改善其脾臟細胞及腸間膜淋巴節細胞的 Th1/Th2 平衡之效果。

[實施例 8](使用杉樹花粉萃取抗原誘發嗜酸性白血球增生模型，進行嗜酸性白血球增生抑制的效果評估試驗)

將杉樹花粉萃取抗原液(含有 0.4 微克/毫升的 Cry j1)每 0.2 毫升/body，於實驗開始的第 0、1、6、8、14 天時，背部皮下投與至 7 周齡的雌性 BALB/c 小鼠(n=9 或 10/群，日本 SLC)，使其產生抗原過敏反應。於第 20 天時，以同樣方法投與 Cry j1 誘發嗜酸性白血球的增生。負對照組則不投予抗原，但給予誘發。各小鼠群於實驗開始的第 21 天起每天強制胃內投與水(對照)或根據實施例 2 所調製的各種劑量(0.5、1.0、2.0 毫克)的 *L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)。各群組成如以下所示。21 日起於腹腔內注入 5 毫升含有 1%FCS 的磷酸緩衝生理食鹽水，採取腹腔細胞。以自動血球計數裝置(F-800，Sysmex 公司)測定腹腔細胞的總細胞濃度，使用細胞離心裝置(Cytospin 3，Shandon 公司)製作腹腔細胞塗抹標本。使用 Hemacolor 快速染色套組(Merck 公司)染色腹腔細胞，以顯微鏡計算嗜酸性白血球數。藉由以下算式得出嗜酸性白血球抑制率。

[算式 2]

嗜酸性白血球抑制率(%)

$$= \left[1 - \frac{(\text{各組的嗜酸性白血球數} - \text{負對照組的嗜酸性白血球數})}{(\text{對照組的嗜酸性白血球數} - \text{負對照組的嗜酸性白血球數})} \right]$$

[表 5]

組別	過敏反應	誘發	OLL2809 投與量(mg/body/day)
對照組	○	○	0(只給水)
負對照組	×	○	0(只給水)
0.5 毫克組	○	○	0.5
1.0 毫克組	○	○	1.0
2.0 毫克組	○	○	2.0

與負對照組相較，對照組由於使用杉樹花粉萃取抗原進行過敏反應以及誘發，因此嗜酸性白血球濃度以及嗜酸性白血球比例(嗜酸性白血球數/總細胞數)有意義的增加($p < 0.01$)。與對照組相較，投與 *L. gasseri* OLL 2809(寄存編號：BCRC 910317)的群組嗜酸性白血球比例有意義的受到抑制($p < 0.05$ 或 0.01)。另外，雖然全部的抗原過敏以及誘發群組別，其腹腔回收液的總細胞濃度並無明顯的差異，不過與對照組相較，投與 2.0 毫克群組的嗜酸性白血球濃度值較低，且其差異具有統計上的意義($p < 0.05$)，嗜酸性白血球的增加有意義的被抑制達到 44%($p < 0.05$)。

以上結果顯示，藉由 OLL 2809 菌株的經口投與模型小鼠，可以抑制其嗜酸性白血球的增加。

[表 6]

組別	總細胞濃度 ($\times 10^5$ 細胞/毫升)	嗜酸性白血球濃度 ($\times 10^5$ 細胞/毫升)	嗜酸性白血球比例 (%)	嗜酸性白血球抑制率 (%)
對照組	16.7 $\pm$ 2.1	4.30 $\pm$ 0.70	25.5 $\pm$ 1.6	0.0 $\pm$ 17.0
負對照組	8.5 $\pm$ 1.2	0.18 $\pm$ 0.05	1.9 $\pm$ 0.3	100.0 $\pm$ 1.2
0.5 毫克組	18.7 $\pm$ 2.1	3.29 $\pm$ 0.54	17.2 $\pm$ 2.0**	24.7 $\pm$ 13.2
1.0 毫克組	19.4 $\pm$ 1.6	3.35 $\pm$ 0.35	17.6 $\pm$ 1.9*	23.2 $\pm$ 8.5
2.0 毫克組	15.8 $\pm$ 1.7	2.48 $\pm$ 0.35*	16.2 $\pm$ 1.6**	44.3 $\pm$ 8.6*

平均值 $\pm$ 標準差，對照組 $n=9$ ，其他組別 $n=10$ ，*，**： $p < 0.05$ ， 0.01 (vs 對照組，Dunnet 多重比較檢定)，細胞濃度以腹腔回收液中的濃度表示。

十、申請專利範圍：

1. 一種過敏預防及 / 或治療劑，其以寄存編號 BCRC910317 寄存之加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株 (*Lactobacillus gasseri* OLL2809) 為有效成分。

2. 一種過敏預防及 / 或治療劑，其以寄存編號 BCRC910317 寄存之加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株 (*Lactobacillus gasseri* OLL2809) 的處理物為有效成分，其中該加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株的處理物係擇自下列至少一種：該乳酸菌的培養物、濃縮物、膏化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物、液狀物、稀釋物、破碎物。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項中任一項所述之過敏預防及 / 或治療劑，其中該過敏的預防及 / 或治療是藉由抑制抗原專一性 IgE 之產生。

4. 如申請專利範圍第 1 或 2 項中任一項所述之過敏預防及 / 或治療劑，其中該過敏的預防及 / 或治療是藉由促進 IL-12 之產生，以及改善 Th1/Th2 之平衡。

5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項中任一項所述之過敏預防及 / 或治療劑，其中該過敏的預防及 / 或治療是藉由活化自然殺手細胞。

6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項中任一項所述之過敏預防及 / 或治療劑，其中該過敏的預防及 / 或治療是藉由抑制嗜酸性白血球的增生。

7. 如申請專利範圍第 1 或 2 項中任一項所述之過敏預

防及/或治療劑，其中該過敏的預防及/或治療係藉由下列至少一項來達成：抑制抗原專一性 IgE 之產生、促進 IL-12 之產生以及改善 Th1/Th2 平衡、活化自然殺手細胞、抑制嗜酸性白血球(eosinophil)的增生。

8. 一種預防及/或治療過敏之食品組成物，其係含有效量之申請專利範圍第 1 至第 7 項中任一項所述之過敏預防及/或治療劑。

9. 如申請專利範圍第 8 項所述之預防及/或治療過敏之食品組成物，其包括乳兒用調製奶粉、幼兒用奶粉等食品、哺乳婦女用奶粉等食品、保健機能食品、病患用食品或發酵乳。

10. 一種如申請專利範圍第 1 至第 7 項中任一項所述之過敏預防及/或治療劑的用途，其係用於製備預防及/或治療過敏之食品組成物。

11. 申請專利範圍第 10 項所述之預防及/或治療過敏之食品組成物的用途，其係用於製備成乳兒用調製奶粉、幼兒用奶粉等食品、哺乳婦女用奶粉等食品、保健機能食品、病患用食品或發酵乳。

12. 一種預防及/或治療過敏之食品組成物的製備方法，其特徵在於使用選自寄存編號 BCRC 910317 之加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株(*Lactobacillus gasseri* OLL2809)或其培養物、濃縮物、膏化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物、液狀物、稀釋物、破碎物之至少一種的處理物。

13. 一種經分離且純化的加氏乳酸桿菌 OLL2809 (*Lactobacillus gasseri* OLL 2809) 菌株，其為寄存編號 BCRC 910317 之加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株。

14. 一種乳酸菌處理物，為寄存編號為 BCRC 910317 之加氏乳酸桿菌 OLL2809 (*Lactobacillus gasseri* OLL 2809) 菌株的乳酸菌處理物，該乳酸菌處理物擇自該乳酸菌的培養物、濃縮物、膏化物、噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、滾筒乾燥物、液狀物、稀釋物、破碎物之至少一種。

15. 一種食品組成物，其包含申請專利範圍第 13 項所述之加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株或申請專利範圍第 14 項所述之乳酸菌處理物。

16. 一種飲料，其包含申請專利範圍第 13 項所述之加氏乳酸桿菌 OLL2809 菌株或申請專利範圍第 14 項所述之乳酸菌處理物。