



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I429444 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：100145402

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 08 日

(51)Int. Cl. : A61K35/74 (2006.01)

A61P37/02 (2006.01)

(30)優先權：2010/12/08 中華民國

099142822

(71)申請人：益擎生技有限公司 (中華民國) YI CHING BIOTECH CO., LTD (TW)

新北市中和區景平路 200 號 9 樓之 3

財團法人食品工業發展研究所 (中華民國) FOOD INDUSTRY RESEARCH AND
DEVELOPMENT INSTITUTE (TW)

新竹市食品路 331 號

(72)發明人：陳慶源 CHAN, HING YUEN (TW)；邱雪惠 CHIU, HSUEH HUI (TW)；宋璧君
SUNG, PI CHUN (TW)；莊雅惠 CHUANG, YA HUI (TW)

(74)代理人：江謝令涵

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所 BCRC910484 2010 年 09 月 06 日

(56)參考文獻：

TW 201016848

CN 101503662

CN 101772571

Ghadimi D, Fölster-Holst R, de Vrese M, Winkler P, Heller KJ, Schrezenmeir J, "Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy and allergic subjects", Immunobiology, 2008, Vol.2008, page 677~692。

Raymind M. Suen, Shalima Gordon, "A critical review of IgG immunoglobulins and food allergy-implications in systemic health", 2004, UK BioTek Laboratories, 網址；<http://www.usbiotek.com/Downloads/information/criticalReview.pdf>。

戴志展，抗過敏方對過敏性鼻炎臨床療效之研究，2008，中醫藥年報，第 26 期，第 233~252 頁。

審查人員：李惟宇

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：10 共 0 頁

(54)名稱

新穎乳酸菌株及其調節免疫反應的用途

NOVEL LACTOBACILLUS STRAINS AND THEIR USES FOR MODULATING IMMUNE
RESPONSE

(57)摘要

本發明係關於新穎乳酸菌株 MP137 及 MP108，及其調節免疫反應之用途。特定而言，本發明之乳酸菌株可促進 Th1 反應及抑制 Th2 反應。

The present invention relates to novel *Lactobacillus* strains, named MP137 and MP108, and their uses for modulating immune response. In particular, the *Lactobacillus* strains of the invention can promote Th1 immune response and inhibit Th2 immune response.

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：100145402

※申請日：100.12.8

※IPC 分類：

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新穎乳酸菌株及其調節免疫反應的用途

NOVEL LACTOBACILLUS STRAINS AND THEIR USES FOR
MODULATING IMMUNE RESPONSE

二、中文發明摘要：

本發明係關於新穎乳酸菌株 MP137 及 MP108，及其調節免疫反應之用途。特定而言，本發明之乳酸菌株可促進 Th1 反應及抑制 Th2 反應。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to novel *Lactobacillus* strains, named MP137 and MP108, and their uses for modulating immune response. In particular, the *Lactobacillus* strains of the invention can promote Th1 immune response and inhibit Th2 immune response.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：
無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於新穎乳酸菌株及其用於調節免疫反應之用途。

【先前技術】

免疫系統是身體用來抵抗外來微生物或毒素的防禦系統。在免疫系統中，T 細胞受刺激後可能分化成第 1 型輔助 T 細胞 (Th1)、第 2 型輔助 T 細胞 (Th2)、以及調控型 T 細胞 (Treg)。其中，Th1 細胞主導細胞調節的免疫反應，可分泌干擾素- γ (IFN- γ)，以及促進樹突細胞和巨噬細胞分泌細胞激素-12 (IL-12) 與細胞毒殺 T 淋巴細胞之增生，有助於對抗病毒感染及癌細胞。Th2 細胞則主導體液免疫反應，可分泌細胞激素-4 (IL-4)、細胞激素-5 (IL-5) 及細胞激素-13 (IL-13)，促使 B 細胞增生及刺激免疫球蛋白 E (IgE) 之產生，可對抗游離的病菌；但過度的 Th2 反應可能導致發炎及過敏反應，例如，氣喘、過敏性鼻炎、濕疹、蕁麻疹、及胃腸疾病等。另，調控型 T 細胞是負責調節 Th1 及 Th2 細胞之平衡，可透過分泌 TGF- β 或 IL-10 來執行此調節能力。已有報導指出調控型 T 細胞可抑制自體免疫與過敏或氣喘反應，目前認為可用於過敏疾病的預防與治療。

許多研究顯示乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.) 具免疫調節功效，可抑制發炎或緩和異位性皮膚炎、過敏性鼻炎或氣喘等過敏疾病，其作用機制包括調節細胞激素的分泌、控制 Th1 與 Th2 反應之平衡及影響抗體之產生等。然而，乳酸菌功效具有菌株特異性 (strain-specific effects)，根據菌株種類之不同而有不同表現，且自然界尚有許多乳酸菌株尚未被發現或予以充分地研究。

【發明內容】

本發明係從台灣健康幼兒糞便檢體分離出新穎乳酸菌株 MP137 及 MP108，其與現有已知的菌株不同。本發明之新穎乳酸菌株具有免疫調節功效，特別是使個體之免疫反應趨向於 Th1 免疫反應，抑制 Th2 免疫反應，有助於對抗病菌感染及降低過敏反應。

因此，在一方面，本發明提供一種經分離之乳酸菌株，其中該乳酸菌株具有選自以下所組成之群之菌株之特性：MP137 菌株，寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910484；以及 MP108 菌株，寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910483。特定而言，本發明提供新穎的乳酸菌株 MP137 及 MP108。

在另一方面，本發明提供一種包含前述乳酸菌株之組合物。該組合物可為藥物或食品，可用於調節個體之免疫反應，特別是促使個體之免疫反應趨向於 Th1 免疫反應，避免 Th2 免疫反應，更特別是降低個體的過敏反應。本發明之組合物具治療氣喘或過敏性鼻炎或對抗腸道致病菌感染之功效。

在又一方面，本發明亦提供一種此處所描述之乳酸菌株之用於製備用於調節個體之免疫反應、治療氣喘或過敏性鼻炎或對抗腸道致病菌感染之藥物或食品之用途。

本發明亦包括一種於所需個體調節免疫反應、提升腸道免疫力、抑制免疫反應、治療氣喘或過敏性鼻炎、或對抗腸道致病菌感染的方法，其包括將有效量的所述乳酸菌株投與至該個體中。

本發明之各個具體實例的細節說明如後。本發明之其他特徵將會經由以下各個具體實例中的詳細說明及申請專利範圍而清楚呈現。

無須進一步的闡述，咸相信本發明所屬技術領域中具有通常知識者基於前述說明即可利用本發明至最廣的程度。因此，可以理解以下的說明僅僅是作為例示說明之用，而非以任何方式限制其餘的揭露內容。

【實施方式】

除非另有說明，否則此處使用之全部技術和科學名詞與本發明所屬技術領域之技藝人士通常所瞭解的意義相同。

此處所使用的冠詞「一」係指該冠詞的一或一個以上（即，至少一個）的文法受詞。

本發明提供經分離之乳酸菌株，其具有 MP137 或 MP108 菌株之特性，其中 MP137 菌株係於 2010 年 9 月 6 日寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910484；以及 MP108 菌株係於 2010 年 9 月 6 日寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910483。特定而言，本發明提供 MP137 及/或 MP108 菌株。

本發明之乳酸菌株 MP137 及 MP108 係由台灣健康幼兒糞便來源經分離取得。經初步試驗，此等菌株為革蘭氏陽性桿菌（圖 1 及 2），且不具觸酶、氧化酶活性及運動性，不產生內生孢子，於好氧及厭氧環境下皆會生長，再進一步進行 16S rDNA 序列分析及 API 50 CHL 系統鑑定，結果如圖 3 及 4 以及表 1 及表 2（實例 2）所示。綜合鑑定結果，MP137 確認為一種新穎的酪乳桿菌副乾酪亞種（*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*）菌株，而 MP108 確認為一種新穎的鼠李糖乳酸桿菌（*Lactobacillus rhamnosus*）菌株。

本發明之 MP137 及 MP108 菌株可以任何方式存在，包括活菌或死菌形式，亦包括具相同特徵的等同菌株及由該等菌株衍生所得之菌體或產物。

本文所使用的「免疫調節」乙詞，當用於形容一物質時，是指該物質具有改變或調整至少一種免疫系統之功能的能力，包括但不限於，改變或調整免疫系統之成員細胞或作用分子（例如，細胞激素及抗體）之數量（或含量）及/或活性。相關領域已發展各種測試方法，評估一物質之免疫調節功能。

本文所使用的「治療」乙詞包括為了治癒、癒合、減輕、

舒緩、改變、矯正、改善、改進或影響該疾病、該疾病之症狀、該疾病引起的殘疾或罹患該疾病之傾向的目的，而將包含一或多種活性劑之組合物施用或投與至患有該疾病、該疾病之症狀或有罹患該疾病之傾向的個體，或對該等個體進行其他處理。例如，根據本發明，治療氣喘或過敏性鼻炎包括施予需要的個體一活性成分，以達到降低或減緩氣喘或過敏性鼻炎的症狀，例如，降低呼吸道收縮現象、減少肺部發炎及改善鼻部症狀（如流鼻水、鼻塞、鼻子癢、打噴嚏等）或非鼻部症狀（如眼睛或耳朵癢、喉嚨癢、眼睛紅、流眼淚等）。

本發明之乳酸菌株具免疫調節功效。在一具體實例中，本發明之乳酸菌株可調節細胞激素的產生，例如，提升個體的 IL-12、IL-10 或 IFN- γ 的產生，以及抑制個體的 IL-4、IL-5 或 IL-13 的產生。在另一具體實例中，本發明之乳酸菌株可調節個體的免疫球蛋白之產生，例如，提升個體的 IgG2a 及抑制 IgE 的產生。本領域具通常知識者可瞭解細胞激素 IL-12 及 IFN- γ 與免疫球蛋白 IgG2a 的產生代表 Th1 免疫反應；細胞激素 IL-4、IL-5 及 IL-13 與免疫球蛋白 IgE 的產生代表 Th2 免疫反應；以及細胞激素 IL-10 的產生代表調節型 T 細胞的活化，其負責調節 Th1 及 Th2 反應之平衡，可用於過敏疾病的預防與治療。

因此，本發明的乳酸菌株可促使個體之免疫反應趨向於 Th1 免疫反應，抑制 Th2 免疫反應，有助於對抗病菌感染及降低過敏反應。

又在本發明之特定實例中，本發明之乳酸菌株可提升個體的 IgA 的產生。本領域具通常知識者已知 IgA 在腸道免疫系統扮演重要角色，其會被分泌至腸道黏膜外，與抗原形成免疫複合體 (immune complex)，以此種方式防止細菌侵入。因此，本發明的乳酸菌株可提升個體腸道免疫力。

在又一具體實例中，本發明之乳酸菌株可對抗腸道致病菌的感染，包括但不限於沙門氏菌及大腸桿菌。在特定實例中，

本發明之乳酸菌株可抑制或取代腸道致病菌吸附於腸道上，因此，具有預防或治療腸道致病菌感染的功效。

此外，在另一具體實例中，本發明之乳酸菌株可降低呼吸道阻力的產生及/或降低肺部發炎。因此，本發明的乳酸菌株尚可用於治療氣喘。氣喘是一種呼吸道發炎疾病，支氣管因發炎細胞及黏液增加，且管壁水腫，因此，造成呼吸道阻力增加，病患呼吸困難、胸悶，嚴重時造成猝死。本領域已發展出標準動物模式測試呼吸道阻力，可參見以下實例。

再者，本領域具通常知識者已知，過敏性鼻炎呈現 Th2 細胞增多的趨勢，而且，近年來 Th1/Th2 免疫調節劑已為預防與治療過敏性鼻炎的重點研究之一。根據本發明，此處所描述的乳酸菌株尚可用於對抗過敏性鼻炎。

在一具體實例中，本發明之乳酸菌株可與其他抗過敏藥物併用。此處所述抗過敏藥物可為此領域已知可用於治療過敏的藥物，特別是治療過敏性鼻炎藥物，包括但不限於抗組織胺、去充血劑及抗發炎藥物（如，白三烯素拮抗劑、類固醇、肥大細胞穩定劑、色甘酸鈉、酮替芬等）。在一特定實例中，本發明的乳酸菌株與抗組織胺併用。本發明之乳酸菌株可視需要與抗過敏藥物同時使用或依序先後使用。

在另一方面，本發明亦提供一種包含前述乳酸菌株的組合物。在一實例中，本發明之組合物包括 MP137 菌株。在另一實例中，本發明之組合物包括 MP108。

特定而言，本發明之組合物可用於調節個體的免疫反應。在一具體實例中，本發明之組合物可調節細胞激素之產生，例如，提升個體的 IL-12、IL-10 或 IFN- γ 的產生，以及抑制個體的 IL-4、IL-5 或 IL-13 的產生。在另一具體實例中，本發明之組合物可調節個體的免疫球蛋白之產生，例如，提升個體的 IgG2a 及抑制 IgE 的產生。因此，本發明之組合物可促使個體之免疫反應趨向於 Th1 免疫反應，抑制 Th2 免疫反應，有助於對抗病菌感染及降低過敏反應。

另，本發明之組合物尚可抑制個體呼吸道阻力的產生及/或降低肺部發炎，可用以治療氣喘。本發明之組合物也可用以治療過敏性鼻炎。

在又一具體實例中，本發明之組合物可提升個體的 IgA 的產生，具提升個體腸道免疫力之功效。

本發明之組合物還可用於對抗腸道致病菌的感染，包括但不限於沙門氏菌及大腸桿菌。

典型地，本發明之組合物包含有效量之乳酸菌株，以達此處所述功效。該有效量可視各種因素而變動，例如，投用途徑、個體的體重及種類，以及投予目的。技藝人士可根據此處的揭示及此技藝已建立的方法依經驗決定個案的劑量。較佳地，本發明之組合物含有 10^8 cfu 以上之乳酸菌株。在一具體實例中，本發明之組合物含有 10^9 - 10^{12} cfu 之乳酸菌株；特定而言，本發明之組合物含有 2.5×10^9 - 5×10^{11} cfu 之乳酸菌株；更特定而言，本發明之組合物含有 5×10^9 cfu 之乳酸菌株（cfu 代表菌落形成單位（colony-forming unit））。

為有利於達到所述功效及/或傳輸目的，本發明的組合物可進一步與生理上可接受的載劑調配成所需形式。此處「生理上可接受的載劑」係指該載劑與本發明組合物內所含有效成分相容，其較佳為能穩定該活性成分並且對欲投予的個體或欲施用的環境無害。本發明之組合物可利用各種已知的常規方法與適當載劑調配成所需形式。

生理上可接受的載劑之實例包括但不限於賦形劑或稀釋劑，例如，羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、滑石、葡聚糖、乳糖、蔗糖、甘露醇及其類似物；黏結劑，例如，阿拉伯膠、海藻酸鈉、乙基纖維素、洋菜、明膠、澱粉、羥基纖維素、羥丙基纖維素及其類似物；潤滑劑，包括硬脂酸、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、滑石、氫化油、蠟及其類似物；濕潤劑；乳化和懸浮劑等。

本發明組合物的形式可為錠劑、丸劑、粉末、糖錠、片劑、懸浮液、乳劑、溶劑、糖漿、及軟和硬明膠膠囊。在一特定實

施中，本發明的組合物係粉末形式。在另一特定實施中，本發明的組合物係膠囊形式。此外，本發明組合物較佳以口服方式投予。

本發明之組合物可被製成藥物或食品，例如，優格、乳酪及乳酸菌粉等。本發明之組合物亦可包括其他添加物，包括但不限於，抗氧化劑，例如，生育醇、二丁基羥基甲苯、丁基羥基甲氧苯、抗壞血酸；甜味劑，例如，甜菊糖、代糖、糖精；著色劑，例如，甜菜紅、梔子藍、姜黃素；以及防腐劑，例如，鈉苯酸鹽、亞硫酸鹽、苯甲酸、己二稀酸等。

在一具體實例中，本發明之組合物進一步包括一或多種其他抗過敏藥物，包括但不限於抗組織胺、去充血劑及抗發炎藥物（如，白三烯素拮抗劑、類固醇、肥大細胞穩定劑、色甘酸鈉、酮替芬等）。

本發明亦提供一種套組，其包括一或多個第一劑量單位，其包括有效量的本發明的乳酸菌株，以及一或多個第二劑量單位，其包括有效量的其他抗過敏藥物。特定而言，其中的乳酸菌株可與抗過敏藥物同時使用或依序先後使用。

本發明亦包括一種於所需個體調節免疫反應、提升腸道免疫力、抑制免疫反應、治療氣喘或過敏性鼻炎、或對抗腸道致病菌感染的方法，其包括將有效量的所述乳酸菌株投與至該個體中。在一實例中，所述乳酸菌株是 MP137 菌株。在另一實例中，所述乳酸菌株是 MP108。較佳地，所述乳酸菌株係以口服投與至所需個體中。在本發明之方法中，服用劑量可視需要予以調整。較佳地，服用劑量為每日 10^8 cfu 以上之乳酸菌株。在一具體實例中，服用劑量為每日 10^9 - 10^{12} cfu 之乳酸菌株；在另一具體實例中，服用劑量為每日 2.5×10^9 - 5×10^{11} cfu 之乳酸菌株；在又一具體實例中，服用劑量為每日 5×10^9 cfu 之乳酸菌株。

本領域具通常知識者可基於本文揭示的內容，使用任何習知方法及技術依需要調配本發明之組合物。

本發明將由下列實例做進一步的說明，但實際發明並不侷限於此說明書所陳述之實例。

實例 1：菌株之分離及培養

採集台灣健康幼兒糞便檢體，於 37°C 下，以乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) 選擇性培養基的 Rogosa 平板培養基培養 48 至 72 小時，培養得乳酸桿菌疑似菌株的各菌落。取該培養物塗布於 MRS 平板上，於 37°C 下厭氧培養 48 至 72 小時，挑選生長於平板上之單一菌落進一步純化，並依實例 2 之敘述進行菌株鑑定，獲得分離菌株 MP137 及 MP108。

將分離菌株接種於 MRS 平板上，厭氧培養 48 至 72 小時後，挑取單一菌落接種至新鮮 MRS 培養液中，待菌株生長狀況良好（肉眼可判斷的濁度），再取 1% 菌液轉移至另一新鮮 MRS 培養液中，於適合溫度培養 18 至 24 小時，重複該步驟活化菌體二次，培養所得菌液供進行後續試驗。

實例 2：菌株鑑定

2.1 初步分析

依標準方式進行初步分析，結果顯示本發明之分離菌株 MP137 及 MP108 為革蘭氏陽性桿菌（圖 1 及 2），且不具觸酶、氧化酶及運動性，不產生內生孢子，於好氧及厭氧環境下皆會生長。

2.2 16S rDNA PCR 分析

針對本發明之分離菌株 MP137 及 MP108 進行 16S rDNA PCR 分析。使用商業套組（AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit, Anxygen Bioscience）抽取菌株之基因組 DNA 作為模版，在 PCR 離心管中添加正反引子（16S-F：GGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 1)；及 16S-R2：AAGGAGGTGAT CCAGCCGCA (SEQ ID NO: 2)）、DNA 聚合酶、緩衝液、dNTPs 等試劑，含量如下：

基因組 DNA	1-2 μ L (100ng)
---------	---------------------

Taq DNA 聚合酶(Takara Co.)	0.5 μ L
10x 緩衝液	10 μ L
dNTP 混合物(2.5mM)	8 μ L
正向引子 16S-F (100 μ M)	1 μ L
反向引子 16S-R2 (100 μ M)	1 μ L
H ₂ O	77.5 μ L
總體積	100 μ L

16S rDNA PCR 反應條件包括步驟 1：95°C，3 分鐘；步驟 2：95°C，30 秒；60°C，30 秒，72°C，45 秒，進行 30 個循環；以及步驟 3：72°C，10 分鐘，最後置於 4°C 終止反應。PCR 反應結束後，以瓊脂膠體電泳分析 PCR 產物，再將含有預測大小的 PCR 產物片段之膠體切下，以商業套組 Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Co.) 純化，再進行定序分析。

將由定序所得 DNA 序列，經由商業上可獲得的電腦程式 (Vector NTI 之 config 程式，Invitrogen Co.) 整理組合，得到正確的 DNA 序列，再傳送到 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 網站上，以核苷酸 BLAST 程式進行比對分析，選取 16S rDNA 序列比對相似度最高的菌種名稱做為菌株的初步鑑定結果。

圖 3 及 4 顯示分離菌株 MP137 及 MP108 之 16S rDNA 部分序列 (SEQ ID NO: 3 及 SEQ ID NO: 4)。比對結果顯示，分離株 MP108 最接近鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、玉米乳桿菌 (*Lactobacillus zeae*)、凱氏乳桿菌 (*Lactobacillus casei*)、酪乳桿菌副乾酪亞種 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) 與類乾酪乳桿菌堅韌亞種 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*)，相似性達 98% 以上；而分離株 MP137 最接近酪乳桿菌副乾酪亞種、類乾酪乳桿菌堅韌亞種、玉米乳桿菌、凱氏乳桿菌與鼠李糖乳酸桿菌，相似性達 98% 以上。

2.3 API 50 CHL 系統鑑定

此外，亦針對本發明之分離菌株 MP137 及 MP108 進行 API 50 CHL 系統鑑定，表 1 及 2 分別顯示分離菌株 MP137 及 MP108 之生理生化測試結果。

根據 API 鑑定系統分析結果，在 49 個測試項目中，分離菌株 MP137 與標準菌株酪乳桿菌副乾酪亞種 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*) BCRC 12248^T 接近，符合的項目有 43 項 (表 1)。

表 1 分離菌株 MP137 之 API 鑑定系統分析結果

API 50 CHL	MP137	酪乳桿菌副乾酪亞種 (<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>) BCRC 12248 ^T
1. 甘油	—	—
2. 赤蘚糖醇 (Erythritol)	—	—
3. D-阿拉伯糖	—	—
4. L-阿拉伯糖	—	—
5. D-核糖	+	+
6. D-木糖	—	—
7. L-木糖	—	—
8. D-側金盞花醇 (Adonitol)	—	—
9. β -甲基-木糖苷	—	—
10. D-半乳糖	+	+
11. D-葡萄糖	+	+
12. D-果糖	+	+
13. D-甘露糖	+	+
14. L-山梨糖	+	—
15. L-鼠李糖	—	—
16. 衛矛糖醇 (Dulcitol)	—	—
17. 肌醇	—	—

18. D-甘露醇	+	+
19. D-山梨醇	+	—
20. α -甲基-D-甘露糖苷	—	—
21. α -甲基-D-葡萄糖苷	—	—
22. N-乙酰葡萄糖胺	+	+
23. 苦杏仁苷 (Amygdalin)	—	+
24. 熊果素 (Arbutin)	+	+
25. 七葉苷 (Esculin)	+	+
26. 水楊苷	+	+
27. D-纖維雙糖	+	+
28. D-麥芽糖	+	+
29. D-乳糖	+	+
30. D-蜜二糖	—	—
31. D-蔗糖	+	—
32. D-海藻糖	+	+
33. 菊糖	+	—
34. D-松三糖 (Melezitose)	+	+
35. D-棉子糖 (Raffinose)	—	—
36. 美沙酮 (Amidon)	—	—
37. 肝糖	—	—
38. 木糖醇	—	—
39. 龍膽二糖 (Gentiobiose)	+	+
40. D-松二糖 (Turanose)	+	+
41. D-來蘇糖 (Lyxose)	—	—
42. D-太格糖 (Tagatose)	+	+
43. D-岩藻糖	—	—
44. L-岩藻糖	—	—
45. D-阿拉伯糖醇	—	—
46. L-阿拉伯糖醇	—	—
47. 葡萄糖酸	—	+

48. 2-酮基-葡萄糖酸	—	—
49. 5-酮基-葡萄糖酸	—	—
49 項試驗中符合的項目	43	

此外，根據 API 鑑定系統分析結果，在 49 個測試項目中，分離株 MP108 與標準菌株鼠李糖乳酸桿菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) BCRC 10940^T 接近，符合的項目有 44 項 (表 2)。

表 2 分離株 MP108 之 API 鑑定系統分析結果

API 50 CHL	MP108	鼠李糖乳酸桿菌 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i>) BCRC 10940 ^T
1. 甘油	—	—
2. 赤蘚糖醇 (Erythritol)	—	—
3. D-阿拉伯糖	—	—
4. L-阿拉伯糖	—	—
5. D-核糖	+	+
6. D-木糖	—	—
7. L-木糖	—	—
8. D-側金盞花醇 (Adonitol)	—	—
9. β-甲基-木糖苷	—	—
10. D-半乳糖	+	+
11. D-葡萄糖	+	+
12. D-果糖	+	+
13. D-甘露糖	+	+
14. L-山梨糖	+	+
15. L-鼠李糖	+	+
16. 衛矛糖醇 (Dulcitol)	—	—
17. 肌醇	—	—
18. D-甘露醇	+	+

19. D-山梨醇	+	+
20. α -甲基-D-甘露糖苷	—	—
21. α -甲基-D-葡萄糖苷	+	+
22. N-乙醯葡萄糖胺	+	+
23. 苦杏仁苷 (Amygdalin)	—	+
24. 熊果素 (Arbutin)	+	+
25. 七葉苷 (Esculin)	+	+
26. 水楊苷	+	+
27. D-纖維雙糖	—	+
28. D-麥芽糖	+	+
29. D-乳糖	+	+
30. D-蜜二糖	—	—
31. D-蔗糖	+	—
32. D-海藻糖	+	+
33. 菊糖	—	—
34. D-松三糖 (Melezitose)	—	+
35. D-棉子糖 (Raffinose)	—	—
36. 美沙酮 (Amidon)	—	—
37. 肝糖	—	—
38. 木糖醇	—	—
39. 龍膽二糖 (Gentiobiose)	+	+
40. D-松二糖 (Turanose)	+	+
41. D-來蘇糖 (Lyxose)	—	—
42. D-太格糖 (Tagatose)	+	+
43. D-岩藻糖	—	—
44. L-岩藻糖	—	—
45. D-阿拉伯糖醇	—	—
46. L-阿拉伯糖醇	—	—
47. 葡萄糖酸	+	—
48. 2-酮基-葡萄糖酸	—	—

綜合上述結果顯示，本發明之分離株 MP108 屬於鼠李糖乳酸桿菌，分離株 MP137 則為酪乳桿菌副乾酪亞種。

實例 3：免疫調節分析

3.1 細胞實驗

3.1.1 熱殺死菌體液之製備

取前述分離株 MP108 及 MP137 之培養菌液，裝入離心管中，置於水浴鍋煮沸加熱 30 分鐘，製備成熱殺死菌體液。菌體液濃度為 1×10^{10} cfu/ml，置於 4°C 供後續實驗使用。

3.1.2 $CD3^+$ T 細胞之純化

收集健康人體的靜脈血液約 100 ml，取 25 ml 稀釋後血液緩慢加入裝有 20 ml 聚蔗糖-泛影葡胺（Ficoll-Hypaque）的離心管，離心 400xg、40 分鐘，利用密度差異，將周邊血液單核球細胞分離出來，再用磷酸緩衝液清洗，並計算細胞數量。將人類周邊血液分離出的周邊血液單核白血球（PBMCs）依適當比例加入 MACS 緩衝液及 $CD3^+$ 微珠，4°C 靜置 15 分鐘後，加入 10-20 ml MACS 緩衝液離心 300xg，10 分鐘，洗去多餘微珠，最後，用少量 MACS 緩衝液回溶細胞，準備開始純化。先以 MACS 緩衝液 3 ml 潤濕 MACS 管柱，待緩衝液滴乾後，加入需純化的細胞，滴乾後再用 3 ml MACS 緩衝液沖洗管柱，可分別得到 $CD3^-$ 及 $CD3^+$ 的細胞，其中 $CD3^+$ 的細胞用含 2% 血清之 RPMI-1640 培養液回溶，加入 10% DMSO 將細胞凍在液態氮中保存、 $CD3^-$ 的細胞則可繼續用在樹突細胞的培養。

3.1.3 人類樹突細胞之培養

將純化 T 細胞剩下的 $CD3^-$ 細胞使用含有 10% 血清的

RPMI-1640 培養液來培養，並另外加入 800 U/ml 重组人類粒細胞巨噬細胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 和 400 U/ml 重组人類 IL-4 來促使單核球分化成未成熟樹突細胞。將細胞培養在 5% CO₂、37°C 培養箱 6 到 7 天，然後將這些懸浮細胞自培養盤沖下，可得到純度約 95% 的樹突細胞。

3.1.4 菌體樣本對於人類樹突細胞免疫功能的調節

收集前述樹突細胞，計算細胞數。調整菌體樣本和樹突細胞之細胞數比例為 1:1、10:1 或 100:1，並以脂多糖 (LPS) 100 ng/ml 當作陽性對照組，培養 48 小時後收下培養液，以酵素免疫分析法 (ELISA, eBioscience 商業試劑) 測量樹突細胞所分泌的 IL-10 及 IL-12 含量。使用其他乳酸菌作為對照，包括加氏乳酸桿菌 (*L. gasseri*)、約氏乳酸桿菌-1 (*L. johnsonii*-1) 及約氏乳酸桿菌-2 (*L. johnsonii*-2)。

結果以平均值樣本分佈的標準差 (Mean±SEM) 表示，*p<0.05 表示有顯著差異，**p<0.01 表示有非常顯著之差異。統計方式為非成對 t 檢定。

表 3：菌體樣本刺激樹突細胞分泌之 IL-12 量

菌株	IL-12 (pg/ml)		
	1:1	10:1	100:1
MP137	502±283	3402±996**	8310±3276*
MP108	79±30*	1186±509*	6346±3411
加氏乳酸桿菌	3±1	69±50	1888±1048
約氏乳酸桿菌-1	7±5	43±31	692±318*
約氏乳酸桿菌-2	8±8	105±70	374±193
NC	0±0		
LPS	4001±941**		

NC 表示培養液對照組，與 NC 比較，若 * p<0.05，** p<0.01 代表有統計上意義。

表 4：菌體樣本刺激樹突細胞分泌之 IL-10 量

菌株	IL-10 (pg/ml)		
	1:1	10:1	100:1
MP137	228±306	695±293**	1171±356**
MP108	139±195	457±311*	1063±355**
加氏乳酸桿菌	66±93	233±368	795±435*
約氏乳酸桿菌-1	64±50	101±149	834±381*
約氏乳酸桿菌-2	37±19	256±148	862±268**
NC	11±1		
LPS	687±318*		

NC 表示培養液對照組，與 NC 比較，若* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ 代表有統計上意義。

表 5：菌體樣本刺激樹突細胞產生 IL-12 與 IL-10 分泌量之比值

菌株	IL-12/IL-10 比例		
	1:1	10:1	100:1
MP137	2.19±0.68**	5.18±1.91*	12.07±6.22*
MP108	1.01±0.38*	2.08±0.95*	6.41±2.94*
加氏乳酸桿菌	0.04±0.02	0.32±0.11*	2.54±0.81**
約氏乳酸桿菌-1	0.11±0.09	0.16±0.05**	1.01±0.50*
約氏乳酸桿菌-2	0.07±0.07	0.32±0.10**	0.50±0.18*
NC	0.00±0.00		
LPS	13.71±7.35*		

NC 表示培養液對照組，與 NC 比較，若* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ 代表有統計上意義。

如表 3 至 5 顯示，本發明之分離株 MP137 及 MP108 可刺激樹突細胞產生較多 IL-12 及 IL-10，顯示可促成 Th1 反應及誘發調節性 T 細胞 (Treg) 的生成，且 IL-12/IL-10 的比值較

高，表示 Th1 反應強於 Treg 反應。

3.1.5 菌株藉由樹突細胞影響 T 細胞之免疫功能

接著，進一步確認菌株藉由樹突細胞影響 T 細胞之免疫功能，分析 IFN- γ 、IL-10 及 IL-4 之分泌量。

樹突細胞與各菌株共同刺激 48 小時，將這些樹突細胞利用 γ -射線處理以停止其增生能力，將細胞數調整為 1×10^4 細胞/槽，同時將先前準備好的 CD3⁺T 細胞數調整為 1×10^5 細胞/槽，將兩種細胞共同培養 48 小時，收集細胞之上清液，利用酵素免疫分析套組（ELISA，eBioscience 商業試劑）來測定細胞激素 IFN- γ 、IL-10 及 IL-4 之分泌量，其中以絲裂原（植物血球凝集素，PHA 10 μ g/ml）的刺激作為對照組，亦使用其他乳酸菌作為對照組，包括加氏乳酸桿菌、約氏乳酸桿菌-1 及約氏乳酸桿菌-2。統計方式與前述相同。

表 6：菌株影響的樹突細胞刺激 T 細胞產生 IFN- γ 的情形

菌株	IFN- γ (pg/ml)	
	1:1	10:1
MP137	37 \pm 16*	212 \pm 160
MP108	27 \pm 6**	38 \pm 13*
加氏乳酸桿菌	8 \pm 1*	6 \pm 2
約氏乳酸桿菌-1	10 \pm 4	7 \pm 2
約氏乳酸桿菌-2	3 \pm 2	12 \pm 9
NC	2 \pm 1	
T	7 \pm 6	
DC	2 \pm 1	
T+PHA	43 \pm 21*	

NC 表示培養液對照組，T 表示只有 T 細胞，DC 表示樹突細胞，T+PHA 表示 T 細胞加上植物血球凝集素。與 NC 比較，若* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 代表有統計上意義。

表 7：菌株影響的樹突細胞刺激 T 細胞產生 IL-10 的情形

菌株	IL-10 (pg/ml)	
	1:1	10:1
MP137	43±2*	33±14
MP108	21±3**	16±1**
加氏乳酸桿菌	8±2	7±1
約氏乳酸桿菌-1	9±1	9±1
約氏乳酸桿菌-2	8±1	8±1
NC	7±2	
T	5±1	
DC	6±1	
T+PHA	34±12*	

NC 表示培養液對照組，T 表示只有 T 細胞，DC 表示樹突細胞，T+PHA 表示 T 細胞加上植物血球凝集素。與 NC 比較，若* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ 代表有統計上意義。

表 8：菌株影響的樹突細胞刺激 T 細胞產生 IL-4 的情形

菌株	IL-4 (pg/ml)	
	1:1	10:1
MP137	1±1	1±1
MP108	1±1	1±1
加氏乳酸桿菌	2±2	1±1
約氏乳酸桿菌-1	3±3	5±3
約氏乳酸桿菌-2	1±1	1±1
NC	2±2	
T	4±4	
DC	1±1	
T+PHA	12±3*	

NC 表示培養液對照組，T 表示只有 T 細胞，DC 表示樹突細胞，T+PHA 表示 T 細胞加上植物血球凝集素。與 NC 比較，若* $p<0.05$ ，** $p<0.01$

代表有統計上意義。

表 9：菌株影響樹突細胞刺激 T 細胞產生 IFN- γ 與 IL-10 分泌量之比值

菌株	IFN- γ /IL-10 比例	
	1:1	10:1
MP137	3.76 \pm 1.75*	7.61 \pm 5.02
MP108	1.54 \pm 0.31**	2.61 \pm 0.94*
加氏乳酸桿菌	1.01 \pm 0.24*	0.87 \pm 0.36
約氏乳酸桿菌-1	1.18 \pm 0.53	0.77 \pm 0.26
約氏乳酸桿菌-2	0.42 \pm 0.28	1.78 \pm 1.36
NC	0.31 \pm 0.15	
T	0.22 \pm 0.13	
DC	0.23 \pm 0.15	
T+PHA	2.39 \pm 1.28*	

NC 表示培養液對照組，T 表示只有 T 細胞，DC 表示樹突細胞，T+PHA 表示 T 細胞加上植物血球凝集素。與 NC 比較，若* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 代表有統計上意義。

如表 6 至 9 顯示，本發明之分離株 MP137 及 MP108 可影響樹突細胞刺激 T 細胞分泌 IFN- γ 及 IL-10，但 IL-4 表現量都很低，表示可促成 T 細胞走向 Th1 反應及刺激 IL-10 分泌，抑制 Th2 反應。

3.2 動物實驗

3.2.1 菌粉之製備

將測試菌之培養菌液予以離心後，去掉上清液，留下菌體部分，加入適當保護劑，置於-80°C 預凍隔夜。再將樣本置入凍乾機進行冷凍乾燥，獲得菌粉，包括本發明之 MP137 菌粉 (3.2×10^{11} cfu/g) 與 MP108 菌粉 (1.8×10^{11} cfu/g)。

3.2.2 動物來源及管餵處理

選用 Balb/c 雌鼠，於臺北醫學大學動物房代養。共分 10 組小鼠，每組小鼠分開飼養於籠中，自由攝食飲水及飼料。以管餵方式額外給予菌粉樣本，每週五天；管餵六週後則予以犧牲，以進行各項調節過敏免疫反應之功效性評估試驗。

依據實驗動物與人體表面積比等效劑量換算出小鼠所需管餵劑量為 2.6×10^8 cfu / 次 / 小鼠，一天餵食一次，此劑量為 1 倍之劑量，稱為 1 倍劑量組，亦進行 0.5 倍劑量組、5 倍劑量組以及對照組，各劑量組說明如下：

- 0.5 倍劑量組： 每天管餵 0.2 ml 含 1.3×10^8 cfu 的菌量之菌粉（相當於成人劑量 5×10^{10} ）；
- 1 倍劑量組： 每天管餵 0.2 ml 含 2.6×10^8 cfu 的益生菌量之菌粉（相當於成人劑量 1×10^{11} ）；
- 5 倍劑量組： 每天管餵 0.2 ml 含 1.3×10^9 cfu 的益生菌量之菌粉（相當於成人劑量 5×10^{11} ）；及
- 對照組： 每天同樣以管餵操作，管餵同體積 0.2 ml 的無菌蒸餾水。

*小鼠與人體表面積之比值為 0.0026，70 公斤體重的成人每日攝食 1 公克之試驗物質，相當於 20 公克小鼠每日餵食 0.0026 公克之劑量。

3.2.3 建立對卵白蛋白 (OVA) 過敏的氣喘動物模式

每隔兩週對小鼠進行腹腔注射，給予 OVA 抗原以及佐劑所混合的溶液。期間會進行眼角採血，將血液離心 12,000 rpm、5 分鐘後收集血清，保存在 -20°C 以進行後續抗體的酵素免疫分析法分析。管餵菌粉樣本六週後，給予小鼠吸入性 OVA 抗原刺激。之後犧牲小鼠採集肺沖洗液及脾臟細胞，並進行肺沖洗液中細胞激素以及脾臟之細胞激素的分泌量等檢測。圖 5 顯示小鼠試驗流程。

3.2.4 體重檢測

在動物試驗期間，每隔兩週記錄小鼠體重增減狀況，以評估飼食益生菌對小鼠生長的影響。表 10 為記錄結果。

表 10：小鼠體重測量結果

	第 0 週	第 2 週	第 4 週	第 6 週
對照組	19.31 ± 0.23	19.12 ± 0.54	20.15 ± 0.15	21.42 ± 0.35
<i>MP108</i>				
0.5 倍	18.89 ± 0.33	19.00 ± 0.34	20.82 ± 0.16	22.83 ± 0.40
1 倍	19.98 ± 0.47	20.17 ± 0.53	21.65 ± 0.54	23.08 ± 0.40
5 倍	19.93 ± 0.23	20.00 ± 0.45	21.42 ± 0.35	22.83 ± 0.36
<i>MP137</i>				
0.5 倍	19.01 ± 0.43	19.42 ± 0.52	21.02 ± 0.48	22.00 ± 0.41
1 倍	19.53 ± 0.34	19.92 ± 0.33	21.73 ± 0.33	22.33 ± 0.48
5 倍	19.15 ± 0.48	19.50 ± 0.37	21.13 ± 0.30	21.92 ± 0.35

結果顯示，與對照組相較，飼食本發明之分離株的菌粉不會影響小鼠體重，無影響小鼠食慾或導致體重減輕之虞。

3.2.5 血液中性異性免疫球蛋白濃度測定

於建立小鼠動物模式的過程中在不同的時間點分別進行眼角採血，測量血清中抗 OVA 抗原之 IgA、IgE、IgG2a 的抗體效價。抗體的測定將以 ELISA 試劑來做檢測，以 ELISA 測讀儀測吸光值計算出各抗體濃度。表 11 至 13 顯示測定結果。

表 11：小鼠血清中抗 OVA 抗原之 IgA 含量測定結果

	第 0 週	第 1 週	第 3 週	第 5 週
對照組	0.046 ± 0.005	0.062 ± 0.008	0.145 ± 0.046	0.345 ± 0.078
<i>MP108</i>				
0.5 倍	0.045 ± 0.004	0.113 ± 0.011	0.666 ± 0.146^a	0.873 ± 0.044^b
1 倍	0.042 ± 0.001	0.098 ± 0.002	0.717 ± 0.214^b	1.150 ± 0.146^b
5 倍	0.047 ± 0.010	0.084 ± 0.003	0.463 ± 0.053	0.710 ± 0.056

MP137

0.5 倍	0.047 ± 0.003	0.089 ± 0.005	0.648 ± 0.119^a	0.798 ± 0.215^a
1 倍	0.049 ± 0.004	0.100 ± 0.008	0.554 ± 0.101	0.730 ± 0.072
5 倍	0.047 ± 0.006	0.086 ± 0.019	0.378 ± 0.046	0.697 ± 0.057

a、b 及 c 表示與對照組相比有統計上的意義 (a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$)。

由表 11 可知，小鼠在餵食本發明之分離株的菌粉後，體內對於 OVA 抗原之特異性 IgA 抗體的產量有顯著增加，表示有提升腸道免疫力之效果。

表 12：小鼠血清中抗 OVA 抗原之 IgE 含量測定結果

	第 0 週	第 1 週	第 3 週	第 5 週
對照組	0.001 ± 0.0005	0.045 ± 0.005	0.057 ± 0.007	0.348 ± 0.126

MP108

0.5 倍	0.002 ± 0.0004	0.043 ± 0.005	0.014 ± 0.002^b	0.082 ± 0.026^b
1 倍	0	0.030 ± 0.005	0.017 ± 0.004^b	0.065 ± 0.017^b
5 倍	0	0.016 ± 0.006^a	0.017 ± 0.004^b	0.057 ± 0.023^b

MP137

0.5 倍	0.0002 ± 0.0002	0.023 ± 0.006	0.021 ± 0.003^b	0.115 ± 0.038^a
1 倍	0	0.020 ± 0.008	0.013 ± 0.004^b	0.128 ± 0.062^a
5 倍	0.0002 ± 0.0002	0.012 ± 0.004^b	0.014 ± 0.004^b	0.105 ± 0.039^a

a、b 及 c 表示與對照組相比有統計上的意義(a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$)。

由表 12 可知，小鼠在餵食本發明之分離株的菌粉後，體內對於 OVA 抗原之特異性 IgE 抗體的產生受到抑制，表示有抑制過敏反應的效果。

表 13：小鼠血清中抗 OVA 抗原之 IgG2a 含量測定結果

	第 0 週	第 1 週	第 3 週	第 5 週
對照組	0.002 ± 0.0005	0.003 ± 0.0007	0.134 ± 0.102	0.232 ± 0.090

MP108

0.5 倍	0.001 ± 0.0005	0.209 ± 0.014^a	0.695 ± 0.033^b	0.604 ± 0.043^b
-------	----------------	----------------------------------	----------------------------------	----------------------------------

1 倍	0.002 ± 0.0004	0.180 ± 0.028	0.797 ± 0.070 ^b	0.690 ± 0.056 ^b
5 倍	0.003 ± 0.0005	0.192 ± 0.074	0.692 ± 0.063 ^b	0.697 ± 0.066 ^b
<hr/>				
<i>MP137</i>				
0.5 倍	0.002 ± 0.0006	0.221 ± 0.080 ^a	0.692 ± 0.073 ^b	0.605 ± 0.038 ^b
1 倍	0.003 ± 0.0002	0.175 ± 0.041	0.692 ± 0.063 ^b	0.499 ± 0.080 ^a
5 倍	0.002 ± 0.0005	0.182 ± 0.064	0.578 ± 0.112 ^b	0.571 ± 0.076 ^b

a、b 及 c 表示與對照組相比有統計上的意義 (a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$)。

由表 13 可知，小鼠在餵食本發明之分離株的菌粉後，體內對於 OVA 抗原之特異性 IgG2a 抗體的產量有顯著增加，表示有促進小鼠體內 Th1 細胞免疫反應的效果。

3.2.6 小鼠肺沖洗液中 IL-13 含量測定

收集肺沖洗液以 ELISA 偵測肺沖洗液中的 IL-13 含量。分別取抗細胞激素之抗體溶於緩衝液中，置於室溫隔夜，隔天用洗滌緩衝液沖洗，加入填充緩衝液在室溫下靜置 2 小時，然後用洗滌緩衝液沖洗，加入待測之肺沖洗液在室溫下作用，接著用洗滌緩衝液沖洗，加入生物素聯結的抗細胞激素之抗體，室溫下靜置 2 小時後，用洗滌緩衝液沖洗，再加入酵素於室溫下作用，之後用洗滌緩衝液沖洗，最後加入呈色劑呈色，以 ELISA 測讀儀測特定波長吸光值來換算出待測液所含之濃度。表 14 顯示測定結果。

表 14：小鼠肺沖洗液中 IL-13 含量測定結果。

	IL-13(pg/ml)
對照組	676.2±75.06
<hr/>	
<i>MP108</i>	
0.5 倍	413.8±42.0 ^b
1 倍	330.6±49.8 ^c
5 倍	488.4±21.0 ^a
<hr/>	
<i>MP137</i>	

0.5 倍	519.3±46.88
1 倍	517.8±16.78
5 倍	405.2±107.14^c

a、b 及 c 表示與對照組相比有統計上的意義 ($a, p < 0.05$; $b, p < 0.01$; $c, p < 0.001$)。

由表 14 可知，小鼠在餵食本發明之分離株的菌粉後，可顯著降低肺沖洗液中 IL-13 的分泌量，表示 Th2 反應受到抑制。

3.2.7 小鼠脾臟細胞之細胞激素分泌測定

犧牲小鼠後將脾臟取出並製備成單一細胞懸浮液，更進一步利用緩衝液將紅血球去除，而白血球則利用 HBSS 溶液清洗後再進行下一步的實驗。將分離出的細胞調好適當的濃度後，置於培養盤中，利用已經定量過的過敏原來刺激這些淋巴球。經過 96 小時的培養後將上層液離心下來以測定其細胞激素 IL-5 製造的量。

表 15：小鼠脾臟細胞（PHA 刺激）之細胞激素分泌含量測定結果

	IL-5 (pg/ml)
對照組	76.8±10.46
<i>MP108</i>	
0.5 倍	59.2±5.71
1 倍	47.2±7.09 ^a
5 倍	19.2±4.27 ^c
<i>MP137</i>	
0.5 倍	39.33±7.55 ^a
1 倍	40.8±12.09
5 倍	36.0±9.88 ^a

a、b 及 c 表示與對照組相比有統計上的意義 ($a, p < 0.05$; $b, p < 0.01$; $c, p < 0.001$)。

由表 15 可知，小鼠在餵食本發明之分離株的菌粉後，脾

臟細胞的 IL-5 分泌量顯著降低，表示 Th2 反應受到抑制。

3.2.8 小鼠呼吸道阻力變化測定

小鼠餵食 MP108 菌粉，餵食劑量如 3.2.2 段落所示。小鼠在六週後麻醉，以氣切方式插管，經由管路給予小鼠吸入含有不同濃度氯化乙醯甲膽鹼（methacholine）的霧化氣體引發氣喘，並同時記錄呼吸阻力變化情形。

結果以相對阻力表示如下：

$$\text{相對阻力} = (\text{氯化乙醯甲膽鹼之阻力} - \text{管壁阻力}) / (\text{食鹽水的阻力} - \text{管壁阻力})$$

結果如圖 6 (A) 所示，餵食生理食鹽水致敏小鼠之呼吸道阻力隨著吸入氯化乙醯甲膽鹼劑量增加而上升，餵食 1 倍劑量的 MP108 菌粉的小鼠之呼吸道阻力在 100 mg/ml 氯化乙醯甲膽鹼刺激下與餵食生理食鹽水組比較顯著較低，餵食 5 倍劑量 MP108 菌粉的小鼠其呈現出來的呼吸道阻力則是非常顯著地較低，甚至低於未被致敏（naïve）的小鼠的呼吸道阻力（*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ ）。

另以 MP137 菌粉進行小鼠吸道阻力測試，餵食劑量如下：

0.5 倍劑量組： 每天管餵 0.2 ml 含 6.5×10^6 cfu 的菌量之菌粉（相當於成人劑量 2.5×10^9 ）；

1 倍劑量組： 每天管餵 0.2 ml 含 1.3×10^7 cfu 的益生菌量之菌粉（相當於成人劑量 5×10^9 ）；

5 倍劑量組： 每天管餵 0.2 ml 含 6.5×10^7 cfu 的益生菌量之菌粉（相當於成人劑量 2.5×10^{10} ）；及

對照組： 每天同樣以管餵操作，管餵同體積 0.2 ml 的無菌蒸餾水。

*小鼠與人體表面積之比值為 0.0026，70 公斤體重的成人每日攝食 1 公克之試驗物質，相當於 20 公克小鼠每日餵食 0.0026 公克之劑量。

此實驗利用 Buxco 系統以非侵入性的操作下，測量小鼠呼

吸道的阻力變化。阻力變化由電腦分析並根據收集小鼠呼吸道變化的測量數據作數學運算而得，結果以指標（Penh 值）表示： $\text{Penh 值} = \text{間隔 (pause)} \times \text{PIF} / \text{PEF}$ ； $\text{間隔} = (\text{Te} - \text{Tr}) / \text{Tr}$ （PIF：最高吸氣流速（peak inspiratory flow）；PEF：最大呼氣流速（peak expiratory flow rate））。刺激小鼠呼吸道的方式為先使小鼠接受生理食鹽水的刺激，再依序接受濃度由低往高的氯化乙醯甲膽鹼（6.25、12.5、25、50 以及 100mg/mL），各濃度刺激 3 分鐘後記錄呼吸道生理變化，以及平均 Penh 值。

結果如圖 6（B）所示，在水對照組小鼠的呼吸道功能指標數值隨著吸入氯化乙醯甲膽鹼劑量增加而上升。與水對照組的過敏小鼠相較發現餵食 0.5 倍、1 倍及 5 倍劑量的小鼠，其 Penh 值較低，表示呼吸道受阻情況獲得改善，尤其可顯著降低給受到 50 以及 100mg/mL 刺激下對小鼠所造成的呼吸道受阻情況。

3.2.9 肺沖洗液中發炎細胞種類分析

此實驗分析餵食 MP137 菌粉對小鼠沖洗液中發炎種類分布的影響，餵食劑量如 3.2.8 段落所示。在接受呼吸道過敏原刺激後，犧牲小鼠進行肺沖洗液的收集。將肺沖洗液離心，上清液取出置於 -20°C 保存。沖洗出來的細胞則用以 cytopspin 儀器將細胞打在波片上後風乾，接著進行劉氏染色，將染劑沖洗後風乾玻片，之後由顯微鏡計數細胞。依據染色結果及細胞型態判斷，將細胞分為四大類：單核球（monocyte）、淋巴球細胞（lymphocyte）、嗜酸性白血球（eosinophil）及嗜中性白血球（neutrophil）。圖 7 顯示分析結果。

結果顯示，在未致敏的小鼠（naïve 組），其肺中因無發炎現象，所以多存在單核球細胞，幾乎無嗜酸性白血球與嗜中性白血球的聚集。而在致敏的小鼠（水對照組），其肺中因有 Th2 細胞主導造成的發炎現象，所以會有明顯的酸性白血球與嗜中性白血球的聚集。將實驗組與水對照組作比較，觀察到有餵食本發明之菌粉的小鼠，嗜酸性白血球與嗜中性白血球浸潤肺中的

情形有減少的趨勢，尤其在 1 倍劑量組有顯著的差異，表示肺部發炎現象獲得改善。

3.3 臨床實驗 (MP108 合併抗組織胺 Zyrtec 療法)

3.3.1 觀察族群

觀察族群為 100 位至基層醫療診所就醫，患有一年以上過敏性鼻炎且鼻塞、流鼻水、咳嗽或喉嚨癢的嚴重度在中度以上的 6-13 歲兒童，但排除以下病症：

- (1) 患有嚴重氣喘；
- (2) 過去三個月內有急性氣喘發作；
- (3) 患有急性或慢性鼻竇炎；
- (4) 過去 10 天內曾用過長效型抗組織胺；
- (5) 過去 3 天用過鼻內或全身性作用的短效型抗組織胺；
- (6) 過去 7 天內用過白三烯素拮抗劑；
- (7) 過去 1 個月內用過鼻內、吸入性或全身性作用的類固醇藥物；
- (8) 過去 3 天內用過去鼻充血劑；及
- (9) 過去 3 個月內用抗敏益生菌。

3.3.2 MP108 抗敏益生菌膠囊

MP108 菌粉依前上述方式產生並製成膠囊，劑量為 5×10^9 cfu/cap。

3.3.2 試驗設計

療程首月（第 0-30 天，治療期）：每日一顆抗組織胺 10mg Zyrtec 加上一顆 MP108 抗敏益生菌膠囊；以及

療程第 2 至 3 個月（30 至 90 天，維持期）：停用抗組織胺，服用每日一顆抗敏益生菌膠囊。

3.3.3 評估項目

病患的評估包括：

(1) 全症狀分數，分為鼻部症狀：流鼻水、鼻塞、鼻子癢、打噴嚏；以及非鼻部症狀：眼睛或耳朵癢、喉嚨癢、眼睛紅、流眼淚。分為 4 個等級如下：

0 = 症狀完全消失。

1 = 輕微（有症狀出現，但不影響個人）。

2 = 中度（症狀明顯，影響個人，但不影響睡眠或生活起居）。

3 = 嚴重（干擾生活起居或睡眠，甚至無法作息）。

(2) 鼻道阻力測試：左側和右側。

(3) 自覺改善程度評估。分為 5 個等級如下：

0 = 大有改善。

1 = 有些改善。

2 = 沒有改善。

3 = 有些惡化。

4 = 明顯惡化。

病患於第 30、60 及 90 天進行上述 (1) 全症狀分數及 (2) 鼻道阻力測試，其中第 60 及 90 天額外進行 (3) 自覺改善程度評估。

3.3.4 試驗結果

本試驗共有 100 名兒童參加，最後共有 59 名完成 3 個月試驗並納入評估。

表 16：

	平均	標準偏差 (S.D.)
年齡	8.76	2.23
	病患數目	%
性別		
女性	18	30.51
男性	41	69.49

診斷		
具有一年以上過敏性 鼻炎病史	59	100
氣喘	16	27.12
異位性皮膚炎	11	18.64

表 17：全症狀分數

	改善幅度	改善人數
鼻部症狀		
第 30 天	37%	48
第 60 天	33%	44
第 90 天	39%	45
非鼻部症狀		
第 30 天	47%	44
第 60 天	44%	42
第 90 天	48%	40
鼻部+非鼻部		
第 30 天	41%	50
第 60 天	37%	48
第 90 天	43%	48

表 17 顯示，在 59 名納入分析的兒童中，參加本試驗三個月後鼻部症狀分數減少 39%，非鼻部症狀分數減少 48%，總症狀分數（鼻部+非鼻部）減少 43%。

表 18：鼻道阻力分數

	改善幅度	改善人數
左側鼻道阻力		
第 30 天	8%	32
第 60 天	26%	42

第 90 天	34%	46
右側鼻道阻力		
第 30 天	24%	39
第 60 天	30%	42
第 90 天	45%	46
平均鼻道阻力		
第 30 天	16%	38
第 60 天	28%	43
第 90 天	39%	49

表 18 顯示，在 59 名納入分析的兒童中，參加本試驗三個月後平均鼻道阻力改善近 40%。

實例 4：對抗腸道致病菌感染之測定分析

本實例以排除 (exclusion) 及置換 (displacement) 實驗測定本發明之分離菌株 MP108 及 MP137 對抗腸道致病菌感染的功效。本實例測試的腸道致病菌包括沙門氏菌 (*Salmonella enterica* subsp. *Enterica*, BCRC10744)，以及大腸桿菌 (*Escherichia coli*, BCRC15372)，並以市售乳酸菌株 (*Lactobacillus casei* variety *rhannosus*, Lcr35 以及 *Lactobacillus acidophilus*, L.a) 作為對照組。

在排除實驗中，將腸道細胞株 Caco-2 細胞 (BCRC 60182) 於培養基 (Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM) 中培養穩定後，加入待測乳酸菌，其中乳酸菌與 Caco-2 細胞之比例為 10:1 (10 MOI, multiplicity of infection)。於 37°C 下共同培養 1.5 個小時後，以磷酸緩衝液 (PBS) 洗去未附著之乳酸菌。接著，加入致病菌感染 Caco-2 細胞，兩者比例為致病菌: Caco-2 細胞為 10:1。繼續於 37°C 下共同培養 1.5 個小時，以 PBS 洗去未附著之菌株後，進行革蘭氏染色，計數附著於 Caco-2 細胞上之致病菌菌數。圖 8 顯示排除實驗的結果，其中 (A) 針對沙門氏菌的實驗結果，以及 (B) 是針對大腸

桿菌的實驗結果。

另，在置換實驗中，培養條件與前述排除實驗相同，但先加入致病菌感染腸道細胞株 Caco-2 細胞（比例為致病菌：Caco-2 細胞=10:1），於 37°C 下共同培養 1.5 個小時後，以 PBS 洗去未附著之致病菌；然後再加入乳酸菌（比例為入乳酸菌：Caco-2 細胞=10:1），繼續於 37°C 下共同培養 1.5 個小時，以 PBS 洗去未附著之菌株後，進行革蘭氏染色，計數附著於 Caco-2 細胞上之致病菌菌數。圖 9 顯示置換實驗的結果，其中（A）針對沙門氏菌的實驗結果，以及（B）是針對大腸桿菌的實驗結果。符號「#」表示相較於對照組有顯著差異 $P<0.05$ ，符號「*」表示兩組比較有顯著差異 $P<0.05$ 。

如圖 8 及 9 顯示，本發明之分離菌株 MP108 及 MP137 可成功抑制或取代腸道致病菌吸附於腸道上，因此具有對抗腸道致病菌感染的功效。

由以上結果證實，本發明分離株 MP108 及 MP137 具有調節免疫功能，可促進 Th1 反應、抑制 Th2 反應、減低過敏、誘發調節性 T 細胞反應、提升腸道免疫力、及降低氣喘個體的呼吸道阻力等效果，亦具有對抗腸道致病菌感染之功效。

熟知技藝之人士將可在不背離本發明精神之下，根據實施例進行改變和修改。要注意的是，本發明並不受限於說明書中實施例所揭露之範圍，而涵蓋於其他根據申請範圍內揭露之所有變化之形式。

【圖式簡單說明】

前文之所述以及實施方式可藉由附加之圖式達到更好的說明效果。為了加強本發明之說明，將適當的實施例之圖式列舉於此。應注意的是，本發明並不受限於列舉於此的說明。

圖 1 係本發明分離株 MP137 在顯微鏡下觀察到的型態。

圖 2 係本發明分離株 MP108 在顯微鏡下觀察到的型態。

圖 3 係本發明分離株 MP137 的 16S rDNA 部分序列 (SEQ ID NO: 3)。

圖 4 係本發明分離株 MP108 的 16S rDNA 部分序列(SEQ ID NO: 4)。

圖 5 顯示實例 3.2 的小鼠試驗流程。

圖 6 顯示經本發明之 (A) MP108 菌株及 (B) MP137 處理的小鼠呼吸道阻力變化測定之結果。

圖 7 顯示小鼠的肺沖洗液中發炎細胞種類分析結果，Mon 表示單核細胞、Eos 表示是酸性白血球、Neu 表示是中性白血球以及 Lym 表示淋巴球細胞。

圖 8 顯示實例 4 的排除實驗結果，其中 (A) 針對沙門氏菌的實驗結果，以及 (B) 是針對大腸桿菌的實驗結果。

圖 9 顯示實例 4 的置換實驗結果，其中 (A) 針對沙門氏菌的實驗結果，以及 (B) 是針對大腸桿菌的實驗結果。

序列表

<110>	台灣東洋藥品工業股份有限公司 財團法人食品工業發展研究所	
<120>	新穎乳酸菌株及其調節免疫反應的用途	
<130>	IT0163/TY0008TW	
<150>	TW099142822	
<151>	2010-12-08	
<160>	4	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	1	
	ggagtttga t cctggctcag	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	2	
	aaggaggatgat ccagccgca	20
<210>	3	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	酪乳桿菌副乾酪亞種 (Lactobacillus paracasei subsp. paracasei)	
<400>	3	
	tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatctt ttgatcacct gagagatcag	60
	gtttccctt cgggggcaaa atgacaggtg gtgatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga	120
	gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca acccttatga ctagttgcca gcatttagtt	180
	gggcactcta gtaagactgc cggtgacaaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca	240
	tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gatggtiaca cgagttgcga	300
	gaccgcgagg tcaagctaatt ctcttaaagc cattctcagt tcggactgta ggctgcaact	360
	cgcctacacg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag cagccgcgg tgaatacgtt	420
	cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtt tgtaacaccc gaagccggtg	480
	gcgtaacctt ttaggggagc	500
<210>	4	
<211>	500	
<212>	DNA	
<213>	鼠李糖乳酸桿菌 (Lactobacillus rhamnosus)	
<400>	4	
	tggagttaga tcctggctca ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa	60
	cgagtctctg ttgatgatcg gtgcttgcac cgagattcaa catggaacga gtggcggacg	120
	ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta agtgggggat aacatttgga aacagatgct	180

aataccgcga tagatccaag aaccgcatgg ttcttggctg aaagatggcg taagctatcg	240
cttttggatg gacccgcggc gtattagctt gtgggtgagg taatggctca ccaaggcgat	300
gatacgtagc cgaactgaga gggtgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact	360
cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc acaatggacg caagtcgat ggagcaacgc	420
cgcgtgagtg aagaaggctt tcgggtcgtt aaactctgtt gtgggagaag aatggtcggc	480
agagtaactg ttgtcggcgt	500

七、申請專利範圍：

1. 一種經分離之乳酸菌株，其中該乳酸菌株為選自以下所組成之群之菌株之一：MP137 菌株，寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910484；以及 MP108 菌株，寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910483。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之乳酸菌株，其中該乳酸菌株係 MP137 菌株，寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910484。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之乳酸菌株，其中該乳酸菌株係 MP108 菌株，寄存於中華民國財團法人食品工業發展研究所，寄存編號為 BCRC910483。

4. 一種組合物，其包括如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之乳酸菌株。

5. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其中該乳酸菌株為活菌或死菌。

6. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其為粉末或膠囊形式。

7. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於調節個體的免疫反應。

8. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於調節個體的細胞激素的產生。

9. 如申請專利範圍第 8 項之組合物，其用於提升個體的 IL-12 或 IFN- γ 的產生。

10. 如申請專利範圍第 8 項之組合物，其用於提升個體的 IL-10 的產生。

11. 如申請專利範圍第 8 項之組合物，其用於抑制個體的 IL-4、IL-5 或 IL-13 的產生。

12. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於調節個體的免疫球蛋白 (Ig) 的產生。

13. 如申請專利範圍第 12 項之組合物，其用於提升個體的 IgG2a 的產生。

14. 如申請專利範圍第 12 項之組合物，其用於提升個體的 IgA 的產生。

15. 如申請專利範圍第 12 項之組合物，其用於抑制個體的 IgE 的產生。

16. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於提升個體的腸道免疫力。

17. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於抑制個體的過敏反應。

18. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於治療氣喘或過敏性鼻炎。

19. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其用於對抗腸道致病菌感染。

20. 如申請專利範圍第 19 項之組合物，其中該腸道致病菌為沙門氏菌或大腸桿菌。

21. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其為藥物或食品。

22. 如申請專利範圍第 4 項之組合物，其為口服形式。

23. 一種如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之乳酸菌株之用於製備用於調節免疫反應、治療氣喘或過敏性鼻炎或對抗腸道致病菌感染之藥物或食品之用途。

八、圖式：



圖 1



圖 2

TCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAG
ATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGTATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGT
TGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
AATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAAGCC
ATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC
CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTTAGG
GAGC

圖 3

TGGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAG
TCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGA
GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACAT
TTGGAAACAGATGCTAATACCGCGATAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTG
AAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGC
CACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCT
TTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGT
CGGCGT

圖 4

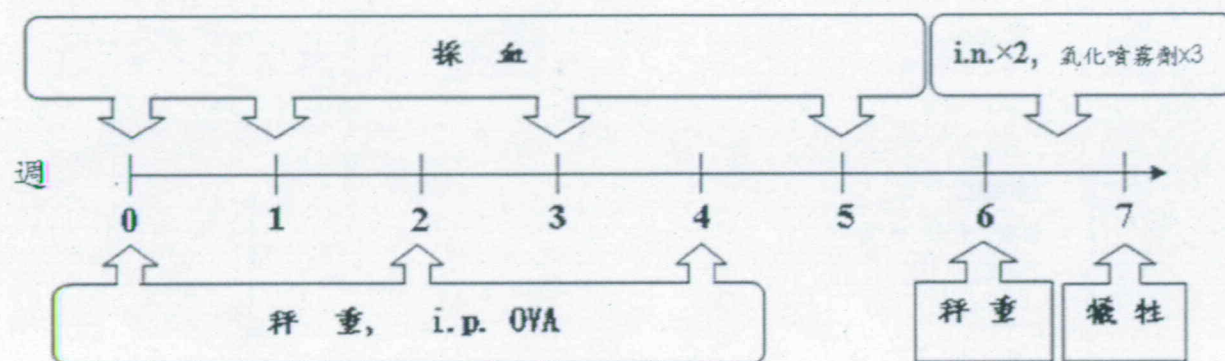


圖 5

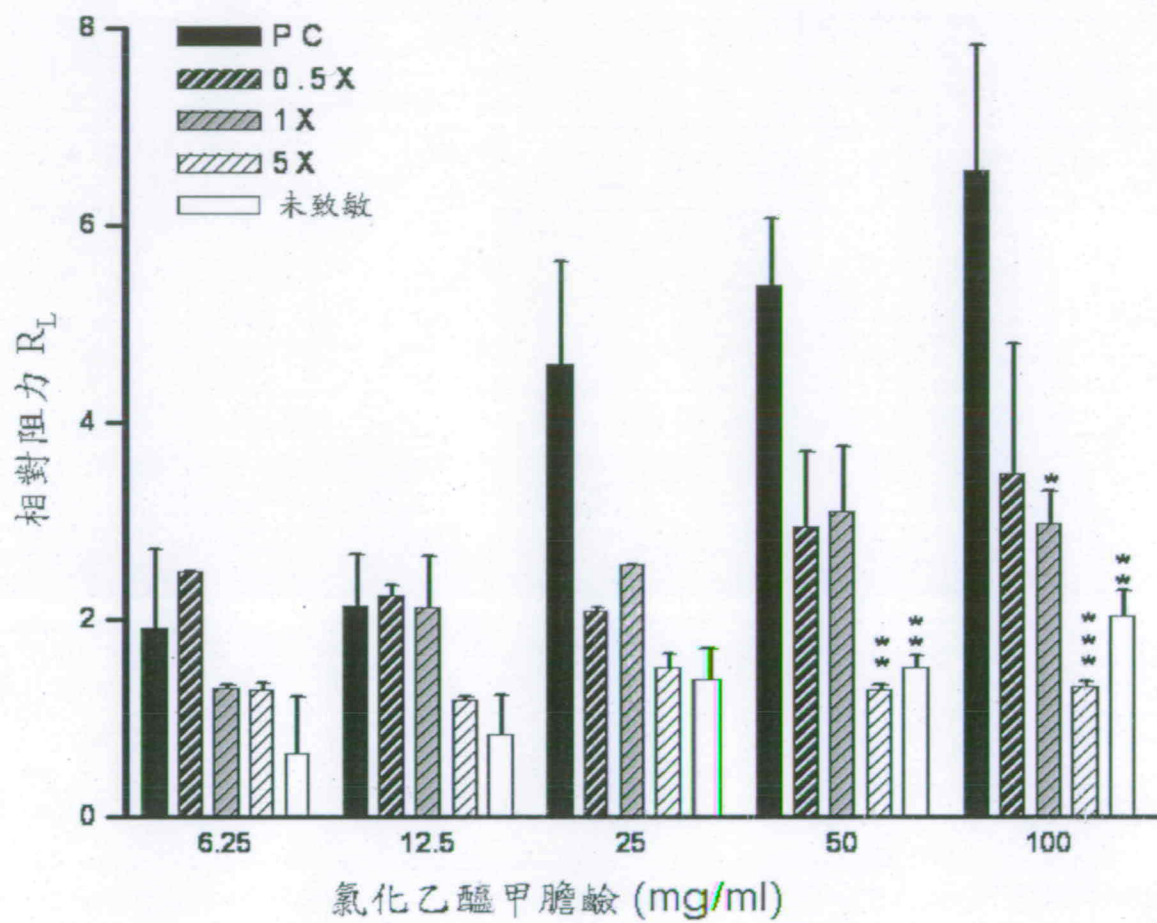


圖 6 (A)

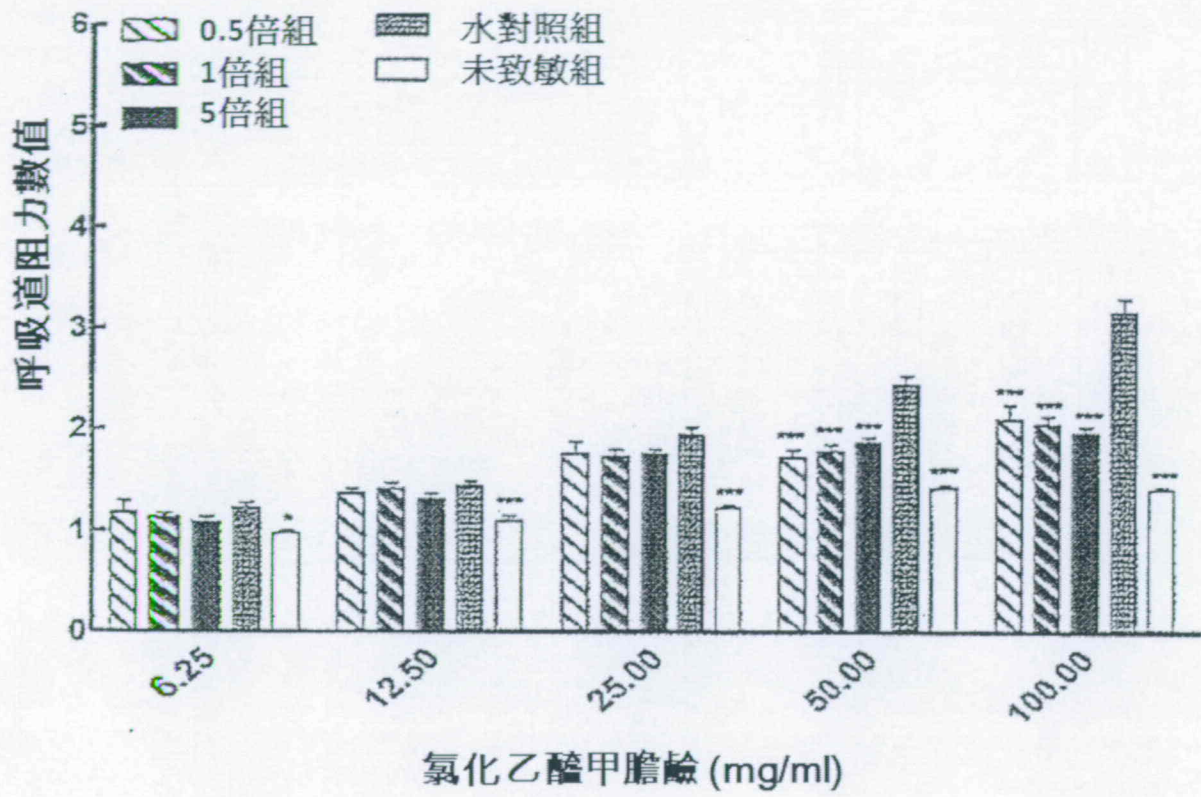


圖 6 (B)

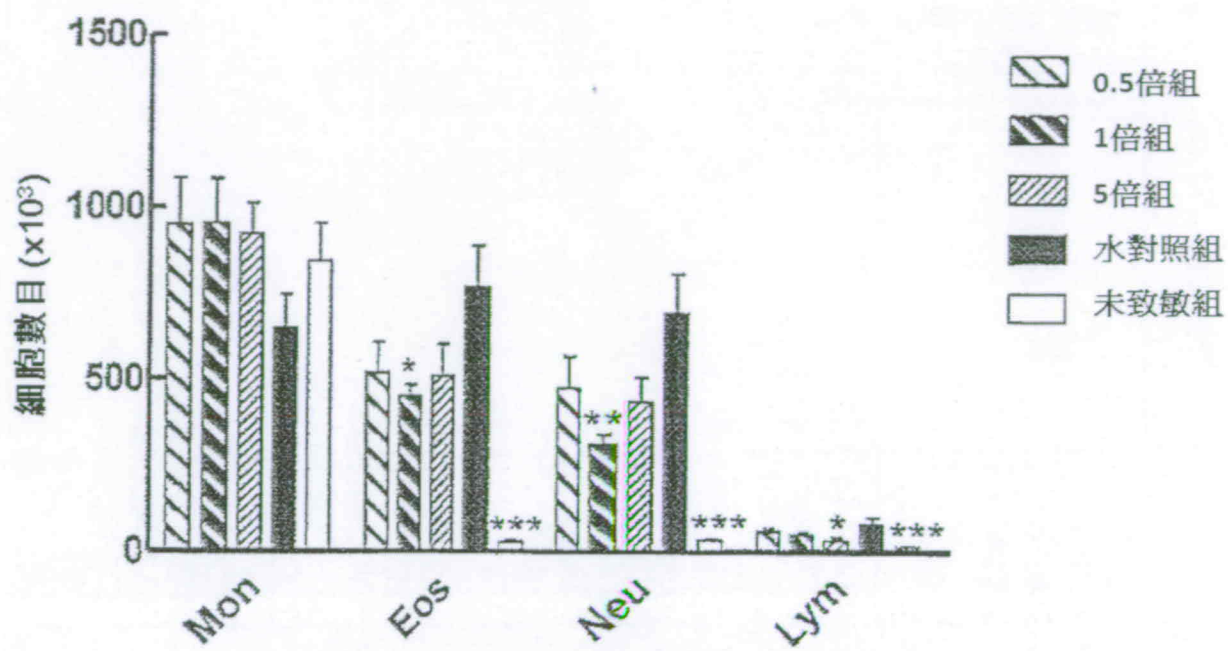
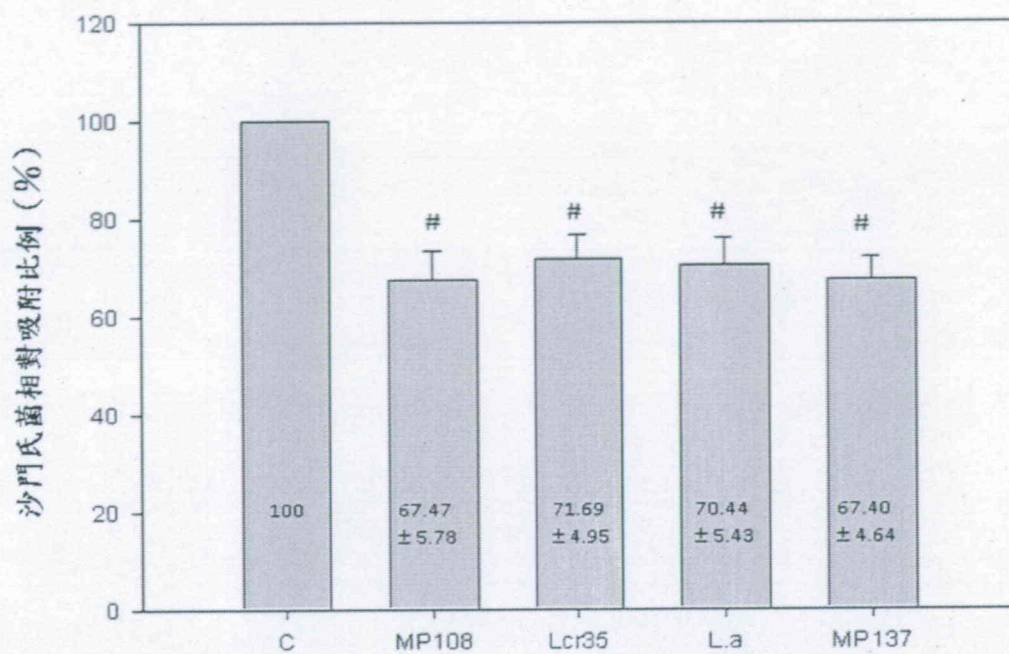


圖 7

(A)



(B)

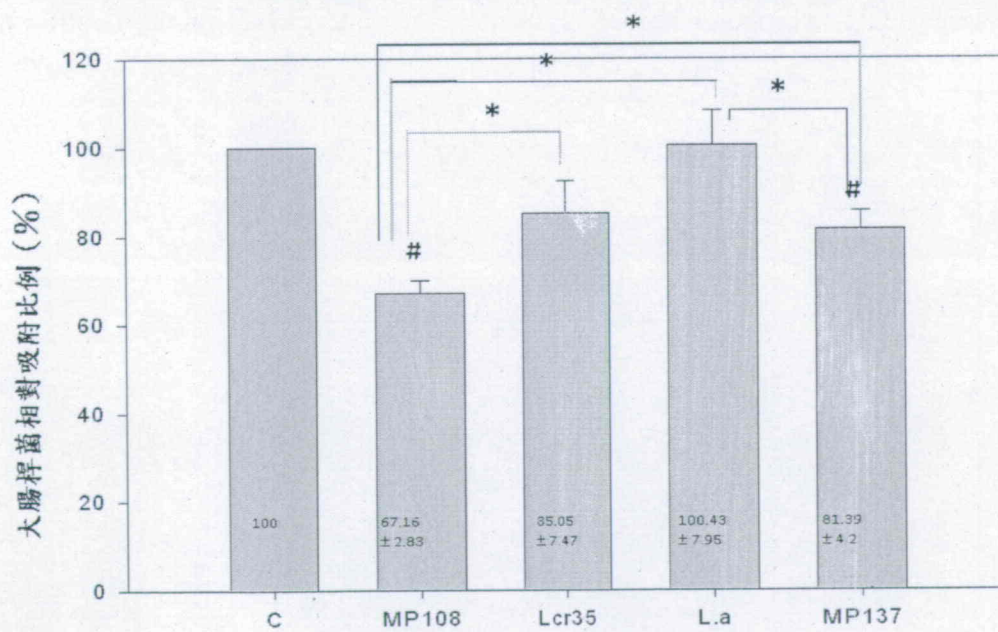
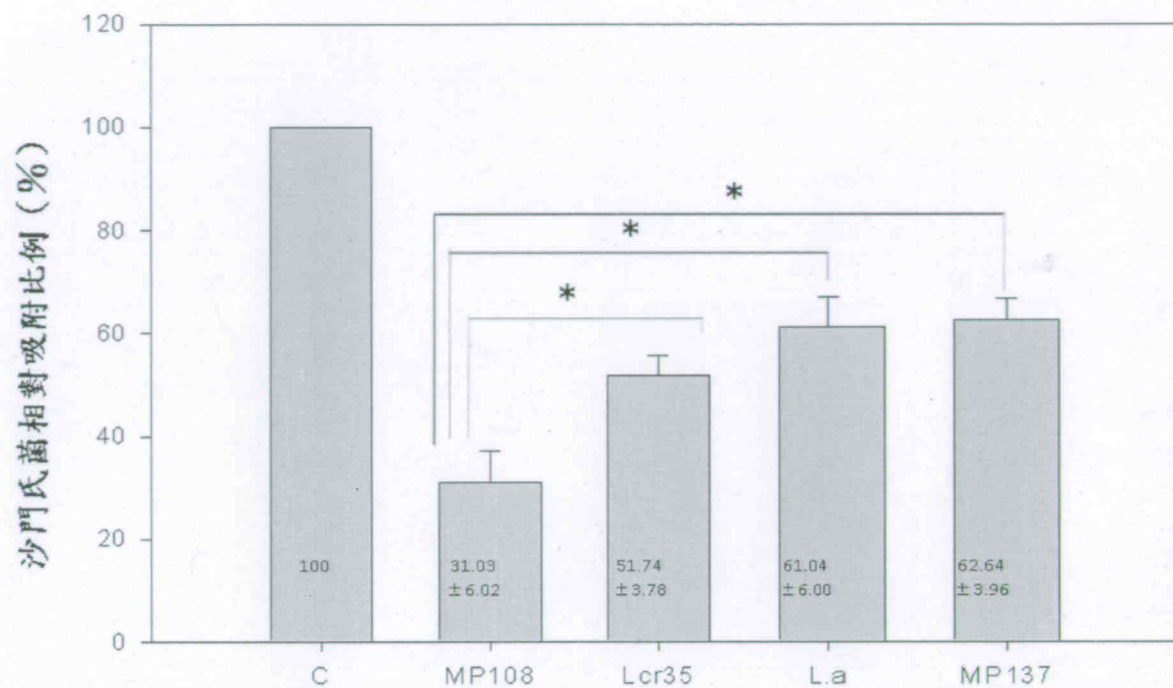


圖 8

(A)



(B)

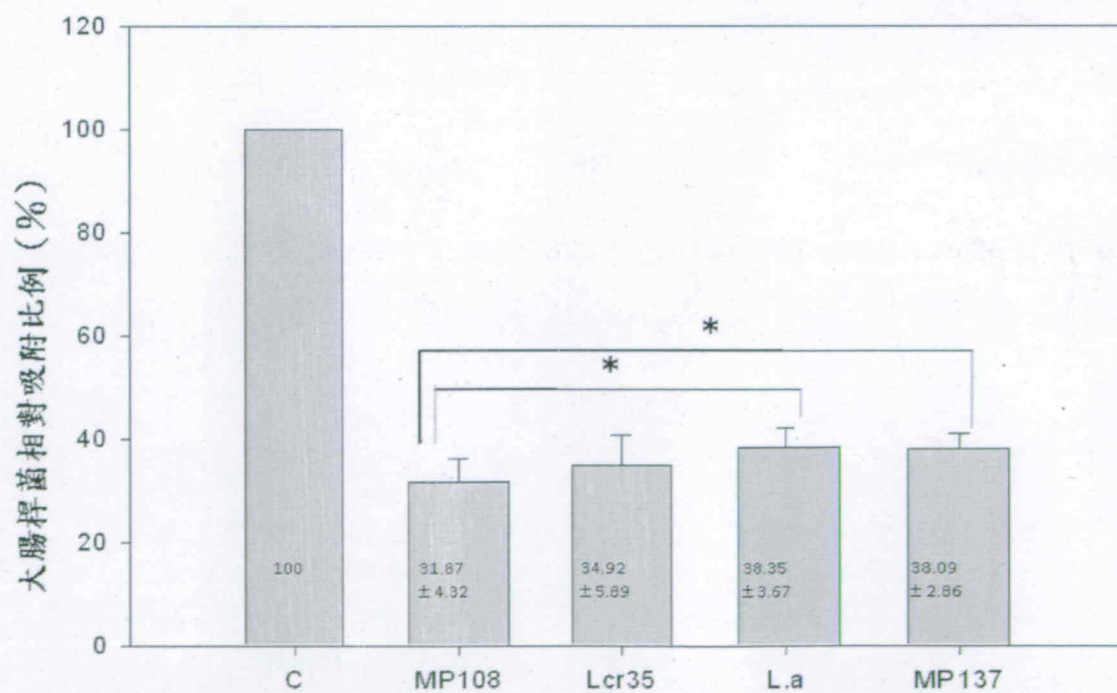


圖 9