

健康食品之輔助調整過敏體質功能評估方法

960712 衛署食字第 0960403113 號公告

壹、前言

健康食品的「輔助調整過敏體質」功能評估，是減少過敏免疫反應之功能評估。所謂降低過敏免疫反應，針對不同過敏型式有各種過敏反應的指標，例如：降低血清過敏抗體含量、降低發炎反應、減少過敏反應相關細胞激素或介質的分泌、調節 T 細胞分泌細胞激素、降低呼吸阻力等。但必須在不影響正常免疫反應的情況下，對過敏指標有減輕作用，對健康才有助益。若以動物實驗可以過敏原致敏動物，再進行抗原特異性免疫反應的評估。至於人體的改善過敏的評估，可由正常人與過敏傾向的人分別進行。

貳、實驗方法

一、動物實驗

實驗動物：建議選用小鼠，常用的 Balb/c 或是 B6 小鼠皆可，6-8 週大，雄鼠或雌鼠皆可，每組隻數為單一性別至少 10 隻。

(一) 致敏小鼠

本動物實驗之過敏免疫反應是以腹腔注射過敏原的模式進行，採用過敏原作為抗原，可以氫氧化鋁作為佐劑(adjuvant)，在注射抗原前及注射抗原一週後以眼窩採血，取得血清進行抗原特異性抗體濃度之分析，確立動物過敏模式之建立，必要時須致敏三至四次。對於呼吸道過敏之動物模式，宜另以噴霧致敏法使從呼吸道接觸過敏原，鼻腔過敏之動物模式宜以鼻腔接觸過敏原等各種不同過敏動物模式。

1. 血液抗體濃度

(1) 可利用 sandwich-ELISA 免疫呈色反應法或 Radial immunodiffusion (RID)法，定量血清中免疫球蛋白 IgE、IgG、IgM、IgA 和總抗體含量

利用免疫呈色反應法測定免疫球蛋白濃度：將血清加入表面已覆蓋免疫球蛋白抗體的 96 孔盤中，靜置反應後，再加入標有呈色酵素的抗體作用，最後加入呈色劑並與標準值對照，經由可見光吸光測定分析計算便可以算出免疫球蛋白濃度。

RID 方法為：將血清放入培養孔中，靜置 24 至 48 小時後，再測量其直徑大小，與標準值對照，算出免疫球蛋白濃度。

(2) 過敏原誘發的特異性抗體產生

利用免疫呈色反應法測定抗原特異性免疫球蛋白濃度：將血清加入表面已覆蓋過敏

抗原的 96 孔盤中，靜置反應後，再加入標有呈色酵素的抗老鼠 IgE、IgG₁ 或等抗體作用，最後加入呈色劑並與標準值對照，經由可見光吸光測定分析計算便可以算出免疫球蛋白濃度。

2. 脾臟或是淋巴結細胞增生反應

細胞增生能力即指免疫細胞受到刺激時，能夠增生的能力。故增生能力之表示，以添加裂殖素後，細胞增生的數值為未添加裂殖素時數值的倍數，稱為增生指數 (Stimulation Index)，簡稱 S. I.。

本實驗的細胞增生的刺激物須包括過敏原和裂殖素，T 細胞須以過敏原刺激培養，另可使用如 ConA、PHA 等裂殖素或抗 CD3 抗體的刺激劑，以分析 T 細胞的增生反應。B 細胞須以過敏原刺激培養，另可使用如 LPS 來刺激，分析 B 細胞的增生反應。

進行步驟：

(1) ³H-thymidine 嵌入法

本方法較靈敏，將脾臟細胞 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 置於 96 孔盤，再加入 RPMI 培養基或分別添加有 LPS、Con A、PHA 等細胞裂殖素的培養基。於 37°C 二氧化碳無菌培養箱培養兩天後，加入 $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ ³H-thymidine，繼續培養 20 小時後，以細胞收集儀收集細胞於濾紙上，濾紙風乾後以閃爍計數儀測 ³H-thymidine 含量，計算細胞增生能力。

(2) MTT 法

MTT 的測定方法，是利用細胞本身的酵素對受質的作用，產生顏色的變化，再進一步測定其吸光值。如果細胞受到細胞裂殖素的刺激，增生越多，則活的細胞愈多，酵素的活性就會較高，可以測到較高的吸光值。利用此一原理，也可以來測定細胞的增殖反應，但是此種測定方法通常對附著性細胞的準確度較高，對懸浮性細胞則較不理想，細胞數與吸光值的直線相關有飽和現象，吸光值無法代表細胞數值，以致較不靈敏，進行本實驗時應特別注意。

(3) 螢光流體計數儀來測定 DNA 的染色

利用螢光染色的方法來分析細胞是否受到刺激，細胞核內的 DNA 是否有任何變化，可以利用 bromodeoxyuridine (BrdU) 的方法來染色。BrdU 的方法則需要再加上一個抗 BrdU 的單株抗體加上螢光，才能利用螢光流體計數儀來加以分析。為了進一步分析是那些細胞的 DNA 有增加的變化，可以同時對這些細胞進行表面標記的分析。如利用抗 CD3 及抗 B220 抗體先行染色，再將細胞加以固定，然後進行 DNA 的染色。對細胞的表面標記及細胞內的 DNA 螢光使用不同波長的螢光，以便能夠在儀器上能對這兩群不同的細胞進行分析。如果能夠達到此一目的，便能夠不需要將細胞分離出就可以知道是

那些細胞受到活化。

3. 細胞激素分泌實驗

將分離出的淋巴球以 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的濃度置於 24-孔盤中，利用已經定量過的過敏原、Con A 或抗 CD3 抗體來刺激這些淋巴球。經過 24 到 48 小時的培養後，將上層液離心下來，以測定其細胞激素製造的量。在取得足夠檢體以前，可將其它檢體先保存在 -70°C ，等到檢體足夠時再一起測試。細胞激素的測定是利用 sandwich-ELISA 法。先將抗細胞激素的抗體先覆蓋在 24-孔盤上，在 4°C 靜置一晚，在進行實驗前先以 1% PBS-BSA 處理清洗去多餘抗體。再加入測定的樣品至 24-孔盤，於室溫 2 小時後加入 biotin 聯結的抗細胞激素抗體。兩小時的室溫靜置後，加入 avidin 聯結過氧化酵素 (avidin-linked peroxidase)，再靜置二個小時後加入受質以呈色。上述的裂殖素的濃度及刺激時間在實驗進行之前都應先測定其最適當的濃度，並以已知濃度的細胞激素作為對照。

4. 呼吸道肺沖洗液之分析

(1) 發炎細胞數量及種類分析，如：嗜伊紅性白血球、中性白血球、單核球及淋巴球等

犧牲鼠隻後，剪開氣管露出小洞，以靜脈置留管插入氣管，軟管綁緊後，以生理食鹽水沖洗肺部 5 次，回收肺沖洗液放入離心管離心，取上清液保存待分析。下層細胞以含 BSA 生理食鹽水溶開，經 trypan blue dye exclusion 法染色，以細胞計數器計算所有存活白血球數目。裝置好玻片後，取細胞液置於 cytopsin 離心管，cytopsin 後取下載玻片風乾，取 Liu A 染劑染色 30 秒，從背面以水龍頭沖去多餘染劑，風乾，取 Liu B 染劑染色 60 秒，再沖去多餘染劑，風乾，觀察染色成果。以阿拉伯膠封片，以油鏡判讀至少五個視野之細胞或總數 200 個以上之細胞組成，計算判讀細胞所佔總細胞之數目。

(2) 發炎相關介質分析，如：組織胺、細胞激素及趨化激素

組織胺可以 HPLC 方法分析，唯樣品中組織胺回收率較低，目前組織胺定量多以市售的組織胺測定試劑組分析。細胞激素與趨化激素分析方法如前所述。

5. 肺功能測定或其他過敏相關有效之指標測定

(1) 氣喘疾病模式：呼吸道阻力、呼吸敏感度

每隻小鼠在最後一次吸入式致敏的隔天進行肺功能測定，使用 whole body plethysmography (Buxco)，以噴霧的方式依序吸入 3 分鐘的 0、3.125、6.25、12.5、25 mg/mL methacholine，再分別測定 3 分鐘，記錄肺功能指標 Penh (Enhanced Pause) 值。

(2) 鼻炎疾病模式：打噴嚏、鼻阻力、鼻內面積、抓鼻次數等

打噴嚏、抓鼻次數等可以抗原溶液滴入小鼠鼻腔內，於滴入性致敏後計數 10 分鐘內小鼠打噴嚏或抓鼻次數，唯此計數方法因個人判斷差異性較大，須多人重複計數。

(3) 其他病症：其他有效評估工具

6. 自然殺手細胞活性

為測定實驗動物之自然殺手細胞的活性，先培養自然殺手細胞的標的細胞（YAC-1 細胞株）。將 YAC-1 細胞與 ^{51}Cr 先在一起培養約 4 小時，將殘餘在試管中的 ^{51}Cr 除去。再加入不同數目的單核細胞與已經與 ^{51}Cr 培養過的標的細胞一起培養，培養一段時間後取出上清液，以 γ -counter 內計算其放射強度。在實驗的過程中，利用 NP-40 或是 HCl 將細胞破壞，以取得 ^{51}Cr 的最高釋放值。

$$\text{計算公式} = \frac{\text{實驗值} - \text{背景值}}{\text{最高釋放值} - \text{背景值}} \times 100\%$$

除了上述傳統方法，目前亦有以 FAScan 分析法，可參照所使用的相關試劑與儀器操作流程，但須明列數據計算方式與表示方法。

7. 吞噬細胞活性

吞噬細胞可以分別測定單核球(monocyte)或是中性白血球的吞噬能力，目前可以分別利用吞噬細菌如 *E. coli* 或酵母菌等方法來加以測定，也可以利用已標記好的 *E. coli* (如螢光)，在細胞吞噬後利用螢光流體計數儀來加以分析。

二、人體的臨床試驗

必須委託國內外大學食品營養、醫藥等相關研究所、醫學中心或其他中央衛生主管機關認可之研究機構執行，需有醫師參與，並遵循衛生單位對保健食品人體實驗有關之相關規定。

人體試驗的過敏免疫功能評估，原則上與動物的評估近似，惟進行人體的臨床試驗之前應經過人體試驗委員會通過才能加以進行。

受試者分對照組（不吃待測樣品）、實驗組（分二至三組劑量），分別在實驗前後採血液，測定抗體，並分離周邊血液單核細胞，進行以下實驗。同時，建議由至少一家以上之試驗中心進行試驗以求公允。

(一) 過敏免疫反應指標

以下分析方法與動物實驗部分方法相同，唯須使用分析人類的試劑。

1. 總 IgE 抗體與過敏抗原特异性 IgE 抗體之測定

對受試者進行採血後，血清部分可利用 sandwich-ELISA 免疫呈色反應法或 Radio immunodiffusion (RID)法，定量血清中免疫球蛋白 IgE 總抗體含量，建議同時測定 IgG、

IgM、IgA 的含量，觀其是否有所變化，分析方法如前所述。

2. 過敏抗原特異性增生反應

對受試者進行採血後，以 Percoll 梯度法分離得淋巴球，如前所述，以適當濃度之裂殖素，常見或特定過敏原刺激後，分析其細胞增生能力。

3. 過敏抗原特異性細胞激素分泌

同前，以 Percoll 梯度法分離得淋巴球，如前所述，以適當濃度之裂殖素，常見或特定過敏原刺激後，收集上清液分析其細胞激素含量。

4. 周邊血液單核細胞分離培養，進行發炎介質分析

同前，以 Percoll 梯度法分離得淋巴球，如前所述，以適當濃度之單核球裂殖素，常見或特定過敏原刺激後，收集上清液分析其發炎介質含量。

5. 發炎細胞計數，如：嗜伊紅性白血球之數量及比例

同前，以 Percoll 梯度法分離得淋巴球顆粒球，如前所述計數細胞。

(二)臨床症狀評估

1. 肺功能檢查

受試者有氣喘病症時，需進行呼吸道阻力、呼吸道敏感度評估。

2. 鼻炎

評估內容包含症狀分數（依據症狀評分表進行評分）、鼻阻力及鼻內面積。

3. 異位性皮膚炎

症狀分數評估。

4. 其他

包含受試者自評及醫師評估等。

參、結果判定之基準

判定的基準原則上依據上述實驗項目及方法進行相關研究，統計分析有意義者判定其功能。