

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 1/20



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03823833.0

[43] 公开日 2005 年 11 月 23 日

[11] 公开号 CN 1701116A

[22] 申请日 2003.9.8 [21] 申请号 03823833.0

[30] 优先权

[32] 2002.9.6 [33] AU [31] 2002951270

[86] 国际申请 PCT/AU2003/001176 2003.9.8

[87] 国际公布 WO2004/022727 英 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.6

[71] 申请人 VRI 生物医学有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 P·L·康韦

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 4 页 说明书 34 页 附图 16 页

[54] 发明名称 益生菌:发酵乳杆菌

[57] 摘要

细菌发酵乳杆菌的变种及其在治疗受试者胃肠疾病、粘膜表面疾病或免疫系统或状况紊乱中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 变种或其组分, 其中所述发酵乳杆菌变种具有以下特征:

- (a) 它为革兰氏阳性、兼性杆菌,
- (b) 它发酵核糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、L-阿拉伯糖及甘露醇,
- (c) 它在 pH 1.5 存活达 4 小时, 生长丢失不高于 log 3,
- (d) 它于 37°C 在存在 0.5% 胆汁盐中增殖导致光密度增加 0.5 至 0.8,
- (e) 它在明胶胶囊中于 25°C 保存时稳定,
- (f) 它以每 mg 组织 log 5 cfu 以上粘附于淋巴集结, 通过直接拮抗作用及通过引发免疫调节两者抑制病原体。

2. 根据权利要求 1 所述的发酵乳杆菌变种, 其中所述变种为 VRI003 (保藏号 NM02/31074)。

3. 根据权利要求 1 所述的发酵乳杆菌变种的组分, 其中所述组分为细胞碎片、提取物、分泌物或经纯化组分。

4. 组合物, 所述组合物包含根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种或包含根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分, 并包含可药用载体。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物, 所述组合物进一步包含益生菌、不可消化膳食组分、膳食纤维或药学活性化合物。

6. 根据权利要求 5 所述的组合物, 其中益生菌为菊粉、抗性淀粉、寡糖、树胶或 β -葡聚糖。

7. 根据权利要求 6 所述的组合物, 其中所述益生菌为未经修饰的高直链淀粉或 β -葡聚糖。

8. 根据权利要求 4 至 7 中任意一项所述的组合物, 其中所述组合物包含发酵乳杆菌变种的活细胞。

9. 根据权利要求 4 至 7 中任意一项所述的组合物, 其中所述组合物

包含发酵乳杆菌变种的死细胞。

10. 根据权利要求 4 至 9 中任意一项所述的组合物，所述组合物为片剂、胶囊剂、粉剂、糊剂、凝胶剂、液体剂型、膳食添加剂或食物产品的形式。

11. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述组合物为片剂形式。

12. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述组合物为食物产品形式。

13. 根据权利要求 12 所述的组合物，其中所述食物产品为乳或基于乳的食物产品。

14. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述组合物为液体剂型形式。

15. 根据权利要求 10 所述的组合物，其中所述组合物为膳食添加剂形式。

16. 用于预防和/或治疗胃肠疾病或其症状的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求 4 至 15 中任意一项所述的组合物的步骤。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述组合物为经口施用。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的方法，其中所述胃肠疾病为肠易激综合征、炎性肠病、腹泻、胃气胀、肠胃气胀、腹痉挛、腹痛、便秘或节段性回肠炎。

19. 根据权利要求 16 至 18 中任意一项所述的方法，其中所述胃肠疾病由病原体引起。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述胃肠疾病由细菌、病毒或原生动物引起。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述细菌为沙门氏菌属 (*Salmonella*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、螺旋杆菌属 (*Helicobacter*)、弧菌属 (*Vibrio*) 或假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

22. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述病毒为诺沃克病毒或轮状病毒。

23. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中所述原生动物为隐孢子虫、内阿米巴、贾第虫或双核阿米巴。

24. 用于预防和/或治疗粘膜表面疾病和/或其症状的方法, 所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用有效量的根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求 4 至 15 中任意一项所述的组合物的步骤。

25. 根据权利要求 24 所述的方法, 其中所述疾病为湿疹、遗传过敏性皮炎或玫瑰痤疮。

26. 根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求 4 至 15 中任意一项所述的组合物的用途, 用于制备治疗和/或预防胃肠疾病、粘膜表面疾病或其症状的药物。

27. 在受试者中刺激 IL-12 产生的方法, 所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求 4 至 15 中任意一项所述的组合物的步骤。

28. 上调 IFN- γ 的方法, 所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求 4 至 15 中任意一项所述的组合物的步骤。

29. 在受试者中诱导 Th1 型反应的方法, 所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求 4 至 15 中任意一项所述的组合物的步骤。

30. 抑制病原体生长的方法, 所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据权利要求 1 或 2 所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求 1 或 3 所

述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求4至15中任意一项所述的组合物的步骤。

31. 调节胃肠道固有微生物的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据权利要求1或2所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求1或3所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求4至15中任意一项所述的组合物的步骤。

32. 根据权利要求1或2所述的发酵乳杆菌变种、根据权利要求1或3所述的发酵乳杆菌变种的组分或根据权利要求4至15中任意一项所述的组合物的用途，用于制备在受试者中刺激IL-12产生、上调IFN- γ 、诱导Th 1型反应、抑制病原体生长或调节胃肠道固有微生物的药物。

益生菌：发酵乳杆菌

技术领域

本发明涉及细菌发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 变种、变种及其组分的制剂，以及它们在哺乳动物中预防和/或治疗疾病及促进哺乳动物健康的用途。

背景技术

整个说明书对现有技术的任何讨论不应认为是承认在本领域中此现有技术是广泛已知或形成一般常识的部分。

固有的细菌 (*indigenous bacteria*) 在预防某些细菌及真菌疾病中起主要作用。它们的此种作用是通过细菌拮抗作用，防止其它微生物在体内存在的过程实现的。参与此活性的机制包括直接竞争营养物，改变区域的酸度使其它微生物不适于生长，产生抑制性代谢产物及抗微生物化学品及通过防止其它微生物结合至宿主表面。

固有菌群也影响免疫系统。在无菌环境中饲养的动物显示低度发育及相对未分化的淋巴组织，低水平的免疫蛋白及对感染的初次应答，而不产生显著的二次应答。

这些微生物通过产生定居所必需的必需维生素及营养物、帮助降解复杂的营养物、保护宿主免受病原体侵袭以及刺激免疫系统而在宿主的健康中起重要作用。此外，认为肠中的微生物通过微生物产生的短链脂肪酸导致 pH 降低而有助于矿物质吸收及脂类代谢。这些短链脂肪酸是结肠生理的调节物并在维持正常肠功能中起重要作用。

胃肠道上部只包含与唾液及食物一起吞入的细菌。由于胃液的高度酸性，很少的生物体主要为乳杆菌可自正常胃中进行培养。小肠上部只包含

相对稀少量的乳杆菌及肠球菌。胃肠道菌群逐渐变化直到变得与结肠中发现的菌群相似，主要为类杆菌属（*Bacteroides*）、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）、梭杆菌属（*Fusobacterium*）、乳杆菌属及真杆菌属（*Eubacterium*）。

身体的此种正常菌群是复杂的生态系统，它受饮食、微生物相互作用及宿主因素如肠蠕动及肠分泌调节。外部因素如应激、饮食变化及药物可影响正常菌群并改变存在的生物体类型或它们的代谢。如果将平衡破坏可对宿主产生有害影响并可引起疾病。

然而，有时失去平衡，侵入的病原体成功穿过身体的防御系统引起感染或引发不适当的免疫反应。同样宿主与固有菌群之间的平衡可在应用抗生素后受到破坏而导致正常的潜伏生物体的感染，例如发生鹅口疮（白色念珠菌（*Candida albicans*）感染）或艰难梭菌（*Clostridium difficile*）感染。

令人失望的是，抗生素表面上提供的“神奇的子弹(Magic Bullets)”失去了它们的一些作用。在过去30年中，抗生素抗性持续增加的问题成为主要的公共卫生问题。现今，一些抗生素几乎对某些微生物无效，而一些细菌对几乎所有已知抗生素药物具有抗性。

此外，大肠中固有微生物牵涉到肠易激综合征（IBS）的证据正在增加，所述肠易激综合征的特征为大便习惯改变、排便紊乱及腹胀。

显然需要备选及可能的补充治疗方法。

本发明的目的是克服或改善现有技术的至少一个缺点或提供有用的备选物。

发明概述

对与以前存在的发酵乳杆菌菌株及其它益生微生物相比较具有令人惊讶的有益特征的新益生菌发酵乳杆菌变种进行了分离。由于它定居胃肠道的有益能力，它在预防和/或治疗胃肠道疾病中特别有用。此外此变种具有有益的免疫调节作用，所述免疫调节作用在肠中局部产生以及通过共同

的粘膜免疫系统在全身的粘膜部位产生。由于粘膜免疫系统的普遍性，变种也可用于预防和/或治疗其它粘膜表面疾病及由于粘膜表面紊乱或免疫系统或受试者的状况紊乱导致的疾病。

根据本发明的第一方面，提供了具有以下特征的新发酵乳杆菌变种或其组分：

- (a) 它为革兰氏阳性、兼性杆菌，
- (b) 它发酵核糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、L-阿拉伯糖及甘露醇，
- (c) 它在 pH 1.5 存活至少四小时，生长丢失不高于 \log_3 ，
- (d) 它于 37°C 在存在 0.5% 胆汁盐中增殖导致光密度增加 0.5 至 0.8，
- (e) 在明胶胶囊中于 25°C 保存时稳定，
- (f) 它以每 mg 组织 \log_5 cfu 以上粘附于淋巴集结，通过直接拮抗作用及通过引发免疫调节两者抑制病原体。

优选地，发酵乳杆菌变种菌株为 VRI 003（保藏号 NM02/31074）。

优选地，组分为细胞碎片、提取物、分泌物或经纯化组分。

根据本发明的第二方面，提供了包含根据第一方面所述的发酵乳杆菌变种或其组分及可药用载体的组合物。

优选地，组合物包含 VRI 003 菌株或其组分。在优选的实施方案中，组合物包含发酵乳杆菌变体的活细胞。然而，本领域技术人员清楚的是组合物也可包含乳杆菌变种的死细胞。在一个实施方案中，组合物包含的组分为细胞碎片、提取物、分泌物或经纯化组分。

用于制备此类细胞碎片、提取物、分泌物或经纯化组分的步骤是公知的。例如，可将细胞超声处理或可将细胞壁自身进行物理破坏和/或收集细胞内容物。可将整个细胞进行洗涤以提取表面组分及然后如果需要，将这些提取物进行分级。

优选地，将发酵乳杆菌与其它组分如益生菌、不可消化膳食组分、膳食纤维或药学活性组分进行组合。更优选地，益生菌包含或由菊粉、抗性淀粉、寡糖、树胶或 β -葡聚糖组成。甚至更优选地，益生菌为未经修饰的

高直链玉米淀粉或 β -葡聚糖。

组合物可制备为片剂、胶囊剂、粉剂、凝胶剂、糊剂、液体剂型、膳食添加剂或食物产品等。优选地，组合物以片剂或胶囊剂形式制备。

根据第三方面，本发明提供了用于预防和/或治疗胃肠疾病或其症状的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的发酵乳杆菌变种或其组分或施用根据第二方面所述的组合物的步骤。

优选的发酵乳杆菌为变种 VRI 003。

术语“受试者”及“个体”在本说明书中可交替应用，并且在本发明上下文中的范围内包括任何哺乳动物，所述哺乳动物可发展或已经具有胃肠疾病和/或粘膜表面疾病和/或粘膜表面紊乱或任何原因引起的免疫系统紊乱导致的疾病。优选的用于施用本发明治疗剂的受试者为人、家养宠物及农用动物。

优选地，胃肠疾病为肠易激综合征（IBS）、炎性肠病、节段性回肠炎和/或其症状，例如腹泻、胃气胀、肠胃气胀、胃痉挛、腹痛或便秘。胃肠疾病可由细菌、病毒或原生动物这样的病原生物体引起。然而，它也可仅仅由不适当生物体定居胃肠道或通过炎性和/或自身免疫机制引起。

优选地，紊乱或疾病为病原体定居受试者胃肠道的结果。优选地，紊乱或疾病是如文中定义的高病原体负荷的结果。更优选地病原体为细菌、病毒或原生动物。最优选的，病原体为沙门氏菌属（*Salmonella*）、大肠杆菌（*E. coli*）、螺旋杆菌属（*Helicobacter*）、弧菌属（*Vibrio*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、梭菌属（*Clostridium*）、类杆菌属；或病毒如诺沃克病毒或轮状病毒，或原生动物如隐孢子虫（*Cryptosporidium*）、内阿米巴（*Entamoeba*）、贾第虫（*Giardia*）及双核阿米巴（*Dientamoeba*）。

在本发明中，当受试者在以下情况时，可发生“高病原体负荷”：(a) 受到病原体攻击，所述病原体的量在它们日常暴露的正常范围外；(b) 受到毒力病原体攻击；(c) 当受试者抵抗力降低时受到病原体攻击，例如在免疫系统被耗竭和/或当受试者的其它天然防御系统没有正常发挥功能时。由于例如应激或抗生素治疗，受试者的抵抗力可降低。

第四方面，本发明提供了用于预防和/或治疗粘膜表面疾病或其症状的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的发酵乳杆菌变种或其组分或施用根据第二方面所述组合物的步骤。

优选地，粘膜表面疾病为湿疹、玫瑰痤疮(roseaca)或遗传过敏性皮炎。

第五方面，本发明提供了在受试者中刺激 IL-12 产生的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的发酵乳杆菌变种或其组分，或施用根据第二方面所述的组合物的步骤。

第六方面，本发明提供了上调 IFN- γ 的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的有效量的发酵乳杆菌变种或其组分，或施用根据第二方面所述的组合物的步骤。

第七方面，本发明提供了在受试者中诱导 Th1 型反应的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的有效量的发酵乳杆菌变种或其组分，或施用根据第二方面所述的组合物的步骤。

第八方面，本发明提供了抑制病原体生长的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的有效量的发酵乳杆菌变种或其组分，或施用根据第二方面所述的组合物的步骤。

第九方面，本发明提供了调节胃肠道固有微生物的方法，所述方法包括向需要此种治疗的受试者施用根据第一方面所述的有效量的发酵乳杆菌变种或其组分，或施用根据第二方面所述的组合物的步骤。

根据欲治疗疾病的严重性、疾病原因、受试者的年龄及在本领域技术人员的技能范围内通过常规程序易于确定的其它标准临床参数的不同，所需剂量发生变化。

发酵乳杆菌变种或其组分或包含所述变种的组合物可通过任何已知方法进行施用，但优选经口施用。

发酵乳杆菌变种或包含所述变种或其组分的组合物可与一种或多种其它药学活性剂联合施用。变种或包含所述变种的组合物可与其它治疗剂同时（共同施用）施用或可以任何次序依次施用。

优选地将发酵乳杆菌变种或其组分或包含它的组合物每日施用。根据

相关疾病的治疗过程、其原因及严重性，施用可一天进行几次或不经常施用（例如每两天或每三天施用一次）。本领域技术人员易于确定这些参数。

在本发明中，术语“稳定”在其范围内包括于 25℃ 储存时每六个月成活力丢失不超过 25% 的范围。

在本文中，当谈及本发明发酵乳杆菌组分时所应用的术语“组分”包括但不限于细胞碎片、提取物、分泌物或来自细菌的经纯化物质。

除了本文另有需要外，本说明书及权利要求书中的单词“包含”等表示包括意义，与排除或无遗漏意义相反；即表示“包括，但不限于”。

附图简述

图 1. 不同浓度胆汁盐对发酵乳杆菌 VRI 003 的生长及成活力的作用。

图 2. 体外低 pH 对 VRI 003 培养物成活力的影响。

图 3. 乳杆菌种对小鼠淋巴集结的粘附。

图 4 及图 5. 提取自发酵乳杆菌 VRI 003 细胞的细胞壁蛋白质与发酵乳杆菌 LMG 细胞壁比较的二维分析，与发酵乳杆菌 LMG（图 5）比较时，显示 VRI 003 上调两个细胞壁蛋白质并下调许多其它细胞壁蛋白质的表达（图 4），其中所述发酵乳杆菌 LMG 以前显示不粘附淋巴集结。

图 6. 发酵乳杆菌 VRI 003 的刺激对巨噬细胞产生细胞因子的影响。

图 7. 经口施用发酵乳杆菌 VRI 003 后淋巴集结细胞因子水平的增强。

图 8. 经口施用发酵乳杆菌 VRI 003 后，经口施用发酵乳杆菌 VRI 003 对脾中细胞因子水平的影响。

图 9. 发酵乳杆菌 VRI 003 在与低水活性抗性淀粉组合并于 4℃、25℃ 及 30℃ 在薄片-薄片泡包装的 I 号明胶胶囊中保存时的稳定性。

图 10. 在 8 周试验期间，来自 4 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期(washout period)及合生素(Synbiotic)治疗期监测的微生物谱。结果用每 mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

图 11. 在 8 周试验期间，来自 5 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期监测的微生物谱。结果用每

mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

图 12. 在 8 周试验期间, 来自 9 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期监测的微生物谱。结果用每 mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

图 13. 在 8 周试验期间, 来自 2 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期监测的微生物谱。结果用每 mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

图 14. 在 8 周试验期间, 来自 3 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期监测的微生物谱。结果用每 mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

图 15. 在 8 周试验期间, 来自 7 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期监测的微生物谱。结果用每 mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

图 16. 在 8 周试验期间, 来自 6 号 IBS 受试者粪便材料中细菌的变化。在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期监测的微生物谱。结果用每 mL 菌落形成单位 (cfu) 表示。

发明详述

虽然对用益生菌预防及治疗许多疾病进行了多种尝试, 用益生菌治疗胃肠疾病的证据变化非常大。现在发现具有以下特征的发酶乳杆菌变种或其组分在预防和/或治疗胃肠疾病和/或其症状中高度有效:

- (a) 它为革兰氏阳性、兼性杆菌,
- (b) 它发酵核糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、L-阿拉伯糖及甘露醇,
- (c) 它在 pH 1.5 存活至少四小时, 生长丢失不高于 \log_3 ,
- (d) 于 37°C 在存在 0.5% 胆汁盐中导致光密度增加 0.5 至 0.8,
- (e) 它在明胶胶囊中于 25°C 稳定保存,
- (f) 它以每 mg 组织 \log_5 cfu 以上粘附于淋巴集结, 通过直接拮抗作用

及通过引发免疫调节两者抑制病原体。优选地，变种为发酵乳杆菌 VRI 003。本发明也提供了用于预防和/或治疗胃肠疾病的方法，所述方法包括向受试者施用发酵乳杆菌变种或其组分，或施用包含变种的组合物。变种可与其它物质例如益生菌、不可消化膳食组分、膳食纤维或药学活性化合物如阿司匹林及他汀类 (statins) 联合。

本发明的方法及组合物已研发为在治疗胃肠疾病中用于人及兽应用，但由于粘膜系统的共同性，可将该治疗应用于其它粘膜表面疾病及粘膜表面紊乱或免疫系统或受试者状态紊乱导致的疾病。无论用于人或家畜的治疗，根本原则是相同的，并且有利的是可应用本发明的治疗而不用考虑上述疾病的原因。

一般地，每日有效量在约 10^8 - 10^{12} 个细菌且施用频率为每日一次或两次。对于长期施用，数量可例如低于上述范围；在其它条件下，可用高于上述范围的量。

发酵乳杆菌变种可通过已知方法，用常规可药用载体、赋形剂、溶剂或佐剂进行制剂。此类步骤及成分是公知的并在权威教科书及手册中进行了详细描述，例如 “Remington : The Science and Practice of Pharmacy”，1995，Mack Publishing Co. Easton, PA 18042，美国，此处引用作为参考。

也可通过常规公知方法，将发酵乳杆菌变种或其组分制备成食物产品。

包含细菌的组合物包括活细菌、湿细菌、干细菌或细菌组分，其中所述细菌组分包括但不限于细胞碎片、提取物、分泌物及经纯化组分。

本发明的食物或饮料产品包含至少一种细菌、含有以同样细菌及其经加工产品作为有效成分的物质。

可用多种方法对组合物进行制剂以适于经口施用，例如以片剂、胶囊剂、液体、膳食添加剂、糊剂、凝胶剂、食物产品等的形式。其它剂型对本领域技术人员是显然的。

可将细菌用于食物或饮料产品中或可与其它食物材料及食物组分适当地以常规方法组合应用。

优选地，将组合物制成有或无其它组分的乳或基于乳的食物产品，所

述其它组分为常规用于制备此类乳产品的组分。

本发明的组合物也可包括已知的抗氧化剂、缓冲剂或其它试剂如着色剂、调味剂、维生素或矿物质。可向组合物中加入增稠剂如玉米淀粉、瓜尔胶、黄原胶等。本发明治疗性组合物的优选额外组分可包括益生菌如菊粉、不可消化膳食组分、膳食纤维、可药用化合物及其它营养物。也可包括膳食或添加酶如乳糖酶、淀粉酶、葡聚糖酶、过氧化氢酶等酶。优选的益生菌包括未经修饰高直链玉米淀粉或 β -葡聚糖。

将细菌与载体组合，所述载体与施用物种的胃肠组织或粘膜表面生理学相容。载体可包含用于制剂入片剂、胶囊剂或粉剂形式的基于固体的干物质；或载体可包含用于制剂入液体或凝胶形式的液体或基于凝胶的物质。载体的特定类型以及最终剂型部分取决于所选择的施用途径。

用于干剂型的一般载体包括但不限于：海藻糖、糊精麦芽糖复合剂、米粉、微晶纤维素（MCC）硬脂酸镁、肌醇、FOS、GOS、葡萄糖、蔗糖等载体，可将干剂型（例如粉剂）加入市售的食物（例如液体剂型、乳产品或水）。同样，剂型的特定类型取决于施用途径。

适当的液体或基于凝胶的载体包括但不限于：水及生理性盐溶液；尿素；醇类及其衍生物（例如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇）；二元醇（例如乙二醇、丙二醇等）。优选地，基于水的载体具有中性pH值（即pH 7.0）。

载体中也可包括防腐剂，所述防腐剂包括羟苯甲酸甲酯、对羟苯甲酸丙酯、苯甲醇及乙二胺四乙酸盐。组合物中的载体可发生变化，条件是只要载体不显著干扰活性成分的药学活性。

本发明的方法包括向人或动物施用发酵乳杆菌变种或其组分，或施用包含所述变种或其组分的组合物以治疗和/或预防胃肠疾病或粘膜表面疾病及粘膜表面紊乱或免疫系统或受试者状况紊乱导致的疾病和/或与此类疾病相关的症状，例如肠易激综合征（IBS）、炎性肠疾病和/或其症状，如例如腹泻、胃气胀、肠胃气胀、腹痉挛、腹痛或便秘及湿疹或玫瑰痤疮。此种治疗可导致调节胃肠道的固有微生物。优选用片剂、胶囊剂、凝胶剂、液体剂型、粉剂、糊剂、膳食添加剂或食物产品等剂型进行施用，所有剂

型通过应用本领域内公知的方法以包含本发明的治疗性组合物而制剂。

本发明优选的实施方案现在通过实施例的形式进行描述。

实施例

实施例 1: 来源及鉴定

VRI 003 变种分离自健康受试者。在一系列实验室实验中, 发现 VRI 003 变种粘附到胃肠上皮组织。也显示对人胃肠病原体具有可论证作用, 并对胆酸有抗性。VRI 003 变种在低 pH 环境中也存活, 并对胃蛋白酶及在营养物有限的情况下有抗性。

细菌变种 VRI003 可在 Rogosa 琼脂 (Oxoid) 平板上于 37°C 厌氧培养箱内进行培养 24 小时。菌株通过连续在 MRS 琼脂 (Oxoid) 平板上于 37°C 厌氧培养箱内培养 24 小时进行转种, 并在向培养液中加入甘油前, 通过在 MRS 培养液中于 37°C 厌氧培养箱内传代培养 24 小时, 将最终培养物在 20% 甘油中于 -70°C 进行储存。

变种 VRI 003 为过氧化氢酶阴性、革兰氏阳性杆菌, 在包含葡萄糖的脑心浸液 (BHI) (Oxoid) 培养液中于厌氧条件生长时产生气体。因此广泛鉴定为异发酵乳杆菌并根据 API 糖类试剂盒 (50 CHL 试剂盒; Biomerieux; 具有 99.9%确定性的供应者数据及数据库) 确定为发酵乳杆菌菌株。特别地, 菌株 VRI 003 利用糖 5、10、11、12、13、25、28、29、30、31、32 及 25。细胞为短杆状、革兰氏阳性并与发酵乳杆菌形态的描述相符。

根据布达佩斯条约, 发乳杆菌菌株 VRI 003 于 2002 年 8 月 27 日保藏在澳大利亚政府分析实验室, 位于澳大利亚, PO BOX 385, Pymble 2073, NSW, 并且保藏物的保藏号为 NM02/31074。

实施例 2: 菌株 VKI003 的特征及描述

(i) 菌落形态

当于 37°C 厌氧培养箱中在 MRS (Oxoid) 琼脂上生长时, 菌落直径约 1mm, 为有光泽、圆顶形、不透明, 并且当用接种环接触时显示有粘性。

所述粘性可能是由于存在细胞外聚合物。将同样平板于 37℃ 在需氧条件下孵育产生一些表面粗糙及边缘不规则的菌落。将这些粗糙菌落传代到 MRS 琼脂上并于 37℃ 厌氧培养箱中孵育，产生接触有粘性的不透明、圆顶形、有光泽不透明菌落。

(ii) 培养液中的生长

变种 VRI 003 在 MRS (Oxoid) 培养液或多种其它培养液中培养，当于 37℃ 厌氧条件下生长时，产生粘稠培养液。

(iii) 对胆酸的抗性

如图 1 所示，当将胆酸加入到 MRS 培养液 (Oxoid) 并将菌株于 37℃ 厌氧条件下孵育 8 小时时，菌株 VRI 003 在存在 0.5% 及 0.15% 胆汁盐的条件下生长。

(iv) 在低 pH 环境中存活

在用于测定应用前，将来自甘油储存液的 VRI003 在 MRS 培养液中传代两次。在测定当天，将来自 MRS 培养液的培养物进行收获，通过于 4000xg 离心并将沉淀物用分别调整 pH 为 1.5 及 2.0 的 Clark and Lubs 缓冲液溶解，使光密度为 0.4 (对应于 1×10^8 CFU/mL)。生物体的存活通过在 4 小时期间每小时一取样，系列稀释并以 100 微升涂布 MRS 琼脂平板，然后将 MRS 平板于 37℃ 厌氧孵育 24 小时进行确定。如图 2 所示，显示发酵乳杆菌菌株 VRI 003 比发酵乳杆菌菌株 VRI 002 存活性强，其在 4 小时期间于 pH1.5 时自每 ml log 8.75 cfu 降至 log 4.93 cfu/ml。

(v) 糖类利用

用 API 50CHL 糖类利用试剂盒以研究发酵乳杆菌 VRI 003 可利用哪种糖类，注意到随孵育时间与发酵乳杆菌菌株 VRI 002 的一些差异。孵育 6 小时后，如通过培养基变成黄色所定义的，VRI 003 能利用以下糖：

核糖

半乳糖

葡萄糖

果糖

甘露糖
麦芽糖
乳糖
蜜二糖
蔗糖
海藻糖
棉子糖。

这时，VRI002 能利用除甘露糖外的所有以上糖类。

孵育 6 小时后，两个菌株能轻微利用 Gluco Na Te。

通过 18 小时孵育，观察到在划线的含甘露糖区域发生变化，由此推断 VRI002 利用甘露糖，但相对缓慢。

通过 24 小时孵育，VRI 003 利用 L-阿拉伯糖及甘露醇是清楚的。VRI 002 除此之外还开始利用两种其它的糖即鼠李糖及 N-乙酰-葡糖胺。

48 小时孵育后，VRI-003 菌株利用所有 Gluco Na Te，而 VRI-002 菌株只有非常轻微利用。

(vi) 发酵乳杆菌 VRI 003 的粘附

(a) 与淋巴集结的体外粘附

将放射性标记的 VRI 003 与淋巴集结体外孵育 30 分钟并对粘附水平进行定量。如图 3 所示，与实验室中发现的其它菌株（LA 1-嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）1、LA 2-嗜酸乳杆菌 2、干酪乳杆菌（*L casei*）及 VRI-002）相比，显示 VRI 003 对淋巴集结细胞结合增强。由于淋巴集结作为肠中免疫系统的取样部位，发酵乳杆菌 VRI 003 对淋巴集结的粘附作用增强表示此菌株的免疫刺激作用增强。

(b) 蛋白质介导的发酵乳杆菌 VRI003 对淋巴集结的粘附

为了对粘附淋巴集结机制的特征进行描述，在粘附测定前，将发酵乳杆菌细胞用蛋白酶及偏高碘酸盐（metaperiodate）进行预处理以确定蛋白质的多糖是否参与粘附。显示用偏高碘酸盐处理增强了粘附，因此不必为理论所束缚，仍可作出细胞外多糖不参与粘附，并且实际上降低粘附的结

论。用蛋白酶处理发酵乳杆菌细胞极大降低了粘附，因此表示细胞壁蛋白质粘附淋巴集结。此外，在加入完整发酵乳杆菌细胞前加入细胞表面提取物到组织时，细胞表面提取物可显著阻断结合，证实发酵乳杆菌 VRI 003 细胞壁表面存在对淋巴集结具亲和性的分子。

表 1. 化学及酶处理发酵乳杆菌 VRI 003 和淋巴集结组织对粘附的影响

处理	粘附指数 (%) ^a	
	发酵乳杆菌 VRI 003	淋巴集结
只用 PBS	100±10.13	100±8.05
蛋白酶 K	33.48±5.67*	120.76±0.27
胰蛋白酶	48.69±5.22	60.81±0.38
高碘酸盐	224.08±21.73*	64.24±6.60
碘酸盐	108.59±2.80	69.54±3.69
缓冲液	100±0.84	100±12.50
细胞表面蛋白质 (5 µg/ml)	48.15±10.23*	ND
细胞表面蛋白质 (50 µg/ml)	46.14±7.91*	ND
细胞表面蛋白质 (100 µg/ml)	42.23±6.37*	ND

^a粘附指数表示为每 mg 淋巴集结湿重粘附细菌数的百分率。粘附对照组织表示 100% 粘附。

数据表示为平均数±平均标准误。在粘附测定前，发酵乳杆菌 VRI 003 或淋巴集结用多种处理进行预处理。

提取自发酵乳杆菌 VIU 003 细胞的细胞壁蛋白质及与以前显示不粘附淋巴集结的发酵乳杆菌 LMG 细胞壁比较的二维分析显示当与发酵乳杆菌 LMG (图 5) 进行比较时，VRI 003 上调两种细胞壁蛋白质及下调多种其它细胞壁蛋白质的表达 (图 4)。

(c) 粘附人肠粘膜

将摄入明胶胶囊中的冷冻干燥粉剂 (每天 log 10-11, 进行 14 天) 的受试者进行内窥镜检查并对自小肠壁取活组织。将活组织进行洗涤并匀浆化, 进行系列稀释并涂布到 MRS 琼脂用于分离粘附的乳杆菌。将经分离

乳杆菌进行纯化并用 VRI 003 特异抗体证实为发酵乳杆菌 VRI 003。

(vii) 发酵乳杆菌 VRI 003 对免疫参数的影响

(a) 发酵乳杆菌 VRI 003 对巨噬细胞的直接影响

制备源自骨髓的巨噬细胞并用不同浓度的发酵乳杆菌 VRI 003 刺激 4 小时。使用高浓度（感染复数 MOI-260；浓度 1）或低浓度（MOI-26；浓度 2）的发酵乳杆菌 VRI 003。

如自图 6 可看到的，巨噬细胞具有浓度反应依赖性细胞因子的释放。在刺激后第 1 天，与接受较低浓度发酵乳杆菌 VRI 002 或发酵乳杆菌 VRI 003 的巨噬细胞相比，用较高浓度发酵乳杆菌 VRI 002 或发酵乳杆菌 VRI 003 刺激的巨噬细胞产生显著较高的 IL-12。对发酵乳杆菌 VRI 003 刺激作出反应的巨噬细胞产生的 IL-10 水平与产生的 IL-12 水平相比是非常低的。

由于巨噬细胞产生的 IL-12 及 IL-10 互相排斥，这是可以预料的。认为巨噬细胞产生的 IL-12 水平在确定针对抗原的免疫反应中起重要作用。胃肠道树突状细胞的局部环境中 IL-12 的存在引发 T 细胞的 Th1 型反应。此数据表明较高剂量的发酵乳杆菌 VRI 003 有能力使免疫反应倾向于 Th1 反应，并且这比用发酵乳杆菌 VRI 002 进行更有效。

(b) 体内发酵乳杆菌 VRI 003 对免疫参数的影响

对 BALB/c 小鼠经口施用发酵乳杆菌 VRI 003，每只小鼠每天施用 1×10^9 cfu。在不同时间点处死小鼠。将脾及淋巴集结进行切除并对免疫参数进行测定。

BALB/c 小鼠经口施用发酵乳杆菌 VRI003 5 天，每只小鼠每天施用 1×10^9 CFU。对照小鼠施用 PBS。第 6 天将小鼠处死。将脾及淋巴集结进行切除并对免疫参数进行测定。

如图 7 显示的，与对照组及与实验中应用的其它实验室菌株（另一菌株为发酵乳杆菌 LF1）相比，经口摄食发酵乳杆菌 VRI 003 5 天导致淋巴集结的 IFN- γ 及 IL-12 显著增强。图 8 显示摄食发酵乳杆菌 VRI-003 似乎不影响脾中的细胞因子水平。摄食发酵乳杆菌 VRI 003 小鼠的 IL-12 及 IFN- γ 水平与对照小鼠（摄食 PBS）相似。因此在缺乏有效感染的正常小

鼠中经口摄食发酵乳杆菌 VRI 003 刺激粘膜免疫，并用于引发它对肠病原体的最佳反应。

(viii) 发酵乳杆菌 VRI 003 的冷冻干燥粉剂的稳定性

图 9 显示 VRI 003 与低水活性抗性淀粉组合在明胶胶囊中于 25℃ 及 30℃ 保存特别稳定。

(ix) 粘附

虽然定居胃肠道的能力对益生菌株在消化道的活性功能不是必要条件，但这是一个所需特征。如果益生菌株可粘附到胃肠道上皮，它可在胃肠道定居即建立并生长在胃肠道中，并不断产生可介导有益作用的代谢产物。变种 VRI 003 当经口施用一些人时定居在人消化道。

(x) 拮抗作用

通过体外病原体抑制研究，明显的是菌株产生抑制一些潜在病原体生长的代谢产物，所述病原体均包括许多株大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*、*Enterococcus faecalis*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 及金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 在内的革兰氏阴性及革兰氏阳性种。

不希望受任何特定的作用机制限制，对于益生菌株有效保护受试者免受来自胃肠道病原体的作用，可需要产生一些抑制病原体生长的代谢产物。将此对生长的抑制作用称为拮抗作用并可将拮抗性代谢产物分类为低或高分子量化合物。将三个不同的方法用于评估菌株 VRI 003 对一些人病原体的拮抗能力，所述三种方法为直接平板共培养测定、在来自乳杆菌的用过培养液 (spent culture fluid) 中的培养液培养及动物攻击模型。

通过用病原体覆盖乳杆菌的点接种物及在接种后测定病原体生长抑制区的大小，直接平板培养法用于筛选许多病原体。为了进一步用此方法对拮抗作用进行定量，将 VRI 003 与病原体在液体培养基中进行共培养并在 24 小时后，对活病原体细胞进行计数。区的大小用于定量抑制程度。

对菌株 VRI 003 的抑制活性也进行了测定，以确定乳杆菌的低或高分子量代谢产物是否介导了所检测的生长抑制作用。对 VRI 003 用过的细菌培养液进行收集并将一部分进行透析以只保留分子量大于 8,000 的化合物。在无或有透析残留物及未透析的经用过培养液中对所选择人病原体的生长进行研究。未经透析过滤的无菌用过培养液阻止病原体的生长，而透析液显示抑菌及杀菌作用。

自体外病原体抑制研究显示菌株产生抑制革兰氏阴性及革兰氏阳性种类的一些潜在病原体生长的代谢产物。在动物攻击研究中显示变种 VR1003 产生可抑制病原体并保护动物的低及高分子量代谢产物。用沙门氏菌攻击经口施用乳杆菌该菌株的小鼠阻止了在只施用沙门氏菌而不施用乳杆菌的对照小鼠中观察到的体重减轻。

实施例 3: 培养物及剂型

(i) 培养物的生长

发酵乳杆菌变种 VRI 003 于 37°C 在发酵容器中生长。然后将容器冷却并将发酵培养液浓缩优选通过离心浓缩。将经收集培养物进行干燥优选通过冷冻干燥并随后进行粉碎。然后将经粉碎物质与主要赋形剂混合以产生每克干物质中所需水平的微生物。所使用的水平根据应用而定（范围高达每克 log11）。然后通过将所有成分在混合器（优选 V-混合器）中混合，将经标准化物质在剂型中进行应用。

(ii) 剂型

(a) 剂型 A: 基于高直链玉米的（合生素剂型）

发酵乳杆菌 VRI 003	100mg
hi-maize 958（或 1043）	170mg
硬脂酸	不超过 4.5mg
二氧化硅	不超过 4.5mg

(b) 剂型 B: 基于微晶纤维素（MCC）的

发酵乳杆菌 VRI 003	100mg
Avicell Ph 112（或等同物）	170mg

硬脂酸	不超过 4.5mg
二氧化硅	不超过 4.5mg

(c) 剂型 C: 如 A 及 B 描述的基于高直链玉米或 MCC 的, 用胶态二氧化硅 (不超过 4.5 mg) 代替二氧化硅或者为胶态二氧化硅及二氧化硅 (不超过 4.5 mg)。

对于 VRI 003 的一个所需特征是它保持成活力, 并在施药后具有在胃肠道生长的能力。如以上概述的此特征为用于所需菌株的一个筛选标准。然而, 这对于所需有益作用不是必需的。

在此方面另一重要因素为虽然菌株具有在胃肠道中多种条件下存活的能力, 在大量生长并以产品形式进行分发时, 菌株必需保持成活力及所需菌株特征。以上显示的所有结果是基于直接从活性生长的实验室培养物收获的 VRI 003 细胞。以下是在大量培养及冷冻干燥后以及在明胶胶囊中包封后, VRI 003 的成活力及菌株特征分析。

(iii) 经冷冻干燥 VRI 003 的成活力

大量生产及冷冻干燥后, 通过分析每克干物质的菌落形成单位 (CFU/g) 对 VRI 003 的成活力进行确定。对在明胶胶囊中包封前及包封后的干粉剂均进行检查。对成活细胞数以十个单一 1g 粉剂样本进行确定。对十个胶囊的内容物也分别进行分析。

通过生产及包封, VRI003 的成活力仍保持高水平。干粉剂包含 5.6×10^{10} cfu/g 且胶囊内容物包含 4.15×10^{10} CFU/g; 结果用 $n=10$ 的平均数表达。

当胶囊在薄片/薄片包装中储存时, 于 30℃ 及 25℃ 储存 6 个月, 注意到成活力降低 1.5 log 或更少。

(iv) 变种特征

将干粉剂及胶囊内容物在磷酸盐缓冲液 (0.1M, pH 7.2) 中悬浮以产生 100 倍的稀释液。对以上概述的变种特征在此细菌悬液中进行检测。对于所有检测, 将 VRI 003 的活性生长培养物包括在内作为内对照。如以下详细描述, 对于冷冻干燥粉剂或对于胶囊内容物, 没有观察到菌株特征

的明显降低。

此外，粉剂及胶囊内容物显示与实验室的生长对照培养物相似的粘附特征。

实施例 4: 有或无益生菌时施用发酵乳杆菌 VRI、VRI 003 对肠易激综合征症状 (IBS) 及胃肠菌群谱的影响

(i) 实验设计

参加者

交了书面试服志愿书 (HREC 99264) 后, 七个 IBS 患者 (2 个男性及 5 个女性) 参加了本研究。在开始本研究前三个月, 所有患者没有施用抗生素。所有患者在参加本试验前通过医生检查显示存在 IBS 诊断标准及没有器质性疾病。所有患者在研究时是有症状的。

试验设计

单盲安慰剂期试验持续 8 周, 其由 3 周安慰剂治疗期、接着 2 周洗脱期 (无治疗) 及最后 3 周合生素治疗期 (即用包含 VRI 003 变种及益生菌的制剂治疗) 组成。较小组的患者用仅包含 VRI 003 的制剂进行治疗。

在本研究中, 患者的饮食不受控制, 但建议他们克制不要食用经发酵乳产品 (例如酸乳酪及酸奶油)。试验的第一天需要来自患者的新鲜粪便样本以形成基线期, 及然后在第 21、35 及 56 天 (每一治疗期前及治疗期后) 对患者的新鲜粪便样本进行收集。患者在试验的第一天完成原始调查表及此后在试验的每周患者完成周调查表。

一般的治疗方案如以下 (提供用于合生素制剂, 但对仅有 VRI 003 的制剂用相似的方案)。

胶囊及糖类

将空胶囊手工装填。胶囊的组装在层流柜中进行并在应用前, 将材料在 UV 下灭菌 15 分钟。安慰剂胶囊包含微晶纤维素 NF XVIII (Mingtai Chemical Company Ltd, 台湾), 而益生菌胶囊包含作为冷冻干燥粉的发酵乳杆菌 (VRI 003) (1.67×10^{10} cfu.gm⁻¹, DSM Moorebank, 悉尼)。将经组装胶囊与两袋硅胶置于 120 mL 样本瓶中。

将麦芽糖糊精 (Fieldstar™, Goodman Fielder, 悉尼) 及抗性淀粉 (CulturePro™ 958, Penfold, 澳大利亚) 分别用作安慰剂及益生糖类。将糖类在层流柜中置于 UV 下 15 分钟, 然后将样本称重 (20g) 并置于储存在干净房间的 70 mL 样本瓶中。

调查表

原始调查表用于在开始试验前记录患者以前及现在的症状。要求患者对他们的症状包括腹泻、便秘、腹泻及便秘交替、肠胃气胀、胃气胀、痉挛性腹痛的严重性以 0 (无) 到 10 (极其严重) 分级。对有关肠紊乱的原因及缓解措施以及食物过敏性等其它问题也进行询问。

在试验期间的每周末, 要求患者完成周调查表, 所述周调查表再次要求他们对他们的症状以及任何肠紊乱性质进行分级。此外, 对有关胶囊及糖类的消费量及明显作用也进行询问。

粪便材料的制备

收集来自 IBS 患者的粪便接种物, 所述 IBS 患者在试验前三个月没有施用抗生素。将粪便收集到干净塑料容器中并在到达后转移到厌氧培养箱中。一份粪便与三份的半浓度 Wilkin-Chalgrens (WC) 培养液 (Oxoid, CM643) 在 Seward stomacher bag 中进行匀浆化。

细菌计数

在灭菌微离心管中, 用半浓度 Wilkin-Chalgrens (WC) 培养液 (Oxoid, CM643) 十倍系列稀释, 然后将 10 μ L 份一式三份逐滴涂布到不同培养基 (表 1) 上。以估计粪便样本中存在的主要微生物群。根据制造者的说明制备培养基。将涂布到 RCA 平板上的样本先加热到 90 $^{\circ}$ C, 进行 10 分钟。

表 1. 发酵中计数的细菌群

培养基	微生物	稀释度涂布	孵育
营养琼脂 (NA; CM3*)	总需氧菌	10^{-4} 至 10^{-8}	O ₂ , 24 小时
麦康基琼脂(MAC; CM7*)	肠杆菌	10^{-4} 至 10^{-8}	O ₂ , 24 小时
WC+血 ¹ 琼脂 (CM619*)	总厌氧菌	10^{-4} 至 10^{-8}	无 O ₂ , 48 小时
WC+血 ¹ + 抗生素添加剂 ² (CM619)	革兰氏阴性厌氧菌	10^{-4} 至 10^{-8}	无 O ₂ , 48 小时
Rogosa 琼脂 (CM627*)	乳杆菌	10^{-4} 至 10^{-8}	无 O ₂ , 48 小时
棉子糖双歧杆菌琼脂 (RB; Hartemink, 1995)	双歧杆菌	10^{-4} 至 10^{-8}	无 O ₂ , 48 小时
加强的梭菌琼脂 (RCA; CM151*)	梭菌	10^{-1} 至 10^{-5}	无 O ₂ , 72 小时

* Oxoid

1 Oxoid 去纤维蛋白血 (每 1L 琼脂 50 mL)

2 Oxoid G-N 厌氧选择性添加剂 SR108B

(ii) 仅施用或与益生菌组合施用发酵乳杆菌 VRI 003 的作用 - 结果总结

表 2: 仅施用或与益生菌 (高直链玉米淀粉) (抗性淀粉= RS) 一起施用, 发酵乳杆菌 VRI 003 对 IBS 症状严重度的作用。结果表示为对应于无症状的“-”至“+”至“+++”, 其中较严重症状显示为“+++”。

症状	基线期	安慰剂期	VRI 003+RS	仅有 VRI 003
腹泻	+++	+++	+	+
胃气胀	+++	++	+	++

甚至仅施用 VRI 003 时是有效的。然而, 与仅施用益生菌或仅施用 β -葡聚糖相比, VRI 003 与高直链玉米淀粉组合升高了 VRI003 细菌水平并降低了某些细菌如沙门氏菌及梭菌的水平。

实施例 5: 在试验期间用来自 IBS 受试者材料的粪便微生物谱的变化试验期间获得了总需氧菌、肠细菌、总厌氧菌、革兰氏阴性厌氧菌、乳杆菌、梭菌及双歧杆菌变化的结果。图上显示的时间点代表在试验开始

(基线期)、安慰剂治疗期结束、洗脱期结束及合生素治疗期结束时的粪便微生物谱。关于结果,根据受试者常规经历的症状,将他们分为主要为腹泻、主要为便秘、以及主要为便秘与腹泻交替这三个小组。因为在具有疾病的受试者症状上的广泛变异性,此分组允许对受试者进行适当评估(Akehurst 和 Kaltenthaler, 2001)。然而,一个受试者不适合三个小组中的任一个,将其归入主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹痛的单独组。

主要为腹泻的受试者

主要为腹泻受试者的粪便微生物谱的变化在图 10 (受试者 4)、图 11 (受试者 5) 及图 12 (受试者 9) 中显示。

受试者 4 (图 10): 除了在洗脱期间总需氧菌增加了 1 log 外,总需氧菌保持在 $1 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的稳定水平。虽然在洗脱期结束时与总需氧菌数相比肠细菌开始显示了很大差异,最初检测到为 $1 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的肠细菌数在合生素治疗期结束后,降低了 1.5 log。开始时均为 $5 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌在合生素治疗期结束时显示增加了 1 log。乳杆菌最初检测到为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 在安慰剂期及合生素治疗期结束时显示降低了 2 log, 在洗脱期间,乳杆菌又有升高。在整个试验期间,未检测到梭菌,而自开始为 $5 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 双歧杆菌数在合生素治疗期,增加了 1 log。

受试者 5 (图 11): 最初检测为 $5 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的总需氧菌在洗脱期及合生素治疗期增加了 1 log。除了在安慰剂治疗期结束时肠细菌数减少了 2 log 外,在所有时间点期间肠细菌保持在与总需氧菌相似的水平 ($5 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$)。总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌数虽然在安慰剂治疗期结束时降低了 1 至 1.5 log,但在试验期间该数保持 $1 \times 10^9 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的恒量水平。开始为 $1 \times 10^6 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的乳杆菌在安慰剂治疗期结束降低了 1 log,但在洗脱期结束时增加了 3 log,在合生素治疗期结束时又降低了 1 log。在试验开始检测到梭菌为 $1 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在试验的其余期为未检测到。开始为 $5 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的双歧杆菌,在安慰剂期及合生素治疗期结束时降低了 1 log,但在洗脱期间增加了 1 log。

受试者 9(图 12): 在基线期检测总需氧菌及肠细菌为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在合生素治疗期结束时缓慢降低 1.5 log。在基线期检测总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌为 $5 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 在安慰剂治疗期结束时增加 1 log 并在研究的其余期保持在稳定水平。在基线期检测到乳杆菌为 $5 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 然而在安慰剂治疗期为未检测到。在洗脱期结束时检测到乳杆菌又为 $5 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在合生素治疗期结束增加了 1 log。试验期间未检测到梭菌。双歧杆菌开始时为 $5 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 在安慰剂治疗期结束时降低了 1.5 log, 然而在洗脱期结束时又增加到 $5 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并直至合生素治疗期结束时一直保持此水平。

主要为便秘的受试者

主要为便秘的受试者的粪便微生物谱的变化在图 13 (受试者 2) 及图 14 (受试者 3) 进行显示。

受试者 2(图 13): 总需氧菌及肠细菌最初检测为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 除了在安慰剂治疗期结束时肠细菌数增加 1 log 外, 在试验期间保持相似水平。总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌在试验期保持 $1 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的相似水平, 在安慰剂治疗期结束时增加 1 log, 在合生素治疗期结束时降低了 0.5 log。开始为 $1 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的乳杆菌在安慰剂治疗期结束时增加了 1 log, 但在洗脱期结束为未检测到并在合生素治疗期结束时又增加了 3 log, 梭菌只在试验开始时为 $1 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在试验的其余期为未检测到。双歧杆菌开始检测为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 在安慰剂治疗期结束时降低 1.5 log, 然后在试验的其余期间为未检测到。

受试者 3(图 14): 总需氧菌及肠细菌在试验期间保持 $5 \times 10^4 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的相似水平并在安慰剂治疗期结束时增加 2 log, 但在合生素治疗期结束时降低 1 log。总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌开始为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在合生素治疗期结束时继续稳定增加 2 log。在试验的开始检测到乳杆菌为 $1 \times 10^4 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$, 但然后在安慰剂治疗期结束时为未检测到。然而, 乳杆菌在洗脱期结束显示增加 4.5 log 并在合生素治疗期结束时又降低 0.5 log。梭菌只在安慰剂治疗期结束时检测到为 $1 \times 10^4 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在试验

的其余期为未检测到。开始为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的双歧杆菌在安慰剂治疗期结束时为未检测到，但在洗脱期结束时又可检测到并在合生素治疗期结束时增加 4.5 log。

主要为腹泻与便秘交替的受试者

主要为腹泻与便秘交替的受试者的粪便微生物谱的变化在图 15（受试者 7）中进行显示。

受试者 7（图 15）：最初检测为 $5 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的总需氧菌及肠细菌在洗脱期结束时增加 2 log，但在合生素治疗期结束时降低 1 log。总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌开始为 $5 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在试验期间保持稳定水平，直到合生素治疗期后总厌氧菌降低 1 log，而革兰氏阴性厌氧菌降低 2 log。除了合生素治疗期结束时检测到乳杆菌为 $5 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 外，试验的大部分时期未检测到乳杆菌。相反，只在开始检测到梭菌为 $1 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 。开始检测到双歧杆菌为 $5 \times 10^6 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ ，然而在安慰剂治疗期为未检测到，只在洗脱期间可检测到为 $5 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在合生素治疗期结束时增加 0.5 log。

其它：主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹痛的受试者

主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹痛的受试者的粪便微生物谱的变化在图 16（受试者 6）中进行显示。

受试者 6（图 16）：总需氧菌及肠细菌最初检测为 $5 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并直到合生素治疗期保持此水平，但在合生素治疗期总需氧菌及肠细菌增加 2 log 的水平。在基线期检测到总厌氧菌及革兰氏阴性厌氧菌为 $1 \times 10^8 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在安慰剂治疗期结束时增加 1 log，然后在研究的其余期保持此水平。研究期间乳杆菌保持 $1 \times 10^4 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 的相对稳定水平。除了在合生素治疗期结束时检测到梭菌为 $5 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 外，在研究期间，未检测到梭菌。双歧杆菌开始为 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在安慰剂治疗期结束时降低 3 log，在洗脱期间又增加到 $1 \times 10^7 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 并在合生素治疗期结束时降低 3 log。

实施例 6：试验期间 IBS 受试者症状严重度的变化

获得了包括腹泻、便秘、腹泻与便秘交替、以及肠胃气胀、胃气胀和痉挛性腹痛症状严重度变化的结果。每个症状按 0 至 10 进行分级，0 表示没有症状，而 10 表示症状极其严重。结果按 1 至 5 级进行显示，1 表示症状严重度轻及 5 表示症状严重度重。每周对所有受试者症状严重度的变化进行监测，然而，结果只显示代表基线期（试验开始）、安慰剂治疗期、洗脱期及合生素治疗期的时间点。根据受试者一般经历疾病的症状，又将受试者分为主要为腹泻、主要为便秘及主要为腹泻与便秘交替的小组。

主要为腹泻的受试者

主要为腹泻的受试者症状严重度的变化在表 3（受试者 4）、表 4（受试者 5）、表 5（受试者 9）进行显示。

受试者 4（表 3）：在基线期腹泻的严重度极其高，然而，在安慰剂治疗期结束严重度降低了一半，在合生素治疗期结束进一步降低到低严重度。在基线期肠胃气胀及胃气胀为中严重度（3），在合生素治疗期结束最终降低到低严重度（1）。在基线期开始痉挛性腹痛也为低（2），在合生素治疗期结束时严重度进一步降低到 1。

表 3 8 周试验期间受试者 #4 症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+（低严重度）至+++++（高严重度）。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	+++++	++	++	+
便秘	-	-	-	-
肠胃气胀	+++	+++	++	+
胃气胀	+++	++	++	+
痉挛性腹痛	++	++	++	+

受试者 5（表 4）：在基线期时腹泻的严重度极其高并在安慰剂治疗期只轻微降低到 4，其后保持在高严重度。在基线期肠胃气胀是低的，安慰剂治疗期间不存在，但在洗脱期及合生素治疗期分别又增加到 1 及 2。在试验期间痉挛性腹痛的严重度保持在 3 的同等水平，但在洗脱期间降低了

1级。在试验期间肠胃气胀及胃气胀的症状是不存在的。

表4 8周试验期间受试者#5症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+（低严重度）至+++++（高严重度）。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	+++++	++++	++++	++++
便秘	-	-	-	-
肠胃气胀	+	-	+	++
胃气胀	-	-	-	-
痉挛性腹痛	+++	+++	++	+++

受试者9（表5）：在基线期时腹泻在中度范围（3）并且直至合生素治疗期时维持此严重度，合生素治疗期时降低了2到低严重度。除了安慰剂治疗期增加了1外，在试验期间便秘不存在。试验期间肠胃气胀也不存在，然而在洗脱期增加了3。在基线期为中严重度（3）的胃气胀，在安慰剂治疗期降低了1。然而，在洗脱期间其又增加了1并然后在合生素治疗期下降到低严重度（1）。在试验期间痉挛性腹痛是不存在的。

表5 8周试验期间受试者#9症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+（低严重度）至+++++（高严重度）。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	+++	+++	+++	+
便秘	-	+	-	-
肠胃气胀	-	-	+++	-
胃气胀	+++	++	+++	+
痉挛性腹痛	-	-	-	-

主要为便秘的受试者

主要为便秘的受试者症状严重度的变化在表6（受试者2）及表7（受试者3）进行显示。

受试者 2 (表 6)：在基线期及试验的大部分不存在的腹泻，在合生素治疗期增加到 1。在基线期及安慰剂期及洗脱期，便秘、肠胃气胀及胃气胀保持在高严重度 (5)，而在合生素治疗期降低了 1。在基线期及安慰剂治疗期，痉挛性腹痛为高严重度 (4)，但在洗脱期及合生素治疗期降低了 3 至低严重度。

表 6 8 周试验期间受试者 #2 症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+ (低严重度) 至+++++ (高严重度)。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	-	-	-	+
便秘	+++++	+++++	+++++	++++
肠胃气胀	+++++	+++++	+++++	++++
胃气胀	+++++	+++++	+++++	++++
痉挛性腹痛	++++	++++	+	+

受试者 3 (表 7)：在基线期时便秘开始为低严重度 (2) 并在安慰剂治疗期继续为此水平，但在洗脱期及合生素治疗期是不存在的。在基线期肠胃气胀开始为高严重度 (5)，在安慰剂治疗期降低到 3 并在洗脱期及合生素治疗期进一步降低到低严重度 (2)。在基线期时胃气胀开始也为非常高严重度并在安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期严重度分别降低到 4、3 及 3。在基线期痉挛性腹痛开始为高严重度 (4) 并在安慰剂治疗期降低到低严重度 (1)，其后在试验的剩余期是不存在的。试验期间腹泻是不存在的。

表 7 8 周试验期间受试者 # 3 症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+（低严重度）至+++++（高严重度）。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	-	-	-	-
便秘	++	++	-	-
肠胃气胀	+++++	+++	++	++
胃气胀	+++++	++++	+++	+++
痉挛性腹痛	++++	+	-	-

主要为腹泻与便秘交替的受试者

主要为腹泻与便秘交替的受试者症状严重度的变化在表 8（受试者 7）进行显示。

受试者 7（表 8）：在基线期时腹泻开始为低严重度（1）但在洗脱期及合生素治疗期增加到 2。在基线期时为低严重度（2）的便秘，在安慰剂期及洗脱期间降低了 1，但在合生素治疗期增加到 3。在基线期时肠胃气胀开始为低严重度（1）并在试验的大部分保持低水平，然而在合生素治疗期增加到 3。胃气胀开始为低严重度（2）并在安慰剂治疗期降低到 1，然而在洗脱期及合生素治疗期分别继续增加到 3 及 4。除了在合生素治疗期痉挛性腹痛增加到中严重度（3）外，它在试验期间是不存在的。

表 8 8 周试验期间受试者 # 7 症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+（低严重度）至+++++（高严重度）。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	+	+	++	++
便秘	++	+	+	+++
肠胃气胀	+	+	+	+++
胃气胀	++	+	+++	++++
痉挛性腹痛	-	-	-	+++

其它：主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹痛的受试者

主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹痛的受试者症状严重度的变化在表9（受试者6）中进行显示。

受试者6（表9）：除了在合生素治疗期腹泻增加1而至低严重度外，腹泻在试验的大部分时期是不存在的。在基线期时肠胃气胀开始为中严重度（3）并在安慰剂期及洗脱期降低到低严重度（1），然而在合生素治疗期又一次增加到中严重度（3）。在基线期胃气胀开始也为中严重度（3）并在安慰剂治疗期变为不存在，然而在洗脱期及合生素治疗期分别又增加到1及3。在基线期时痉挛性腹痛开始为低严重度（2），在安慰剂治疗期是不存在的，但在洗脱期及合生素治疗期分别增加了1及3。试验期间便秘是不存在的。

表9 8周试验期间受试者#6症状严重度的变化

在基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期对症状的严重度进行监测，结果表示为+（低严重度）至+++++（高严重度）。

症状	基线期	安慰剂期	洗脱期	合生素期
腹泻	-	-	-	+
便秘	-	-	-	-
肠胃气胀	+++	+	+	+++
胃气胀	+++	-	+	+++
痉挛性腹痛	++	-	+	+++

讨论

试验期间用来自IBS受试者材料的粪便微生物谱的变化与症状严重度变化之间的相关性

临床试验持续了总共8周，前3周涉及由麦芽糖糊精胶囊和纤维素组成的安慰剂治疗期。接着的2周为没有任何治疗的洗脱期。最后3周涉及由VRI 003胶囊和RS组成的合生素治疗期。在试验开始时对粪便样本进行收集以建立基线期，其后在每个治疗期前及每个治疗期后进一步收集样本。此外，通过自0至10分级的评分系统，每个患者也完成周调查表以监

测他们症状严重度的变化，所述 0 至 10 分级的评分系统中，0 为不存在症状，而 10 为最严重症状。然后为了方便，将结果转换为 1 至 5 级并显示为基线期、安慰剂期、洗脱期及合生素治疗期的情况。

如 Akehurst 等人和 Weston 等人 (Akehurst 和 Kaltenthaler, 2001; Weston, 等人, 1993) 显示的，根据患者症状的主要方面将患者分为 3 个亚组。因为在不同患者疾病中他们正常经历的症状的广泛变异性，因此将患者分为主要为腹泻、便秘或腹泻与便秘交替的亚组以因此对特定症状的变化进行评估。一个受试者 (#6) 特别显示不同于 3 个亚组中任何其它患者经历的症状，因此将其分到主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹泻症状的其它组。

主要为腹泻的受试者

合生素治疗期结束时，显示受试者 4 所有症状严重度的普遍降低 (表 3)，特别是腹泻，在基线期时开始为高严重度并然后在合生素治疗期结束时降低到低严重度。与此症状可能的相关性可在自基线期时的 $1 \times 10^5 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ 缓慢降低至合生素治疗期结束时的 $5 \times 10^3 \log \text{ cfu. mL}^{-1}$ (图 10) 的肠细菌中见到。乳杆菌数似乎与受试者 4 显示的任一症状均不相关，然而在合生素治疗期观察到双歧杆菌增加了 1 log，这与以前讨论的双歧杆菌能利用 RS 相关。然而，双歧杆菌的增加导致腹泻的降低是不太可能的，如在安慰剂期间此症状严重度开始降低，因此可能是在此受试者中，肠细菌对腹泻的严重度具有较大影响。

在试验期间，显示受试者不表现任何症状严重度的总体降低 (表 4)。然而，可注意到在安慰剂治疗期，观察到没有肠胃气胀，这可与肠细菌数降低 2 log (图 11) 相关。此受试者的总体概况表明合生素治疗对其不提高任何有益作用，而安慰剂治疗期可对症状的严重度有一些有益作用。在洗脱期乳杆菌数增加了 3 log，但在合生素治疗期结束时降低了 1 log。洗脱期间乳杆菌的大量增加也可与在此期间受试者显示的痉挛性腹痛降低相关，其在合生素治疗期结束时严重度增加，并在此期间乳杆菌有较小降低。观察到乳杆菌增加与痉挛性腹痛降低的相关也与 Nobaek 等人的发现有关，

所述 Nobaek 等人观察到施用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 降低 IBS 患者的疼痛及肠胃气胀 (Nobaek 等人, 2000)。在洗脱期也观察到双歧杆菌增加了 1 log, 因为据推定双歧杆菌间接促进乳杆菌的生长, 所以双歧杆菌增加也与乳杆菌的增加相关。虽然此受试者在合生素治疗期显示没有改善症状, 周调查表的评论表明在治疗期间症状保持相同, 而不是严重度增加。

试验结束显示受试者 9 所有症状的严重度整体改善 (表 5), 特别是合生素治疗期结束时自中严重度降到低严重度的腹泻及胃气胀。此类症状的降低可与肠细菌从基线期至合生素治疗期结束时降低 2 log 相关。也观察到在安慰剂治疗期结束后双歧杆菌增加了 3 log。然而, 此增加在症状还保持中严重度的洗脱期间开始, 因此双歧杆菌数对合生素治疗期症状的减轻没有作用。也观察到在合生素治疗期结束时乳杆菌数增加 (1 log), 这可与症状严重度降低相关。双歧杆菌及乳杆菌的增加也可与施用显示促进双歧杆菌生长并因此促进乳杆菌生长的 RS 相关 (Brown 等人, 2000)。

主要为便秘的受试者

受试者 2 除了洗脱期及合生素治疗期痉挛性腹痛严重度大大降低外, 显示受试者 2 大部分症状没有得到改善。来自粪便微生物谱的结果 (图 13) 显示在合生素治疗期, 不能检测到双歧杆菌并在此时间观察到总需氧菌及肠细菌降低 (1 log)。这可能表明肠细菌的降低可降低痉挛性腹痛的症状, 然而只可推测没有双歧杆菌也可与症状的降低相关, 因为认为双歧杆菌对人肠有益。受试者 2 的粪便微生物谱也显示在合生素治疗期乳杆菌没有提高到较高数量。这可因为乳杆菌在受试者肠中的低起始数引起的, 所述低起始数可能需要较长时间刺激到较高数量。虽然受试者的症状没有显示整体改善, 周调查表表明试验期间经历的症状保持稳定且严重度没有增加。

显示受试者 3 症状的严重度整体普遍改善 (表 7), 特别是洗脱期及合生素治疗期结束时降低的便秘及痉挛性腹痛。此类症状的改善可与合生素治疗末期双歧杆菌数的大量增加 (4 log) (图 5) 相关。双歧杆菌的增加表明在合生素治疗期施用 RS 刺激了双歧杆菌的生长。也显示施用的膳

食纤维（例如 RS）通过膨胀粪便降低便秘症状（Lambert, 等人, 1991; Philips, 等人, 1995）。与双歧杆菌相比, 虽然试验期间乳杆菌数低, 如果试验延长较长时间, 乳杆菌的数量可有较大程度增加。合生素治疗期结束时肠细菌也降低（1 log）, 且虽然其降低较少, 也可利于此类症状严重度的降低。

主要为腹泻与便秘交替的受试者

在安慰剂治疗期显示受试者 7 的所有症状改善（表 6）, 而在合生素治疗期显示症状严重度增加。试验期间观察到肠细菌数逐渐增加（图 15）, 表明肠细菌的增加可与症状如胃气胀及腹泻的上升相关。然而, 应当考虑的重要方面为施用益生菌如 RS 可能增加甚至健康受试者的胃气胀及肠胃气胀（Cummings 等人, 2001; Munster 等人, 1994）, 因此 IBS 受试者经历的此类症状的增加不是不可能的。也观察到在洗脱期间双歧杆菌数量增加, 而在安慰剂治疗期不能检查到, 表明双歧杆菌的增加大概可与此类症状的严重度增加相关。也观察到在 RB 培养基中检测到非常高量的双歧杆菌并注意到在此种平板上检测到除双歧杆菌外的其它种细菌, 如乳杆菌种（Hartemink 等人, 1996）。因此对生长在 RB 培养基上的菌落需进行生物化学试验, 以证实它们均为双歧杆菌种。

虽然合生素治疗期症状的严重度似乎增加, 但来自周调查表的评述表明此类症状经历与基线期相比较是正常的。

其它: 主要为肠胃气胀、胃气胀及痉挛性腹痛的受试者

对于受试者 6（表 9）观察到的症状严重度的变化（表 9）显示此受试者在安慰剂治疗期经历了症状严重度的降低, 而合生素治疗期显示似乎对症状具有不利作用。安慰剂治疗期, 观察到双歧杆菌数降低, 且乳杆菌数在较小程度上降低（图 16）。安慰剂治疗期双歧杆菌数目降低 3 log, 与肠胃气胀的降低及不存在胃气胀及痉挛性腹泻相对应。这只能表明尽管认为双歧杆菌为有益细菌, 但它们可与此类症状的增加相关。也应当考虑施用益生菌特别是 RS 显示胃气胀及肠胃气胀症状增加（Cummings, 等人, 2001; Munster, 等人, 1994）, 所述胃气胀及肠胃气胀症状增加为受试

者 6 在合生素治疗期施用 RS 期间显示的症状。安慰剂治疗期症状严重度的普遍改善也可归因于纤维素引起的可能膨胀作用及因此易于排便。周调查表也表明受试者在洗脱期饮用了少量酒精，这可加重症状。此外，应当注意此受试者在合生素治疗期经历了应激，这也可增加症状的严重度，如其它人观察到的（Lidbeck 和 Nord, 1994; Longstreth 和 Wolde-Tsadik, 1993）。

粪便微生物谱的试验结果表明肠杆菌数的普遍降低与症状严重度的降低相关。乳杆菌数的增加也与一些症状的改善如肠胃气胀的降低（受试者 5）相关。然而，乳杆菌在改善症状方面似乎不发挥非常主要作用。相比较而言，可显示双歧杆菌的增加与症状的严重度有一些相关性，但它可为混合作用。可观察到双歧杆菌的增加与便秘及痉挛性腹痛的降低（受试者 #3）相关，然而双歧杆菌的增加也可与肠胃气胀及痉挛性腹痛的增加（受试者 #7）相关。可能双歧杆菌的不同种涉及症状严重度的增加或降低，或可能不同的患者受定居的不同肠微生物影响，其中所述定居的不同肠微生物影响胃肠道中双歧杆菌水平。

试验提供了初步结果，所述初步结果证明当施用含 VRI 003 及 RS 的合生素剂型或仅施用 VRI 003 时，IBS 患者的粪便微生物谱及症状严重度产生有利变化。

实施例 7: 湿疹的治疗

经医学诊断为严重湿疹的 21 岁女性患者表现为全身广泛皮疹及面颊毛细血管扩张。皮肤非常干燥并由于干燥感觉紧缩。目前治疗包括每日施用可的松乳膏及保湿剂。

用发酵乳杆菌 VRI-003 治疗，开始为每天早晨用 3 粒胶囊与食物及晚上用 3 粒胶囊与食物，每粒胶囊包含 4.2×10^{10} cfu。保湿剂及可的松乳膏照常应用。经口施用发酵乳杆菌 2 周后，用视觉模拟标度(visual analog scale, VAS; 标度 1-10, 其中 1 = 低且 10=严重)显示湿疹严重度降低了 2 个单位，皮肤的红色减轻，用 VAS 显示过敏性降低了 2 个单位，皮肤纹理得到轻微改善。发痒也降低并观察到剥落减少。总体上，患者的生活质

量得到改善。

实施例 8: 肠紊乱的湿疹患者

经医学诊断为湿疹的 33 岁男性患者, 所述湿疹表现为发炎、发痒、皮肤干燥及开放性溃疡。以前治疗包括施用类固醇软膏。阑尾切除术后, 受试者也经历了肠疾病。

用发酵乳杆菌 VRI003 治疗, 以天为基础, 开始治疗时为早晨用 3 粒胶囊与食物及晚上用 3 粒胶囊与食物, 每粒胶囊包含 4.2×10^{10} cfu。摄入发酵乳杆菌 VRI003 2 周后, 报道受试者与他的湿疹相关的搔痒降低。同样他的胃肠健康得到改善, 即上厕所次数大大减少。

实施例 9: 具有慢性疲劳且矿物质及维生素吸收/利用率不好的节段性回肠炎

一个患有节段性回肠炎 10 多年的 35-40 岁女性, 每天早晨及晚上施用 3 粒胶囊与食物 (每粒胶囊包含 4×10^{10} cfu 的发酵乳杆菌 VRI 003), 1 周后腹泻、痉挛、腹痛、不断疲劳及液体滞留的症状大大降低。粪便变得成型。铁及维生素 B12 水平极好, 因此证实肠中发酵乳杆菌 003 的存在改善了铁及维生素的吸收和/或生物利用率。

实施例 10: 益生发酵乳杆菌 VRI-003 对肠易激综合征 (IBS) 患者的作用

对 IBS 患者进行了随机、多中心、交叉试验以研究益生发酵乳杆菌 VRI 003 在降低 IBS 中见到的胃肠紊乱严重度的作用。研究进行了整 18 周 (完成试验后 2 周的随访), 其中受试者接受活性及安慰剂治疗期。益生菌治疗方案的详细情况如下:

周	治疗
0-2	基线期
4 周	益生菌期/安慰剂期
6 周	洗脱期 (无治疗)
4 周	益生菌期/安慰剂期

本研究靶向于满足 IBS Rome 标准的, 属于 17-74 岁年龄组的受试者,

所述 IBS Rome 标准是通过医学顾问证实的。然而，研究排除了经历胃肠感染及任何其它类型器质性疾病（即肝病等）的患者。也强烈建议志愿者在参加研究时不摄入任何益生菌。

患者历史：54 岁，白种人，女性，自她十几岁患 IBS。活动性 IBS 症状包括腹泻及胃气胀，特别是在晚上。当受试者 1 吃糖含量高的食物如蛋糕、面粉糕饼及巧克力时，她的症状加重。

治疗 1：早晨及晚上随食物摄入 1 粒发酵乳杆菌 VRI 003 胶囊，每粒胶囊包含 3×10^{10} VRI-003/胶囊。

症状评估：早晨及晚上施用 1 粒发酵乳杆菌 VRI-003 胶囊导致规则的肠蠕动。粪便变得坚硬并且胃气胀的强度降低。然而，当食用饮食中富含糖的食物时，发酵乳杆菌 VRI-003 不降低症状的严重度，也不加重症状。

实施例 11：发酵乳杆菌 VRI 003 对玫瑰痤疮症状的益处

具有活动性 IBS 及脸上有玫瑰痤疮的男性 45-55 岁患者，他的皮肤科医生对玫瑰痤疮的红色及损伤治疗多年。在用发酵乳杆菌 VRI 003 治疗 IBS 时（每天在明胶胶囊中含 \log_{10} -11 cfu），玫瑰痤疮引起的患者脸上的红色及损伤极大降低并能停止使用所有抗生素软膏及类固醇乳膏。在摄入发酵乳杆菌 003 时，他脸上的疾病减轻。

虽然本发明参考这些具体实施例进行了描述，本领域技术人员可以理解本发明可以许多其它形式具体体现。

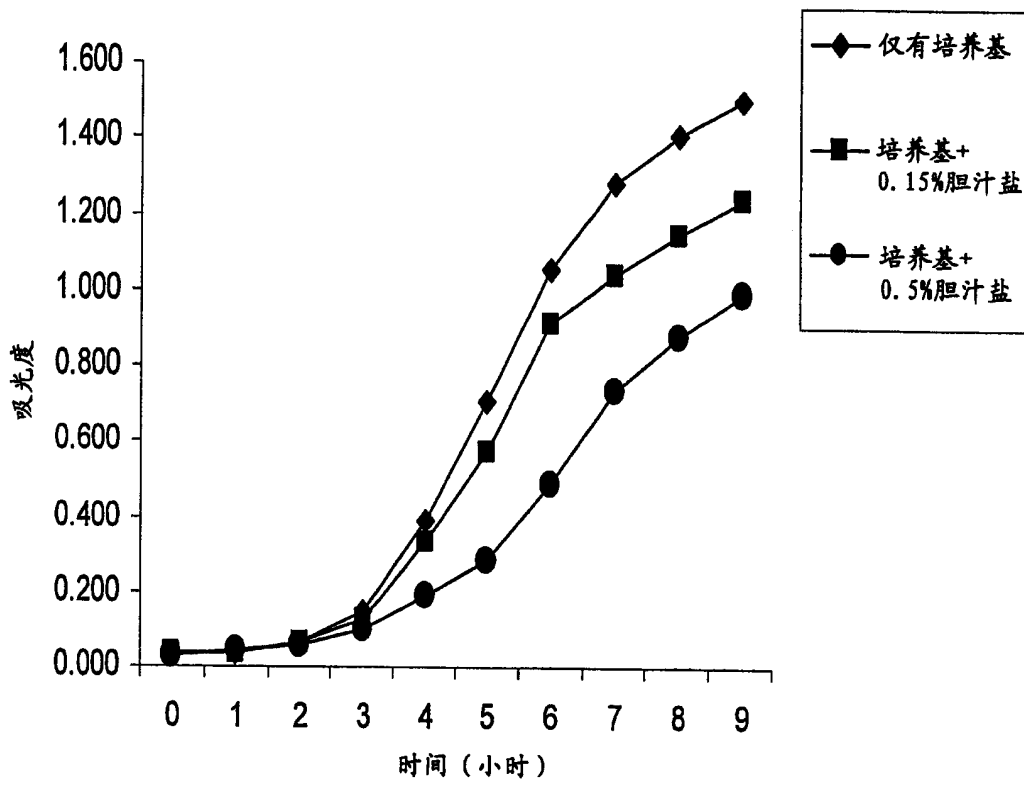


图1

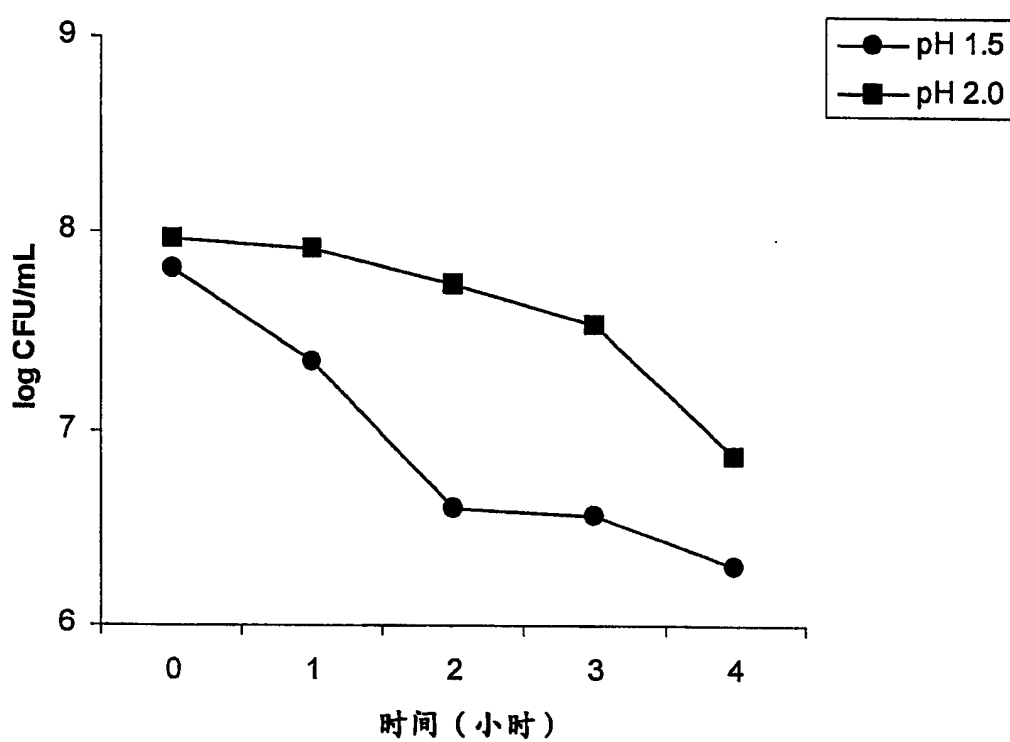


图2

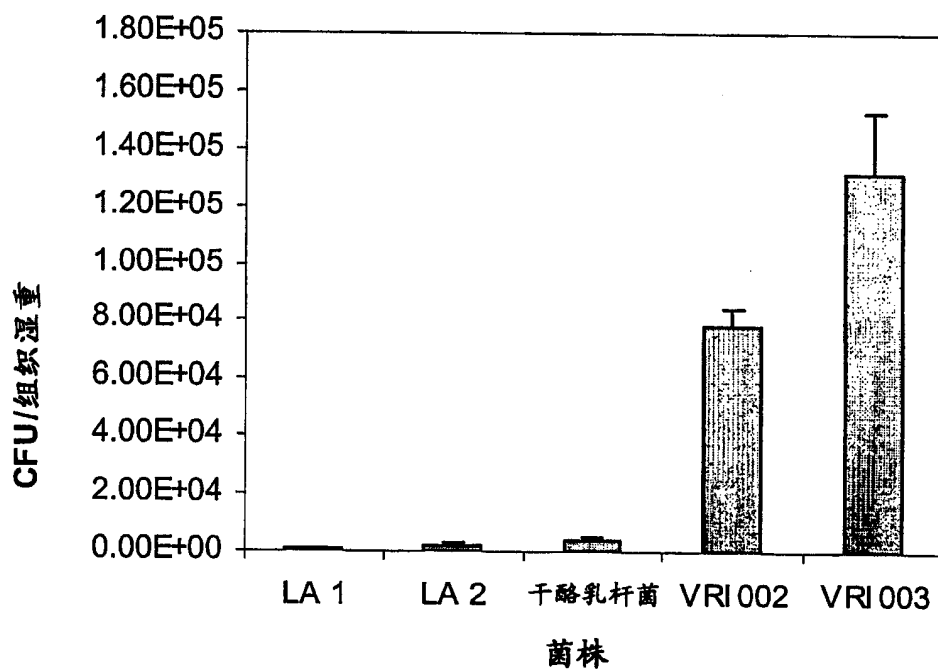
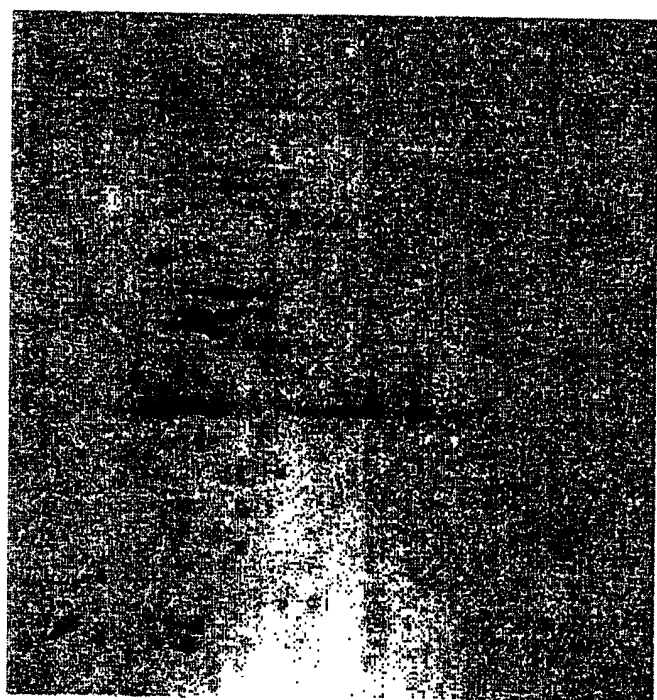


图 3



□ 上调
○ 下调

发酵乳杆菌VRI 003

图4

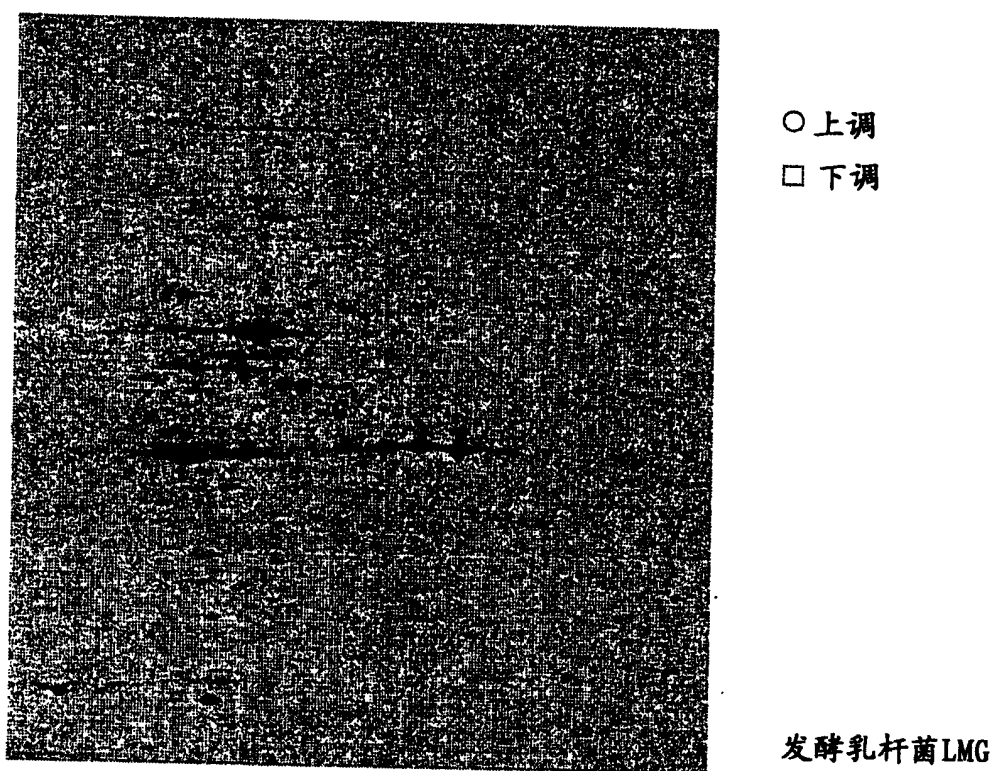


图5

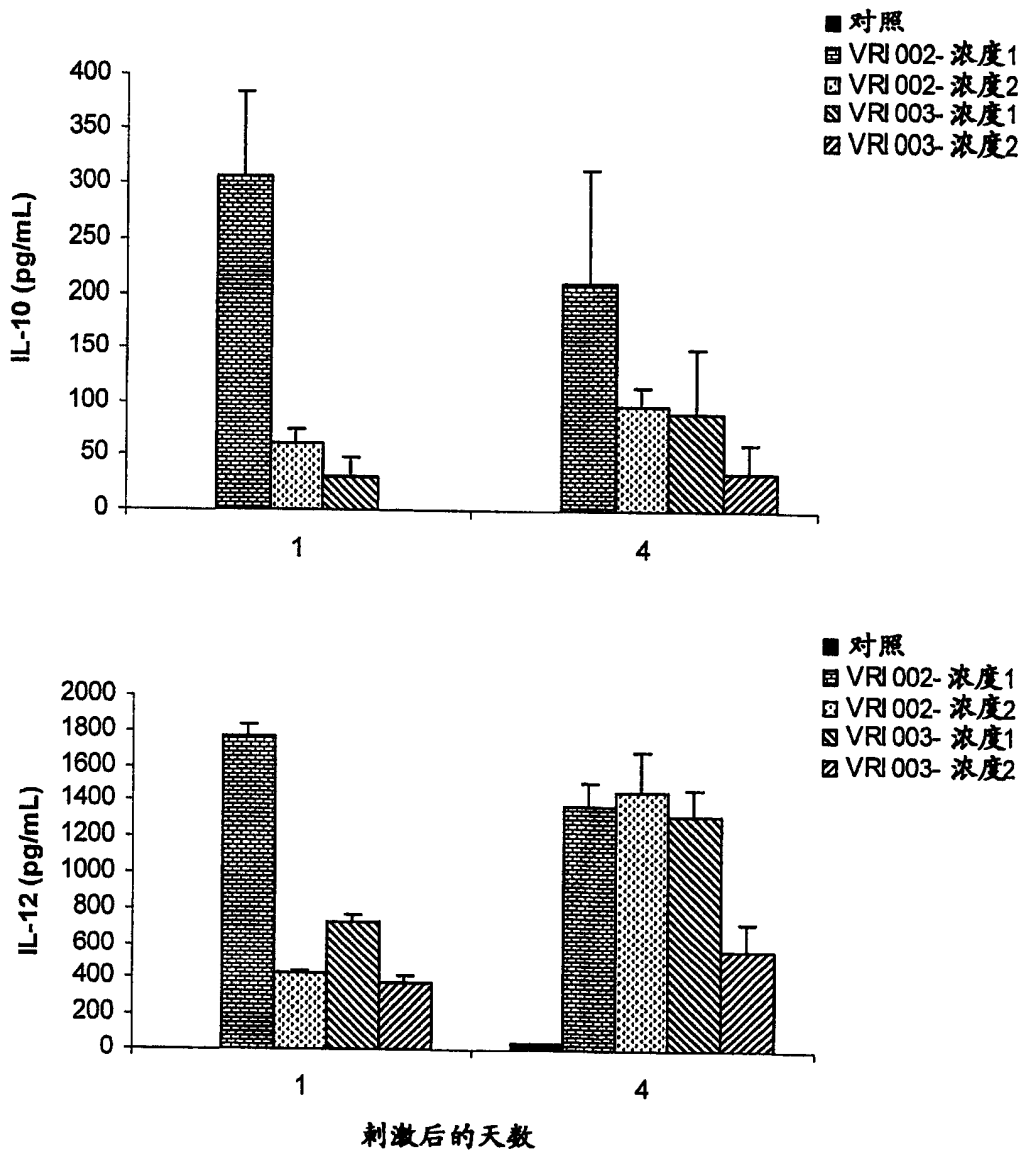


图6

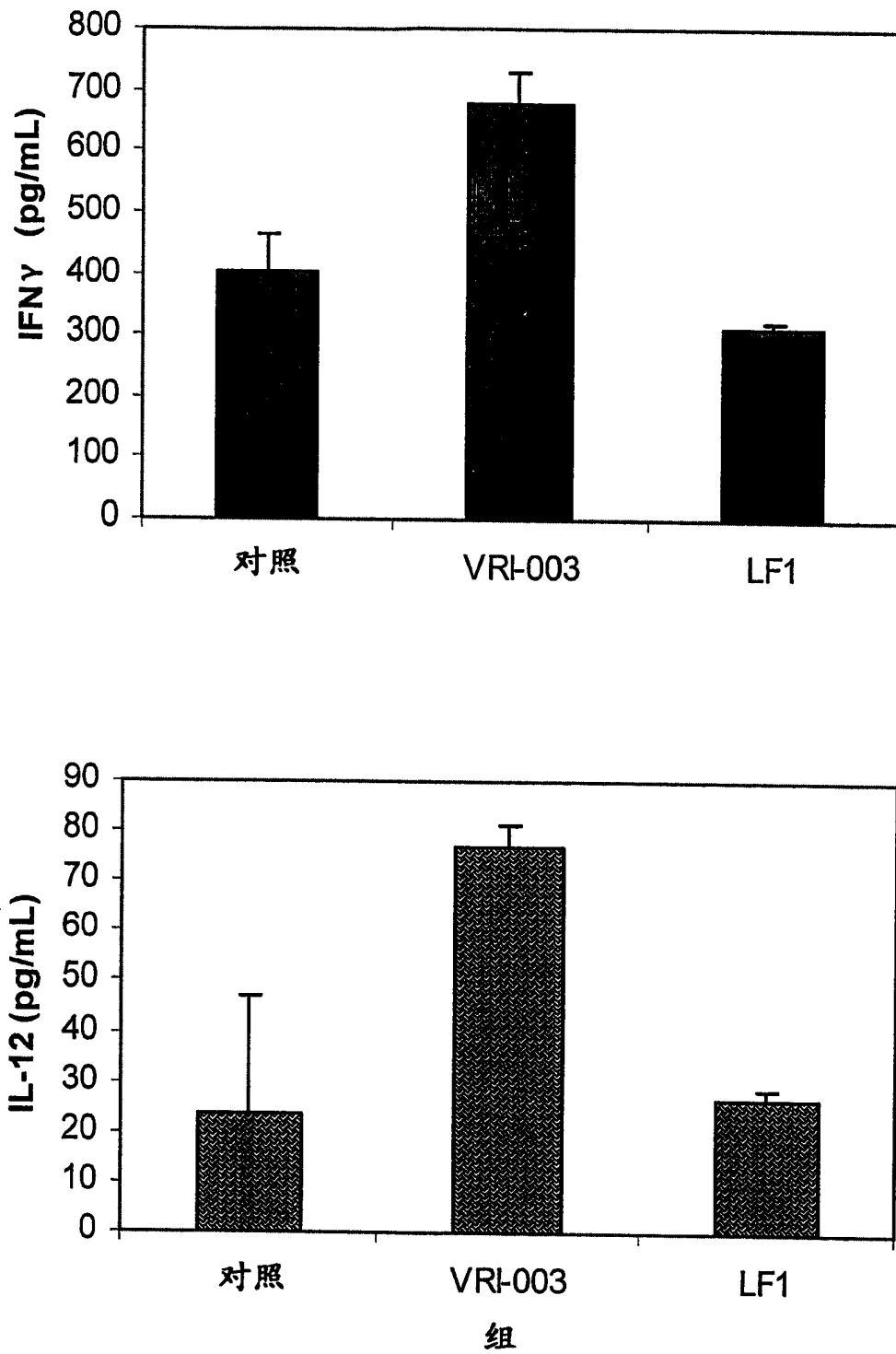


图7

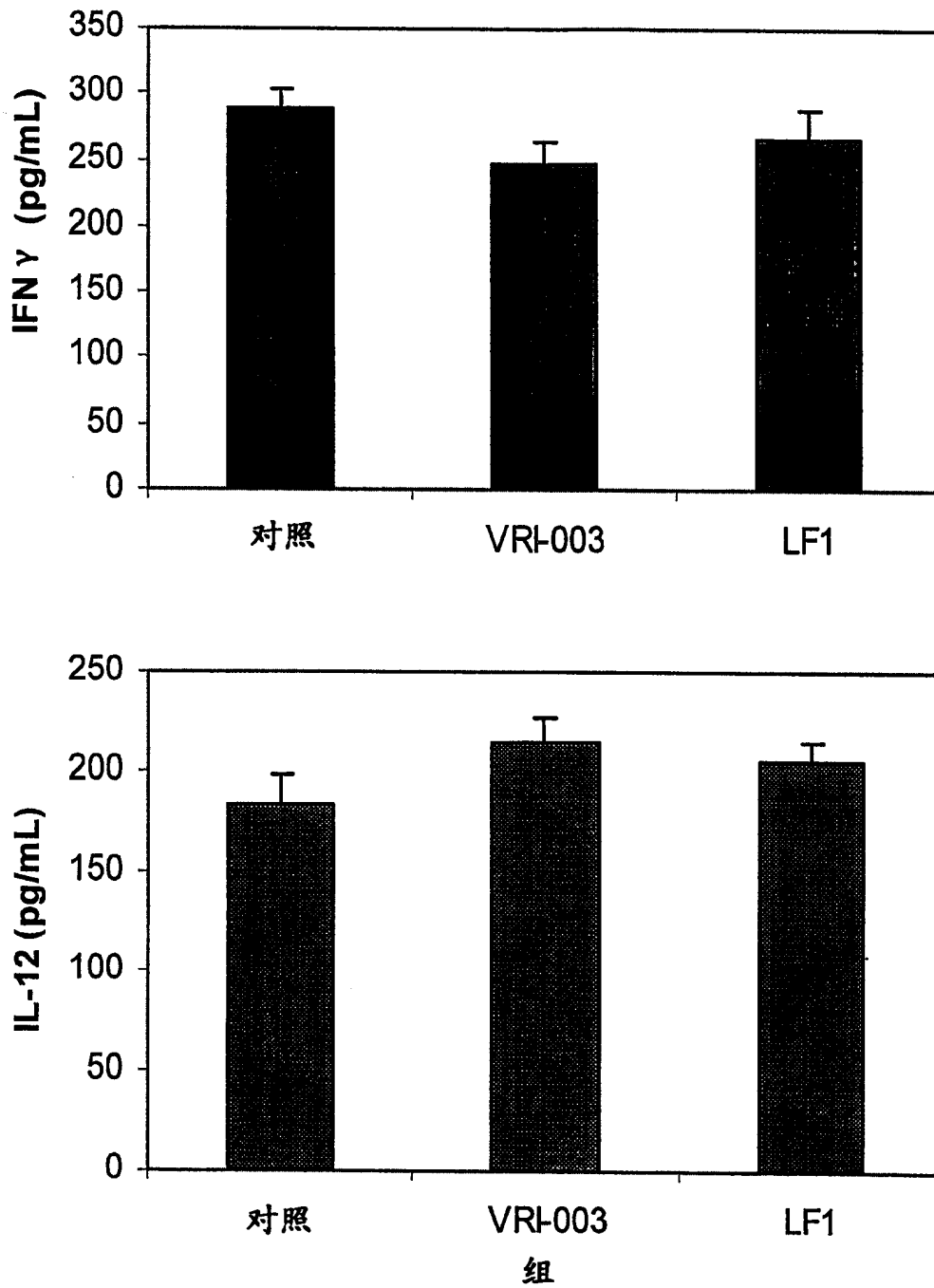


图8

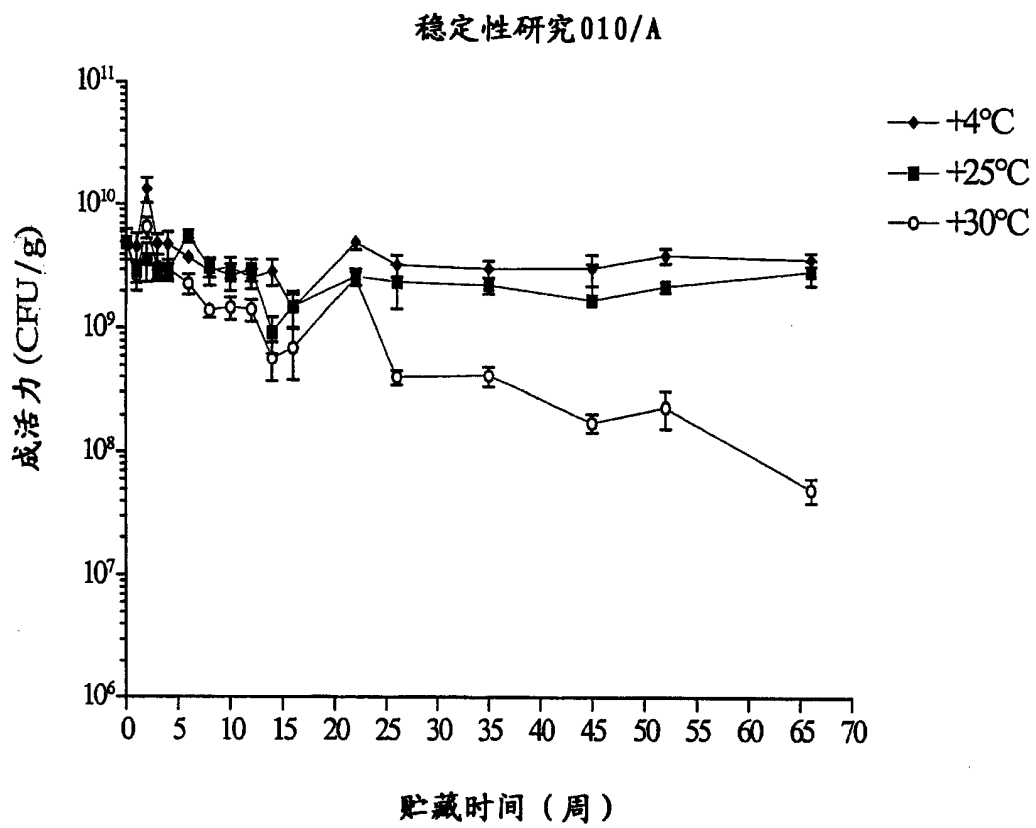


图9

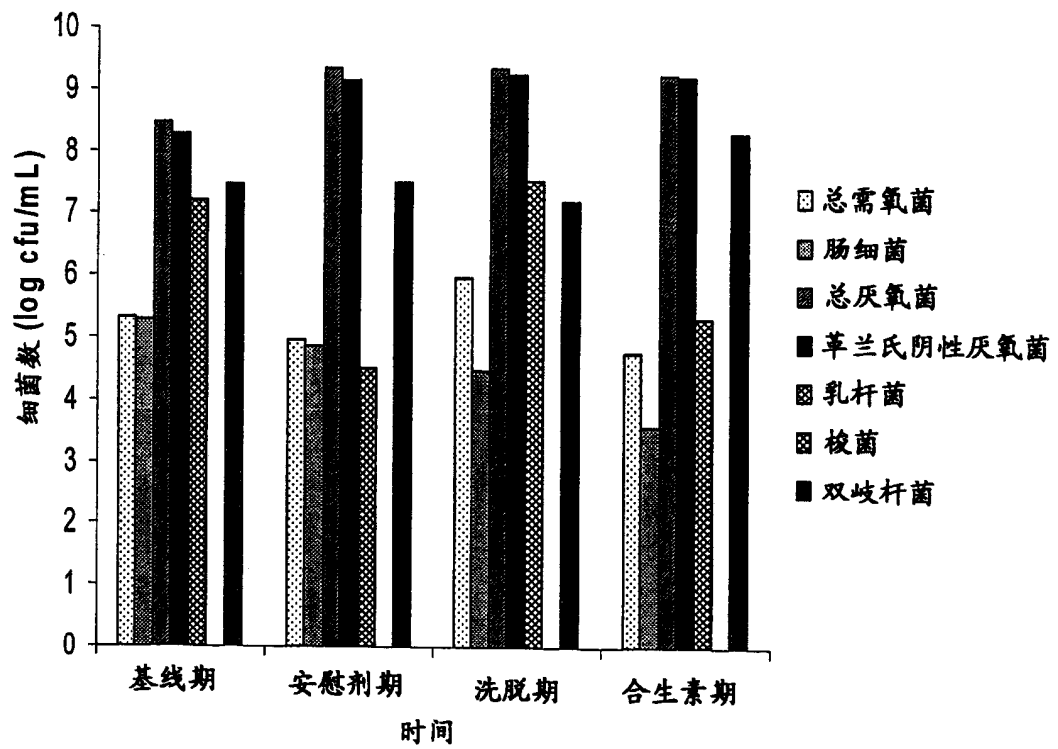


图10

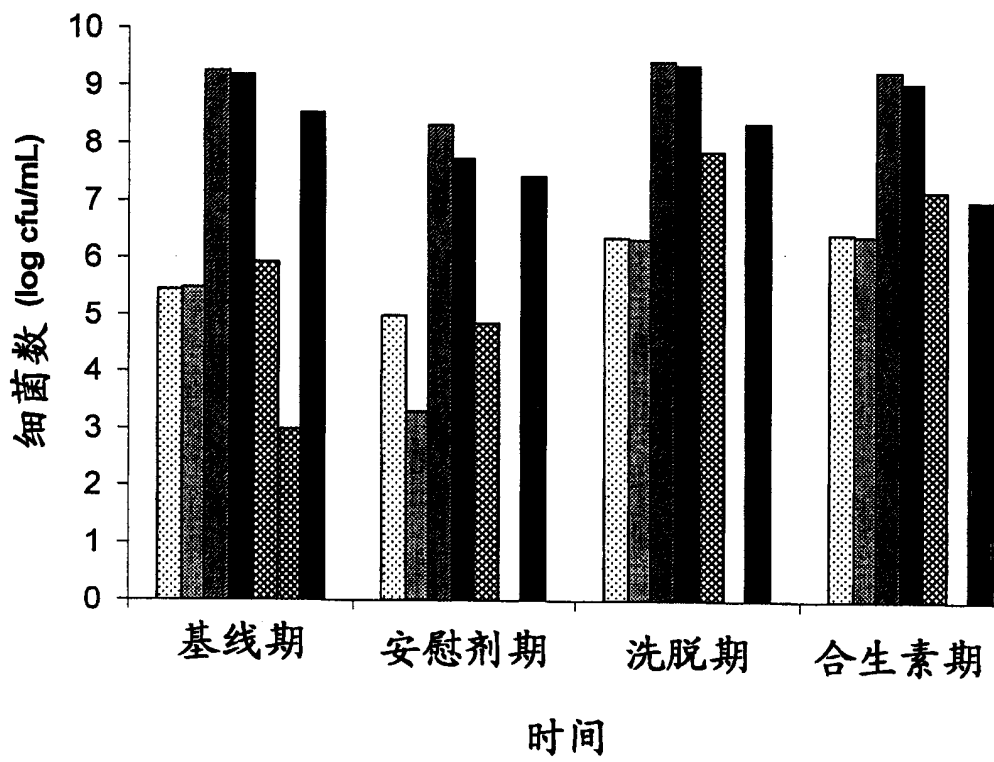


图11

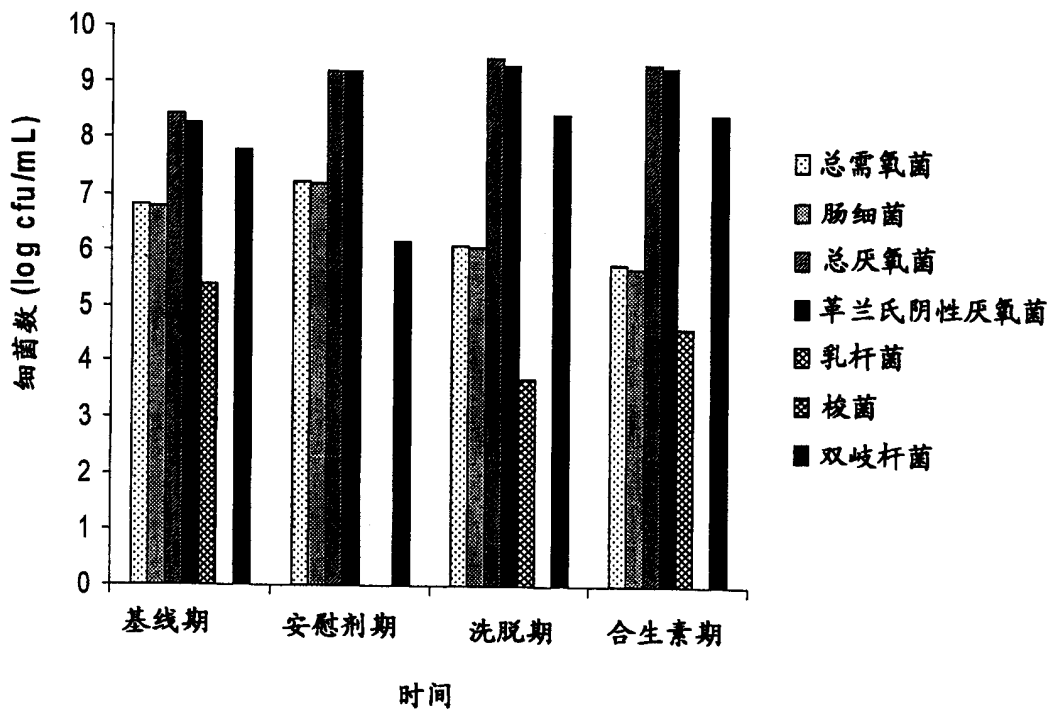
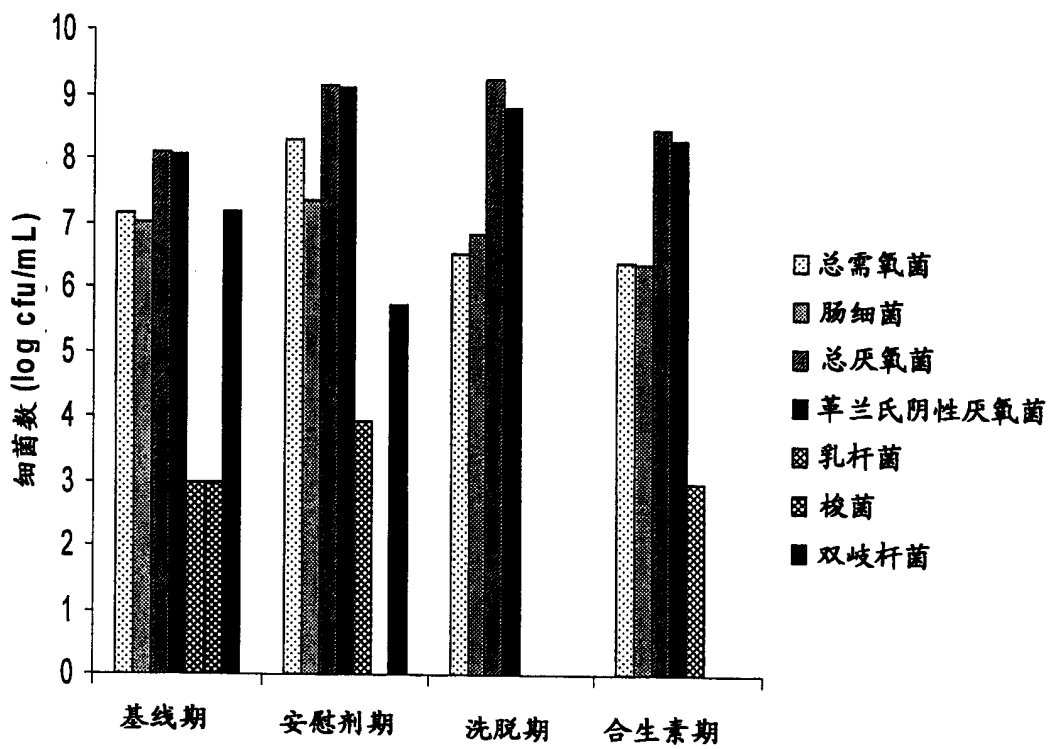
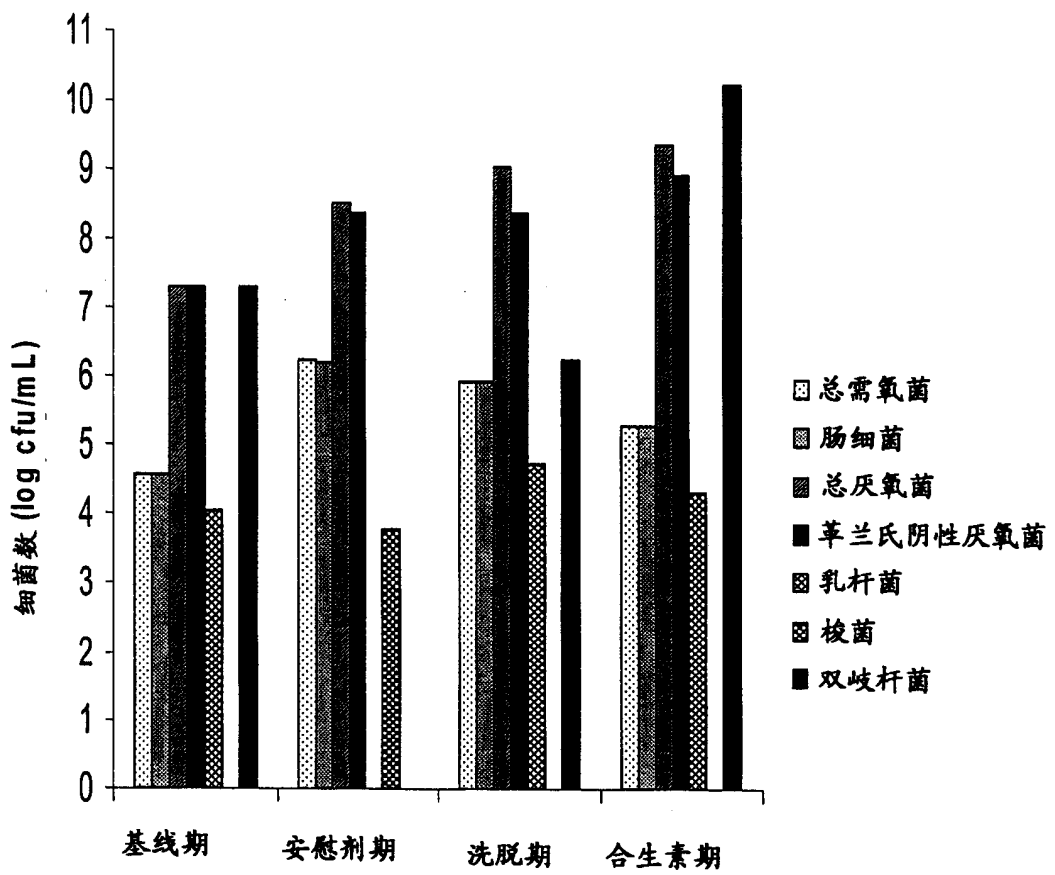


图12



时间
图 13



时间
图 14

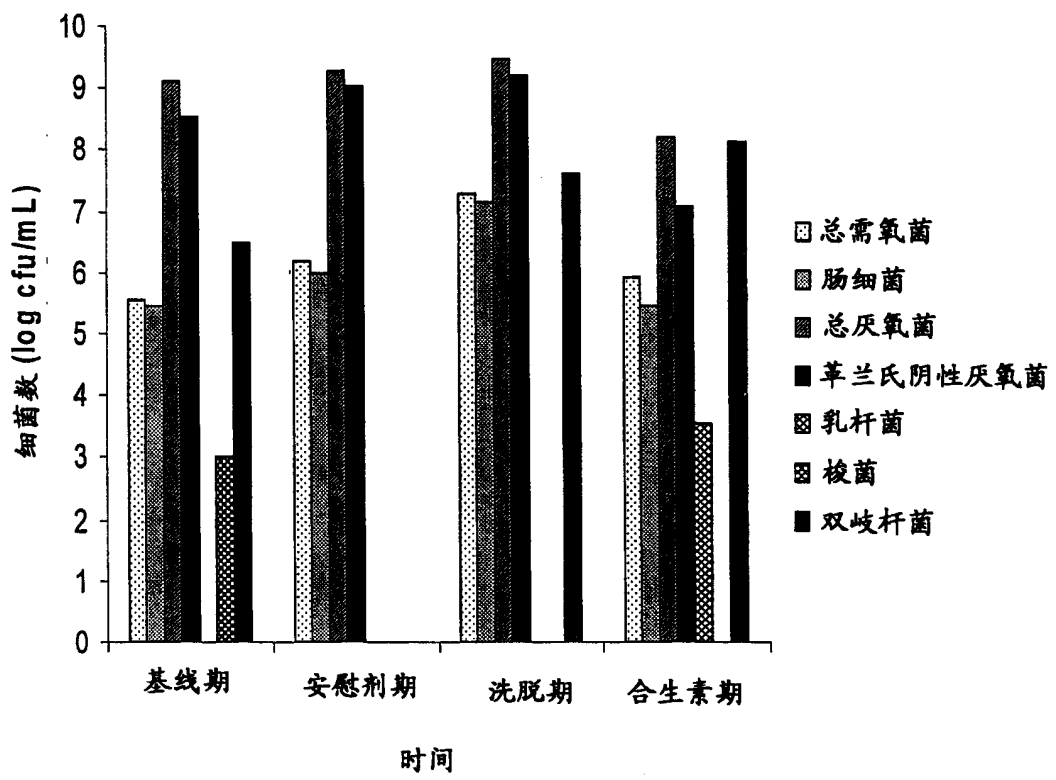
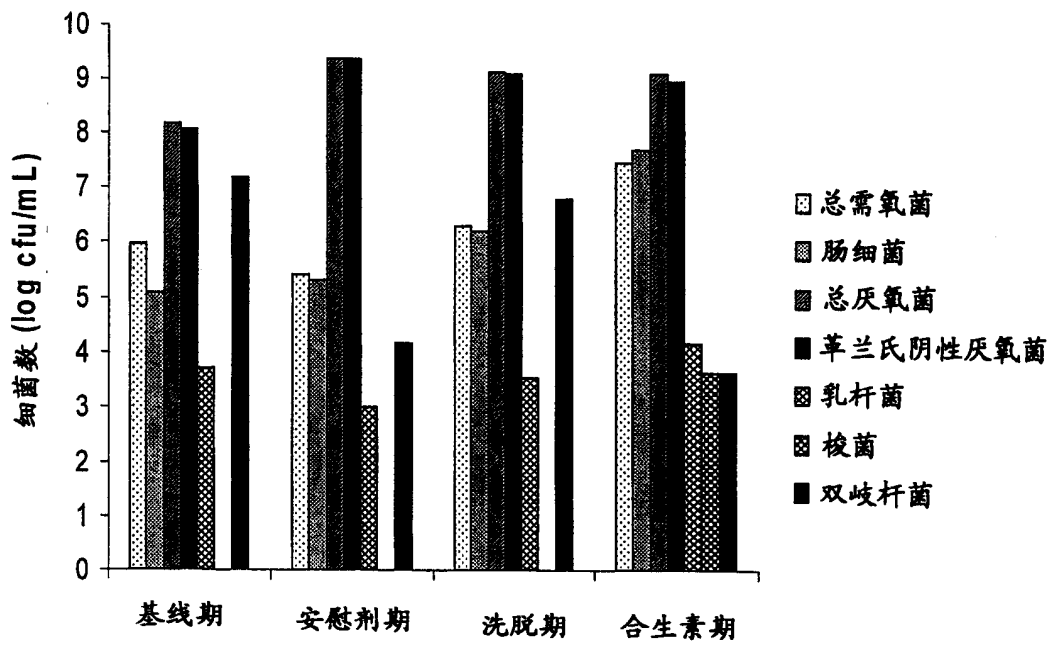


图15



时间
图16