

出國報告（出國類別：研究）

促進農業國際接軌與新南向市場佈
局-赴捷克參加第 13 屆 IPC 2019 國際
益生菌研討會與成果發表

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所

姓名職稱：林幼君 副研究員

派赴國家/地區：捷克布拉格

出國期間：108 年 6 月 14-25 日

報告日期：108 年 8 月 10 日

摘 要

IPC 研討會 (International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health) 是全球最大聚焦於益生菌、益生質與腸道菌相及健康之國際研討會。本次會議畜產試驗所由林幼君副研究員出席，以本所動物保健計畫「新穎代謝分子應用於抗緊迫飼料添加物之開發與動物飼養保健」之研發成果，進行論文口頭發表以展示本所研究成果，並吸收新知俾利規劃未來研究方向。今年 IPC 2019 研討會之趨勢著重於腸道菌相對於宿主健康之影響，除過去廣為人知對於腸道、免疫與代謝等領域之應用以外，目前益生菌已成為改善運動能力、情緒與腦部病變等相關疾病研究的焦點，故益生菌產品研發已逐漸朝向藥物益生菌 (Pharmabiotics) 之觀念進行開發，探討如何使用益生菌作為天然藥物之主成分來治療和預防疾病，且不僅受限於活性微生物，另包括死菌與代謝產物及植入微生物組 (Microbiome) 等之應用層面，也已成為現階段益生菌產品開發之趨勢方向。

益生菌於動物健康之影響於本次會議上以「永續經營」為主軸，強調微生物對於畜禽飼養的重要性。在動物性蛋白質需求量大增的時代，動物育種與營養持續改進的成果使畜禽動物之產能迅速提升，然而建構生物的營養成分透過「腸道」這個唯一途徑進行吸收，故使「腸道功能之最大化」，是畜禽生產未來能持續突破的關鍵因素，包括對於小分子營養分、降低腸道中「氨」與不良代謝物之產生，以及促進水分與礦物質吸收等作用，益生菌在此即扮演重要角色。綜觀本次會議主題，了解微生物於畜禽生產亦影響許多應用範圍，包括以動物育種觀點進行母畜至幼畜優良菌相建構；抗緊迫、情緒與腳部灼傷改善等動物福祉；增進屠體與屠肉品質之畜產加工；以及改善蛋白質發酵所產生的不良臭味與污水及堆肥品質促進等現場管理，皆與益生菌及相關菌相調節息息相關，故對於微生物核心研究技術之建構相當重要，因此本次計畫成果將對於研究規劃之更新與政策制定推動應用有所幫助。

目 次

	頁次
書名頁.....	1
摘要.....	2
目次.....	3
正文	
壹、目的.....	4
貳、過程.....	5
參、心得.....	7
肆、建議.....	27
附錄.....	29

壹、目的

在科學研發進程快速變化的條件下，活性微生物產品開發，隨著研究演化之進程從益生菌 (probiotics)、益生質 (prebiotics) 之應用，逐漸拓展至微生物相關之代謝物(postbiotic) 與其聯生菌群 (parabiotics)，乃至腸道菌相 (Gut Microbiota) 皆受到科學家廣泛討論。故當前所屬研域之研發趨勢及亮點，須透過頂尖國際研討會之參與而得，IPC 國際益生菌研討會 (International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health) 是全球最大聚焦於益生菌、益生質與腸道菌相及健康之國際研討會，該會於 2018 年之會議，共有 450 位科學家共襄盛舉，其中分別有 36% 及 21% 來自於產業及市場開發人員，27% 來自於學術研究機構。此外，總計高達 70% 參與者具博士學歷，集結來自產業界與科學界最頂尖的益生菌科學家發表最新的研究進展。IPC 的宗旨在於提供產學研界一個最佳的科學平台，以交換最先進 (state-of-the-art knowledge) 的益生菌相關知識。因此 IPC 具有絕對性的指標意義，使每年益生菌國際大廠，如杜邦 (DUPONT)、養樂多 (Yakult)、森永 (Morinaga) 等公司，爭相贊助並尋求具潛力之合作機會。故本次由本所研究人員申請前往捷克布拉格參與今年度 IPC 2019 研討會，以了解益生菌應用於飼料與食品之最新管理政策以及研究趨勢，並以本所動物保健計畫「新穎代謝分子應用於抗緊迫飼料添加物之開發與動物飼養保健」之研發成果，進行論文口頭發表。

貳、過程

本計畫於 108 年 6 月 14 日至 6 月 25 日前往捷克布拉格市之布拉格國際會議中心 (Prague Congress Centre) 參加 IPC 2019 研討會，主題包括益生菌表面成分與宿主受體、腦腸肝軸:脂肪代謝與益生菌之關係、臨床試驗與健康聲明、益生菌的臨床應用、益生菌的管理現況與作用模式、益生菌與腸漏症、保健益生菌、益生菌及其載體工具的未來趨勢與動物健康論壇等 9 大主題，本次出國人員行程表如下：

日期	地點	行程說明
6 月 14 - 15 日 (週五~週六)	臺灣桃園機場 (TPE)-布拉格瓦 茨拉夫·哈維爾國 際機場機場 (PRG)	搭乘阿聯酋航空 EK367 班機自臺灣桃園國際機場啟程，並於 6 月 15 日 8:35 於杜拜搭乘 EK139 班機轉機飛往捷克布拉格瓦茨拉夫·哈維爾國際機場機場 (PRG)，6 月 15 日下午 4:00 抵達。
6 月 16 日 (週日)	布拉格會議中心	前往布拉格會議中心進行 IPC2019 會議報到、確認行程及相關發表事項準備。
6 月 17 日 (週一)		1. 參加細菌素與抗菌胜肽舉辦之科學論壇 (Bacteriocins and Antimicrobial Peptides Symposium) 2. 飼料與食品益生菌之創新-EFSA 監管機關工作討論會議 (INNOVATION FROM EFSA IN FEED & FOOD)
6 月 18 日 (週二)		1. IPC2019-脂肪代謝與益生菌之關聯性-腦腸肝軸應用研究 (The Brain-Gut-Liver Axis: Lipids and Probiotics) 2. IPC2019-益生菌臨床試驗和健康聲明證明 (Clinical Trials and Health Claim Substantiation)
6 月 19 日		1. IPC 2019-益生菌的臨床應用 (Clinical

日期	地點	行程說明
(週三)		Application of Probiotics) 2. IPC 2019-益生菌應用於動物保健子項會議(Animal health symposium) 3. 進行口頭論文發表
6 月 20 日 (週四)		1. IPC 2019-保健用益生菌 (Probiotics for Health) 2. IPC 2019-益生菌與益生質的未來與輸送系統 (Future of Probiotics and Prebiotics and Delivery Vehicles)
6 月 21 日 (週五)		與 IPC 2019 主席,亦是亞洲乳酸菌協會成員 - 來自韓國之知名益生菌科學家 Prof. Sin-Hyeog Im 互動,並進一步討論該研究機構與本所學術合作與同仁出國研習之可行性。
6 月 22 - 23 日 (週六、週日)	布拉格會議中心	與研討會期間相關學術專業人員、益生菌產品生產廠商與技術人員交流討論,尋求相關合作契機。
6 月 24 - 25 日 (週一、週二)	布拉格瓦茨拉夫·哈維爾國際機場 機場 (PRG) -臺灣桃園機 (TPE)	搭乘阿聯酋航空 EK410 班機自拉格瓦茨拉夫·哈維爾國際機場起飛,並於 6 月 25 日上午 3:40 於杜拜轉機,隨後搭乘 EK366 班機自杜拜飛往臺灣桃園國際機場,6 月 25 日下午 4:15 抵達。

參、心得



圖 1. 歐盟食品與飼料法規工作坊開場

一、參加歐洲食品安全局食品與飼料法規工作坊

（一）法規工作坊基本介紹

目前動物保健產品之開發，以益生菌材料為基礎之產品具有高度商品化優勢，然而益生菌產品不僅需透過新的科學方法與證據，針對過去長期使用材料或具潛力之新興菌種進行驗證與質疑，在動物產品開發上亦需了解全球監管機關如歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 及美國農業部 (United States Department of Agriculture, USDA) 對於益生菌有效性及安全性之監管方式，方可研發適合國內與外銷廠商所需，符合規格之益生菌產品。本工作討論會議名稱定為「EU REGULATORY ASPECTS OF PROBIOTICS & POTENTIAL SYNERGY WITH OTHER FEED/FOOD COMPONENTS」，會議由來自 European Union Food Chain Legislation Expert Pen & Tec Consulting 之 Elinor McCartney 女士為主席，同時針對歐盟對於食品及飼料所使用之微生物進行趨勢討論，內容涵蓋歐盟人類與動物益生菌監管方面所涉及的主題：

- 新穎益生菌株於生物刺激素(biostimulants)、飼料添加物 (feed additives)、食品原料、膳食補充品、特殊醫學用途配方食品 (Food for Special Medical Purposes, FSMPs) 及殺生物劑 (biocides) 之應用
- 益生菌與其他物質之協同作用 - 與植物、益生質 (prebiotics)、酵素或其他成分
- 益生菌之效益與功效宣稱之未來挑戰
- 飼料添加物
- FSMPs 及殺生物劑之應用

(二) 益生菌於畜禽與食品之定義與分類

FAO 及 WHO 於 2001 年將益生菌定義為「在足量使用的情況下，對宿主健康有益的活體微生物」；而益生菌於動物飼養之使用在國內屬於微生物飼料添加物之範疇，而飼料管理法所稱飼料添加物，係指為提高飼料效用，保持飼料品質，促進家畜、家禽、水產類發育，保持其健康或其他用途，而附加使用之物。相關可使用之品項細目，在法規中皆有詳細明訂之品目，其規格及其使用準則，亦需由中央主管機關進行公告。依據歐洲食品安全局 EFSA 對於微生物飼料添加物之法規現況，屬歐盟指令飼料法規 (EC) 益生菌作為飼料添加物 1831/2003 及委員會法規 Com. Reg. (EC) 429/2008：添加到飼料或水中的成分或成分組合以滿足特定需要等進行監管，相關文件涵蓋的詳細要可參考 2017/2018 年 EFSA 更新指南，相關分類整理如下：

依據飼料添加物之功能和性質，按照第 7 條和第 9 條規定的程序，飼料添加物應區分為下列一項或多項：

1. 飼料技術添加物 (technological additives)：任何物質添加到飼料中用於技術目的。
2. 感官添加物 (sensory additives)：任何物質，添加到飼料中可改善或改變飼料的感官特性或動物對食品的視覺特性。
3. 營養添加物 (nutritional additives)。

4. 畜產技術添加物（zootechnical additives）：任何用於影響動物健康狀況或用於影響環境的添加物，其項下可再區分如以下：
- (1) 消化率增強劑物質（digestibility enhancers）：當餵給動物時，通過對目標飼料原料的作用可增加飼料消化率。
 - (2) 腸道菌群穩定劑（gut-flora stabilizers）：微生物或其他化學物質限定物質，當餵給動物時對於腸道菌群有穩定之作用。
 - (3) 有利於環境的物質產生正面影響。
 - (4) 其他畜產技術添加物。
 - (5) 抗球蟲藥（coccidiostats）和組織單體抑制劑（histomonostats）。



圖 2. 法規討論會中針對菌株安全性評估進行小組討論與互動

（三）歐盟對於微生物飼料添加物之管理

為使所開發或生產之飼料添加物符合歐盟之規範，需準備相關數據，經由專家小組針對申請案進行產品之風險評估與審查，會議中根據專家之建議認為微生物飼料添加物之申請，應著重於微生物之菌種身份（Identity）、安全性（Safety）及效益（Efficacy）的資料審查。在微生物身份之鑑定包含產品使用之菌種之普

遍性與安全性，菌種之使用依據風險評估概念可參照歐盟於 2007 年所建立之安全菌株認可清單（Qualified Presumption of Safety, QPS），以最接近產品的微生物菌種的安全使用歷史，作為微生物安全評估的一般性方法。

QPS 安全菌株清單之更新由 EFSA 進行，且內容含菌種之一般性與特殊性用途以及相關限制，因此可大大減少提出申請時所需檢具之安全性證明與龐大的試驗費用，包含抗生物質、目標動物之安全性、目標消費者之安全性以及對環境的影響等皆可簡化。其次，針對微生物飼料添加物之安全性評估，應廣泛針對不同接觸族群進行探討，若使用之菌種不屬 QPS 清單所列，須檢附包含目標使用動物、對於申請物質的基因毒性、使用者與工作者之安全性，以及對於終端消費者之安全性等相關佐證資料進行審查。

表 1. 微生物飼料添加物申請所需之科學資訊供審查

	Section	Feed additives containing viable microorganisms	
		Bacteria	Fungi
Identification	2.1	V	V
Antimicrobial susceptibility	2.2	V	
Antimicrobial production	2.3	V	V
Toxigenicity and pathogenicity	2.4	V	V
Genetic modification	2.5		
Absence of the production strain	3.1		
Presence of DNA from the production strain	3.2		
Compatibility with other authorized additives	4.2		

除基本安全性之認定以外，有關飼料添加物對於動物生理及營養方面所宣稱之功效，如果具有可驗證的科學證據，在歐盟的法規是可以被接受的（Article 13, Reg.(EC) N 767/2009）。然而飼料添加物之宣稱，不能涉及預防治療或治癒疾病（除了球蟲抑制劑和組織單體抑制劑），除非解決營養不平衡的問題，然而所檢

附之科學數據需提出至少三個不同地區所進行之有效 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.10$) 之試驗數據，提供給動物營養領域之會議專家進行審查。其他有關改善飼料品質之飼料技術飼料添加物（如防腐劑、酸度調節劑、青貯添加劑、衛生條件增強劑等），則允許減少相關生理營養改善之功效數據資料。

（四）美國對於益生菌產品之管理

美國對於益生菌於飼料及食品之應用相關法規，是由美國食品藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration, FDA）之獸醫藥物中心（Center for Veterinary Medicine, CVM）及（Center for Food Safety and Applied Nutrition, CEFSAN）分別進行管理（動物和人類）。對於動物而言，動物使用的飼料添加物沒有明確的單獨類別，評斷該產品被認為是食物或藥物，然而以直接食用的微生物產品，須遵照下列規定：

1. 食品添加物申請（Food Additive Petition, FAP）。
2. 美國飼料管理協會（Association of American Feed Control Officials, AAFCO）：定義了所使用之成分以法規裁量結果取得同意，而非以制式的許可文件進行管理。
3. 公認安全（Generally Recognized As Safe, GRAS）：需要大量已發表之科學文獻與數據來支持菌種之安全性、穩定性、同質性與實用性。
4. 新膳食成分（New Dietary Ingredient, NDI）：用於人類食品補充劑新穎成分，需要進行安全性評估。

在美國相關監管單位裁量大部分是沒有期限的，除非 FDA 質疑產品的安全性（或預期用途），然而上述準則多數以安全性作為考量，然而對於健康促進等功效宣稱，則需另外以根據聯邦食品、藥品和化妝品法案規定，獲得新動物藥品應用（approved new animal drug application, NADA）之批准，方可進行產品販售。

（五）加拿大對於微生物飼料添加物之管理

在加拿大方面，對畜產動物與寵物飼料（包括補充劑）的監管單位不同，雖然食品之管理在美國 FDA 與加拿大食品檢驗局（Canadian Food Inspection

Agency, CFIA) 之間存在互認依據，但沒有包括飼料的部分。在加拿大飼料經營販售業者，不需要許可即可將飼料投入市場販售，但產品本身可能需要產品授權/批准註冊。在畜產動物方面，所有畜產動物（包含馬）使用之飼料，必須符合飼料法（Feed act）和飼料法規（Feed regulation (1983)）RG-1 之規定，其中有關活性微生物產品（Viable microbial products, VMPs）屬於規範內「胃腸改良劑」之範疇。在寵物食品方面雖有寵物食品進口政策（Health of Animals Act and Regulations）之規定，但目前沒有針對寵物食品的專法進行管理。

（六）中國對於微生物飼料添加物之管理

依據中國農業和農村事務部（Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, MOARA）之規定，益生菌被歸類為微生物類的飼料添加物，可作為飼料添加物之菌種亦以正面表列之方式出版於飼料添加物之目錄中，如使用之菌種不在列表之中，則應註冊為新飼料或新飼料添加物。



圖 3. 芬蘭教授 Dr. Wright 說明抗生素耐性主題

（七）益生菌產品所面臨之挑戰 - 菌種抗生素抗性

在 20 世紀約 1940 年已經觀察到亞臨床劑量（subclinical doses）的抗生素可提高飼料效率並使動物具有更好的生長性能，因此抗生素作為生長促進劑的使用，

開始成為一種全球性的做法。比起治療人類與動物疾病，實際上有更多的抗生素被作為添加劑用於動物生產，於是在 1990 年代初期，發現動物具有更多的抗生素抗性產生，因此歐盟在 2006 年逐步停止使用抗生素促進劑，美國已於 2017 年跟進相關禁用規定。當全球出現減少使用抗生素作為生長促進劑的共識時，應同時注意到微生物飼料添加物中亦具有存在抗生素抗性（antibiotic resistance, AMR）的問題，特別是從益生菌到病原體的抗性基因的潛在基因轉移，而不是具抗性之益生菌本身帶來的潛在風險。歐盟在 2001 年，當時的動物營養科學委員會（Scientific Committee on Animal Nutrition, SCAN）即頒布了第一個關於評估抗人類臨床和獸醫重要抗生素的微生物安全的標準指南「ON THE CRITERIA FOR ASSESSING THE SAFETY OF MICRO-ORGANISMS RESISTANT TO ANTIBIOTICS OF HUMAN CLINICAL AND VETERINARY IMPORTANCE」。

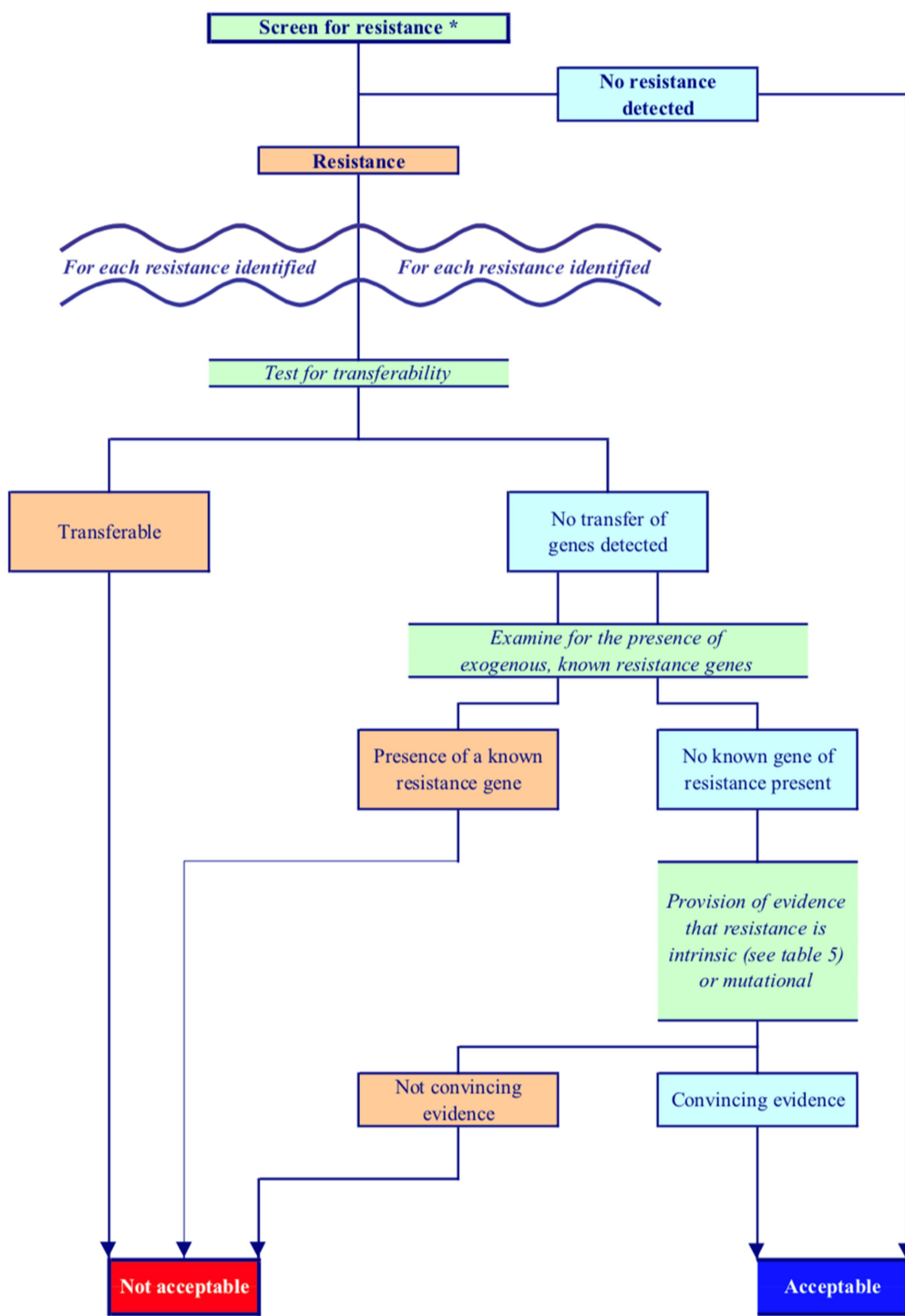


圖 4. 對於微生物是否具抗生素抗性之篩選評估流程

由於微生物之生理特性，細菌本身即具有 AMR 特性，如部分厭氧菌對氨基糖苷類的抗性，以及許多乳酸菌由於細胞壁的特殊組成，而對萬古黴素具有抗性。因此抗抗生素基因普遍存在，如基因 *aac* (6') 及基因 *sfkmr*，廣泛存在於屎腸球菌 (*Enterococcus faecium*) 菌株中，並且引起高度的卡那黴素抗性，但是卻沒有引起後續的關注。現階段對於 AMR 之評估，最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentration, MICs) 為一重要指標，如微生物飼料添加物如腸球菌屬 (*Enterococci*)、乳酸桿菌屬 (*Lactobacilli*)、片球菌屬 (*Pediococci*) 與桿菌屬 (*Bacilli*) 微生物，其抗性超過 MICs，將會認定菌株具有抗性，然而更重要須釐清的是，找出這樣的抗性是否存在於所有菌株中，是屬內在的 (intrinsic)、可突變的 (mutational) 或可傳遞的 (transmissible) 的抗性，特別是抗性基因若具有轉移性，將是不可被接受的，且外源性和已知的抗性基因，其表達可能被內在抗性所掩蓋，這些問題將會是評估菌株安全性之關鍵點。

對於上述評估菌株 AMR 的問題，歐盟於 2018 年綜合了以前的幾個指南，出版「Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms」可供微生物抗性之參考 (<https://www.efsa.europa.eu/en/applications/feedadditives/regulationsandguidance>)，其中闡明核心的新穎技術是需要提供微生物的全基因組序列 (Whole Genome Sequence, WGS) 提交授權，以評估菌種之分類以及安全性評估。微生物飼料添加物的 AMR 評估目前為兩階段的過程，這兩個步驟結合了菌株的表型評估和基因組的生物資訊學分析，以評估「基因轉移」及「轉移性」，同時在文件中提到，微生物本身具有之內在抗性並不屬於安全問題，這點相當重要。

而利用 WGS 進行 AMR 評估的重點，應在世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 所明列的重要抗生素 (Critically Important Antibiotics, CIAS) 和高度重要的抗生素 (Highly Important Antibiotics, HIAS) 中，篩選 WGS 與 AMR 相關的基因，如果發現 AMR 基因，應對該菌株進行表型測試，如果發現

AMR 基因但表現型呈現敏感型 (sensitive)，則要評估 AMR 基因被活化的可能性。AMR 基因的比對，須透過與現有不斷更新的資料庫進行比對，如 CARD、Resfinder 及 ARG-ANNOT 資料庫等，尋找完整的 AMR 基因包含基因鑑定、預測之功能、辨識度的比例 (percentage of identity) 以及 E 值 (e-value) 等資料，作為評估菌種安全性之依據。

表 2. 抗生素抗性表現型與基因型比對之風險評估

MICs test / WGS search for AMR	MICs > cut-off	MICs < cut-off
Gene found	Hazard	Further studied needs to determine whether the gene may become active
Gene not found	Uncertainty: case-by-case assessment	OK

WGS 可作為微生物安全性評估一個很好的工具，但無論是偵測到內在的抗藥性還是後天轉移的，這項新穎技術還是可能會對目前抗菌素耐藥性的解釋產生後續衍生的問題。此外，分類學特徵的修正可能導致參考菌株需要重新分類，因此在 WGS 的分析中，可能會出現越來越多影響表型抗性的基因，然而當表現型是數種不同的抗性基因所造成的結果時，要如何解釋 AMR 的本質，便該聚焦於基因之可傳遞性而非抗性基因本身了。



圖 5. 比利時講者 Sarah Lebeer 說明鼻腔和皮膚益生菌產品的有益作用

二、參加益生菌影響微生物相關分子模式與對應之模式識別受體論壇

IPC 2019 研討會次日首先探討的主題，為益生菌表面成分與對應之宿主受器對於宿主健康的影響。益生菌在宿主體內是天然人類微生物群之共生物，或在發酵食品或食品補充劑中提供，在消化道定植後，可透過調節免疫反應來影響人類健康。研究發現這些特定的微生物的存在與否，以及所造成之腸道微生物群結構的變化，同時影響免疫和炎症性疾病，因此益生菌的潛在應用，同時還包括治療由輪狀病毒、過敏、濕疹、腸易激綜合徵及炎症性腸病引起的腹瀉。

來自法國 INRA 的演講者 Gwenael Jan，說明益生菌的表面分子在上述之相互作用中起重要作用。這些關鍵的表面分子被稱為微生物相關分子模式（Microbe-associated Molecular Pattern, MAMP），可被相應的模式識別受體（pattern recognition receptors, PRR）識別，並存在於宿主細胞表面。MAMP 的作用包括腸道相關免疫系統的貼附與調節，以調節宿主與寄生細菌間的交互作用，這些 MAMP 包括表面蛋白（surface proteins），糖蛋白（glycoproteins），脂蛋白（lipoproteins），菌毛（pilins），鞭毛蛋白（flagellins）以及多醣類（polysaccharides）。

可以感知 MAMP 宿主的 PRR，包括存在於上皮細胞與樹突細胞表面的 Toll 樣受體（Toll-like receptors, TLR）以及 DC 特異性 C 型凝集素（C type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin, DC-SIGN），Jan 同時介紹利用雙歧桿菌、乳酸桿菌及丙酸桿菌的實例，從分子到體內研究說明以益生菌刺激 MAMP 作用的實際案例，讓益生菌與宿主之間的相互作用能有更清楚的輪廓。在相關領域的研究中，來自日本 RIKEN 綜合醫學中心的講者 Hiroshi Ohno 亦分享利用多發性硬化動物模型，觀察小腸腸道細菌對實驗型自身免疫性腦脊髓炎發病機理的影響，在不同抗生素處理之下，腸道微生物菌相組成的改變，以及特定微生物的存在，是影響中樞神經系統發病機制的重要關鍵。

在相關機制於益生菌產品開發之應用案例分享，來自比利時的講者 Sarah Lebeer 說明益生菌產品在發酵食品以及腸胃道以外的有益作用，包含亦可作為鼻腔與皮膚等環境的潛在益生菌。通過分離篩選過程，Lebeer 的團隊證實存在於鼻腔和皮膚環境的益生菌具有抗菌與抗發炎的活性作用，並且將它們配製成鼻噴霧劑和護膚霜。經潛在功效測試與安全性評估後，亦在健康志願者中進行了安全性和耐受性的臨床療效測試研究，未來可作為改善相關問題的新型對策。

三、參加益生菌影響腦 - 腸 - 肝軸作用論壇

在研討會第二天的下午場，講題主要探討腸道中之微生物組和大腦之間的雙向信號傳導，以及益生菌和益生質如何有益地影響腦-腸軸線（gut-brain axis）之間的相互作用。腸－腦軸線是兩個器官間的溝通橋樑，目前已知腸道菌相組成對於腸腦軸線之調控亦扮演關鍵角色，三者之間可透過神經、內分泌及免疫相互影響，並調控全身各種生理作用，包括從腦部發育至神經相關疾病，皆與腸－腦軸線有著密切的關係。當腸道菌相因遺傳、飲食或藥物等影響造成菌相失衡（dysbiosis），不僅對於腸道功能性疾病造成影響，亦成為造成精神疾病的原因之一，腸道功能性疾病包括大腸激燥症（irritable bowel syndrome）、發炎性腸道疾病（inflammatory bowel disease, IBD），以及精神疾病如憂鬱症（Depression）、阿茲海默症（Alzheimer's disease）與帕金森氏症（Parkinson's Disease），在本節會議中皆有來自不同領域的專家進行分享。首先來自馬來西亞的 Liong 教授分享

Lactobacillus plantarum DR7 植物性乳酸菌，從神經退行性疾病到壓力、記憶和認知，乳酸菌是如何影響大腦健康。從果蠅的試驗模型中顯示，DR7 可經由改善腸道菌相對阿茲海默症造成逆轉。另外在衰老和高脂血症大鼠中，另一菌株 DRZ 則可表現出改善大鼠的壓力與焦慮症狀以及記憶力的改善。此外，來自臺灣陽明大學蔡英傑教授的團隊亦在會議中提出精神益生菌（Psychobiotics）的概念，這類的菌種被定義為活的微生物，由其賦予宿主心理健康益處而稱之。蔡教授在會議中亦提出該團隊所研發的 *Lactobacillus plantarum* PS128 在給予小鼠早期壓力的處理下，可經由調節多巴胺和血清素等神經物質，達到改善焦慮和抑鬱行為效果。此外，經由阿茲海默症與帕金森氏症的動物模式，亦證實 PS128 可改善動物經注射 icv-STZ 所導致空間學習與長期記憶的缺陷。



圖 6. IPC 2019 主席針對藥用益生菌的可行性進行專題演講

四、功效菌株發展成為藥用益生菌的可行性

腸道微生物群作為調節宿主健康的關鍵作用已廣為人知，然而這些菌株是否具有作為藥物應用的潛力與可行性，在會議中亦受到重視及討論。在第二日的會議中，本次大會主席，來自韓國的益生菌專家 Sin-Hyeog Im 提出益生菌作為恢復宿主免疫系統平衡的預防或治療方式。然而益生菌作為藥物之使用須考量其效

力是具有菌株特異性的特性，即使在同一物種內，在功效上也表現出很大的差異。此外，EFSA 與其他國家的監管機構，對於此類成分亦要求，須具有明確與功能宣稱相關的有效成分以及作用方式。同時 Im 教授亦提出另一個問題，即目前仍有研究顯示，當患者或實驗動物處於疾病發展過程時，若服用不適當的益生菌菌株，反而會加劇正在進行的免疫更加紊亂。因此，提供客製化與專用的益生菌菌株，對於處於疾病狀態的病人，是需要極度更嚴謹的。此外，該如何鑑定益生菌菌株基因與表現型的特性，以及其功效分子的組成結構，亦須得到有利的科學證明。在 Im 教授團隊的研究中，已發展透過誘導調節性 T 細胞（Treg）或抑制 Treg 細胞活性，同時激活 CD8T 細胞的細胞毒活性等方式，鑑定不同類型的益生菌菌株。例如該團隊以高 IL-10 與低 IL-12 誘導能力的雙歧桿菌 PRI1 作為誘導 Treg 的細菌，增強了結腸中透過 CD4 + T 細胞群所誘導的 CD4 + Foxp3 + Helioslow Treg（iTreg）細胞的產生。而從機制上來看，Bb PRI1 主要藉由其產生的莢膜多醣（CPS）經由 TLR2 誘導調節性 DC 所產生的免疫作用，進而增強 iTreg 細胞的產生。諸如此類的科學證據，提供了發展特定益生菌菌株作為藥物使用的科學證據。

表 3. IPC 2019 研討會中口頭及海報發表之研究趨勢與相關技術應用整理

技術名稱	功能與應用領域	發展單位	國別
微生物相關分子模式 (MAMP) 與可被相應的模式識別受體 (pattern recognition receptors, PRR) 識別	微生物功效機制分析	Laboratory for Intestinal Ecosystem, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences	日本
腦長軸研究與腦肝軸機制研究	老化等神經退化疾病模式與驗證	Bioprocess Technology, School of Industrial Technology, University Sains Malaysia,	馬來西亞
歐盟 EFSA 法規分析	益生菌於歐盟食品與飼料案件申請	European Union Food Chain Legislation Expert Pen & Tec Consulting	西班牙
特異性免疫細胞與動物模式	益生菌產品免疫調節機制建立	Pohang University of Science and Technology (POSTECH)	南韓
微生物抗生素耐性與基因轉移機制探討	微生物抗生素耐性評估	University of Eastern Finland, Institute of Public Health and Clinical Nutrition	芬蘭
抗菌胜肽與細菌素機制研究	抗菌製劑開發與功效測試	Université de Lille / Norwegian University of Life Sciences	法國 / 挪威



圖 7. IPC 2019 益生菌與動物健康研討會主持人 Ajay Awati 開場致詞

五、參加益生菌與動物健康研討會並進行論文發表

（一）微生物與畜牧永續經營議題

IPC 2019 研討會第三天舉辦益生菌與動物健康研討會，本研討會由動物營養專家 Ajay Awati 主持，以永續生產為會議主軸，探討微生物在各層面對畜禽生產之影響。隨著世界人口不斷增加，對於蛋白質的需求亦不斷上升，因此促進了畜禽產業的快速增長。一般來說，畜禽生產在過去幾十年中已經大幅增長，以白肉雞的飼料轉換率（飼料重/體增重）為例，自 1960 年的 2.5 至今已提升至 1.65，提升近 34% 的生產效率。此外，白肉雞的上市體重亦從 1.68 公斤提升至 2.8 公斤，生產效率的提升亦高達 66%。近年來，消費者對於減少抗生素的使用、高品質的肉類產品，以及更高水準的動物福祉與飼養環境的要求，對於畜禽的永續生產及獲利構成了極大的挑戰。然而這些機會與挑戰，大部分皆與腸道健康有關。換句話說，腸道中的微生物組成和活性是這場變革的重要指標，無論是透過研發新的飼料添加物及新的應用方式，或是透過改善菌相組成使腸胃道功能達最大化吸收效益，皆使畜禽生產可朝向永續經營的概念更近一步。

微生物在動物飼糧中的應用可產生許多正面的效益，如微生物發酵所產生的揮發性脂肪酸，可作為 5 - 28% 的豬隻能量來源，其中丁酸（butyrate）亦提供 70% 能量供腸道上皮細胞吸收，透過微生物發酵亦可減少氨的產生並減少能

量的浪費，而部分微生物亦可產生維生素 K 及維生素 B，或加速水分及礦物質在腸道的重吸收。此外，會議中亦提及微生物對於動物福祉及後續的屠肉品質可造成影響，如飼糧中高濃度的蛋白質提升氨的產生，造成家禽足部損傷，若利用微生物改善氨的代謝，即可進一步改善白肉雞足部損傷進而提昇動物福祉。在屠肉品質部分，部分微生物在動物腸道中進行色胺酸的代謝可產生糞臭素（skatole），當經由血液吸收後可儲存於動物脂肪中產生異味；同樣的，動物腸道對於蛋白質代謝後所產生的異味，亦可透過空氣之傳播或不當排放造成飼養環境之惡臭與水源之污染，進而影響附近居民及工作者之健康。因此在研擬促進畜禽永續生產之策略下，應妥善利用微生物的力量，維持飼糧、動物宿主以及微生物菌相間之平衡，促使腸道功能達到最大化，進而改善後續衍生之環境問題。



圖 8. 益生菌與動物健康研討會參與情形

此外，酵素的使用亦普遍受到重視，無論是降低飼料成本，或是對於飼料在腸道中消化動力學的影響，酶的應用不僅有助於消化，亦可作為調整微生物菌群的工具，例如飼料中的纖維在腸胃道中造成較高的食糜粘度，並增加消化物運輸的時間，進而促進小腸中微生物群落的增殖，並與宿主競爭可用的營養物質，降低營養物質的消化率，然而若飼料中添加適當之酵素如木聚醣酶，即可通過降解可溶性阿拉伯木聚醣，降低食糜的粘度並抑制小腸中微生物群落的增殖。



圖 9. 林幼君副研究員於益生菌與動物健康研討會中進行口頭發表

(二) 試驗研究口頭發表

除參與研討會了解益生菌於動物健康之應用外，本人亦於會議中進行論文口頭發表。常見益生菌產品大部分以『一定的活性微生物數量之共生對於宿主健康有正面之影響』著稱，雖對健康具有成效，但對於確切有效成分之宣稱，仍處於模糊地帶。本所營養組執行『新穎代謝分子應用於抗緊迫飼料添加物之開發與動物保健』計畫，已突破此限制，成功開發具有明確功效成分之益生菌產品，不僅明顯改善蘭嶼豬經脂多醣 (Lipopolysaccharide) 誘導緊迫發炎所導致之敗血症狀，於一般商業雜交品種的豬隻，亦具有促進其生長性能之表現。因此，本研究於 IPC2019 進行口頭發表，對於展現臺灣對於益生菌應用於動物保健飼料添加物開發之成效，具有指標的宣傳效果。

六、與 IPC 2019 與會學者針對益生菌研究趨勢進行交流討論

本次研討會主席為來自韓國知名益生菌研究學家 Sin-Hyeog Im，目前擔任韓國浦項工科學大學（Pohang University of Science and Technology）基礎科學研究所免疫與微生物學院教授，他的研究主要專精於益生菌、腸道菌相以及細胞的免疫分子調控。Im 教授於相關領域發表超過 115 篇期刊論文，同時亦為國際知名期刊 *Frontiers in Immunology* 之主編。Im 博士實驗室有五個主要研究領域，包含 1. 轉錄因子（Ets1 和 NFAT1）在免疫調節和耐受中的作用；2. 淋巴細胞和抗原呈遞細胞 DCs 與巨噬細胞中 IL-10 基因調控的分子機制；3. 益生菌產生 IL-10 的訊息傳遞途徑及潛在機制；4. 由益生菌誘導的調節性 DC 和 iTreg 細胞的表徵；5. 針對自身免疫性疾病（如重症肌無力和類風濕性關節炎）的抗原特异性免疫療法的開發。本次出國參訪期間有幸與 Im 教授針對益生菌產品開發等議題進行交流討論，過去他曾於 2015 年亞洲乳酸菌研討會時來到臺灣，了解現階段臺灣益生菌產業之狀況發展，是以追求新穎功效訴求菌種開發為常見之策略，然而他認為欲使產品壽命長久，亦須具備與功效性相呼應之學理驗證，他同時表示，臺灣具有許多特色化菌種，若可與該團隊所開發特殊動物模式或細胞分析技術平台合作，便可針對相關學理機制進行深度之研究。

在 IPC 2019 會議中，另一位有進一步接觸之益生菌專家為 Wilhelm Holzapfel，他目前於韓國韓東國際大學（Handong Global University）擔任客座教授。Holzapfel 博士身為知名益生菌研究學者，自 1996 年以來，他即擔任 IUMS（國際微生物學會聯合會食品微生物學和衛生學國際委員會）的 ICFMH 主席。在其研究生涯期間，亦發表了三百餘篇科學論文、63 本書籍，以及編輯了 5 本科學書籍。同時他也是各種微生物學會的成員以及匈牙利微生物學會的榮譽會員。Holzapfel 博士之研究主要關注於乳酸菌基本的生理、功能、分類以及生物多樣性，同時亦針對菌種在不同生態系統中的作用有深入的探討。Holzapfel 博士之研究團隊目前聚焦於益生菌及其對腸道微生物群的影響，與會期間 Holzapfel 教授亦前來聆聽本次之口頭發表。

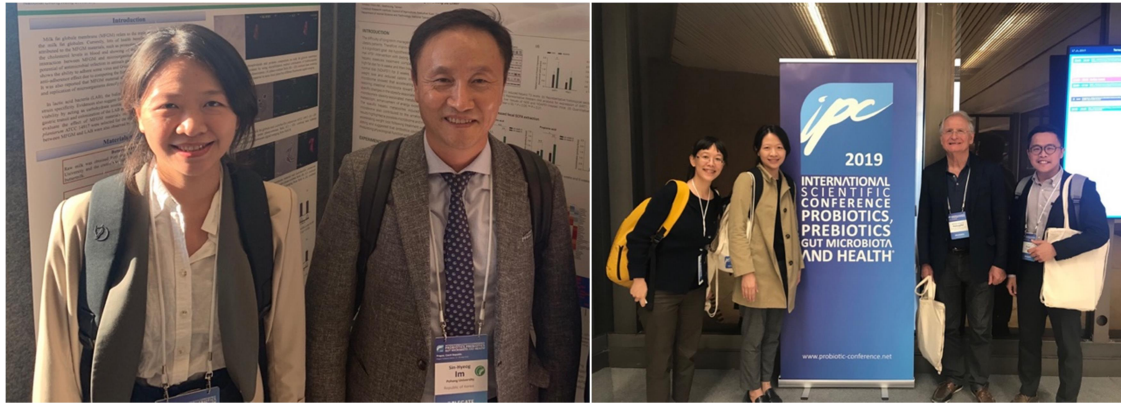


圖 10. 與 IPC 2019 主席 Sin-Hyeog Im(左)及德國益生菌專家 Wilhelm Holzapfel
(右) 合影

肆、建議

1. 畜禽益生菌產品開發首重菌株之安全性

為使國內畜禽益生菌產品之開發符合國際法規趨勢及相關規範，菌株於研發階段應著重於菌種身份（Identity）、安全性（Safety）及效益（Efficacy）的資料建立。在微生物身份之鑑定包含產品使用之菌種之普遍性與安全性，菌種之使用依據風險評估概念可參照歐盟於 2007 年所建立之安全菌株認可之 QPS 清單，以產品的微生物菌種是否接近清單中之菌種，作為微生物安全評估的一般性方法，可大大減少提出申請時所需檢具之安全性證明與龐大的試驗費用，包含抗生物質、目標動物之安全性、目標消費者之安全性以及對環境之影響等皆可簡化。

2. 抗生素減量替代方案以外，菌種的抗生素耐性亦是重要課題

益生菌產品是否具抗性基因的轉移特性，比起菌株本身之抗性更值得受到關注。WGS 可作為抗生素耐性評估的重要工具，須透過現有不斷更新的資料庫進行比對，亦需比對表現型之結果作為評估菌種安全性之評估依據。然而無論是偵測到內在的抗藥性還是後天轉移，WGS 技術還是可能會對目前對抗菌素耐藥性的解釋需有更多檢測數據支持，相關評估試驗可參考人類臨床和獸醫重要抗生素的微生物安全的標準指南「ON THE CRITERIA FOR ASSESSING THE SAFETY OF MICRO-ORGANISMS RESISTANT TO ANTIBIOTICS OF HUMAN CLINICAL AND VETERINARY IMPORTANCE」。

3. 功效性評估應注意地區性結果之差異

飼料添加物之宣稱，不能涉及預防或治癒疾病，然而依據歐盟之規定，所檢附之科學數據需提出至少三個不同地區所進行之有效之試驗數據，提供給動物營養領域之會議專家進行審查。而國內現階段針對保健動飼料添加物相關審查方式與機制正逐步建立，可參考歐盟現行審查機制，將飼料添加物一功能性進行區分，

另針對其特性制定所屬之審查規範，如涉及功能性之宣稱，宜考量同一物質於不同試驗場域所造成之結果差異。

4. 微生物機制途徑與功效物質之解析，為益生菌產品開發現階段之重點

益生菌的表面分子所產生之微生物相關分子模式 MAMP 與相對應的模式識別受體 PRR，是宿主與寄生細菌間的交互作用的重要管道，徹底了解其作用機制可讓益生菌與宿主之間的相互作用能有更清楚的輪廓。此外，包括調控腦-腸軸（gut-brain）、腸-皮膚（gut-skin）及腦-壓力（gut-stress）等新穎潛力飼料添加物，亦逐漸展露頭角。

5. 微生物製劑與動物腸道菌叢調節的應用，可作為畜禽產業永續發展的方向

在動物性蛋白質需求量大增的時代，動物育種與腸道菌相建構並行的方式，可加速畜禽生產效率之選拔，其中以「腸道功能之最大化」是畜禽生產未來能持續突破的關鍵因素，綜觀本次會議主題，了解微生物於畜禽生產亦影響許多應用範圍，包括以動物育種觀點進行母畜至幼畜優良菌相建構；抗緊迫、情緒與腳部灼傷改善等動物福祉；增進屠體與屠肉品質之畜產加工；以及改善蛋白質發酵所產生的不良臭味與污水及堆肥品質促進等現場管理，皆與益生菌及相關菌相調節息息相關，故對於微生物核心研究技術之建構相當重要，因此本次參訪心得將對於研究規劃之更新有所幫助。

伍、附錄

一、IPC 2019 口頭發表摘要

二、IPC 2019 口頭發表簡報



INTERNATIONAL
SCIENTIFIC
CONFERENCE
**PROBIOTICS,
PREBIOTICS**
GUT MICROBIOTA
AND HEALTH

Proceedings

17 – 20 June 2019
Prague, Czech Republic

0072 – Development of Novel Metabolic Molecules Producing *Lactobacilli* as an Anti-Stress Feed Additive for Animal Health Care

Yu Chun Lin¹, Cheng Chin Kuo², Yen Po Chen³

¹Livestock Research Institute- Council of Agriculture- Executive Yuan, Animal Nutrition Division, Tainan, Taiwan Province of China

²National Health Research Institutes, Institute of Cellular and System Medicine, Miaoli, Taiwan Province of China

³National Chung Hsing University, Department of Animal Science, Taichung, Taiwan Province of China

Introduction

Stress in piglet is a complex state particularly caused by the environment, which contributes to the reduction of pig health. Chronic or acute stress-related illnesses, including immunity depression and bacterial infections, can lead to a decrease in agricultural productivity and growth efficiency in animal production. Thus, the control and prevention of stress and its related illnesses are was key factors affecting the profitability of the livestock industry. Recently, a growing interest of feeding animals with innovative feed-additive, particularly by using functional probiotics which provide potential health-promoting benefit to animals. In our previous studies, a novel metabolic molecule exhibited anti-inflammatory properties expression as a the that suppressed COX-2 expression in cancer cells and quiescent fibroblasts were discovered by comparative metabolomics as an innate vasoprotective factor, which showed the potential for application in animal health care.

Methods

To extend the findings in application of feed additive, one potential probiotics *Lactobacillus* strain Y310, originally isolated from raw milk, have been demonstrated highly produced with this novel metabolic molecule. First, to test the intestinal protective ability of the selective strain, we investigated the effects of Y310 on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis with mouse model. After that, we carried out to determine the protective effect of this selected strain on against of lipopolysaccharide (LPS) induced endotoxemia and immune stress by using Lan-yu minipigs. Otherwise, dietary supplementation on growth performance, gut microbial composition, and immune function in crossbred-Landrace×Duroc (LD) piglets were also investigated.

Results

The intestinal protective effects of Y310 on the regulation of intestinal physiology indicate that this strain could ameliorate DSS-induced colitis with a significant attenuation of the bleeding score and colon length shortening. Production of proinflammatory cytokines was decreased and that of the anti-inflammatory cytokine was increased in the DSS-treated mice given this strain. In anti-stress effect of pigs, the result indicated that animal fed a basal diet supplemented with Y310 showed a similar trend on suppression of lipopolysaccharide-induced damages as compared with an intraperitoneal injection of this metabolic molecules. Dietary supplementation with Y310 suppressed the amount of LPS-induced bronchoalveolar lavage fluid and proinflammatory cytokine production as well as endotoxemic lung tissues. In addition, a better beneficial effectsof selected potential probiotics on growth performance and feed efficiency was noted after the addition of the probioticin commercial LD piglets.

Discussion

Overall, our data indicated that the selected probiotics with high production of the novel metabolic molecule potential on animal health promoting. This bacteria also showed a great industrial potential to livestock industry with inexpensive alternative feed ingredients while contributing to the agricultural economy.

Keywords: metabolic molecules; *Lactobacilli*; anti-inflammation; feed additive; endotoxemia



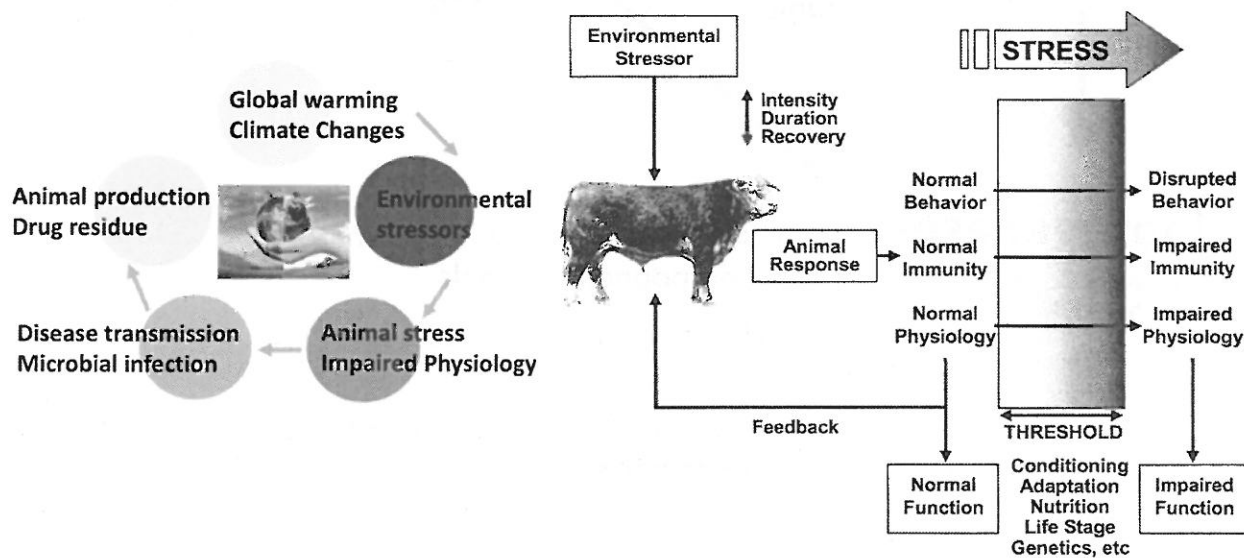
Development of novel metabolic molecule as an anti-stress feed additive for animal health care

YU CHUN LIN

Associate Researcher

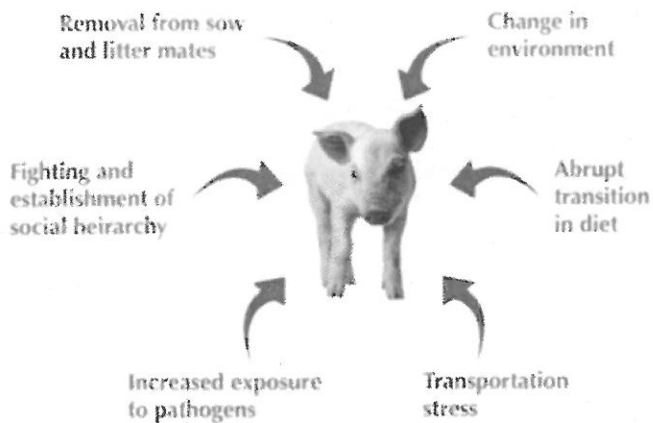
Taiwan Livestock Research Institute

Responses of animals to potential environmental stressors that can influence performance and health



(Hahn, 1999)

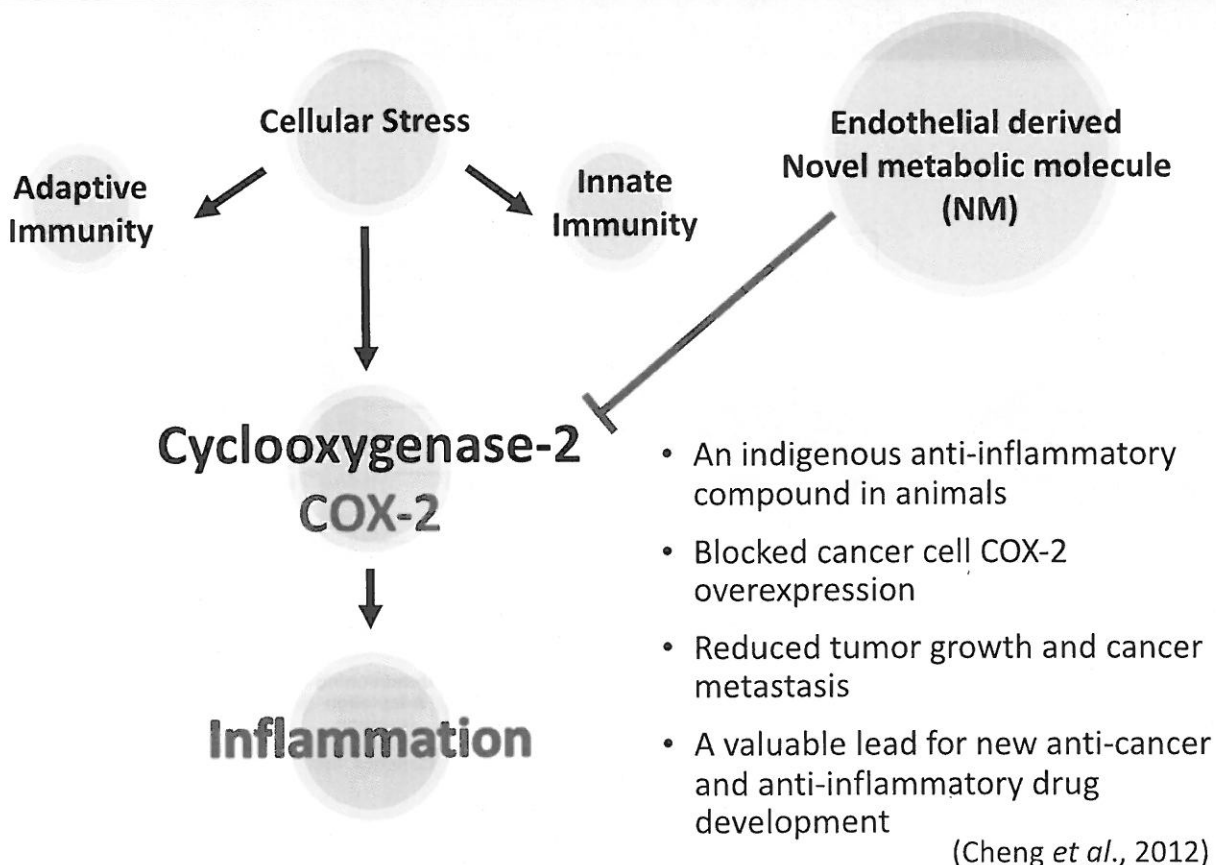
Environmental Stressors caused pig infection



- **Impaired immunity**
 - Multiple bacterial infection
 - Sepsis
- **Digestive tract infection**
 - *Escherichia coli* infection
 - Salmonellosis
- **Respiratory tract infection**
 - Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS
 - Porcine circovirus type 2, PCV2

<https://www.nationalhogfarmer.com/nutrition/starter-diets-and-beyond-benefits-spray-dried-plasma>

Innate protective factor from endothelium



Development of anti-stress feed additive

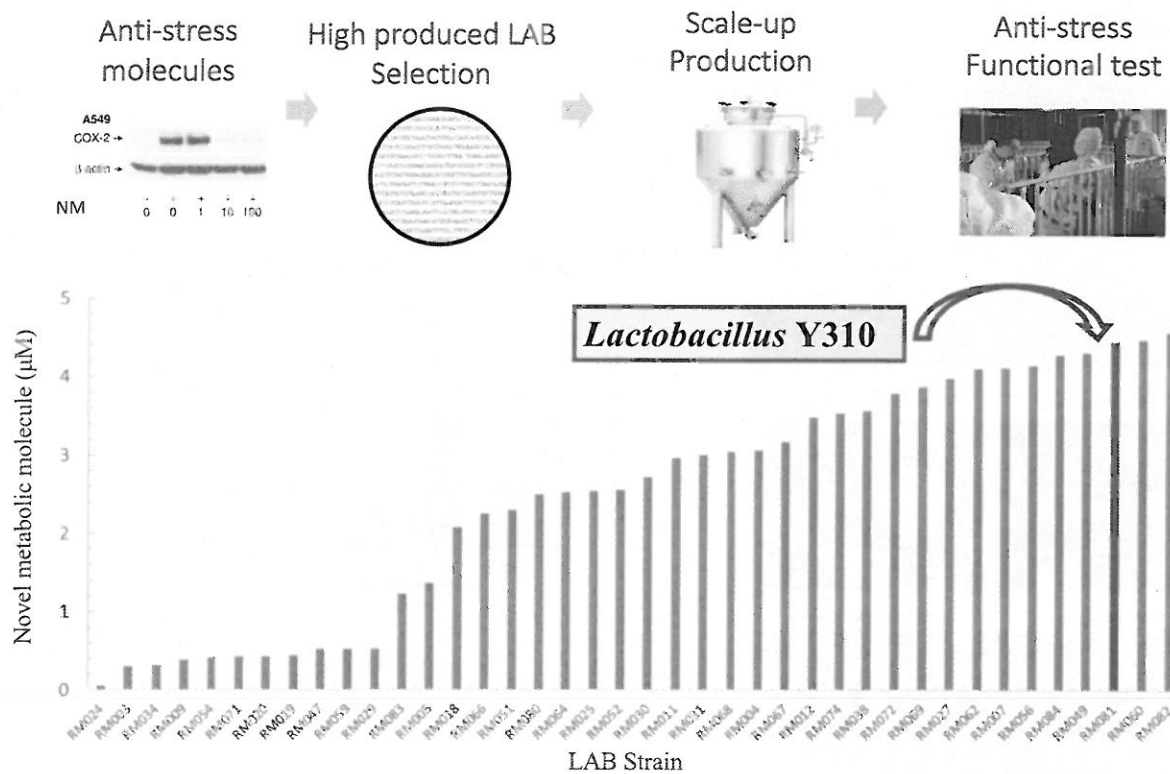
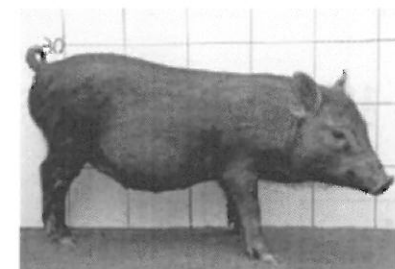


Figure 1 Production of Novel metabolic molecule by lactic acid bacteria from bovine raw milk.

Lipopolysaccharide, LPS - induced stress & inflammation minipig model

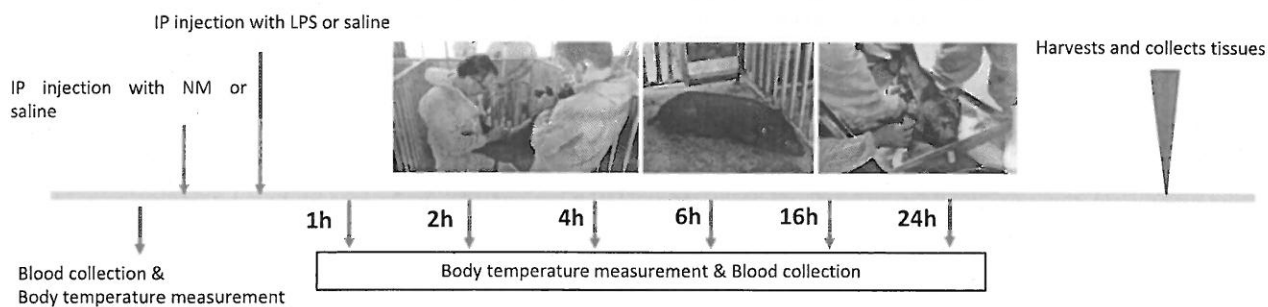


30 kg Lan-yu minipig

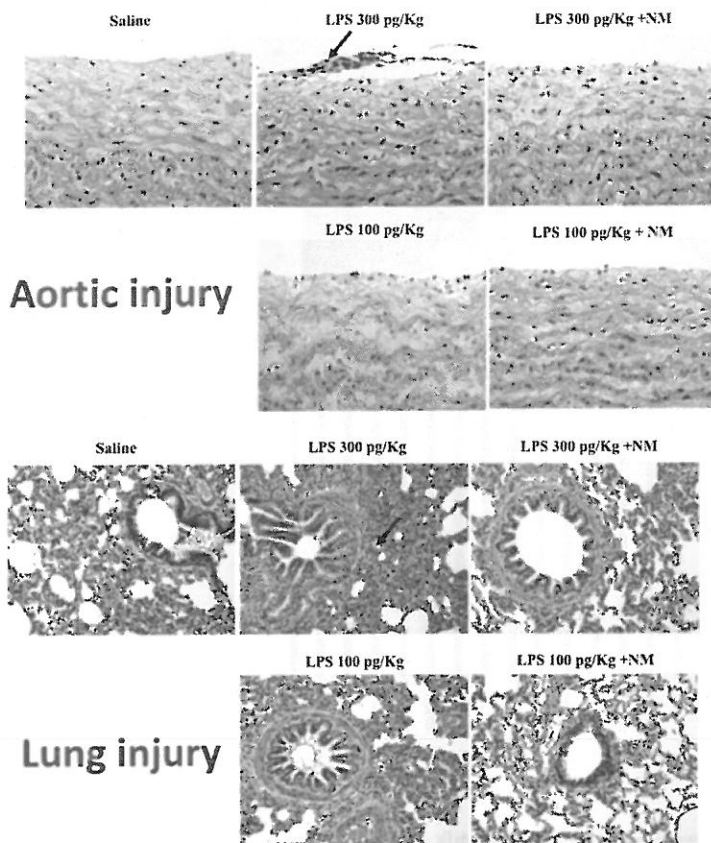
- (A) Saline
- (B) LPS 300 pg/Kg
- (C) LPS 300 pg/Kg + NM
- (D) LPS 100 pg/Kg
- (E) LPS 100 pg/Kg + NM
- (F) *Lactobacillus* Y310 + LPS 100 pg/Kg

(A-E) : Pig feed with Basal Diet

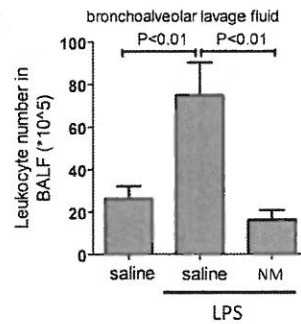
(F) : Basal Diet contain 1×10^8 CFU/g *Lactobacillus* Y310



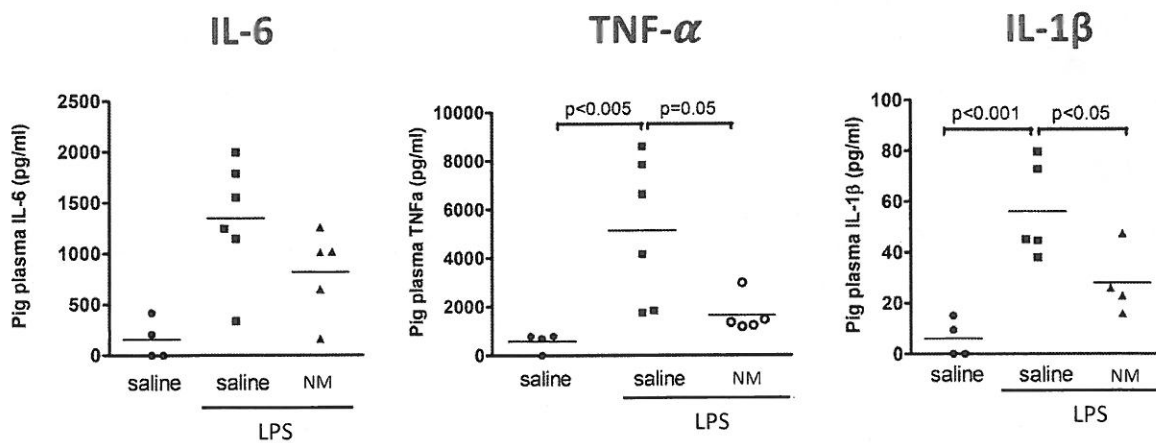
Injection of NM protects LPS-induced organ injury in septic shock pigs



Pulmonary inflammation

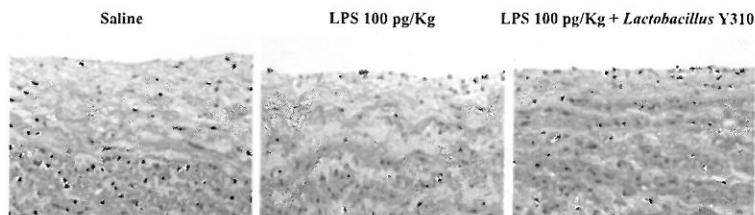


Injection of NM blocks LPS-induced plasma cytokine storm in septic shock pigs

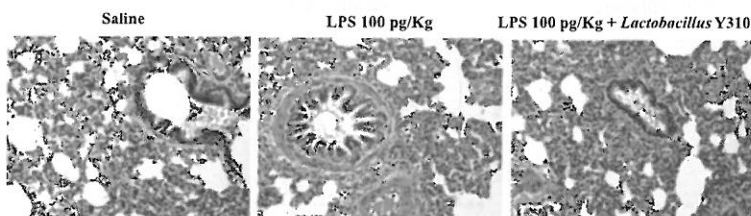


Feed with *Lactobacillus* Y310 protects LPS-induced organ injury in septic shock pigs

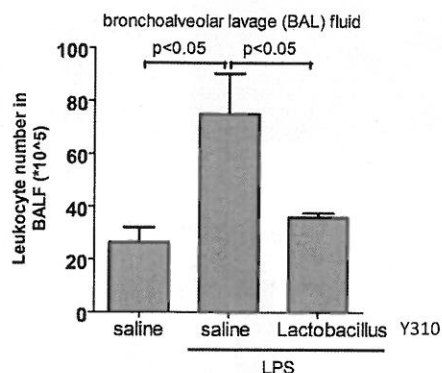
Aortic injury



lung injury

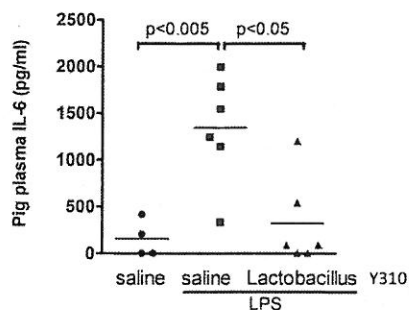


Pulmonary inflammation

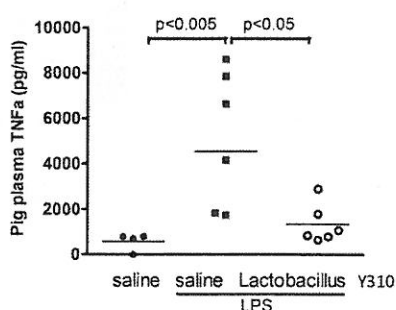


Feed with *Lactobacillus* Y310 blocks LPS-induced plasma cytokine storm in septic shock pigs

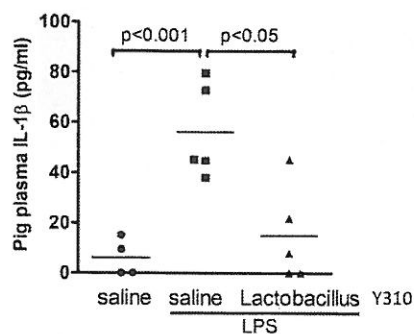
IL-6



TNF- α



IL-1 β

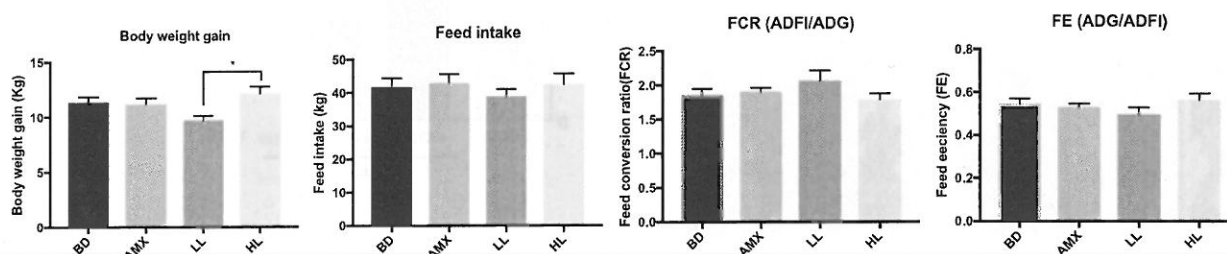


Effect of *Lactobacillus* Y310 on growth performance in cross-bred Landrace × Duroc piglet



40 Cross-bred Landrace × Duroc (LD) piglet

- (A) Basal Diet (BD, n=10)
- (B) BD + 200ppm Amoxicillin (AMX)
- (C) BD + 1×10^6 CFU/Kg *Lactobacillus* Y310 (LL)
- (D) BD + 1×10^8 CFU/Kg *Lactobacillus* Y310 (HL) ✓

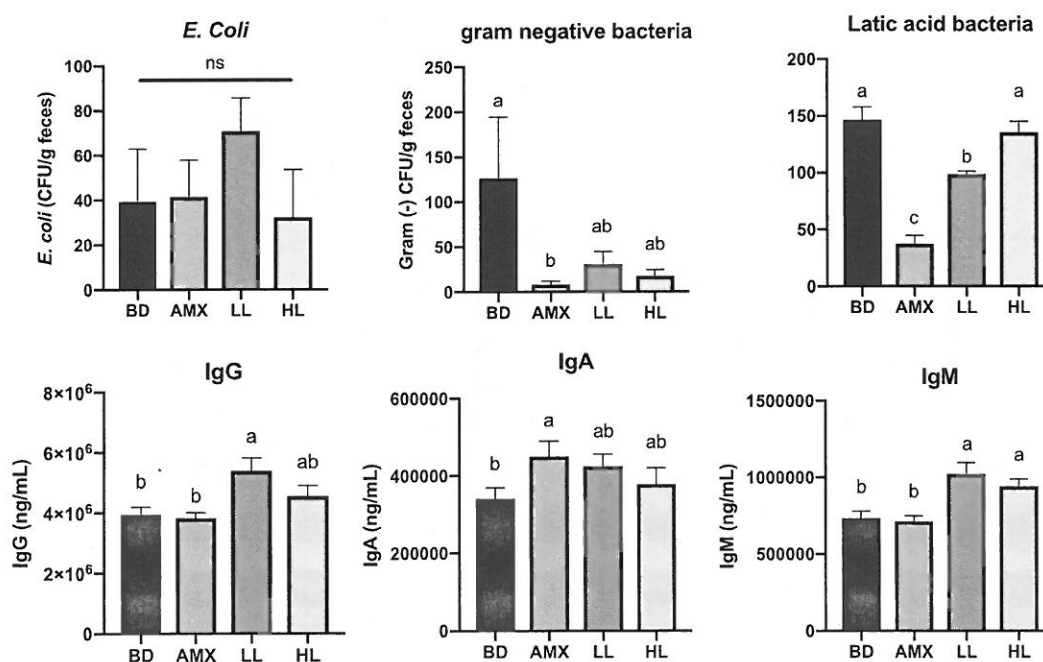


FCR: Feed conversion ratio ADFI: Average daily feed intake

FE: Feed efficiency

ADG: Average daily gain

Lactobacillus Y310 modulates cultivated-gut bacteria and serum immune properties in cross-bred Landrace × Duroc piglet



Conclusion

- NM and Y310 blocked cytokine storm and prevented LPS-induced septic lung damages.
- Administration of NM expressing *Lactobacillus* Y310 had the potential to prevent porcine endotoxemia.
- We development a *Lactobacillus* strain with clear functional ingredient may be a valuable material for developing new animal feed additives or healthy supplies to protect pig from systemic inflammatory disorders or shock.

Acknowledgement

Nutrition Division, Livestock Research Institute
Department of Animal Science, National Chung Hsing University
Institute of Cellular and System Medicine, National Health Research Institutes

