

## 臺北市立動物園 109 年動物認養保育計畫

提案日期：108 年 10 月 31 日

主 持 人	臺北市立動物園動物組王怡敏助理研究員
計畫編號/名稱	10904_食葉性單胃動物健康照護專科建立(2)
計 畫 期 程	109 年 01 月 01 日至 109 年 12 月 31 日
計畫屬性(可複選)	<input checked="" type="checkbox"/> 族群管理 <u>10</u> % <input checked="" type="checkbox"/> 保育繁殖 <u>20</u> % <input type="checkbox"/> 域內保育 <u>  </u> % <input checked="" type="checkbox"/> 國際交流 <u>10</u> % <input type="checkbox"/> 動物醫療 <u>  </u> % <input checked="" type="checkbox"/> 照養管理 <u>35</u> % <input type="checkbox"/> 行為豐富化 <u>  </u> % <input type="checkbox"/> 教育推廣 <u>  </u> % <input checked="" type="checkbox"/> 人才培訓 <u>20</u> % <input checked="" type="checkbox"/> 動物營養 <u>5</u> % <input type="checkbox"/> 其他： <u>          </u>
經 費 需 求	認養經費 <u>625,881</u> 元
計畫摘要(需含計畫目標、擬解決問題、重要工作項目)	<p><b>一、 計畫目標：</b></p> <p>本計畫目標為延續並深入食葉性單胃動物健康照護專科建立(The establishment of monogastric folivores' healthcare specialty)。本園部分大貓熊與無尾熊個體素有消化道菌相不穩定或因壓力紊亂等相關問題，因此本計劃將以食葉性單胃動物(monogastric folivore)大貓熊為主要研究對象，利用大貓熊建立糞便菌相培養與乳酸菌製備標準化流程，進行菌種鑑定和體外試驗，建立基礎資訊並評估生物安全性，以作為後續餵飼試驗的參考。並且以此標準化流程為基礎，將相關技術應用在同為食葉性單胃動物無尾熊之菌相研究等健康照護上，更進一步發展無尾熊之體外發酵試驗。</p> <p>除了乳酸菌研究之外，也統合過往經驗，建立動物牙科醫療聯繫平台與標準化流程，並從牙科監控、血壓監控與測量標準化，以及繁殖季期間圓仔健康檢查，再加上菌相研究，由這四大方向強化大貓熊健康照護，盼藉由提升動物健康，以提高繁殖成功率，同時也為圓仔在未來的可能繁殖工作做預先準備，並在國際期刊上發表相關研究成果。</p>

## 二、擬解決問題：

包含(1)了解先前由大貓熊糞便，分離出最主要的乳酸菌 *Weissella confusa* 是否在一年四季中，皆為大貓熊腸道最常見的乳酸菌。(2) 進行體外試驗分析，了解 *Weissella confusa* 是否會因過於強勢，而對其他大貓熊腸道常見菌種產生抑制性。同時也透過體外試驗，了解 *Weissella confusa* 對於腸道環境的耐受性。(3)以無尾熊之桉樹葉發酵測試前兩段式消化處理，以及體外發酵測試，從體外試驗了解無尾熊的消化特性。(4)建立動物牙科醫療聯繫平台與標準化流程，標準化血壓測量流程，期盼藉由本計畫強化動物飼養管理，提高繁殖成功機率。(5)了解圓仔在接近發情高峰前，是否有可以作為參考的指標，以為將來可能出現的繁殖機會，預先做好準備。

## 三、重要工作項目：

### (一) 進行大貓熊 *Weissella confusa* 的體外試驗分析，

了解此菌種是否為大貓熊腸道乳酸菌中的優勢菌種、對於其他常見大貓熊腸道菌種是否有抑制性，以及在體外模擬腸道環境的耐受性：食葉性單胃動物(monogastric folivore)用於描述動物的食性，是屬於植食性(herbivorous)當中以植物枝葉為主食的食葉性(folivorous)，並且在消化道構造上，為僅有一個胃部的單胃動物(monogastric animal)，其中大貓熊即是一個例子。大貓熊為熊科動物，具有肉食動物的單胃消化道特徵，卻以食葉性為主要食物來源。根據基因體定序結果指出，大貓熊具有蛋白酶的基因序列，卻不具有纖維素酶相關基因序列 (Li *et al.*, 2010)。纖維素的分解可能是透過具有纖維素酶基因序列的腸道細菌所進行 (Zhu *et al.*, 2011)。另外也有研究指出，腸胃道疾病曾經是圈養大貓熊最主要的死因之一(Qiu and Mainka, 1993)。顯示腸胃道菌相在大貓熊健康與消化上，所扮演的重要角色。

本園與臺灣大學動物科學技術學系王翰聰老師合作，建立大貓熊腸胃道菌相檢測技術，進行長期追蹤了解營養健康狀況。園內雄性大貓熊個體團團，在成年後每年均有腸胃道不適的情況，

且每年均有至少兩次以上的異常便排便記錄。由2016年至2019年腸胃道菌相檢測的結果，顯示團團的腸胃道總菌量，相較於園內另外兩隻腸胃道較健康之大貓熊，有總菌量較少之趨勢。且經由2019年間每月定期菌相追蹤結果指出，在乳酸菌比例上，團團在施打長效型抗生素或排出黏液便時，腸道乳酸菌比例會大幅下降，然而另外兩隻雌性個體，在施打抗生素後乳酸菌比例並無變化，全年乳酸菌比例十分穩定且未排出黏液便。綜合上述長期菌相追蹤結果，團團的腸道乳酸菌相，和另外兩隻雌性個體相比較不穩定，容易因外在食物季節轉換或內在因素影響而產生波動。

中國人工繁殖大貓熊，也曾有罹患消化道疾病的紀錄，推測可能的成因是過早離開母獸、飼養管理不當或抗生素使用不當(王等, 1998)。考量到園內目前抗生素在大貓熊上的低使用頻度，還有現場管理的情況，以及團團因幼年期與雙胞胎兄弟交替予母熊哺育，於出生6個月之後便與母熊分開。因此幼年期過早離開母獸，導致團團無法自母獸接種合適腸道菌相，有可能是團團腸胃道菌相較不穩定之主因之一(Francino, 2014; Matamoros *et. al.*, 2013)。在人類中也有研究指出，腸道菌相的建立在幼年期是關鍵，可能會影響個體健康狀況(卞等, 2018)。而在黏液便相關研究上，有研究指出黏液便常發生於大貓熊每年主食由竹桿轉換到竹葉之轉換期，由食物轉換期肇因的腸道菌相組成改變，導致排出黏液便(Williams *et. al.*, 2016)。顯示在食物轉換期間，補充腸道保健相關之補給品是可以考慮的飼養管理方針。本園為了輔助改善團團的腸胃道問題，自105年10月8日開始餵飼市售「人類」益生菌LP33。考量LP33係「人類」菌株，不一定適用大貓熊。且在畜產界將自動物體分離之益生菌，添加於飼料餵飼動物，從而改善動物健康狀況，已經被廣泛應用於豬和雞等物種的餵飼管理上(Angelis *et al.*, 2006; Musa *et al.*, 2009)。因此發展自健康大貓熊腸胃道中分離益生菌，餵飼腸道健康程度較差之個體進行健康照護，是值得進行的研究方向。

目前在大貓熊益生菌上已經進行的相關研究，大部分著重在分離芽孢桿菌及分解纖維素的能力，探究芽孢桿菌對於促進大貓熊消化和平衡菌相的能力(周等，2016)。少部分在乳酸菌上的研究，則是從大貓熊糞便中分離出乳桿菌，並對部分實驗動物進行急性毒性實驗，證明無毒性反應後，在臨床上應用在數隻有腸胃道疾病的大貓熊上，記錄症狀改善的情況(王等，1998)。並且另有大貓熊乳酸桿菌益生菌專利(中國專利：CN106434411A)，著重在該益生菌對於提升大貓熊免疫球蛋白數量、降低發炎反應，以及緩解急性腸道發炎的症狀上之功效。值得注意的是，近兩年來在大貓熊乳酸菌上的相關研究，開始迅速發展，著眼於大貓熊乳酸菌在飼養管理上作為益生菌的潛在優勢，自大貓熊糞便純化乳酸菌種鑑定、菌株全基因體定序，以及體外試驗等方面皆有初步研究結果發表(Du *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2018)。然而綜觀而言，目前在大貓熊益生菌研究中，相關研究仍舊十分缺乏。

目前以乳酸菌為基礎的益生菌研究，配合長期餵飼益生菌並進行腸道菌相追蹤，以評估益生菌在腸道菌相平衡上的功效的基礎追蹤資料並未建立。進一步對於有效菌株的菌種鑑定，並深入探究個別菌種產酸能力與生化特性，都是未來要實際應用的重要依據。乳酸菌為數種不同菌種的總稱，在許多不同物種的研究中，指出以乳酸菌作為益生菌，在不同菌種中可能有許多的潛在益處，包括抗氧化能力、協助治療惡性腫瘤、增強免疫系統、緩解腸道疾病、抑制壞菌生長，以及安全性較高(Didari *et al.*, 2014; Iqbal *et al.*, 2014; Ljungh and Wadström, 2006)。考量到乳酸菌在腸道中生產有機酸，降低腸道酸鹼值，或是經由分泌抑菌物質，產生有利於益菌生長，並同時抑制病原菌及雜菌產生之環境，將有助提升大貓熊日常健康照護，且以乳酸菌作為益生菌的應用，在生物安全性上已經被廣泛證實安全性較高，僅有極低的感染風險(Didari *et al.*, 2014; Ljungh and Wadström, 2006)。因此從潛在功效與安全性兩方

面考量，以乳酸菌為主的大貓熊益生菌研究，具有發展的空間及研究價值。

因此於先前計劃中，已經與臺灣大學動物科學技術學系王翰聰老師展開長期合作，在建立大貓熊腸胃道糞便菌相檢測技術後，針對園內大貓熊腸胃道菌相進行長期監測，並且記錄腸胃道較不穩定的雄性大貓熊團團在餵飼市售「人類」益生菌 LP33 後的腸道菌相變化。同時在 107 年度的計劃中，已經採集腸胃道較健康之雌性大貓熊圓圓之竹葉便、精料便、竹筍便和竹桿便，從中分離出 60 個菌落。後續進行菌體大量培養，並加入保護劑凍乾，完成大貓熊益生菌粉末的製備。也進行體外消化試驗，檢測益生菌粉末對酸性環境和膽鹽的耐受性。雖然已知乳酸菌具有很高的安全性，但考量到大貓熊的珍貴稀有性，以及在大貓熊可參考的相關研究仍十分有限，因此於 108 年度的研究，著重於安全評估標準的初步建立，以及本試驗所篩選純化出之菌種鑑定。由 16s rDNA 菌種鑑定，和 API 50 CHL 乳酸菌菌種鑑定結果指出，本試驗所分離出的乳酸菌主要為 *Weissella confusa*。

*Weissella confusa* 常見於新鮮的發酵食物，並且是健康脊椎動物中常見的腸道菌種，在近年來因為其作為益生菌的潛力而開始受到重視(Fusco *et. al.*, 2015)。由人類糞便純化之 *Weissella confusa* 被認為可能有作為益生菌之功效 (Lee *et. al.*, 2012)。在畜產界近年來亦開始重視此菌種作為益生菌的潛力，開始進行相關的初步研究，另有研究由馬的糞便純化出 *Weissella confusa*，進行益生菌潛力的初步探討(Sturino, 2018; Xia *et. al.*, 2019)。同時在大貓熊乳酸菌研究上，亦有 *Weissella spp.* 的相關研究，顯見其在益生菌領域上的重要性(Du *et. al.*, 2018; Xiog *et. al.*, 2018)。

考量 108 年度成果，雖然已有數篇報導指出 *Weissella confusa* 的安全性，並建議應可使用於直接餵飼動物(Cupi *et. al.*, 2019; Sturino, 2018)。但由於 *Weissella confusa* 不在農委會所公告「可供給家畜、家禽、水產動物之飼料添加物參考物質表」

之中，且不同於一般較被廣泛使用的 *Lactobacillus spp.* 和 *bifidobacterium spp.*，*Weissella confusa* 屬於較少被使用之乳酸菌種，仍有部分生化特性尚待釐清，又考量到大貓熊的珍貴稀有性，因此本年度計畫將會先暫緩餵飼大貓熊團團試驗製備的乳酸菌膠囊，轉而進行 *Weissella confusa* 的體外試驗分析，了解此菌種是否為大貓熊腸道乳酸菌中的優勢菌種、對於其他常見大貓熊腸道菌種是否有抑制性，以及在體外模擬腸道環境的耐受性。首先為每季收集本園三隻大貓熊之糞便樣本，分別篩選純化其中的乳酸菌，進行 16s rDNA 菌種鑑定，和 API 50 CHL 乳酸菌菌種鑑定，其中 API 50 CHL 乳酸菌菌種鑑定，是利用不同乳酸菌種，能利用的碳水化合物種類並不完全相同之特性，檢驗待測菌種於 49 種不同碳源發酵的情況，鑑定所屬的乳酸菌菌種。透過菌種鑑定確認為 *Weissella confusa*，109 年須持續追蹤該菌種是否在一年四季，皆為本園三隻大貓熊糞便乳酸菌叢中的優勢菌種。其次為在體外環境中，將糞便懸浮液與 *Weissella confusa* 混合後，利用體外發酵培養檢驗混合前後菌相比比例變化，在體外環境模擬投餵該菌種後，是否會過於強勢而對原生腸道菌叢產生抑制性。最後為針對 *Weissella confusa* 進行耐酸和耐膽鹽測試，模擬投餵後通過腸道環境的情況。綜合上述試驗成果，將可增進對大貓熊腸道乳酸菌的基礎研究成果，並可供後續是否要進行實際餵飼大貓熊的評估依據。

(二) 無尾熊之桉樹葉發酵測試前兩段式消化處理，以及體外發酵測試：本計畫於歷年來所建立之大貓熊糞便菌相培養技術，和目前正在發展中的益生菌製備流程，預計將於未來整理成標準化流程公開發表，供其他單位作為參考。但在正式發表前，已建立之相關技術已可導入園內其他動物之健康照護，其中在無尾熊上的相關研究，是目前可以進行之方向。

於 107 年年初，園內一隻公無尾熊因肩胛肌肉量偏低，且有腸胃不適的狀況，因而進行糞便

抹片檢查，發現腸道總菌量偏少。在參考澳洲無尾熊專業人員的建議下，以另一隻健康公無尾熊的糞便混合代奶餵飼該隻無尾熊，期望能補充其腸道總菌數，在餵飼三週之後重新進行糞便抹片檢查，結果顯示總菌量正常，所以停止進行全糞移植操作。但該隻無尾熊於隔日健康狀況急轉直下，腹部腫脹又排出稀軟便，而且進食狀況不佳。於次日狀況持續惡化，精神狀況不佳無法進食且腹部嚴重鼓脹，嘗試可行之治療方法皆無效。再諮詢澳洲無尾熊專業人員的建議後，給予人道處理。

由結果雖無法斷言，該隻無尾熊之死是因為對全糞移植操作產生不良反應，或是由於本身健康因素。且參考人類在以全糞移植治療局部性迴腸炎(Crohn's disease)的安全性研究，係由捐贈者糞便純化出的微生物相，在受贈者麻醉的情況下，以鼻空腸管飼(naso-jejunal tube)或胃鏡注入(gastroscopy infusion)直接導入中腸接種，相較於由口攝入全糞，已有較高安全性。即使如此，在人類的全糞移植癒後追蹤中，仍有 13.6% 的患者會出現身體不適的症狀，包括發燒、排便頻率增加和脹氣等(Wang *et al.*, 2018)。另外，目前在園內的無尾熊域外保域族群，仍有數隻有親緣關係的個體，有容易排出軟便的情況。有鑑於無尾熊全糞移植的先例，以及目前在無尾熊腸道菌相監測上，僅有糞便抹片檢測腸道總菌數的技術，因此發展無尾熊糞便菌相培養技術，用於長期監測園內無尾熊腸道菌相變化，實為本園無尾熊健康照護工作的當務之急。

在無尾熊糞便菌相培養技術上，相關的文獻目前仍舊十分有限，以早期的研究為主(Osawa *et al.*, 1992)。雖然無尾熊和大貓熊在分類上，分屬有袋目和食肉目，在演化上親緣關係並不相近，但在大貓熊上本園已利用大貓熊建立了於野生動物發展腸道菌相培養的標準化流程，且考量到大貓熊和無尾熊，皆是以單一植物類群為主食的食葉性動物，且在消化道構造上同樣為單胃動物。因此在大貓熊上建立的技術發展流程，和菌相培養

所使用的材料與方法，仍舊有參考的價值。本計劃於 108 年度，已經透過參考大貓熊的標準化流程，和無尾熊腸道微生物相關文獻，建立本園無尾熊糞便採樣與保存，以及糞便菌相培養的方法。但同時也發現雖然菌相檢測方法可以沿用，但是在評估菌相穩定度的指標上，大貓熊的評估標準難以直接應用在無尾熊上，且無尾熊的菌數變化幅度較大，不易歸納出健康個體的數值做為參考指標。另有研究指出，無尾熊為了適應桉樹葉有毒性的次生代謝物產物，而在腸道菌相上與其他有袋類草食性動物有所不同(Shiffman *et al.*, 2017)。因此本年度計畫除了將持續評估合適的腸道菌相健康評估標準外，也會針對無尾熊特殊的食性，利用進行不同桉樹葉於糞便接種液之體外發酵測試，透過分析發酵產物及菌相變化，初步建立從腸道發酵數值及代謝產物，評估無尾熊腸道健康狀態之方法。本試驗目的在於考量到只透過糞便菌相分析，可能不足以建立無尾熊的健康指標，希望透過正常與異常糞便之發酵產物與桉樹葉成分變化間的關係，找尋適當的腸道健康判斷指標。因此先在體外環境深入了解無尾熊消化與菌相變化的關係，以利後續尋找可能會反應個體健康狀況產生變化時，而也同時有變化的數值，作為監測的參考指標。

(三) 統合過往經驗，建立動物牙科醫療聯繫平台與標準化流程，並從牙科監控、血壓監控與測量標準化，以及繁殖季期間圓仔健康檢查，再加上菌相研究，由這四大方向強化大貓熊健康照護，盼藉由提升動物健康，以提高繁殖成功率，並且為圓仔在未來的可能繁殖工作做預先準備：園內目前共飼育三隻大貓熊，分別為雄性個體團團、雌性個體圓圓，及兩者之雌性子代圓仔。隨著兩隻親代個體年齡漸入中壯年，健康照護專科的建立日趨重要。因此除了上述大貓熊腸道菌相研究外，也同時發展牙科與血壓監控健康照護。

在牙科方面因為技術已有突破性發展，所以本年度計畫將把重點放在牙科長期監控，以及動



物牙科醫療聯繫平台與標準化流程建立。本園飼養的三隻大貓熊，都有不同的牙科醫療需求。其中大貓熊圓圓可能有因遺傳性造成的瑤瑤質發育不全問題，而導致天生牙齒強度較低，在食用較硬之食材或是於繁殖季因煩躁啃咬棲架時，較容易造成牙齒的損耗。因此於先前計畫中，已經開始發展在大貓熊上製作牙模，以及評估最佳牙套材質等牙科相關技術。於2019年7月首次發生左下門齒崩裂牙髓組織幾近外曝，隨即安排臺大牙醫團隊會同本園獸醫師，為圓圓進行活髓治療保護崩裂門齒。未來將持續進行追蹤牙齒磨耗狀況，評估已嚴重磨損的犬齒是否有安裝鈦金屬牙套之急迫性。而在大貓熊團團上，雖然此個體牙齒健康程度較佳，卻於2018年12月食用竹桿時發生左上犬齒崩裂牙髓組織外曝，後續隨即安排活髓治療與安裝鈦金屬牙套，成為全球首例安裝牙套的大貓熊，登上各個國際媒體版面。然考慮到鈦金屬之強度和大貓熊齒列構造，鈦金屬牙套有可能加深左下犬齒咬合面原有的刻痕，因此將透過影像紀錄與牙模製作，持續監控術後變化。綜合上述，本年度計畫將持續與臺大牙醫團隊合作，發展大貓熊牙科醫療與後續追蹤技術，並藉此機會提升本園野生動物牙科專科能力，建立雙方聯繫窗口與標準作業流程，已利將來本園其他野生動物(如黑猩猩和臺灣黑熊)，有牙科照護需求時，能獲得更好的醫療照護。

在血壓方面，將進行大貓熊高血壓控制與測量標準化之初探。在大貓熊上若需要進行定期的血壓監測，需要特別進行動物醫療訓練，以使動物配合血壓量測，故若無明顯臨床症狀，許多與外保育單位之貓熊，並未進行定期之血壓量測，使得在確診有高血壓時，症狀已經相當嚴重。本園在配合繁殖操作之定期健康檢查中，於2015年發現雄性大貓熊個體團團之血壓數值高於雌性大貓熊個體，並且由野生動物健康照護與醫療小組以經食道超音波診斷出團團心臟二尖瓣有閉鎖不全之狀況，造成部分血液逆流，推測很可能是高血壓的前期症狀。在家庭寵物病理中，常藉由血

壓監測及藥物治療，來穩定血壓，而血壓監測之正確性關鍵在於測量方式，正確之測量方式始能反應真實之血壓，然相關研究在大貓熊上仍然十分有限。本園於 2015 年起開始血壓監測及投藥治療，以定時、定點、記錄動物狀態，及因應壓脈帶之臂圍限制於下臂定位測量，同時投予大貓熊團團鈣離子阻斷劑(脈優)，4 年投藥治療過程中，依測量之血壓數值調整藥物量，發現給予 2 顆脈優較能有效控制高血壓，其收縮壓維持在 150 至 160 mmHg 之間，顯示目前脈優給予劑量應能有效控制大貓熊血壓。然而，團團血壓監測之收縮壓偶有較其他日偏高約 20 mmHg 之情況。在人類相關研究上，血壓量測有其標準化流程與限制，為避免血壓量測不準確，必須排除病患受到醫事人員影響而出現「白袍高血壓」，或血壓測量條件不一致而測得所謂「假性高血壓」。因此本年度計畫將檢測團團血壓數值在其他條件不變情況下，是否受到走動、休息狀態之影響；或因測量人員不同而有數值上之變化，以標準化現行之血壓量測方式，以求能反應團團真實之血壓。

而在大貓熊圓仔上，因考量到圓仔上次進行全身麻醉健康檢查已是數年之前，故將安排圓仔於本年度計畫的發情期間，進行全身麻醉健康檢查，包含外觀檢查、牙科、超音波、X 光、斷層掃描、和生殖系統婦科檢查等，以了解基礎健康狀況資訊。特別是在牙科部分，因圓圓牙齒問題有可能是遺傳因素造成，而圓仔為其子代，且在左下犬齒尖端有疑似齶齒黑點，為確認圓仔是否有相同問題，故在進行健康檢查的時候，將進行牙科相關的檢查與齒模製作。

期望透過強化大貓熊健康照護，提高動物飼養管理品質，以提升繁殖成功率。在園內自 100 年開始進行團團和圓圓的自然交配與人工繁殖操作，於 102 年透過人工授精首次產下子代圓仔。於 104 年圓圓斷奶後，每年均持續進行繁殖配對，但僅有 106 年可能有懷孕但最後流產，其餘年度均無懷孕記錄，顯示大貓熊人工繁殖困難之處。有研究指出，大貓熊人工授精的成功率僅為 60%

(Hou *et al.*, 2006)，即便是在最佳的時間點進行人工授精，繁殖成功率也只提升到 75% (Huang *et al.*, 2012)。有鑑於圓圓在產下子代圓仔後有子宮感染的症狀，且在 106 年有流產的紀錄，為了確認圓圓生殖系統的狀況，於 107 年年底，會同人醫進行婦科健康檢查，結果指出圓圓子宮腔沒有沾黏的情況，且生殖前庭陰道口未培養出病原菌，綜合其他檢查結果，顯示圓圓應能繼續配合繁殖操作。

在大貓熊繁殖操作上，兩隻成年大貓熊個體自開始配對起，至目前為止從未成功進行自然交配。以物種繁殖保育而言，讓圈養個體能展現出自然交配行為是首要目標，其次才是以人工繁殖進行輔助。園內兩隻成年大貓熊個體，在觀察多年自然交配的過程，雌性個體展現出抵尾和俯伏等標準交配姿勢，但雄性個體並無展現標準交配動作。因此曾於先前計畫中進行種公獸人工培訓，促使其發展自然行為，使用聲音、氣味與大貓熊自然交配影像等媒介，模擬野外大貓熊交配場域。但結果顯示，雄性個體對於聲音及影像並無正向反應，無法使其模仿影片中自然交配行為，亦對後續自然交配操作沒有有效幫助。因此在今年度計畫中，將參考日本上野動物園成功繁殖的操作模式，於發情高峰前一個月開始，讓雄性個體進入雌性個體過夜使用後的欄舍，以氣味刺激雄性個體發情。在自然交配部分將嘗試在現場調度可行的狀況下，於雌性個體發情高峰期間，盡可能增加兩隻大貓熊互動的時間，以實際的聲音、氣味及視覺刺激，增加自然交配成功機率。在日常照管上也會以行為豐富化物件，加強雄性個體在自然交配時所需之肌力。

在人工授精方面，有研究指出在大貓熊尿液雌酮-3-葡萄糖苷(E1g)高峰 24 小時內，進行人工授精操作有 75% 成功率；而在尿液 E1g 高峰 24 至 48 小時內操作，成功率降為 29%；並且在 48 小時之後的成功率則趨近於零(Huang *et al.*, 2012)。顯示人工授精的時間點，是否配合雌性大貓熊的發情高峰，是繁殖操作能否成功的關鍵因素之一。

因此在本年度計畫中，將延續過往累積之經驗，持續在大貓熊發情期和妊娠期，在生理、行為與荷爾蒙上進行密集監控，掌握人工授精的最佳時機 (Lindburg *et al.*, 2001; Masui *et al.*, 1989; McGeehan *et al.*, 2002)。

在大貓熊圓仔方面，於 108 年度計畫中，透過與對岸積極地進行溝通和交流，並利用兩岸四地會議期間面對面進行具體討論，使得圓仔在未來獲得繁殖機會的可能性露出曙光。為了因應在未來可能的圓仔繁殖操作需求，在本年度的計畫中將展開各項預先準備工作，包含上述在繁殖期進行全面性的健康檢查，進行生殖系統婦科檢查，並且進行更詳實的圓仔發情行為觀察，找出圓仔開始發情至發情高峰期間，是否有可作為即將到達發情高峰的指標，並且與圓圓的觀察結果進行統計分析比較，比較年輕個體和經產個體間，在發情行為上的差異。

另一方面，也持續發展園內其他物種之生殖細胞保存技術，同步進行人工生殖技術專業人才培育。持續依據動物行為、繁殖季及荷爾蒙變化，借鏡大貓熊模式，取得品質較好之精子與卵子，以備後續依據族群管理之建議，提供作為人工授精之基礎。園內有部分雄性個體因族群管理需求而實施去勢、死亡個體的副睪取得精子或者發展動物訓練等技術，不需要經過動物麻醉電極採精以達到降低動物傷害的效果。同時也已導入先進儀器協助精子品質鑑定，以儀器的客觀分析結果，取代先前仍由技術人員，以主觀判定的部分精子品質鑑定項目，持續精進生殖細胞保存操作技術。

綜合上述，本年度將統合過往經驗，建立動物牙科醫療聯繫平台與標準化流程，並從牙科監控、血壓監控與測量標準化，以及繁殖季期間圓仔健康檢查，再加上菌相研究，由這四大方向強化大貓熊健康照護，盼藉由提升動物健康，以提高繁殖成功率。在大貓熊繁殖上，將參考過去經驗精進繁殖操作，並透過動物行為觀察、荷爾蒙檢測、強化營養管理，以及持續發展本園生殖細

胞操作與保存技術，從各個面向著手，進行大貓熊繁殖操作工作，並且強化圓仔在未來的繁殖預先準備工作。期望能增加園內大貓熊域外保育族群數量，並將親代的遺傳訊息在族群中傳遞下去，並在園內建立大貓熊域外保育衛星族群。

(四) 整理菌相追蹤研究和牙科護理研究成果，分別進行國際期刊發表：

本計畫在菌相與牙科研究上，已累積不少研究成果，預計整理試驗目前成果，撰寫並投搞至國際期刊，並依期刊委員意見，補充實驗數據。在菌相研究方面，目前在國際上針對透過大貓熊乳酸菌，作為大貓熊益生菌的研究相當熱門且競爭激烈，於近兩年已陸續有相關的初步研究發表，包含乳酸菌純化篩選和初步的體外試驗結果，以及 *Weissella cibaria* 全基因體定序結果(Du *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2018)。雖然與本計畫已進行的部分相關研究略有重疊，但考量到本計畫在乳酸菌純化步驟、體外試驗設計、已累積長期菌相追蹤結果，以及詳細的每日攝食紀錄，仍保有相當的優勢，且相關研究在大貓熊乳酸菌生物安全性之體外試驗仍相當有限，因此本計畫仍有發展的空間。在執行上除了要加快研究腳步外，也將於本年度計畫中，整理本計畫先前累積的菌相追蹤結果進行發表，後續則依照期刊委員審查建議，修改文章與補充數據。在牙科方面，大貓熊團團成為全球首例安裝牙套的大貓熊，登上各個國際媒體版面，並引發廣泛討論。針對這次在大貓熊健康照護上的突破性進展，已經於 108 年度開始撰寫文章，預計將在本年度計畫中完成文章撰寫，投搞至國際期刊，並進行投稿後文章的修改與資料補充，並視情況在文章中加入術後追蹤成果。透過國際期刊發表，以彰顯本園與相關合作單位，在大貓熊研究上的成果。

實施方法與步驟（條列簡要述明）

一、動物益生菌製備標準操作程序方式及體外試驗研究，聯合臺灣大學動物科學技術學系王翰聰老師，步驟如下：

（一）大貓熊消化系統穩定試驗與無尾熊糞便菌相分析技術

和臺灣大學動物科學技術學系王翰聰老師合作，另外在無尾熊上則是參考大貓之材料與方法，以及 Osawa *et al.*(1992)所使用之培養基以及培養條件作為參考，建立菌相分析技術。惟腸球菌(*Enterococcus* spp.)在大貓熊所使用的 m-EI agar base (Difco, BD 214885)，於無尾熊糞便菌相培養上的效果不佳，經測試後轉而採用 Bile Esculin Agar (Difco, BD 299068) 可以達到良好培養效果。而在大貓熊上的實驗方法如下：

(1) 菌相分析方法：

將新鮮糞便 1 g，加入厭氧稀釋液 9 mL(每 100 mL 中含 0.2 g Gelatin、50 mL 去離子水、50 mL 鹽溶液及 25 mg Resazurin)，混合均勻後進行序列稀釋，進行好氣性總菌、兼氣與厭氧菌培養。所培養的菌種和相對應培養基如下：*Escherichia coli*，MacCONKEY-Agar (Difco, BD 212123)；*Enterococcus* spp.，m-EI agar base (Difco, BD 214885)；*Salmonella* spp. 與 *Shigella* spp.，SS agar (Difco, BD 274500)；*Clostridium* spp.，Reinforced Clostridial Medium (Difco, BD 218081)；*Lactobacillus* spp.，Lactobacilli MRS agar (Difco, BD 288130)。各培養基於適當溫度培養 24-36 小時後進行菌落計數，好氣與厭氧總菌則分別以 LB agar (Acumedia 7279A)及 Wilkins-Chalgren agar (Acumedia 7233A)進行培養計數。

(2) 自菌相良好個體圓圓糞便純化乳酸菌株備製方法(徐等，2006；郭等，2015)：

收集供應個體(圓圓)糞便樣本，分為竹葉便、精料便、竹筍便和竹桿便分開均勻液化。再利用 Lactobacilli MRS agar 進行 48 小時培養，算出乳酸菌數並收集優勢菌落，並且將收集之菌落進行 1

週液態培養增殖。樣本離心過後，將離心下來的乳酸菌收集添加保護劑，參考 Carvalho *et al.*(2002) 方法進行乳酸菌冷凍乾燥成粉末，裝入動物用膠囊。將製作完成之將膠囊做體外試驗，模擬實際消化狀況計算出存活率、檢測穩定性。後續因目前考量到生物安全性，尚待本年度計畫成果確認，所以目前暫無實際添加進飼糧中之規劃。未來若確認安全性後，則會添加進提供給腸道菌相較不穩定之大貓熊團團，季節性追蹤其腸道菌相變化。操作方式則為停止日常餵飼的 LP33 膠囊一週後，再連續以製備之乳酸菌膠囊餵飼試驗個體一個月，每天餵飼的量為  $10^9$ cfu/g 的乳酸菌粉共 10g，並於餵飼酸菌前後每週採集糞便追蹤菌相，同時也會採集另外兩隻腸道菌相較穩定，也沒有食用任何益生菌製品的大貓熊個體糞便進行菌相分析比較。

二、針對試驗篩選純化之主要乳酸菌，進行體外試驗分析，建立生物安全性基礎資訊：

(一) API 50 CHL 乳酸菌菌種鑑定與 16s rDNA 菌種鑑定：在 API 50 CHL strip (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 的各個試驗孔中，含有 49 種不同的碳水化合物，可測知細菌對碳源的利用情形。在接種細菌之後，細菌在其中生長會造成培養基的 pH 值的變化，由培養基的顏色變化來判定細菌的種類，可鑑定菌種(乳酸菌屬，52 菌種)。

(1) 取單一菌落，在 MRS 培養基上以 37°C 厭氧環境下培養 24 小時，將培養盒中加入約 10ml 的無菌水，使盒中保持濕度，將 API 50 CHL strip 放入盒中。

(2) 操作之前要先將菌活化，最好為培養 18-24 小時之純菌落。

(3) 使用菌液濁度儀調配細菌懸浮液及接種：從培養基上挑取數個菌落加入 API 50 CHL Medium 中均勻混合，菌液濃度調配為 2 McFarland，將此菌液加滿 API 50 CH strip 各個試驗孔的 tube 部分。各個試驗孔的 cupule 部分要覆蓋無菌礦物油。

- (4) 在需氧環境下 30°C 或 37°C 培養 48 小時。
- (5) 為防止培養時所產生的氣泡干擾，可將 strip 的一端稍為墊高，使氣泡集中在 tube 上半部或下半部。
- (6) 在 24 小時及 48 小時各作一次判讀，由因為 pH 值的轉變而造成的顏色變化，判斷是否為正反應，記錄結果並以電腦軟體判斷菌種。

同時也將試驗中所分離的菌株，送交生技公司進行 16s rDNA 的基因檢測與標準生理生化分析，以確認其實際遺傳組成，並提供未來微生物資源之應用資料。

- (二) 檢測大貓熊腸道中優勢乳酸菌種：每季收集本園三隻大貓熊之糞便樣本，團團在採集樣本兩週前，須先開始暫停餵飼 LP33，避免影響結果。自樣本分別篩選純化其中的乳酸菌，將數個菌落進行 16s rDNA 菌種鑑定，和 API 50 CHL 乳酸菌菌種鑑定，了解 *Weissella confusa* 是否在一年四季飼糧組成各有差異的時期，仍在本園三隻大貓熊腸道中，皆為最常見的乳酸菌菌種。
- (三) 大貓熊腸道優勢乳酸菌抑菌性體外試驗分析：了解 *Weissella confusa* 或其他試驗中所分離出的大貓熊優勢乳酸菌種，對於其他常見大貓熊腸道菌種是否有抑制性。在體外環境中，將糞便懸浮液與不同濃度之待試驗菌種(如 *Weissella confusa*)粉末混合後，檢驗混合前後菌相比例變化，並分析投入之測試菌種存在狀況。以體外環境模擬投餵該菌種後，是否會因過於強勢而對原生腸道菌叢產生抑制性。
- (四) 在體外模擬腸道環境的耐受性：針對 *Weissella confusa* 或其他試驗中所分離出的大貓熊優勢乳酸菌種進行耐酸和耐膽鹽測試，模擬投餵後通過腸道環境的情況。
  - 1. 耐酸測試：
    - (1.1) 將四種來源乳酸菌菌粉以 MRS broth 活化兩次，以 37°C 培養 24 小時，再各取 1 mL 分別加到



pH 2、2.5、3、5、7.3 之 9mL PBS buffer 中，充分混合。

(1.2) 以 37°C 培養，於 0 小時及 3 小時各取 0.1mL 菌液加進 9.9mL MRS broth 裡，養 12 小時後測 660nm 的吸光值，每個樣品做三重複，對比各樣品於兩時間點吸光值有否改變，從而分析各樣本的耐酸程度。

## 2. 耐膽鹽試驗：

(2.1) 取在 pH 2.5 下生長 3 小時的菌液各 1.5mL，以 12500 xg 離心 10 分鐘去除上清液後，加入 100 $\mu$ L pH 7.3 的 PBS。

(2.2) 將上述 1 之菌液分別加到含有 0.3% ox gall (Sigma 8008-63-7) 之 9.9mL MRS broth (實驗組) 及不含 0.3% ox gall 之 9.9mL MRS broth (Control 組) 中，並於各培養液中取 200 $\mu$ L 加入 96 孔盤，每個樣品三重複，測起始於 660nm 的吸光值，再以鋁箔、保鮮膜及夾鏈袋密封後於 37°C 培養箱中培養。

(2.3) 每小時測定一次 660nm 的吸光值，測定 6 小時後作出各樣本吸光值隨時間變化的趨勢線。比對各實驗組及其 Control 組，算出兩組吸光值上升 0.3 之時間及兩者之差距，以判斷各樣本的耐膽鹽程度。

## 三、無尾熊體外消化試驗

(一) 桉樹葉發酵測試前兩段式消化處理：飼糧採食後，進入後腸部位進行發酵之組成與原始飼糧成分並不相同，為模擬經過胃部與小腸消化之程序後，實際殘餘至盲腸部位發酵之飼糧成分，試驗將參考陳等(2013)之程序，採用透析袋配合兩段式酵素消化，模擬動態消化程序進行前處理。消化液之組成配製參考 Rodrigues *et al.*(2017)之組成配製進行。試驗用透析袋，於 EDTA 溶液中煮沸 10 分鐘後，以蒸餾水洗淨後加入 2 g 之磨碎凍乾之桉樹葉，並加入 20 mL 之模擬胃液(含 pepsin)，以

1:100 之體積於 39°C 下進行 4 小時透析消化。模擬胃部消化結束後，加入 2 mL 之模擬腸液(含 pancreatin)後，再以 1:100 之體積於 39°C 下進行 16 小時透析消化。消化殘餘物進行冷凍乾燥後，才作為體外發酵測試之基質。在試驗所選擇的桉樹葉部分，將選取園內無尾熊主要食用的桉樹樹種進行。本園無尾熊所食用之桉樹樹種，依食用頻度由高至低，共分為三大類，分為主食、副食，以及稀有桉，故本試驗主要將選擇最常食用之主食桉樹葉進行分析。

(二) 體外發酵測試：體外發酵評估將分別以公母無尾熊新鮮糞便為微生物接種來源，各試驗之桉樹葉樣品均先經兩段式模擬胃腸消化後再進行試驗。發酵產氣試驗之厭氧稀釋液參考 Wang *et al.* (2004)，之配方進行配製。分別收集公母無尾熊之新鮮糞便進行混合，混合後以預熱之厭氧稀釋液稀釋 5 倍為接種液。秤取 0.5g 兩階段體外消化殘餘物，加入 50 mL 接種液於 39°C 水浴進行 48 小時產氣發酵試驗。另外接種 3 重複之發酵測試瓶，於厭氧手套箱中進行培養，於接種後每隔 12 小時進行微生物計數分析及發酵產物分析。

(三) 試驗分析項目：發酵過程中之產氣收集方式依 Awati *et al.* (2006) 之步驟進行，產氣動力學資料以 Groot *et al.* (1996) 之產氣曲線模式進行產氣指標計算。發酵不同時間點與發酵終止後進行 pH 值測定，以冰浴降溫後離心收取發酵液以進行組成分析。發酵液依照 Voragen *et al.* (1986) 之方法以 HPLC 分析其揮發性脂肪酸與乳酸濃度，以呈色法分析發酵液氨濃度。接種後不同時間之均勻混合後發酵液進行微生物分析，參考先前計畫中建立之分析方法，利用以不同選擇性培養基進行平板培養計數以確認菌數變化。

#### 四、 荷爾蒙檢測與生殖細胞保存技術：

(一) 持續監測雌性個體發情周期：採集尿液以內分泌素免疫分析法檢測尿液中雌酮-3-葡萄糖苷 (E1G) 濃度，依照濃度變化推算該個體可能的發情

周期天數與發情高峰，嘗試安排人工授精的預計時程表。

(1)分析方法如下：

- (1.1) 製備吸附有 E1G 抗體之 96 槽微滴盤，每槽加入稀釋樣本以及標準液。
- (1.2) 加入稀釋之孕酮/雌酮-3-葡萄糖苷/睪固酮-蕁草根過氧化酶結合物，於室溫靜置。
- (1.3) 以 washing buffer 沖洗微滴盤。
- (1.4) 加入發色劑，於室溫進行避光呈色反應，呈色完成後加入硫酸終止反應。
- (1.5) 以微滴盤光度計 (Microtiter plate spectrophotometer) 測吸光值進行分析。

(二) 精子冷凍保存技術(以人猿為例)(Omes *et al.*, 2013)：

(1)冷凍精子保存實驗操作如下：

- (1.1)使用人工陰道採集新鮮精液。
- (1.2)人猿精液遇空氣後會凝結成膠狀，用細胞培養液(Ham's F10)培養液沖洗和靜置半小時，待膠狀物融解釋放精子。
- (1.3) 離心蒐集精子沉澱物，依序加入冷藏稀釋液(TEST yolk buffer, 0% glycerol)和冷凍稀釋(TEST yolk buffer, 12% glycerol)液，於 4 度 C 冷房靜置 4 小時。
- (1.4)細管分裝：精子混和液填入 0.25mL 麥管，以 CRITOSEAL 粉封口。
- (1.5)液態氮蒸氣降溫：將麥管移動至冷凍層架上，架面距離液態氮液面 4 cm，靜置 10 分鐘，將麥管投入液態氮中，靜置待數分鐘，待其降溫；將麥管放置入鋁條，移入於液態氮桶中保存。
- (1.6) 精子品質分析項目：精子活力、運動狀態、精子存活率、精子畸形率、頂體完整率。

(2)解凍精子實驗操作如下：

- (2.1)保麗龍盒裝入 5 cm 液態氮，快速於保存液態氮桶取出鋁架於保麗龍盒中，於塑膠

管中取出所要之麥管後，鋁架盡速放回保存液態氮桶。

(2.2)在液態氮桶以鑷子取出麥管，至 37 度 C 水中輕搖 45 秒，以手擦紙擦是細管外水分。

(2.3)麥管以剪刀剪開兩端，使精液流入預熱之 3 ml 小試管(含有與精液等量 37 度 C 的 Ham's F10)。

(2.4)精液鏡檢：活力、運動狀態、存活率、密度、頂體完整率、畸形率。

(三) 卵子冷凍保存技術技術(以人猿為例)：

(1) 卵子採集：

(3.1) 從死亡個體中取出卵巢，將其置放於 37 度 C 含 0.1 mg/ml Penicillin-Streptomycin 之 0.9 %生理鹽水攜回實驗室

(3.2)卵巢以生理鹽水洗淨後再噴灑 70%之酒精(重複三次) 置於直徑 10 cm 培養皿。

(3.3) 以 18 號針頭之 1 ml 注射筒吸取卵巢表面直徑約 2-8 mm 的濾泡。

(3.4) 於立體解剖顯微鏡下，以玻璃吸管吸取卵母細胞。

(2) 冷凍卵

配置下列培養基：

(4.1) Holding medium (HM) : 18ml TL-HEPES+2ml Fetal calf serum, 以 0.2  $\mu$ m Filter (需不含醋酸纖維素，避免把 FCS 中之蛋白吸走)。

(4.2) Sucrose medium (SM) : 3.423g sucrose+12ml HM。

(4.3) VS1 : HM 850ul+乙二醇 75ul+DMSO 75ul。

(4.4) VS2 : SM 670ul+乙二醇 165ul+DMSO 165ul。

(4.5) 於四孔培養皿，第 1、2 孔放入 HM 溶液，第 3 孔放入 VS1，第 4 孔放入 VS2。

(4.6) 吸取 2-3 卵依序放置第 1 至 4 孔，於第 3 孔停留 3 分鐘，第 4 孔停留 20-25 秒。

(4.7) 將卵吸入麥管中，迅速移入浸在液態氮

中的冷凍管( 1 mL 於管壁開口週圍穿二孔)  
，旋緊蓋子，移入液態氮桶保存。

(5) 解凍卵

(5.1)預熱 TS (Thawing solution)在 Petri Dish  
至 37 度 C。

(5.2)將 DS (Diluent solution)、WS (Washing  
solution)回室溫(25-27 度 C)。

(5.3)將冷凍管放入水浴槽移除上蓋。

(5.4)冷凍管移出水面至 37 度 C 的 TS 1min，  
再將卵胚吸入至距離麥管口 2 mm。

(5.5)連同冷凍管移出卵胚至 25-27 度 C 的 DS  
3 min，再將卵胚吸入至距離麥管口 2 mm。

(5.6)將卵胚移至 WS1 放置 5 min，再轉移至  
WS2 放置 1 min。

(5.7)將卵胚移至 37 度 C 培養液培養 2 hr。

五、 大貓熊自然與人工繁殖實施方法與步驟：

(一)依據大貓熊繁育技術委員會計算交配適宜性係數  
(MSI)後選定目標個體繁殖：雄性大貓熊「團團」，  
系譜號 588，2004 年 9 月 1 日出生。雌性大貓熊「  
圓圓」，系譜號 587，2004 年 8 月 30 日出生。皆於  
2008 年 12 月 23 日自四川雅安碧峰峽貓熊基地引進  
至臺北市立動物園。

(二)營養照護管理：

(1) 在非繁殖季調整窩窩頭配方為減肥窩窩頭，透過  
降低配方中碳水化合物的比例來降低熱量，並補  
充亞麻仁油維持優質油脂攝取量。

(2) 在接近繁殖季與繁殖季期間，調整窩窩頭配方為  
好孕窩窩頭，並補充維他命 E。為了增進卵子品  
質，增加維他命 E 攝取量到 800IU 提高細胞抗氧  
化能力，以及在窩窩頭配方中加入蜂王蛹和黑豆  
粉，藉以提供大貓熊在野外可能攝取之優質蛋白  
質，並借重黑豆抗氧化能力，從營養支持提升圓  
圓的卵子品質。

(3) 將竹葉送往檢驗分析單位，檢驗化合物如單寧酸  
等，比較竹葉攝食狀況不佳期間的竹葉品質是否  
有差異。

(4) 在日常照管上透過食物誘導與增設棲架等訓練雄性個體後肢肌力。

(三)發情期與妊娠期操作實施方法與步驟：

(1) 發情高峰期監測與繁殖配對操作

(3.1) 行為項目：發情期(2-3 月)全日活動量、雌性個體各項發情行為(蹭陰、過水、泡水、羊叫、鳥叫、舉尾、俯伏)頻率分析。  
(3.2) 攝食量變化：每日測量與紀錄 2 隻個體的食物之攝食量。

(3.3) 生理特徵監測：動物訓練躺下或坐姿，觀察外陰部變化並拍照紀錄。

(3.4) 荷爾蒙濃度監控：於發情季接近時，每兩日採集尿液，待發情季開始後，提高採尿頻度為每日一次，隨發情進程配合發情監測結果，於可能的發情高峰接近時，進一步提高採尿頻度為每日 2-3 次，檢測孕酮(P4)和雌酮-3-葡萄糖苷濃度(E1G)變化。

(3.5) 繁殖配對與人工授精：利用監測雌性大貓熊尿液中的荷爾蒙濃度變化，並結合行為與外觀變化，於濃度達高峰後 48 小時內，進行自然交配與人工授精。

(2) 妊娠期監測

(4.1) 行為項目：妊娠期(6-7 月)全日活動量、雌性個體妊娠行為(舔陰、築巢)頻率分析。

(4.2) 攝食量變化：每日測量與紀錄雌性個體的食物之攝食量比例。

(4.3) 生理特徵監測：動物訓練躺下或坐姿，觀察乳房和外陰部變化並拍照紀錄。

(4.4) 荷爾蒙濃度監控：每日採集尿液和糞便檢測孕酮濃度變化，預測產期。

六、大貓熊牙科與血壓量測醫療之標準化流程建立

(一)在牙科方面：除了匯整醫療成果發表至國際期刊外，也將參考目前園內與合作單位之溝通管道與窗口，建立聯繫的標準化流程，以便未來園內動物若有需

	<p>要會同外部單位的牙科醫療需求，可以在第一時間以最有效率的方式，完成訊息溝通。</p> <p>(二)在血壓測量方面：除了確立大貓熊血壓測量之標準化流程外，也檢測團團血壓數值在其他條件不變情況下，是否受到走動、休息狀態之影響；或測量人員不同而有數值上之變化，以求現行之血壓量測方式能反應團團真實之血壓。試驗將30天之活動狀況分成測量前30分鐘休息與走動兩個組別進行比較，且另比較試驗30天內活動量相同時，由不同人員測量之血壓數值差異。</p>
<p>預期成果（條列簡要述明）</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 了解大貓熊乳酸菌 <i>Weissella confusa</i> 在大貓熊腸道中所扮演的角色，包含其對於腸道環境的耐受性及安全性，知悉其是否會因過於強勢，而對其他大貓熊腸道常見菌種產生抑制性，綜合探知其成為大貓熊益生菌之潛質。</li> <li>2. 由體外消化試驗，推測無尾熊腸道內的消化模式，並評估是否可以作為腸道健康穩定度之量化指標。</li> <li>3. 建立大貓熊牙科與血壓量測醫療、標準化流程，期盼藉由本計畫強化動物飼養管理，提升動物專科醫療，與轉化應用到其他物種之可行性。</li> <li>4. 分析圓仔在接近發情高峰前，是否有可以作為參考的指標，以為將來可能出現的繁殖機會，預先做好準備。</li> <li>5. 大貓熊牙科與長期菌相監控結果，共兩篇國際期刊發表。</li> <li>6. 增加大貓熊圈養個體數量，以延續園內大貓熊族群。</li> <li>7. 精進園內生殖細胞保存技術，擴大本園冷凍精液方舟之典藏動物數量。</li> <li>8. 與國際接軌，建立動物園國際技術交流管道，引入國際發展新知，精進園內研究發展。</li> </ol>
<p>已參與計畫名稱及合作機構</p>	<p>相關專業團隊：<input checked="" type="checkbox"/>有 <input type="checkbox"/>無</p> <p>（註：國際交流及人才培訓計畫請簡介國際保育組織或培訓參訪機構；其他類型計畫請簡介國內外進行類似工作之專業團隊）</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>臺灣大學獸醫學系繁殖生理與細胞生物學研究室</u>，主要研究精子熟成、細胞骨架於細胞膜蛋白動力學等分子調控機制。</li> </ol>

	<p>2. <u>臺灣大學動物科學技術學系</u>，具多年野生動物營養和腸道菌相建立的研究經驗，執行過動物園動物認養計劃「單一食性動物腸道健康狀況評估平台之建立」，已有大貓熊腸道菌相研究經驗。</p> <p>3. <u>中國大熊貓保護研究中心及成都大熊貓繁育基地</u>，為圈養大貓熊最重要的繁育管理及研究單位，擁有豐富大貓熊飼養管理及繁殖經驗。</p> <p>4. 「野生動物健康照護及醫療小組」成員(包含國立臺灣大學牙醫專業學院、臺大醫院麻醉部等)。</p> <p>建立合作平臺可行性：  <input type="checkbox"/>否</p> <p>5. <input checked="" type="checkbox"/>是，團隊<u>中國大熊貓保護研究中心</u>、<u>臺大獸醫專業學院</u>、<u>臺灣大學動物科學技術學系</u>、「野生動物健康照護及醫療小組」成員(包含國立臺灣大學牙醫專業學院、臺大醫院麻醉部等)。</p>
<p>團隊成員在計畫內之角色(擔任之具體工作性質、項目及範圍)</p>	<p>1. 王怡敏助理研究員：計畫統合及執行，動物族群管理，個體選擇和統籌各執行單位。</p> <p>2. 余珍芳視導：生殖細胞採集及冷凍操作流程規劃和相關設備購建。</p> <p>3. 聘任助理：精子冷凍保存技術操作、監控發情期與妊娠期動物行為、紀錄統整、實驗設計、採集竹子或糞便等各式樣本，實際至<u>臺灣大學動物科學技術學系</u>進行糞便純化、益生菌粉末製備，以及菌相培養分析操作，將相關技術引進園內。</p> <p>4. 動物館區之區館長及管理員：動物個體管理和協助採集樣本。</p> <p>5. 生殖生理實驗室技術人員：賀爾蒙分析、冷凍保存技術操作和設施維護、種源資料庫管理。</p> <p>6. 郭俊成：動物麻醉保定、醫療與檢驗工作、人工採精操作、懷孕超音波檢測。</p> <p>7. 「野生動物健康照護及醫療小組」成員，包含：  A. 臺灣大學牙醫專業學院：搭配獸醫進行牙科護理(牙套適應狀況評估、牙周病情況、補綴檢視等)。  B. 臺大醫院麻醉部：搭配獸醫進行經食道超音波心臟檢視，評估心臟功能及血壓狀況。</p>



<p>投入計畫之工作時數(每週平均)或比率(%)</p>	<p>1. 大貓熊乳酸菌 <i>Weissella confu</i> 體外試驗分析 30%  2. 無尾熊體外消化試驗 20%  (以上三項中本園共佔 25%、<u>臺灣大學動物科學技術學系</u>共佔 25%)  3. 大貓熊健康專科與繁殖相關研究與操作、生殖細胞保存 50%</p>
<p>相關專業經驗及過去參與類似計畫之研究成果</p>	<p>1. 臺北市立動物園 105 年度認養計畫  計畫名稱：動物園責任動物(zoo-mission animal)之人工繁殖技術研究  研究成果：  (1) 成功轉移大貓熊採精及冷凍精液技術於其他物種，已增加 4 目 10 科 10 種物種冷凍精子，逐步實踐動物園規劃已久的冷凍方舟計畫。團隊與技術成熟的過程中也初步進行了巨猿類人工繁殖相關工作，鎖定出巨猿類冷凍精子關鍵研究重點。  (2) 105 年雌性大貓熊發情高峰日為 2 月 28 日，在高峰後 72 小時內進行了自然配對和兩次人工授精。比較過去三年 (101 年、102 年和 103 年)的發情模式，105 年較往年提早兩週以上，發情期較過去短暫，顯示單一大貓熊個體的生理周期並非永久穩定，尚需累積更多資料。</p> <p>2. 臺北市立動物園 106 年度認養計畫  計畫名稱：亞洲旗艦物種人工繁殖技術與照養專科技術發展  研究成果：  (1) 研究環境緊迫對腸胃道菌相的影響，運用在大貓熊照養科學化；並且初步將大貓熊糞便純化備製膠囊相關技術引進動物園，測試純化之乳酸菌活性。  (2) 長期監測園內雌性人猿<u>香妞</u>之荷爾蒙週期變化，並且搭配適當時機與雄性個體進行自然交配，而成功受孕。並且成功監測到尚未有生產經驗之雌性人猿<u>可秀</u>的發情週期，計劃利用人工授精技術增加人猿族群量。</p> <p>3. 臺北市立動物園 107 年度認養計畫  計畫名稱：國際焦點物種之繁殖技術與科學化照養之建立  研究成果：</p>

	<p>(1) 建立自健康大貓熊腸道中，分離出乳酸菌製成益生菌粉末之標準化流程。並且再完成體外消化試驗後，首次餵飼腸胃較不佳的大貓熊，初步追蹤益生菌粉末在平衡腸道菌相上的效果。</p> <p>(2) 在本園雌性大貓熊<u>圓圓</u>身上完成婦科檢查，確定該個體仍能配合明年繁殖操作。同時也完成牙齦囊袋切除手術，避免患處牙周病繼續惡化，危及動物健康狀況。並且在術後建立特殊食譜，協助治療處傷口癒合，也配合先前已建立的糞便採樣和菌相分析技術，輔以糞便酸鹼值測量，以科學化的方法監測特殊食譜對動物腸道健康之影響。以上成果同時也是為將來大貓熊老年照護，做出初步研究。</p> <p>3. 臺北市立動物園 108 年度認養計畫 計畫名稱：食葉性單胃動物健康照護專科建立 研究成果：</p> <p>(1) 建立全年之中，本園三隻成年大貓熊之菌相監測，發現其中一隻雄性個體，有腸道菌相容易失去平衡的狀況。</p> <p>(2) 進行試驗純化篩選之乳酸菌種鑑定，結果指出大部分屬於 <i>Weissella confu</i>。</p> <p>(3) 建立無尾熊腸道菌相監測技術，並進行長期追蹤。</p>
<p>計畫優勢 (可複選並說明)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■創新性：無尾熊菌相培養與體外消化相關研究，目前在技術面上有值得發展的空間，本園將與臺大王翰聰老師合作，建立腸道菌相監測技術，強化本園健康專科照護。</li> <li>■前瞻性：大貓熊益生菌研究，目前主要集中在芽孢桿菌分解纖維素的能力上，在乳酸菌上的研究在兩年開始迅速發展。本園從近幾年開始發展乳酸菌相關的益生菌研究，與國際同步競爭。</li> <li>■獨特性：不同於無尾熊菌相分析常使用的抹片方法，本園發展菌相監測，以及體外消化試驗，以更精確的方式進行腸胃道健康監控。</li> <li>■國際競爭力：本計畫在大貓熊和無尾熊上發展的菌相追蹤技術和益生菌研究，在將來都有計劃公開發表，所發表的標準化技術流程，或是所分離出的益生菌種，將有助於國際上遇到相同照護難題的單位進行參考，用於改</li> </ul>

	<p>善動物健康狀況。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■核心保育計畫：大貓熊在原棲地是相當重要的旗艦動物，發展大貓熊相關研究，將能協助回饋到原棲地大貓熊族群，在過程中同時也保護棲地中其他物種，並且大貓熊在本園也屬於核心保育物種。</li> <li>■動物園精進業務：聯合獸醫、人醫和動物科學等各方學者，與專業合作，精進動物園動物照養專科技術，科學化並穩定照養流程。並且透過計劃進行人才培訓與技術轉移，將能逐步將動物腸道菌相分析技術引入園內，強化本園動物健康照養技術。</li> <li>■其他：透過更深入的研究，創造更多的話題，吸引企業和個人聚焦，協助保育工作推廣，募集社會資源。</li> </ul>
<p>預期效益 (可複選)</p>	<p>可量化效益</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■增進動物福祉</li> <li>■改善圈養環境</li> <li>■提升照養(醫療)技術</li> <li>■保育教育推廣</li> <li>■提升動物園形象</li> <li><input type="checkbox"/>保育臺灣本土物種</li> <li>■建立保育合作平臺</li> <li>■培訓專業人才</li> <li>■增加遊園人次</li> <li><input type="checkbox"/>其他：_____</li> </ul> <p>不可量化效益：_____</p>
<p>重要參考文獻(至少五篇)</p>	<p>(註：環境教育、國際交流及人才培訓計畫免填)</p> <p>王強、何光昕、余星明、趙波、張安居、余建秋、楊志、雷蕾、張再蓉、曾蔚。1998。微生態製劑在大熊貓疾病治療中的臨床應用研究。中國微生態學雜誌 10: 349-350, 353。</p> <p>卞建葉、殷健、徐滬濟。2018。母體腸道菌群與新生兒免疫系統。現代免疫學 38: 434-436。</p> <p>周紫曉、鐘志軍、周瀟瀟、彭廣能、李奇、陶志勇、楊平、楊俊、陳英、王亞萍、譚和林。2016。大熊貓腸道菌群的研究進展。微生物學通報 43: 1366-1371。</p>

郭卿雲、涂榮珍、黃建榕、劉芳爵、陳希嘉、陳明汝、林幼君。2015。飼料添加用乳酸菌之篩選及特性分析。畜產研究 48: 178-187。

徐志遠、劉榮、郭本恒、李保國。2006。保護劑在乳酸菌凍乾過程中的應用。乳業科學與技術 4: 155-165。

陳亮、張宏福、高理想、趙峰。2013。仿生法評定飼料乾物質消化率的影響因素。中國農業科學 46: 3199-3205。

Angelis, M. D., S. Siragusa, M. Berloco, L. Caputo, L. Settanni, G. Alfonsi, M. Amerio, A. Grandi, A. Ragni, and M. Gobetti. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Res. Microbiol. 157: 792-801.

Awati, A., B. A. Williams, M.W. Bosch, Y. C. Li, M. W. Verstegen. 2006. Use of the in vitro cumulative gas production technique for pigs: an examination of alterations in fermentation products and substrate losses at various time points. J. Anim. Sci. 84: 1110-1118.

Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata, P. Gibbs. 2002. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhammnosus* during storage in the presence of protectants. Biotechnol. Lett. 24: 1587-1591.

Cupi, D., and S. G. Elvig-Jørgensen. 2019. Safety assessment of *Weissella confusa* – A direct-fed microbial candidate. Regul. Toxicol. Pharmacol. 107: 104414.

Didari, T., S. Solki, S. Mozaffari, S. Nikfar, and M. Abdollahi. 2014. A systematic review of the safety of probiotics. Expert. Opin. Drug. Saf. 13: 227-39.

Du, X., F. Dai, F. Yao, M. Tan, and Q. Pan. 2018. Genome Sequence of *Weissella cibaria* M2, a Potential Probiotic Strain Isolated from the Feces of a Giant Panda. Microbiol. Resour. Announc. 7: e01121-18.

Francino, M. P. 2014. Early development of the gut microbiota and immune health. Pathogens. 3:769–90.

Fusco, V., G. M. Quero, G-S. Cho, J. Kabisch, D. Meske, H. Neve, W. Bockelmann, and CMAP. Franz. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Front. Microbiol. 6:155.

Groot, J. C., J. W. Cone, B. A. Williams, F. M. Debersaques, E. A. Lantinga. Multiphasic analysis of

	<p>gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. 1996. Anim. Feed Sci. Technol. 64:77–89.</p> <p>Hou, R., J. Wang, and Y. Liu. 2006. Artificial insemination in: Zhihe Zhang. Page 238-266. Giant panda ex-situ conservation: theory and practice. Press. China.</p> <p>Huang, Y., D. Li, Y. Zhou, Q. Zhou, R. Li, C. Wang, Z. Huang, V. Hull, and H. Zhang. 2012. Factors affecting the outcome of artificial insemination using cryopreserved spermatozoa in the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). Zoo. Biol. 31:561–573.</p> <p>Iqbal, M. Z., M. I. Qadir, T. Hussain, K. H. Janbaz, Y. H. Khan, and B. Ahmad. 2014. Review: probiotics and their beneficial effects against various diseases. Pak. J. Pharm. Sci. 27: 405-15 .</p> <p>Lee, K. W., J. Y. Park, H. R. Jeong, H. J. Heo, N. S. Han, and J. H. Kim. 2012. Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces. Anaerobe 18: 96 – 102.</p> <p>Li, R., W. Fan, G. Tian, H. Zhu, L. He, J. Cai,...J. Wang. 2010. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. Nature. 463: 311-317.</p> <p>Lindburg, D. G., N. M. Czekala, and R. R. Swaisgood. 2001. Hormonal and Behavioral Relationships During Estrus in the Giant Panda. Zoo Biol. 20: 537-543.</p> <p>Liu, Q., X. Ni, Q. Wang, Z. Peng, L. Niu, M. Xie, Y. Lin, Y. Zhou, H. Sun, K. Pan, B. Jing, and D. Zeng. 2019. Investigation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Giant Panda Feces for Potential Probiotics In Vitro. Probiotics &amp; Antimicro. Prot. 11: 85-91.</p> <p>Ljungh, A., and T. Wadström. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. Curr. Issues. Intest. Microbiol. 7: 73-89.</p> <p>Masui, M., H. Hiramatsu, N. Nose, R. Nakazato, Y. Sagawa, H. Tajima, and K. Saito. 1989. Successful Artificial Insemination in the Giant Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>) at Ueno Zoo. Zoo Biology 8:17-26.</p> <p>Matamoros, S., C. Gras-Leguen, F. Le Vacon, G. Potel, and M. F. de La Cochetiere. 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. Trends Microbiol. 21: 167-173.</p> <p>McGeehan, L., X. Li, L. Jackintell, S. Huang, A. Wang, and N. M. Czekala. 2002. Hormonal and behavioral correlates of estrus in captive giant pandas. Zoo Biol.</p>
--	--

	<p>21: 449-466.</p> <p>Musa, H. H., S. L. Wu, C. H. Zhu, H. I. Seri, and G. Q. Zhu. 2009. The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. <i>J. Anim. Vet. Adv.</i> 8: 313-321.</p> <p>Omes, C., A. L. Marchetti, M. L. Masanti, R. Bassani, C. Tinelli, R. C. Sanarica, A. Spinillo, and R. E. Nappi. 2013. Human spermatozoa cryopreservation: comparison of three different freezing protocols. <i>CryoLetters.</i> 34: 535-543.</p> <p>Osawa, R., W. H. Blanshard, and P. G. O'Callaghan. 1992. Microflora of the pouch of the koala (<i>Phascolarctos cinereus</i>). <i>J. Wildl. Dis.</i> 28: 276-280.</p> <p>Qiu, X., and S. Mainka. 1993. Review of Mortality of the Giant Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>J. Zoo Wildl. Med.</i> 24: 425-429.</p> <p>Rodrigues, D. B., C. Chitchumroonchokchai, L. R. B. Mariutti, A. Z. Mercadante, M. L. Failla. 2017. Comparison of two static in vitro digestion methods for screening the bioaccessibility of carotenoids in fruits, vegetables, and animal products. <i>J. Agric. Food Chem.</i> 65:11220-11228.</p> <p>Shiffman, M. E., R. M. Soo, P. G. Dennis, M. Morrison, G. W. Tyson, and P. Hugenholtz. 2017. Gene and genome-centric analyses of koala and wombat fecal microbiomes point to metabolic specialization for <i>Eucalyptus</i> digestion. <i>PeerJ.</i> 5:e4075.</p> <p>Sturino, J. M. 2018. Literature-based safety assessment of an agriculture-and-animal-associated microorganism: <i>Weissella confuse</i>. <i>Regul. Toxicol. Pharmacol.</i> 95:142-152.</p> <p>Wang, H., B. Cui, Q. Li, X. Ding, P. Li, T. Zhang, X. Yang, G. Ji, and F. Zhang. 2018. The Safety of Fecal Microbiota Transplantation for Crohn's Disease: Findings from A Long-Term Study. <i>Adv. Ther.</i> 35: 1935-1944.</p> <p>Wang, J. F., Y. H. Zhu, D. F. Li, Z. Wang, and B. B. Jensen. 2004. In vitro fermentation of various fiber and starch sources by pig fecal inocula. <i>J. Anim. Sci.</i> 82: 2615-2622.</p> <p>Williams, C. L., K. A. Dill-McFarland, M. W. Vandewege, D. L. Sparks, S. T. Willard, A. J. Kouba, G. Suen, and A. E. Brown. 2016. Dietary Shifts May Trigger Dysbiosis and Mucous Stools in Giant Pandas</p>
--	--

	<p>(<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). Front. Microbiol. 7:661.</p> <p>Voragen, A. G. J., H. A. Schols, M. F. Searle-van Leeuwen, G. Beldman, F. M. Rombouts. 1986. Analysis of oligomeric and monomeric saccharides from enzymatically degraded polysaccharides by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 370: 113–120.</p> <p>Xia, Y. and S. Qin, and Y. Shen. 2019. Probiotic potential of Weissella strains isolated from horse feces, a probable equine probiotic. Microbial. Pathogenesis. 132:117-123.</p> <p>Xiong, L., X. Ni, L. Niu, , Y. Zhou, Q. Wang, A. Khalique, Q. Liu, Y. Zeng, G. Shu, K. Pan, B. Jing, anf D. Zeng. 2018. Isolation and Preliminary Screening of a <i>Weissella confusa</i> Strain from Giant Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). Probiotics &amp; Antimicro. Prot. 11: 535-544.</p> <p>Zhu, L., Q. Wu, J. Dai, S. Zhang, and F. Wei. 2011. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. PNAS. 108: 17714-17719.</p>
<p>附 件</p>	<p>■無</p> <p>□文件____種</p> <p>□圖說____種</p> <p>□其他_____</p>