行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

運用系統化腸道免疫評估方法於具特殊免疫調節功能益生菌之開發--以無菌鼠篩選有效減低過敏或抑制腸道致病菌感染能力之人類益生菌(2/3)

期中進度報告(精簡版)

計 畫 類 別 ： 整合型
計 畫 編 號 ： NSC 96-2321-B-040-002-
執 行 期 間 ： 96 年 08 月 01 日至 97 年 07 月 31 日
執 行 單 位 ： 中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

計 畫 主 持 人 ： 詹明修

報 告 附 件 ： 出席國際會議研究心得報告及發表論文

公 開 資 訊 ： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2 年後可公開查詢

中 華 民 國 97 年 06 月 24 日

二、計畫緣由與目的

利用微生物做為食品或是以微生物發酵來改造食品的成份、風味已有千年以上的記錄。在現代社會，微生物甚至於應用在製藥工程及其他如環境保護、能源開發或是各種工業原料等相當多的層面，以和我們的生活有著密不可分的關係。食用益生菌 (probiotics) 的種種好處已隨近年來產學界的研究而有顯著增加的趨勢 (Carson and Riley, 2003; Lin, 2003; Gill, 2003; Adolfsson et al., 2004; Teitelbaum, 2005)。動物實驗或是人體試驗均證明益生菌等具有減輕腸胃道感染，有增強宿主對抗致病細菌或病毒之作用，甚至於增加疫苗誘發之抗體製造 (Gill, 2003; Carson and Riley, 2003; Myllyluoma et al., 2005; Sykora, et al., 2005; Gotteland et al., 2005; Sgouras et al., 2005; Martins et al., 2005)。(Szymanski et al., 2006; Sarker et al., 2005; Matsuzaki et al., 2005; Rao et al., 2005; de Vrese et al., 2005)。另一方面，已有許多證據顯示微生物感染可能是自體免疫疾病的致病因子 (Bach, 2005)，而食用益生菌具有減緩發病程度的效果 (Calcinaro et al., 2005; Baharav et al., 2004; Hoentjen et al., 2005) 。

由此可見，益生菌的功能絕非僅僅是幫助消化與製造維他命、刺激腸道維持腸道細胞正常黏液分泌功能、正常分泌抗微生物之胜肽及相關抗菌因子。腸道微生物同時也透過抗原以及細菌其他成份來刺激腸道免疫系統使之產生免疫調節的作用。事實上，近三年來陸續在許多重要的期刊發表指出腸道共生菌或益生菌可重建免疫系統，並促進TH1免疫反應的趨勢 (Mazmanian et al., 2005)。Nenci等人最近發表於**Nature**的論文發現，腸道上皮細胞的功能及NF-kB訊息傳遞路徑的活化程度，與發炎性大腸炎 (inflammatory bowel disease; IBD) 的發生有極為重要的關聯性 (Nenci et al., 2007)。腸道上皮細胞需要NF-kB訊息傳遞路徑來維持腸上皮細胞的功能，但是另一方面，免疫細胞NF-kB訊息傳遞路徑的高度活化則易引發炎症反應。抑制腸道上皮細胞活化NF-kB訊息傳遞路徑會促進腸道之發炎的機會 (Frick et al., 2007;)。致病菌包括*H. pylori*、*Y. enterocolitica* 或是*Shigella*等會造成上皮細胞NF-kB訊息傳遞路徑的高度活化或引發發炎反應，而部分益生菌如*L. fermentum*、*L. salivarius*、*B. infantis*或是*S. boulardii*可抑制致病菌或其產物所引發之發炎反應 (Riedel et al., 2006；Al-Ashy et al., 2006; O'Hara et al., 2006; Sougioultzis et al., 2006; Tien et al., 2006)。2007年The Journal of Nutrition出版之副刊所登之多篇回顧性文章，更是以腸道菌的作用做為此副刊之主題，其內容含括腸道益生菌與宿主之交互作用及其分子或是細胞層面機制之探討，或是腸道益生菌與過敏反應、與自體免疫反應之間的相關性等 (Winkler et al., 2007; Corthesy et al., 2007; Sheil et al., 2007; Ouwehand, 2007; Matsuzaki et al., 2007)。此外，Nature Immunology 期刊在最近亦刊登多篇關於腸道菌與宿主免疫系統關係之文章 (Pamer, 2007; Sansonetti , 2007; Denning et al., 2007; Matsuzaki et al., 2007; Kelsall, 2008)。證明我們現階段所研究的產品是非常受到免疫界的重視，而我們更希望從我們的研究的結果能快速地將之商品化，以達成本群體計劃之目標。

雖然已有多篇文章探討腸道細菌對免疫反應之影響，但是其使用種類仍局限於現今在市面上流通使用之菌種為多。由於腸道菌對於腸道免疫系統的發育所扮演的角色仍不是十分清楚，所以我們第一年計劃中使用LGG益生菌在GF小鼠建立人類腸道菌相動物模式，除了作為篩選新品種優勢益生菌做為保健食品外，另也同時想進一步了解腸道益生菌對腸道免疫系統的發育與調節的機制。就研究益生菌的免疫調節實驗而言，以無菌鼠進行實驗，其最大的質疑與落差在於所得數據能否回向印證於非無菌的一般人類，因此我們建立此一動物模式實也同時也併用SPF小鼠模式。

本子計畫第一年已建立無菌鼠餵食LGG乳酸菌之平台，於第二年也已經進行將無菌鼠與SPF小鼠餵食食品工業研究所提供之多種益生菌。第一年計劃中，長期餵食LGG益生菌可略為增加脾臟細胞數目。無菌鼠脾臟中B淋巴細胞的數目則比無特定病源鼠的略高，相反地，T淋巴細胞數與巨噬細胞的數目則略低。無菌鼠餵食 LGG後，其巨噬細胞的數目則有回升的現象。體外培養之下給予 LPS 或 Con A 刺激之下，無菌鼠以及無特定病源鼠的脾臟細胞均可增生，顯示無菌鼠以及無特定病源鼠的脾臟細胞對裂殖素誘發細胞增生的現象是相似的。無菌鼠長期餵食的條件下，相較於只餵水之控制組，餵食LGG小鼠脾臟細胞對裂殖素產生IL-2有促進的作用，但對IL-5與IFN-γ有抑制的現象。而以LGG死菌刺激之下，脾臟細胞所分泌之細胞激素呈現TH1的免疫趨勢。

有別於第一年的平台建立，第二年則著手於菌種之篩選，除原有計劃外，並針對各委員所提供之寶貴意見進行修正，所以我們在第二年有幾項重要的改變：

一、 第一年使用健康小鼠，我們於第二年計畫中是以氣喘及腸道感染等疾病模式更進一步來探討，以期更能擴大免疫調節之反應。
二、 免疫調節機制的探討仍以無菌鼠為主，但是在篩檢菌株方面則以 SPF 實驗動物為主力，以符合人類為非無菌之狀態。
三、 第一年使用LGG乳酸菌，今年以第一年各子計畫的成果，自一百株菌株中挑選具潛力之菌株進一步做動物實驗篩選，以符合預設之篩檢目的。
四、 以人類週邊血液單核細胞測試菌株誘導細胞激素分泌之種類與能力，降低動物模式實驗與人類體內實際變化之差異。
五、 由單一菌株改為使用功能類似之多重菌株混合方式來餵食，以加速篩檢速度
六、 增加以四週齡嬰兒糞便建立新生兒腸道菌相小鼠以了解人類菌相在小鼠腸道中停留建構之能力。

本計畫希望透過以上六項設計，能在第二年產出初步具商品化潛力之菌株，並希冀未來能有第三年計劃挑選出各種不同功能目的的特定菌株。

三、材料與方法

人類益生菌菌株 活菌菌株來源有二：1. 由子計畫一食品工業研究所提供新鮮培養之活菌已驗證之菌株；2. 由耕莘醫院附設的坐月子中心提供出生後 4±1 週的嬰兒糞便，由輔大以厭氧罐運送。死菌樣品乃經隔水煮沸 50 分鐘之死滅處理(9 x 10^9/ml in PBS) 以做為體外細胞培養，刺激免疫細胞之用途。餵食乳酸菌菌株之選擇。食品工業研究所提供菌株已於第一

年計劃中進行大規模細胞株篩選，本實驗室也以人類週邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) 分析自食工所數據中較值得進行再評估之 30 株菌 (菌株編號為 A9-11, A19-24, A30, A34, A40, B3, B5-7, D6, D7, D11-13, D17, D21, D24,D26,D29, D30, D43, D49, D51)。所獲得之結果再挑選出 INF-γ高的前十名，其中刪去菌株來源較有疑慮者，最後選定七株菌株 (菌株編號為 A9, A24,A30, B3, B5, D6, D13) 進行等量混合餵食 (表一)。

實驗動物建立人類腸道菌相 實驗動物乃由子計畫二國家實驗動物中心提供之週齡 6 至 8 週之無菌 (germ free; GF) C57BL/6小鼠或購自國家實驗動物中心之Specific pathogen free (SPF) C57BL/6小鼠與 SPF BALB/c小鼠。餵食 GF B6 小鼠活菌由子計畫二國家實驗動物中心黃彥智博士團隊進行；SPF小鼠餵食活菌則分別包括國家實驗動物中心(與GF小鼠對照)或是在中山醫學大學附設動物中心 (asthma模式) 進行。小鼠餵食菌量條件為每週一次，每次餵食總量為 2×10^9 CFU 之混合菌株，共餵食兩次。小鼠於餵菌前先禁食 1 日以使其空胃，於餵食日以餵食器餵食 0.2 ml 菌液。另我們也進行 GF小鼠餵食新生兒胎糞以建構模擬人類完全腸菌相之動物模式。餵食樣品嬰兒糞便加七株菌株的實驗則只餵食一次，於開始餵食後兩週犧牲。

氣喘實驗動物模式建立 以ovalbumin (OVA) 為過敏原，每週腹腔注射一次混合氫氧化鋁佐劑 (OVA 20 μg/ml 或等量 PBS 與 40 mg/ml Alum)，劑量為，共注射五次。另於犧牲小鼠之前一週開始每天以鼻部滴入方式給予 (5 μg/ml OVA in sterile PBS, drop 75 μl OVA or PBS to indicated mice)。 餵食益生菌混合菌液乃於犧牲小鼠前兩週及前一週餵食，200 μl/mouse。

小鼠免疫器官摘取 以二氧化碳麻醉小鼠，無菌條件下摘取脾臟、腸繫膜淋巴組織及腸組織，測量並記錄各組織重量。將免疫組織分割部份給予第二子計畫進行淋巴組織結構分析；將取得之腸繫膜淋巴組織及腸組織送交第三子計畫進行腸道免疫細胞之體外活性分析試驗。本計畫針對脾臟細胞進行系統性免疫系統之活性進行分析。研究項目與方法如下:

1. **脾臟重量與脾臟細胞數目** 小鼠脾臟以無菌方式取出後，秤重，再將脾臟於無菌的條件下研磨並製成單細胞懸浮液，計算脾臟細胞數目。

2. **流式細胞儀分析血液中各種免疫細胞之比例** 將小鼠脾臟細胞置於 FACScan 培養液 (RPMI-1640 medium with 2% fetal bovine serum and 0.1% sodium azide)，調整細胞濃度為 4×10^6 cells/ml，將細胞與螢光抗體反應後進行流式細胞分析。於流式細胞儀專用試管中加入 100 μl 脾臟細胞與標定免疫細胞之螢光抗體 (包括 anti-CD3、anti-B220、anti-CD4、anti-CD8、anti-F4/80等)。避光下於 4°C 反應四十分鐘後，加入 2 ml FACScan 培養液清洗兩次後，於各檢體試管加入 0.3 ml FACScam 培養液，進行流式細胞分析。

3. **脾臟細胞增殖能力** 將製成之脾臟細胞懸浮液調整濃度為 2×10^6/ml，於96 孔培養盤各孔中加入100 μl 細胞以及不同濃度之裂殖素，於 37°C 5% 二氧化碳培養箱內培養。培養液配方為RPMI1640 medium + 10% FBS + 2 mM L-glutamine + 0.05 mM 2ME + Gentamicin。三天後加入 10 μl CCK-8 試劑，混合均勻後再置回培養箱內繼續培養，每隔一小時以分光光度計 (spectrum photometer) 偵測吸光值。 T 淋巴細胞使用之裂殖素為 1.25、2.5、5 μg/ml concanavalin A (Con A)，而 B 細胞則使用1.25、2.5、5 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) 刺激。加熱處理之死菌亦做為刺激免疫細胞之刺激原 (細菌:細胞比例分別為 1:1, 10:1, 100:1)。

4. 細胞激素表現分析 將脾臟細胞懸浮液 (2×10^6/ml) 置於 24 孔培養盤中，以 Con A、LPS 或是 LGG 刺激，經48小時的培養後收取培養液，保存在 -80°C 至檢體收集完畢後再一起測試。我們以 ELISA 評估 IL-2、IL-4、IL-5、IL-12 p70、IFN-γ 與 TNF-α 之表現量。

人類週邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells) 培養 為測試益生菌對人類免疫細胞刺激後所產生的反應是否與刺激小鼠脾臟細胞有相似之表現，我們分以四位健康者週邊血液單核細胞與益生菌共同培養，再將培養液收集並以ELISA 評估 IL-4、IL-10、IFN-γ 與 TNF-α 等細胞激素之含量。

肺部沖洗液之準備與分析 心臟採血後之小鼠固定於固定架上，將老鼠從腹腔剪開至胸部，但不傷及肋骨與肺臟。以鑷子輕夾橫隔膜，用細針或剪將它搓破但注意勿傷及肺臟 (使內外壓力一致，以便沖洗肺部時能擴張)。剪開喉部找出氣管，將 PE tube 插入，並以棉線綁緊固定。針筒抽取 1 ml 之 PBS，灌入肺部再吸出，灌吸動作重複三次。採集之灌洗液置於-80℃冷凍。

四、執行進度及成果

分析三十株菌株刺激人類周邊血液單核細胞所分泌之細胞激素

第一年計畫中，本子計劃以 LGG 乳酸菌做為標準品，餵食無菌鼠或無特定病原 C57BL/6 小鼠，結果顯示 LGG 具有刺激無菌鼠走向 TH1 之免疫調節趨勢。而第一子計畫也已將 107 株益生菌經 RAW264.7 細胞株測試 cytokine profile 之異同而區分為五群。為快速篩檢並觀察菌株對人類免疫細胞產生之反應，我們遂以 PBMC 做為標的細胞來進行篩檢。我們遂由子計畫一於第一年中在細胞株篩檢的實驗結果為基礎，經四個子計畫成員共同討論後挑選三十株菌株，這三十株菌株個別與四位健康受試者之 PBMC 共培養 24 小時，將上清液以 ELISA 分析，

結果顯示，IL-4 值偏低，IL-10 和 TNF-α 值之樣品間差異不明顯 (data not shown)，但 INF-γ 差異則較為顯著 (表一)。本年度計畫中，第一子計畫仍持續以 PBMC 篩選其他菌株，而在本子計畫中，則先自先前三十株所得的數據挑選 INF-γ 分泌量較高的前十名菌株，在刪去菌株來源較有疑慮者 (非自人體或非食品取得) 後，選定七株益生菌株進行混合菌株餵食氣喘小鼠模式的試驗。

Table 1. Probiotic-stimulated interferon-γ secretion by peripheral blood mononuclear cells. PBMC were cocultured with one strain of probiotic at 37°C. IFN-γ secretion of PBMCs was determined in the supernatants 48 hours after ex vivo restimulation. Data are represented as means of IFN-γ secretion in pg/mL.

Strain	IFN-γ pg/ml (Mean) (n=3)	SD
A11	258	199
D13	247	208
A9	234	170
A30	208	116
B7	148	239
A34	129	82
A24	125	82
B5	87	85
B3	80	93
D6	75	82
A22	64	49
D51	55	40
A40	55	32
D12	53	34
D21	29	45
A10	20	18
A14	19	8
A23	18	13
D43	16	10
A19	15	18
D49	15	14
D17	13	17
D26	11	15
A20	10	7
D24	8	12
D11	7	11
B6	6	3
D30	4	6
A21	3	3
D29	1	2

七株益生菌混合株餵食無菌鼠之脾臟細胞受大腸桿菌 LPS、Con A、以及混合菌死菌刺激所表現之細胞激素變化

將無菌鼠隔週餵食 2 x 10^9/once/mouse 七株益生菌混合菌株液共兩次，在第十四天犧牲小鼠後，取其脾臟細胞與不同濃度之 LPS、Con A 以及益生菌死菌共同培養，收取其細胞培養液，以 ELISA 測試 TH1/TH2 相關細胞激素的表現量。

大腸桿菌的 LPS 可刺激巨噬細胞以及促使小鼠 B 淋巴細胞增生。實驗結果顯示，LPS 刺激無菌鼠(GF 組)脾臟細胞並不會顯著地刺激產生 IL-2，但仍隨 LPS 劑量增加有微量促進 IL-2 的產生，然而在有餵食混合菌株的組別(Probiotic mixture; ProMix)，脾臟細胞並不會被 LPS 所刺激 (圖一)。

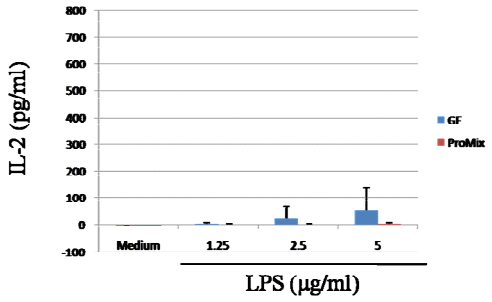

Figure 1. Oral administration of probiotic mixture suppressed LPS-stimulated IL-2 secretion by splenocytes. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of LPS at 37°C. IL-2 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-2 secretion in pg/mL.

我們也測試包括 IL-4、IL-5、IL-10 等 TH2 趨勢之細胞激素。如圖二，雖無顯著差異，但是可見餵食混合菌株之小鼠的脾臟細胞受 LPS 刺激下產生 IL-4 的量較少。圖三顯示高劑量 (5 μg/ml) LPS 可以刺激無菌小鼠的脾臟細胞

產生 IL-5，而餵食混合菌株之小鼠的脾臟細胞受 LPS 刺激下產生 IL-5 的量則較少。IL-10 的分泌可隨給與 LPS 的劑量增加而增加，但是此一現象無論是否有餵食混合菌株，IL-10 的製造均未受影響(圖四)。

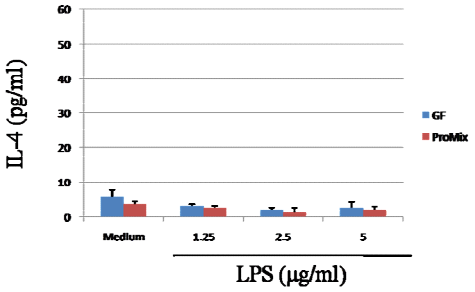

Figure 2. Oral administration of probiotic mixture partially suppressed LPS-stimulated IL-4 secretion by splenocytes. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of LPS at 37°C. IL-4 secretion of splenocytes was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-4 secretion in pg/mL.

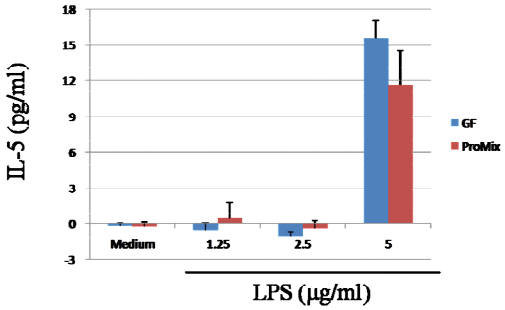

Figure 3. Oral administration of probiotic mixture partially suppressed high dose LPS-stimulated IL-5 secretion by splenocytes. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of LPS at 37°C. IL-5 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-5 secretion in pg/mL

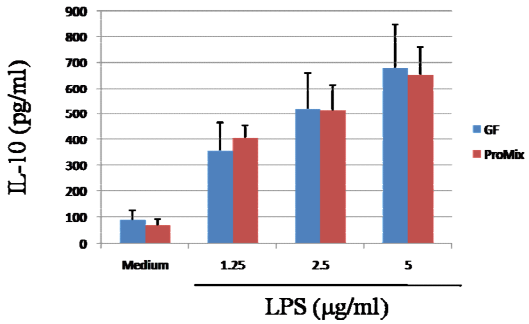

Figure 4. Oral administration of probiotic mixture did not suppress LPS-stimulated IL-10 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of LPS at 37°C. IL-10 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-10 secretion in pg/mL

TH1 趨勢之細胞激素包括 IL-12、IFN-γ，IL-12 為兩分子形成的細胞激素，我們測試其中之 IL-12p70 的表現，發現 LPS 刺激無菌鼠的脾臟細胞時，需隨 LPS 劑量增加才能增加 IL-12p70 的表現，但是有餵食益生菌混合菌者，在低劑量 LPS 作用下即有較高量 IL-12p70 的表現。

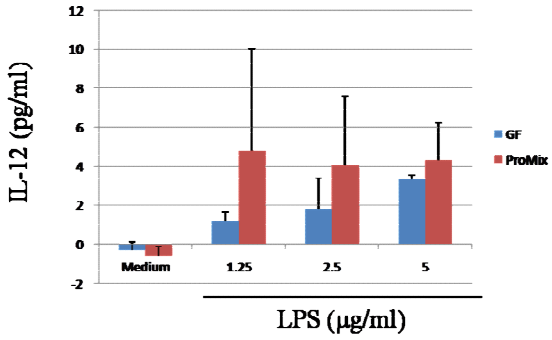

Figure 5. Oral administration of probiotic mixture enhanced LPS-stimulated IL-12p70 expression. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of LPS at 37°C. IL-12 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-12 secretion in pg/mL

雖然我們最初以益生菌刺激 PBMC 並選擇七株產生 IFN-γ較高者來進行混合餵食，但是本次實驗中餵食益生菌後並未發現 LPS 所誘導之 IFN-γ的表現有顯著差異，即使圖五中顯示 IL-12p70 的表現與是否餵食益生菌有關 (圖六)。圖六顯示活體腸道內益生菌存在下之免疫細胞對於 LPS 誘導之 IFN-γ的表現較不受影響。

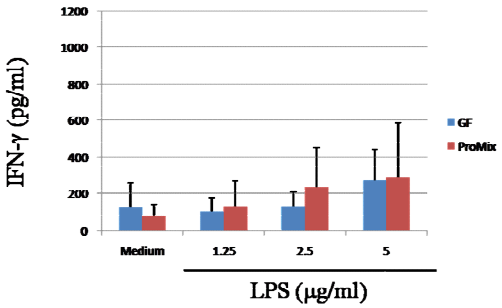

Figure 6. Oral administration of probiotic mixture did not enhance LPS-stimulated IFN-γ secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of LPS at 37°C. IFN-γ secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IFN-γ secretion in pg/mL

以 Con A 刺激 T 淋巴細胞的實驗中，有無餵食益生菌對於 IL-2 的表現並未有顯著影響(圖七)。然而在 Con A 刺激 IL-4 分泌上，餵食益生菌卻有少許促進之作用(圖八)。另一方面，Con A 雖無法顯著刺激 IL-5 製造，餵食益生菌組 IL-5 的表現量則更低於無菌鼠組 (圖九)。

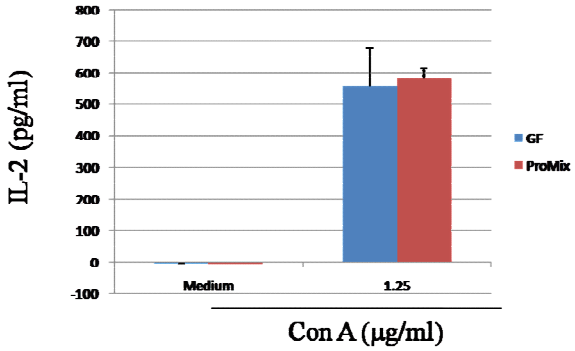

Figure 7. Oral administration of probiotic mixture did not influence Con A-stimulated IL-2 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with 1.25 μg/ml Con A at 37°C. IL-2 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-2 secretion in pg/mL.

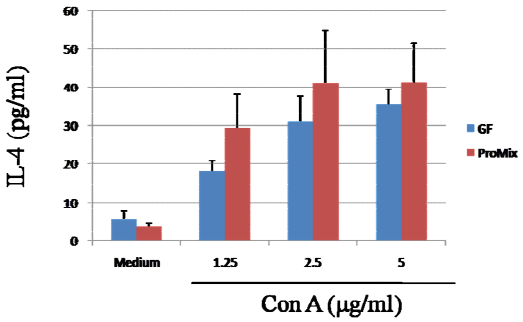

Figure 8. Oral administration of probiotic mixture partially enhanced Con A-stimulated IL-4 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of Con A at 37°C. IL-4 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-4 secretion in pg/mL.

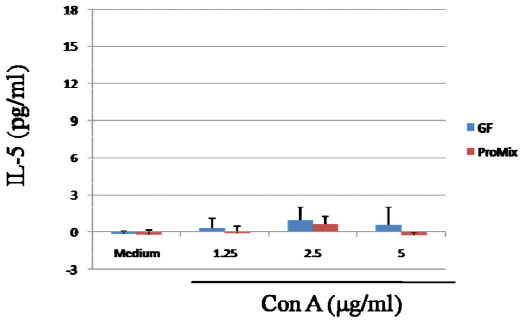

Figure 9. Oral administration of probiotic mixture partially suppressed Con A-stimulated IL-5 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of Con A at 37°C. IL-5 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-5 secretion in pg/mL.

Con A 可刺激 T 細胞分泌 IL-10，但是餵食混合菌株並無顯著影響 IL-10 之表現(圖十)。然而如同圖五以 LPS 刺激，餵食混合菌株小鼠脾臟細胞受 Con A 刺激下，其 IL-12 表現量較無菌鼠組高 (圖十一)。顯示餵食混合菌株後之小鼠脾臟細胞在受到刺激時較易產生 IL-12。而在餵食混合菌株小鼠脾臟細胞受 Con A 刺激下，同樣也有部分促進 IFN-γ表現的能力 (圖十二)。

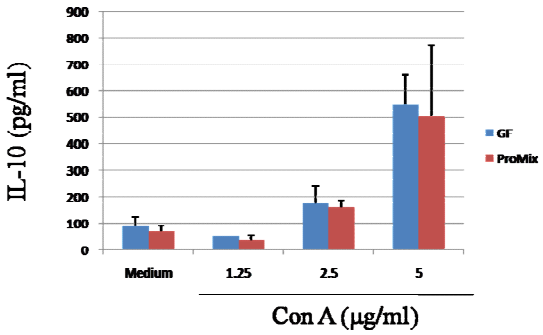

Figure 10. Oral administration of probiotic mixture did not suppress Con A-stimulated IL-10 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of Con A at 37°C. IL-10 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-10 secretion in pg/mL.

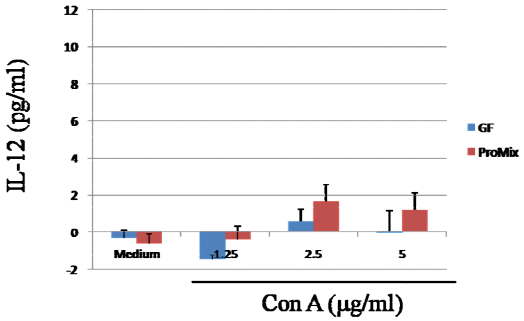

Figure 11. Oral administration of probiotic mixture partially increased Con A-stimulated IL-12 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of Con A at 37°C. IL-12 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-12 secretion in pg/mL.

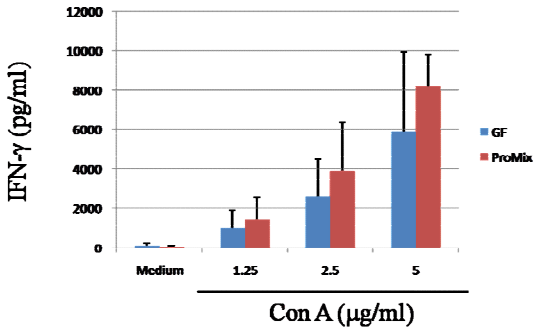

Figure 12. Oral administration of probiotic mixture partially increased Con A-stimulated IFN-γ secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of Con A at 37°C. IFN-γ secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IFN-γ secretion in pg/mL.

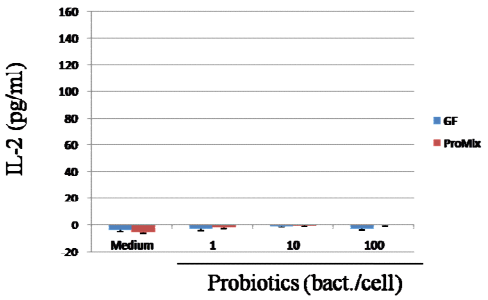

Figure 13. Probiotic mixture did not induced IL-2 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of probiotic mixture at 37°C. IL-2 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-2 secretion in pg/mL.

我們在 ex vivo 培養脾臟細胞中，加入混合菌株之死菌，其菌與細胞之比例濃度為 1:1、10:1 與 100:1。在死菌的刺激下，同樣來觀察細胞激素的變化。實驗結果顯示，益生菌死菌並不會刺激脾臟細胞分泌 IL-2 (圖十三)，對於 IL-4 則部分數據呈現促進作用 (圖十四)。雖然高劑量死菌可以誘導少量 IL-5 表現，但是餵食益生菌組的表現量仍低於無菌鼠，顯示益生菌死菌直接或間接抑制了 IL-5 的表現 (圖十五)。

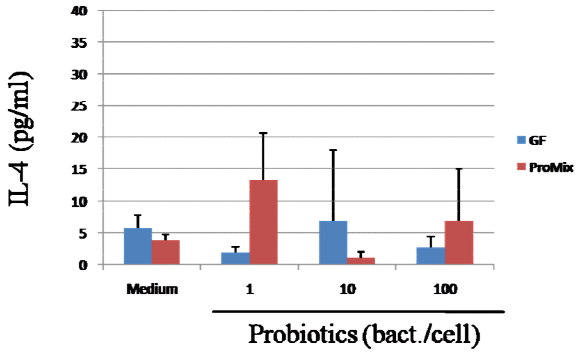

Figure 14. Oral administration of probiotic mixture partially increased probiotics-stimulated IL-4 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of probiotic mixture at 37°C. IL-4 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-4 secretion in pg/mL.

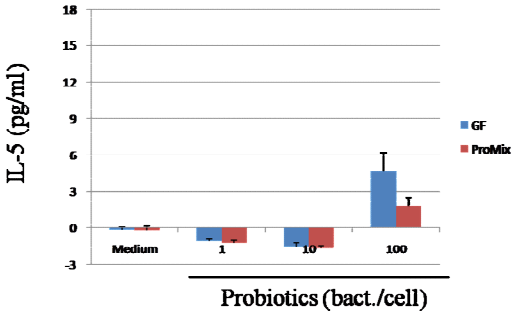

Figure 15. Oral administration of probiotic mixture partially suppressed high dose probiotics-stimulated IL-5 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of probiotic mixture at 37°C. IL-5 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-5 secretion in pg/mL.

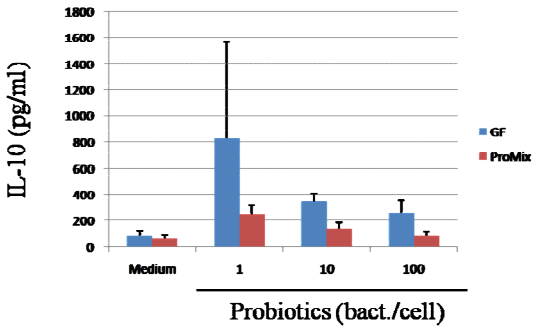

Figure 16. Oral administration of probiotic mixture suppressed probiotics-stimulated IL-10 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of probiotic mixture at 37°C. IL-10 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-10 secretion in pg/mL.

如圖十六所示，我們發現無菌鼠受低劑量益生菌死菌刺激時會製造 IL-10，然而隨著死菌之劑量增加，IL-10 的表現也隨之受道抑制。有意思的是，餵食過混合益生菌則 IL-10 表現量顯著比無菌鼠組減少，亦隨死菌數增加而其 IL-10 表現量更少。

更令人注意的是，益生菌死菌顯著促進 IL-12 表現，顯示益生菌直接刺激脾臟細胞走向 TH1 免疫反應 (圖十七)。而低劑量之死菌即可刺激脾臟細胞產生 IFN-γ (圖十八)，但是隨死菌菌數增多而減少。我們發現死菌對於 IL-12 誘導表現呈現低高劑量死菌可誘導出較多 IL-12 分泌(圖十七)，但是高劑量死菌卻反而抑制了 IFN-γ的表現(圖十八)，而圖十五也顯示高劑量死菌會誘導出少量 IL-5。我們認為益生菌死菌中可能含有兩組不同的成份，其中低劑量時較易誘導 TH1 反應而極高劑量時會促使 TH2 免疫反應。

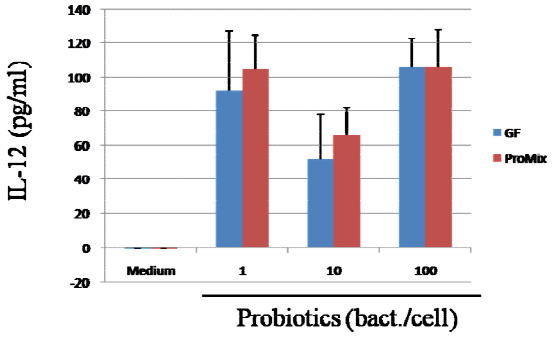

Figure 17. Probiotic mixture directly stimulated splenocytes IL-12 secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of probiotic mixture at 37°C. IL-12 secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IL-12 secretion in pg/mL.

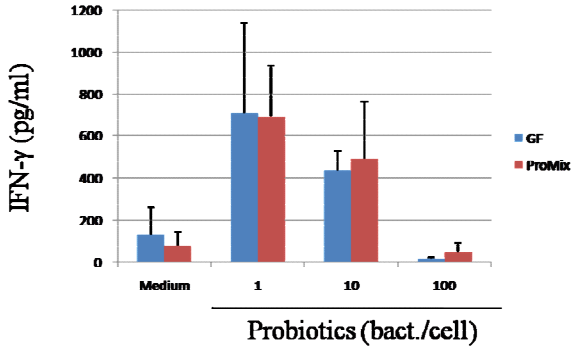

Figure 18. Low dose probiotic mixture directly stimulated splenocytes IFN-γ secretion. Splenocytes from germ-free mice force-fed sterile water or probiotic mixture were cultured with various doses of probiotic mixture at 37°C. IFN-γ secretion was determined in the supernatants 48 hours after the ex vivo restimulation. Data are represented as means of IFN-γ secretion in pg/mL.

餵食益生菌對氣喘模式小鼠脾臟細胞族群之影響

我們以 OVA 做為過敏原致敏 SPF C57BL/6 小鼠，並將其脾臟細胞以螢光抗體標定後以流式細胞儀分析其各免疫細胞族群之比例。如圖十九，與第一年計劃的結果類似，無菌鼠的 B 淋巴細胞比例較高，而 SPF 小鼠 B 細胞比例就較低，其它如 T 細胞與巨噬細胞均在 SPF 小鼠脾臟細胞中有較高的比例。給與益生菌混合菌種餵食後，其 T 細胞與巨噬細胞數目均有增加之勢(圖十九)。比較 CD4 T/CD8 T 比例可以發現餵食益生菌混合菌液之小鼠，其 CD4/CD8 比例較低，顯示 cellular immunity 反應較強，亦即 TH1 免疫反應較強，此又與圖十九中巨噬細胞增多有類似之處。

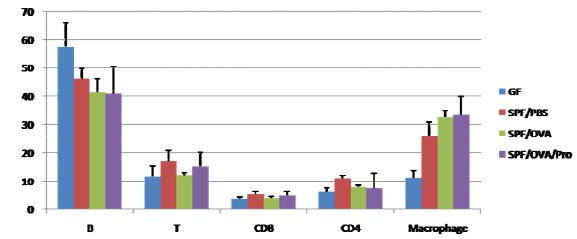

Figure 19. Immunophenotyping of splenocytes obtained from non-treated germ-free, SPF, OVA-sensitized SPF or force-fed OVA-sensitized SPF mice.

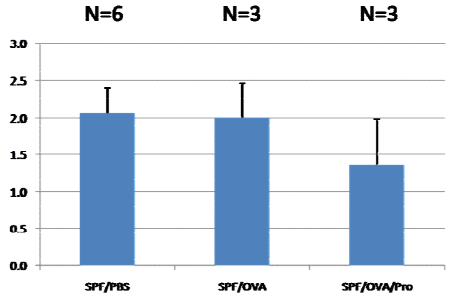

Figure 20. The $CD4^+T/CD8^+T$ cell ratios in splenocytes obtained from PBS-treated, OVA-sensitized, or probiotic-fed asthma mice.

同時餵食四週齡嬰兒糞便與益生菌混合菌液，亦可發現較無菌鼠之 B 細胞比例有減少，T 細胞與巨噬細胞數目有增多，而 CD4/CD8 比例則有減少的現象 (圖二十一、圖二十二)。唯嬰兒糞便中菌種複雜，造成 CD4/CD8 比例減少並不顯著，此亦暗示並非任何腸內細菌均適合做為調節免疫之用，各菌種的功能互異導致於免疫調節機制可能相互抵消。

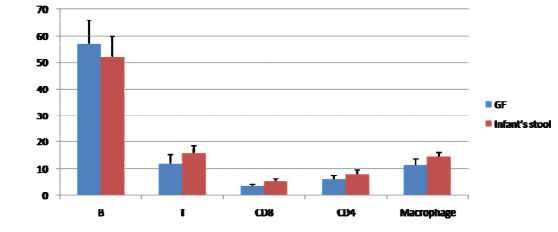

Figure 21. Immunophenotyping of splenocytes obtained from non-treated germ-free, and infant's stool-fed germ-free mice.

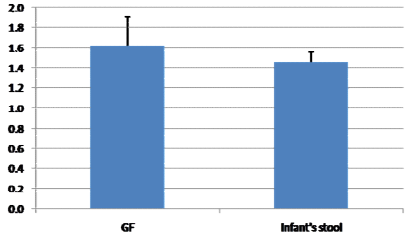

Figure 22. The $CD4^+T/CD8^+T$ cell ratios in splenocytes obtained from non-treated or infant's-feces-fed germ-free mice.

餵食益生菌對氣喘模式小鼠肺部細胞激素之影響

由於之前使用之無菌鼠為 C57BL/6 小鼠，一開始我們使用同品系小鼠做為 asthma 模式之用，圖十九與圖二十之結果即是以 C57BL/6 小鼠所進行，然 C57BL/6 小鼠屬於 TH1 免疫趨勢之品系，為求氣喘模式能順利建立完成，我們改為以 BLAB/c 小鼠做為模式，同樣以 OVA 誘導氣喘。我們將誘導氣喘之小鼠給予混合益生菌餵食，以觀察是否改善氣喘。肺部沖洗液監測肺部細胞激素之變化，而組織切片染測觀察肺部發炎程度 (結果尚分析中)。圖二十三與二十四顯示餵食混合菌株增加 IL-12 與少量 IFN-γ表現的趨勢，然而包括 IL-4 以及 IL-5 亦有增加的趨勢 (圖二十五、二十六)，IL-10 表現之變化則不顯著 (圖二十七)。我們認為有可能是 OVA 誘導失敗或是益生菌劑量過高的問題，目前正處理中。

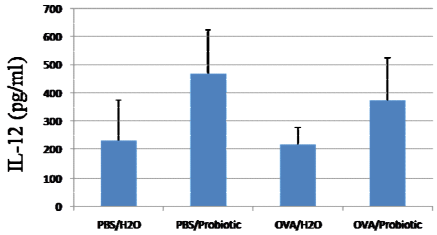

Figure 23. Oral administration of probiotic mixture enhanced IL-12 expression in BAL. SPF BALB/c mice were either treated with multiple doses of OVA for sensitizing to asthma or with PBS as contorl. The mixture of seven probiotic strains or sterile water was oral administrated as indicated, and the concentration of IL-12 in BAL was evaluated by ELISA. Detailed procedure is described in materials and methods.

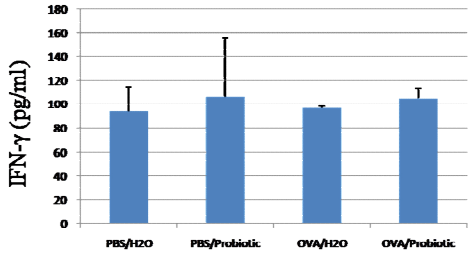

Figure 24. Oral administration of probiotic mixture partially enhanced IFN-γ expression in BAL. SPF BALB/c mice were either treated with multiple doses of OVA for sensitizing to asthma or with PBS as contorl. The mixture of seven probiotic strains or sterile water was oral administrated as indicated, and the concentration of IFN-γ in BAL was evaluated by ELISA. Detailed procedure is described in materials and methods.

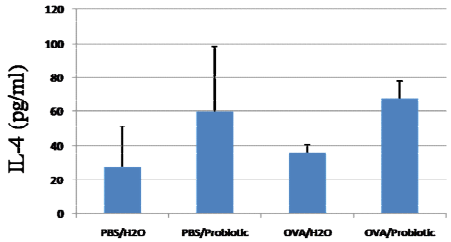

Figure 25. Effects of probiotics on OVA-induced asthma model. SPF BALB/c mice were either treated with multiple doses of OVA for sensitizing to asthma or with PBS as contorl. The mixture of seven probiotic strains or sterile water were oral administrated as indicated, and the concentration of IL-4 in BAL was evaluated by ELISA. Detailed procedure is described in materials and methods.

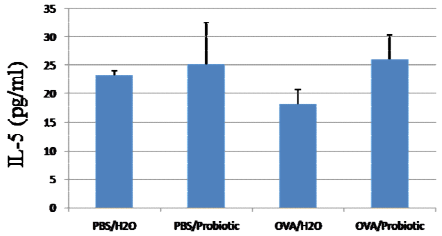

Figure 26. Effects of probiotics on OVA-induced asthma model. SPF BALB/c mice were either treated with multiple doses of OVA for sensitizing to asthma or with PBS as contorl. The mixture of seven probiotic strains or sterile water were oral administrated as indicated, and the concentration of IL-5 in BAL was evaluated by ELISA. Detailed procedure is described in materials and methods.

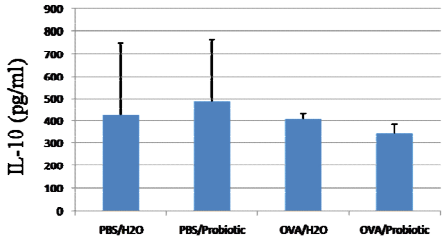

Figure 26. No different in level of IL-10 concentration in BAL. SPF BALB/c mice were either treated with multiple doses of OVA for sensitizing to asthma or with PBS as contorl. The probiotic mixture or sterile water were oral administrated as indicated, and the concentration of IL-10 in BAL was determined by ELISA.

結論與討論 我們發現 LPS 促使脾臟細胞分泌 TH2 反應之細胞激素 IL-5，而餵食七種混合益生菌株則有少量抑制 LPS 誘導之 TH2 免疫反應，但另一方面對於刺激 TH1 反應之 IL-12 的表現則較為顯著。在 Con A 刺激下，餵食七種混合益生菌株對 IL-2 的製造沒有影響，對 IL-4 則有些許促進表現，對 IL-5 則有抑制；反觀對 IL-12 與 IFN-γ則有促進表現的作用。重要的是，益生菌菌體本身具有直接刺激脾臟免疫細胞產生 TH1 趨勢的免疫反應。而此一現象在少量細菌存在下即有所反應，而高劑量益生菌(bacteria: cells=100:1)的存在下反而降低 IFN-γ的表現。

在氣喘動物模式中，雖然餵食菌株之小鼠其肺中 IL-12 表現顯著，但餵食菌株對其他細胞激素表現亦有所影響。有關氣喘動物模式實驗，將繼續進行研究。

另建立感染模式小鼠亦開始著手進行之。

五、計畫成果自評：(是否達成預定成效，如進度落後請說明原因)

我們已利用 PBMC 來加強篩選細胞激素表現具顯著差異之菌株，此部分亦已技術轉移給第一子計畫做更大量菌株之篩檢。就初步篩選菌株而言已具初步成效。另於建立氣喘小鼠模式中，配合無菌鼠以一般 SPF 小鼠，我們已觀察了七株具表現較高量 IFN-γ之混合株在餵食後對小鼠的免疫調節變化。

事實上在一百多株的菌株中，至少有五大群具有不同免疫調節特性之菌株，所以我們尚可再持續對不同群落之菌株個別再進行分析。

此外，對於評估氣喘小鼠之肺部受過敏原 OVA 刺激後所誘導之發炎與病變，目前以組織切片與染色方法，持續進行分析中，本次報告並未納入其成果。但以 BAL 中細胞激素的含量變化來說，OVA 並未顯著誘導發炎反應，而 IL-12 與 IL-4 都有較顯著增加之趨勢，尚較難以判斷 TH1/TH2 的反應走向。所以我們將再重複進行氣喘模式之建立與評估。

無論是七株菌株之混合菌液或是與四週齡嬰兒糞便混合餵食，皆證明腸道菌影響免疫細胞族群比例，並影響 LPS 或是 Con A 等 mitogens 刺激所產生細胞激素之分泌。其結果顯示：一、 本群體計畫將人類腸道細菌或食用菌以餵食的方式轉殖入小鼠之動物模式，無論是無菌鼠或是 SPF 小鼠，均可成功做為觀察益生菌免疫調節之作用；二、目前所優先挑選之七株益生菌，僅就其對 PBMC 刺激產生 IFN-γ的能力來進行判斷與分組，我們必須再對其他激素的製造所產生之效應持續進行評估，目前子計畫一陳慶源博士團隊正快速分析中。

就本計畫第二年的初期成果而言，個人認為已接近預定成效。

六、參考文獻

Adolfsson, O., S. N. Meydani, and R. M. Russell. 2004. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:245–256. Review.

Akhiani, A. A., K. Schon, and N. Lycke. 2004. Vaccine-induced immunity against Helicobacter pylori infection is impaired in IL-18-deficient mice. *J Immunol.* 173:3348-3356.

Al-Ashy, R., I. Chakroun, M. E. El-Sabban, and F. R. Homaidan. 2006. The role of NF-kappaB in mediating the anti-inflammatory effects of IL-10 in intestinal epithelial cells. ***Cytokine***. 36(1-2):1-8.

Bach, J. F. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J. Autoimmunity* 25:74-80.

Baharav, E., F. Mor, M. Halpern, and A. Weinberger. 2004. Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. J Nutr. 134(8):1964-1969.

Calcinaro, F., S. Dionisi, M. Marinaro, P. Candeloro, V. Bonato, S. Marzotti, R. B. Corneli, E. Ferretti, A. Gulino, F. Grasso, C. De Simone, U. Di Mario, A. Falorni, M. Boirivant, and F. Dotta. 2005. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia.*48:1565-1575.

Carson, C. F. and T. V. Riley. 2003. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. *Commun. Dis. Intell.* 27 Suppl:S143-S146.

Christensen, H. R., H. Frøkiaer, and J. J. Pestka. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. ***J. Immunol.*** 168(1):171-178

Corthesy, B., H. R. Gaskins, and A. Mercenier. 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. ***J Nutr.*** 2007 Mar;137(3 Suppl 2):781S-790S. Review.

de Vrese, M., P. Rautenberg, C. Laue, M. Koopmans, T. Herremans, and J. Schrezenmeir. 2005. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur. J. Nutr.* 44:406-413.

Denning TL, YC Wang, SR Patel, IR Williams, and B Pulendran. 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8:1086-94.

Flohe, S. B., H. Agrawal, D. Schmitz, M. Gertz, S. Flohe, and F. U. Schade. 2006. Dendritic cells during polymicrobial sepsis rapidly mature but fail to initiate a protective Th1-type immune response. *J Leukoc Biol.* 79:473-481.

Frick, J. S., K. Schenk, M. Quitadamo, F. Kahl, M. Koberle, E. Bohn, M. Aepfelbacher, and I. B. Autenrieth. 2007. Lactobacillus fermentum attenuates the proinflammatory effect of Yersinia enterocolitica on human epithelial cells. ***Inflamm. Bowel. Dis.*** 13(1):83-90.

Gill, H. S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17:755-773. Review.

Gotteland, M., L. Poliak, S. Cruchet, and O. Brunser. 2005. Effect of regular ingestion of *Saccharomyces boulardii* plus inulin or *Lactobacillus acidophilus* LB in children colonized by *Helicobacter pylori*. *Acta Paediatr.* 94:1747-1751.

Hoentjen, F., G. W. Welling, H. J. M. Harmsen, X. Zhang, J. Snart, G. W. Tannock, K. Lien, T. A. Churchill, M. Lupicki, and L. A. Dieleman. 2005. Reduction of colitis by prebiotics in HLA-B27 transgenic rats is associated with microflora changes and immunomodulation. *Inflamm. Bowel Dis.* 11: 977-985.

Isolauri, E. 2003. Probiotics for infectious diarrhea. *Gut* 52:436-437.

Johnson-Henry, K. C., D. J. Mitchell, Y. Avitzur, E. Galindo-Mata, N. L. Jones, and P. M. Sherman. 2004. Sherman Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in H.

pylori-infected mice. *Dig. Dis. Sci.* 49:1095-1102.

Kelsall B. 2007. Innate and adaptive mechanisms to control of pathological intestinal inflammation. *J Pathol.* 214:242-259.

Kim, D. C., F. I. Hsu, N. A. Barrett, D. S. Friend, R. Grenningloh, I. C. Ho, A. Al-Garawi, J. M. Lora, B. K. Lam, K. F. Austen, and Y. Kanaoka. 2006. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-depe dent pulmonary inflammation. *J Immunol.* 176:4440-4448.

Lin, D. C. 2003. Probiotics as functional foods. *Nutr. Clin. Pract.* 18:497-506.

Marteau, P. and F. Shanahan. 2003. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17:725-740. Review.

Maassen, C. B., C. van Holten-Neelen, F. Balk, M. J. den Bak-Glashouwer, R. J. Leer, J. D. Laman, W. J. Boersma, and E. Claassen. 2000. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. ***Vaccine.*** 18(23):2613-2623.

Magalhaes, J. G., I. Tattoli, and S. E. Girardin. 2007. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. ***Semin. Immunol.*** Epub ahead of print

Martins, F. S., R. M. D. Nardi, R. M. E. Arantes, C. A. Rosa, M. J. Neves, and J. R. Nicoli. 2005. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 51:83–92.

Matsuzaki, T., A. Takagi, H. Ikemura, T. Matsuguchi, and T. Yokokura. 2007. Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. ***J. Nutr.*** 137(3 Suppl 2):798S- 802S. Review.

Matsuzaki, T., M. Saito, K. Usuku, H. Nose, S. Izumo, K. Arimura, and M. Osame. 2005. A prospective uncontrolled trial of fermented milk drink containing viable *Lactobacillus casei* strain *Shirota* in the treatment of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurol. Sci.* 237:75 – 81.

Mazmanian, S. K., C. H. Liu, A. O. Tzianabos, D. L. Kasper. 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell. 2005 Jul 15;122(1):107-118.

Myllyluoma, E., L. Veijola, T. Ahlroos, S. Tynkkynen, E. Kankuri, H. Vapaatalo, H. Rautelin, and R. Korpela. 2005. Probiotic supplementation improves tolerance to Helicobacter pylori eradication therapy - a placebo-controlled, double-blind randomized pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 21:1263-1272.

Nenci, A., C. Becker, A. Wullaert, R. Gareus, G. van Loo, S. Danese, M. Huth, A. Nikolaev, C. Neufert, B. Madison, D. Gumucio, M. F. Neurath, and M. Pasparakis. 2007. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. ***Nature***. 446(7135):557-561.

O'Hara, A. M., P. O'Regan, A. Fanning, C. O'Mahony, J. Macsharry, A. Lyons, J. Bienenstock, L. O'Mahony, and F. Shanahan. 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. Immunology. 118(2):202-215.

Pamer, EG. 2007. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol* 8:1173- 1178.

Rao, S., S. Hu, L. McHugh, K. Lueders, K. Henry, Q. Zhao, R. A. Fekete, S. Kar, S. Adhya, and D. H. Hamer. 2005. Toward a live microbial microbicide for HIV: Commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc. Natl. Aced. Sci.* USA. 102:11993–11998.

Riedel, C. U., F. Foata, D. Philippe, O. Adolfsson, B. J. Eikmanns, and S. Blum. 2006. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. ***World J. Gastroenterol.*** 12(23):3729-3735.

Sansonetti PJ. 2006. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* 7(12):1237-1242.

Sarker, S. A., S. Sultana, G. J. Fuchs, N. H. Alam, T. Azim, H. Brussow, and L. Hammarstrom. 2005. Lactobacillus paracasei strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. *Pediatrics.* 116:e221-228.

Sheil, B., F. Shanahan, and L. O'Mahony. 2007. Probiotic effects on inflammatory bowel disease. ***J. Nutr.*** 137(3 Suppl 2):819S-824S. Review.

Sgouras, D. N., E.G. Panayotopoulou, B. Martinez-Gonzalez, K. Petraki, S. Michopoulos, and A. Mentis. 2005. *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12: 1378–1386.

Sheu, B. S., H. B. Yang, J. J. Wu, A. H. Huang, X. Z. Lin, and I. J. Su. 1999. Development of Helicobacter pylori infection model in BALB/c mice with domestic cagA-positive and -negative strains in Taiwan. *Dig Dis Sci.* 44:868-875.

Sougioultzis, S., S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. Pothoulakis, and C. P. Kelly. 2006. Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappa B-mediated IL-8 gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 343(1):69-76.

Sundquist, M and M. J. Wick. 2005. TNF-alpha-dependent and -independent maturation of dendritic cells and recruited CD11c(int)CD11b+ Cells during oral Salmonella infection. *J Immunol.* 175:3287-3298.

Sykora, J., K. Valeckova, J. Amlerova, K. Siala, P. Dedek, S. Watkins, J. Varvarovska, F. Stozicky, P. Pazdiora, and J. Schwarz. 2005. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J. Clin. Gastroenterol.* 39:692-698.

Szymanski, H., J. Pejcz, M. Jawien, A. Chmielarczyk, M. Strus, and P. B. Heczko. 2006. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 23:247-253.

Tien, M. T., S. E. Girardin, B. Regnault, L. Le Bourhis, M. A. Dillies, J. Y. Coppee, R. Bourdet-Sicard, P. J. Sansonetti, and T. Pedron. 2006. Anti-inflammatory effect of Lactobacillus casei on Shigella-infected human intestinal epithelial cells. ***J. Immunol.*** 176(2):1228-1237.

Winkler, P., D. Ghadimi, J. Schrezenmeir, and J. P. Kraehenbuhl. 2007. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. ***J. Nutr.***137(3 Suppl 2):756S-772S. Review.

Teitelbaum, J. E. 2005. Probiotics and the treatment of infectious diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24:267-268.

96 年度「保健食品研究開發」計畫期中報告審查表

計畫主持人：詹明修　　經費來源：國科會

計畫類型：■ 整合型　□ 個別型　□ 產學合作

計畫名稱：以無菌鼠篩選有效減低過敏或抑制腸道致病菌感染能力之人類益生菌

評審項目：

一、書面報告審查意見：

1. 計畫進度報告內容之撰寫是否詳實、明確?

■ 是 □否 意見：

2. 計畫之實驗方法、內容在技術上是否可行?

■ 是 □否 意見：

3. 實驗結果是否合理?

■ 是 □否 若未盡合理，應改善之處為：

4 是否符合預定進度?

■ 是 □否 意見：

5. 本子計畫之研究成果是否對整體整合型計畫之推動具有貢獻及必要性? (非整合性計畫免填)

■ 是 □否 意見：

6. 本計畫之研究成果是否以開發保健食品產品為目標進行?

■ 是 □否 意見：

二、綜合意見或建議事項：(針對計畫執行方向及困難點提供意見)

以菌株刺激人類周邊血液單和細胞所分泌之 INF-γ 量篩選的依據原理是否合理？

計畫主持人：詹明修　　經費來源：國科會

計畫類型：■整合型　□ 個別型　□ 產學合作

計畫名稱： 以無菌鼠篩選有效減低過敏或抑制腸道致病菌感染能力之人類益生菌

評審項目：

一、 書面報告審查意見：

1. 計畫進度報告內容之撰寫是否詳實、明確？

■ 是 □ 否 意見：

2. 計畫之實驗方法、內容在技術上是否可行？

■ 是 □ 否 意見：

3. 實驗結果是否合理？

■ 是 □ 否 若未盡合理，應改善之處為：

4. 是否符合預定進度？

■ 是 □ 否 意見：

5. 本子計畫之研究成果是否對整體整合型計畫之推動具有貢獻及必要性？（非整合型計畫免填）

■ 是 □ 否 意見：

6. 本計畫之研究成果是否以開發保健食品產品為目標進行？

■ 是 □ 否 意見：

二、 綜合意見或建議事項：（針對計畫執行方向及困難點提供意見）

96 年度「保健食品研究開發」計畫期中報告審查表

出席國際學術會議心得報告

計畫編號	96-2321-B-040-002-
計畫名稱	運用系統化腸道免疫評估方法於具特殊免疫調節功能益生菌之開發－以無菌鼠篩選有效減低過敏或抑制腸道致病菌感染能力之人類益生菌(2/3)
出國人員姓名 服務機關及職稱	詹明修 中山醫學大學 醫學系 微生物暨免疫學科 副教授
會議時間地點	20080601-20080605, Boston Convention & Exhibition Center, Boston, USA
會議名稱	108th General Meeting of the American Society for Microbiology
發表論文題目	無

一、參加會議經過

五月三十一日搭長榮航空班機 BR0028 經舊金山轉機 (AA 0150) 抵波士頓，於下榻飯店 (Royal Sonesta Hotel) 稍作休息後即前往會議會場。參與會議過程包括每日選擇有興趣或是重要的演講聆聽之外，亦在會場觀看論文海報以及參觀與會廠商的攤位，除學術上的學習外，學術交流以及新儀器的了解亦是本次出國的目的之一。

本次會議中，較令我注意的項目是細菌所形成的生物膜與致病性的關係，生物膜是細菌群落與細菌分泌物等在與宿主接觸的表面所建構的構造，過去一直有人在研究細菌在生物膜中的生存型態以及細菌的基因調控等研究方向。近年來，生物膜在活體內所造成的影響逐漸受到重視，本次會議中亦聆聽到數場有關生物膜的演講。此外，包括抗菌(金黃色葡萄球菌) 物質的研發、感染宿主細胞激素表現的調控，以及嗜中性細胞細胞外抗菌機制等等都是在我的研究領域以外而令我感到十分有趣的項目，正所謂他山之石可以攻玉，本次聆聽的演講對我的研究有非常大的幫助。

會議通常於下午結束，每日會後的晚餐時間就成了我和同夥的夥伴們放鬆的時刻。由於 Boston 是港口城市，海鮮十分新鮮，尤其是龍蝦更加有名，所以我們也藉此機會品嘗一番。原先亦想參觀著名的哈佛大學與 MIT 等名校，無奈行程較緊湊而取消。

於當地時間六月五日搭 AA0197 班機至 San Francisco 轉機長榮 BR 0017 班機，於台灣時間六月七日早上抵達桃園機場

二、與會心得

這次行程非常趕，以至於體力上較難以負荷，但是收穫不少！這是我第一次參加 ASM 的年度會議，ASM 的會議其實就像過去我所參加的 ICI (international conference of immunology)，會議涵蓋的議題極廣，包羅萬象，所以有人戲稱 ASM general meeting 這種會議像“大拜拜”一樣。也因議題廣泛，所以有興趣聆聽的題目也很多，但也往往發生想聽的演講衝堂的現象，只好忍痛犧牲掉較次要的題目。但是從另一個角度來看，我

卻可以接觸到許多不同領域的研究，算是另種收穫。在會議結束之後，倒有種要趕快回到實驗室做實驗的衝動。

若說對於此次參與會議有所遺憾的地方，那就是決定參加的時間太晚，以至於錯過投稿的機會，否則在個人的研究上會有更多討論與回響，在此也感謝國科會近年來對我的出國補助。