

# 日本動物生物安全第三等級實驗室操作流程及管理實務研習報告

報告人：李淑慧 研究員（疫學研究組）

## 摘要

於 96 年 12 月 2 日到 8 日赴「日本北海道大學人畜共通感染症研究中心」及「獨立行政法人動物衛生研究所 Prion 研究中心」，研習高病原性家禽流行性感冒、牛海綿狀腦病與西尼羅熱等新浮現人畜共通傳染病之診斷技術與檢驗流程。本次研習由北海道大學人畜共通感染症研究中心主任喜田宏教授及動物衛生研究所 Prion 研究中心主持人橫山隆博士，親自帶領指導，實地觀摩此兩座高生物安全實驗室及實驗動物的相關設備，並詳細瞭解負壓實驗室周邊維持設施，得以充分瞭解其操作流程與管理實務，此行收穫豐碩亦有助於本所實驗室生物安全之提升與加強。

## 目的

為積極防範新浮現人畜共通傳染病，如東南亞各國持續發生的高病原性禽流感 H5N1、牛海綿狀腦病及於 1999 年入侵美國的西尼羅熱等，本所於 2003 年建置國家動物傳染病中心及首座符合生物安全之負壓動物解剖房，以因應全球層出不窮的新浮現人畜共通傳染病，並確保畜產業永續發展及國民健康。為順利執行人畜共通傳染疾病監測、診斷業務，並確保操作人員及環境之生物安全，有必要強化高生物安全等級實驗室人員之操作實務，爰研提本計畫前往日本觀摩北海道大學新建置高生物安全實驗室及實驗動物的相關設備，並赴東京茨城縣筑波市 Prion 疾病研究中心負壓實驗室實務研習操作流程與管理基準。

## 研習地點與內容

### 一、北海道大學高病原性家禽流行性感冒實驗室觀摩及研習：

12 月 3 日上午 8:00 拜訪北海道大學獸醫學研究所喜田宏教授，喜田教授講授日本新浮現人畜共通傳染病-高病原性家禽流行性感冒之診斷及最新研究成果及交換經驗與心得。

### (一) 北海道大學高病原性家禽流行性感冒實驗室之歷史沿革：

北海道大學 (Hokkaido University) 創立於 1876 年，原本稱為札幌農業學院 (Sapporo Agricultural College)，後來改制為東北帝國大學 (Tohoku Imperial University, 1907-1918) 及北海道帝國大學 (Hokkaido Imperial University, 1918-1947)，最後於 1947 年改為北海道大學並延用至今。而獸醫科學的課程始自 1880 年才開始，隸屬於農學院。最近一次改制在 1995 年，稱為獸

醫學部及獸醫學研究所 (Graduate School of Veterinary Medicine)，其下設有 4 個講座共 17 間實驗室，喜田宏教授主持微生物實驗室(Microbiology Laboratory)隸屬於疾病控制學講座 (Disease Control Department)。由於喜田宏教授的高病原性家禽流行性感官實驗室為國際動物衛生組織之參考實驗室，瞭解許多人畜共通傳染病原源自於動物的疾病病原，在原自然宿主身上不見得引起嚴重疾病。而是全球環境及人類行為之改變，以及國際交通和動物貿易的便利，造成許多動物病原與人類接觸的頻率大增，進而形成新浮現人畜共通傳染病可能潛在流行的危機。有鑑於近幾年 SARS、Nipah、Hanta、Hendra 及 Influenza 等新興傳染病的流行，需瞭解到人畜共通傳染病是無法杜絕的，必須事先採取監測的方式加以預測和預防來控制人畜共通傳染病的發生。為了整合人類與動物醫學的資源，需有特殊機構集合細菌學、病毒學、寄生蟲學、免疫學、病理及電腦科學各方面專家。實驗室裡不僅有日本本國學生亦有許多外國留學生，包括馬來西亞、巴基斯坦及桑比亞等國，北海道大學每年提供海外留學生研習名額並提供獎學金，因此北海道大學裡有許多外國學生，其討論及發表皆以英文為主，故其學生皆具有良好之英文程度，研討會及成果發表皆以英文為主，其講座走廊上所有簡介及文獻發表海報皆以英文為主，此為極佳之技術外交模式，一來可協助這些開發中國家培育診斷人才，亦可實際取得當地國之新浮現人畜共通傳染病詳細資訊及病材，可迅速掌握時效，進行頂尖研究提升其在國際學術界之地位。該校建築物之相關導覽及樓層標示等皆附英文解說，充份顯示出其極具國際觀。目前正常運作的生物安全第三等級之動物實驗室 (ABSL-3)，位於獸醫學研究所建築的頂樓，觀摩時正值實驗人員進行於進行研究，故可觀摩其整個操作流程，包括雞隻飲水及飼料之添加及更換，實驗衣物等之穿戴及污染物包裹及滅菌流程等。研究人員著拋棄式防護裝、眼罩、口罩、手套及鞋套，將整個鋁製的個別隔離籠卸下移至生物安全操作櫃裡更換飼料，每個隔離籠都具獨立空氣過濾管道，動物實驗室顯得乾淨與明亮。實驗結束後的隔離籠經穿牆式滅菌器滅菌處理，再移出實驗室外清潔風乾以醫療廢棄物方式處理。

## (二) 北海道大學人畜共通傳染症研究中心研習：

12 月 3 日下午，由伊藤助理教授帶領，進入人畜共通感染症研究中心新建置之高生物安全實驗室，逐間參觀及瞭解相關操作及管理實務，觀摩後與喜田宏教授討論研習心得及新浮現人畜共通傳染病全球疫情及最新研究成果。

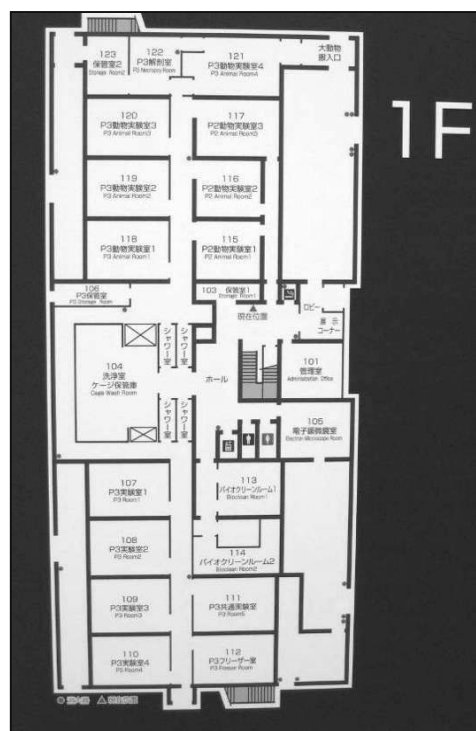
### 1. 北海道大學人畜共通傳染症研究中心創立史：

北海道大學於 2005 年 4 月 1 日開始設立人畜共通感染症研究中心 (Research Center for Zoonosis Control)及實驗室之建設，並於 2007 年 9 月 13 日完工，於 2007 年 10 月 30 日揭牌。喜田宏教授擔任人畜共通感染症研究中心主任，往下細分 5 個部門，分別為國際流行病學系 (Department of Global Epidemiology)、分子病理生物學系 (Department of Molecular Pathobiology)、生物資源系 (Department of Bioresources)、國際合作與教育系 (Department of Collaboration and

Education) 以及 2007 年新成立的尚比亞 Hokudai 人畜共通傳染病控制中心 (Hokudai center for zoonosis Control in Zambia)。因此除了喜田宏教授原有高病原性家禽流行性感冒參考實驗室的業務之外，此研究中心亦研究其他重要人畜共通傳染病，如伊波拉(Ebola virus infection)、肺鼠疫(Pneumonic plague) 及鉤端螺旋體感染症 (Leptospirosis) 等惡性傳染病，並提供教育訓練培育人才，藉以增進全球人類福祉，達成控制人畜共通傳染病之目的。

## 2. 人畜共通傳染症研究中心樓層及功能簡介：

人畜共通傳染症研究中心佔地 1,770 平方公尺，二層樓鋼鐵加強抗震建築物總面積 3,006 平方公尺。一樓有管理室、P3 實驗室(5 間)、P3 動物舍(4~7 間)、P3 冷凍室、洗滌室、P2 動物舍、電子顯微鏡室及籠架清洗室。二樓則是主任室、參考實驗室、P2 實驗室、P2 冷凍室、職員辦公室及會議室。伊藤助教帶領參訪團並詳盡地解說目前研究中心的結構與運作，研究中心裡包含 14 位教授老師、技術人員、博士後研究及國內外研究生總共約 62 人。



圖一、研究中心一樓平面圖，包括管理室、P3 實驗室 (5 間)、 P3 動物舍 (4~7 間)、P3 冷凍室、洗滌室、P2 動物舍、電子顯微鏡室及籠架清洗室。



圖二、研究中心二樓平面圖，包括主任室、參考實驗室、P2 實驗室、P2 冷凍室、職員辦公室、會議室。

在二樓走廊上，一邊是各部門開放式辦公室，另一邊就是相對應的 P2 實驗室，所有需冷凍保存的病毒、細菌與細胞會集中於冷凍室，重要的病原會特別上鎖以維護安全，並於冰箱外特別標示出各別位置，以方便拿取而減少冰箱開啟頻率及時間。由於過去曾發生細胞保存的液態氮桶，因為液態氮不足而造成許多重要的種原及細胞損失，因此安裝特殊偵測警示裝置，當液態氮降至臨界點以下時，會直接顯示於桶蓋上的顯示器，冷凍室裡甚至有-150℃ 冷凍冰箱直接取代液態氮桶的功能。在這裡的研究人員除了進行人畜共通傳染病的診斷及研究外，亦負擔教學工作，因此在此研究中心亦接受國外研究生的申請，以進行跨國合作。

### (1) 保全系統：

該中心保全監視系統計有兩套，一為實驗室內部之監控生物安全系統(監控中心設於二樓，可即時監看 P3 實驗室內動物的臨床症狀，其視野可調整方向，焦距可拉遠拉近，近到可以直接觀察實驗動物，因此非常方便研究人員藉由電腦螢幕監看就近觀察，不需進入實驗室內。另一套為全中心之保全及保安系統，設於一樓管控中心，設有建築物全部出入口的監視系統，可回溯查詢人員出入情形，資料可儲存一個月。此兩系統可相互連接，以達即時監控及紀錄之目的。由於監視系統功能強大及研究中心內網路之需求龐大，需有搭配之伺服器、計算機及硬碟。



圖三、P3 實驗室裡的監視鏡頭可對著隔離籠，亦可調整往生物安全作櫃。



圖四、可拉近至直接觀察實驗動物。



圖五、伊藤助教授介紹監視系統及研究中心內部網路的伺服器。



圖六、另一套監控人員出入的監視系統。

## (2) 中心內部設施及動線導覽：

一樓主要為 P3 實驗室，並且具有特殊空間彈性調整，原有 P2 動物實驗室 3 間，在需要時可以轉為 P3 動物實驗室，亦預留轉為 P3 動物實驗室的進出動線。在動線上亦將 P3 實驗室與動物實驗室相連，方便樣本的傳送。每間實驗室的進氣處、排氣處、人員進入處，安全操作櫃處及隔離籠設備均設有壓力檢測表，可隨時監控實驗室裡各處負壓值是否處於正常範圍。動物實驗室的設備專為嚙齒動物、家禽及幼小大型動物準備，因此具大小不同的隔離籠，及幼小的反芻動物的柵欄。個別的隔離籠均具有獨立的供氣過濾系統，並且裝卸方便，除了體型大於嚙齒動物的隔離籠設備需另放置一台升降機，以方便離隔籠移動。另有一間實驗室內只放置單獨大型隔離籠設備，並一端具有通道連接安全操作櫃，專為離乳豬(約 50 公斤以下)設計使用。試驗進行時，均利用隔離籠上的手套為豬隻換水及飼食。進行採樣或攻毒時，則將豬隻以類似保定籠的設計趕進生物安全操作櫃中進行。最後則是供年輕反芻獸使用的動物實驗室。



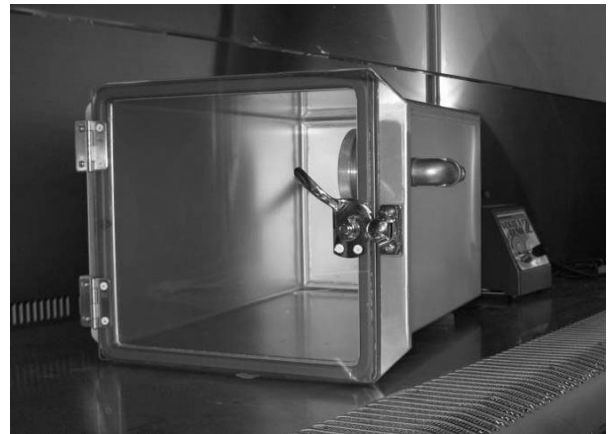
圖七、壓力檢測表。



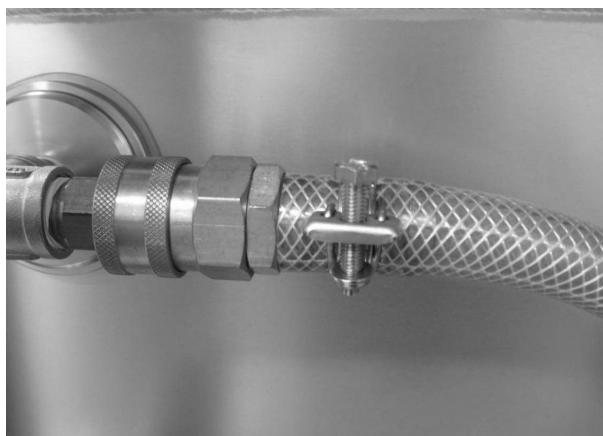
圖八、不同處壓力檢測表所需正常負壓範圍不同。



圖九、啮齒動物用隔離籠。



圖十、試驗進行時隔離籠置於生物安全操作櫃。



圖十一、各個隔離籠均有獨立的供氣濾過管道。



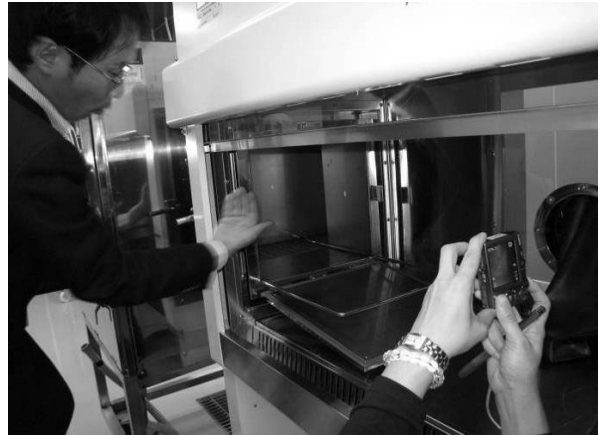
圖十二、家禽用隔離籠。



圖十三、大型隔離籠可使用升降機。



圖十四、離乳豬使用隔離籠與生物安全櫃。



圖十五、與生物安全櫃相通的管道。

### (三) 獨立行政法人構動物衛生研究所參訪及研習：

#### 1. 動物衛生研究所導覽及拜會動物衛生研究所行政長官：

獨立行政法人生物特定產業技術研究機構動物衛生研究所，位於茨城縣筑波市，於 1921 年為獨立研究單位，底下共 12 個研究團隊，包括流行病學、人畜共通傳染病、病毒性疾病、外來性疾病、細菌/寄生蟲疾病、副結核病、高等生物學、環境/地方性疾病、Prion 疾病及動物疾病控制與預防等，全所包括所長、職員、技術人員及研究人員共 252 人。

#### 2. Prion 疾病研究中心參訪及研習：

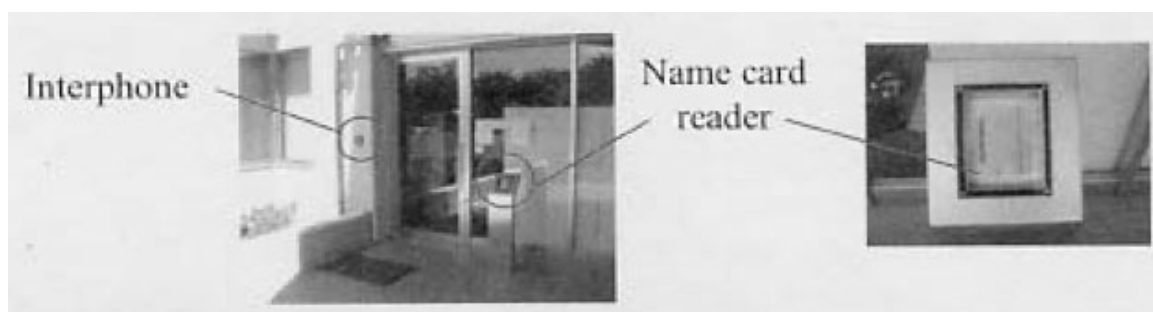
##### (1) Prion 疾病研究中心簡介：

此次主要參訪 Prion 疾病中心內建置之高生物安全實驗室，狂牛症(Bovine spongiform encephalopathy) 首次於 2001 年 9 月爆發於日本，震驚當時的日本社會經濟，鑑於 prion 病原難以一般滅菌法去除及生物體慢性累積的特性，於同年開始進行屠宰場全面屠體 prion 的檢測，待檢測通過才使牛肉進入消費市場。又為使牛肉來源得以追縱調查，亦建立牛肉產銷履歷制度，才使得日本民眾對於牛肉重建信心。動物衛生研究所的 Prion 疾病中心為 BSE 亞洲區參考實驗室，於 2004 年 8 月起正式落成啟用，此實驗室生物安全需同時符合 WHO 實驗室生物安全及 OIE 動物衛生準則。為容納高 30 頭大型反芻動物，及 2 萬隻小鼠的設備，總面積達 13,000 平方公尺，為地下一層，地上三層，鋼鐵加強建築物。地下室為排水及滅菌室、廢棄物滅菌室及電氣室。

##### (2) Prion 疾病研究中心高生物安全實驗室內部設施：



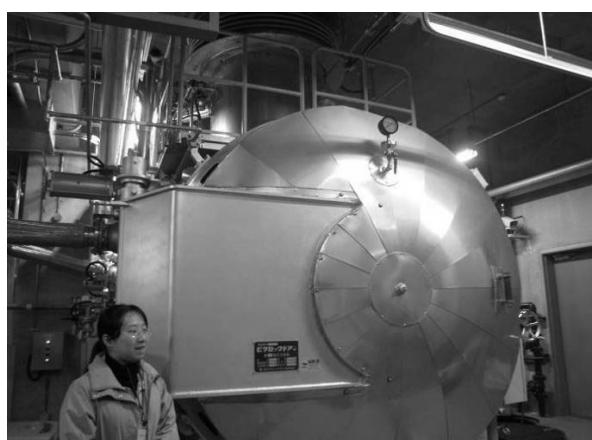
一樓則是管理室、P3 實驗室(5 間)、P3 動物舍(17 間)及會議室。二樓設有空調設備、廢氣排出設備、辦公室、P2 實驗室及討論室。三樓則是一般辦公室、P2 實驗室及洗滌室，所有滅菌設備不同於一般 121℃ 30 分鐘的滅菌步驟，需能以 135℃ 30 分鐘以上進行滅菌。大部份的樣本來自屠宰場，每年可 數千樣本的檢測工作及時間限制的重荷(檢測通過才能上市)，讓他們提出改用採樣的建議，然而來自消費族群的壓力，仍延用目前每屠體均檢測的規定。其餘樣本則是來自其他檢驗單位，由於初步篩選使 ELISA 方式檢測，因此欲確診為 prion 疾病，需送至此研究中心以 Western blotting 做最後確定。Prion 疾病中心進出管制嚴格，需有感應卡進入一般行政辦公區域，若欲進入實驗管制區，則是另需建立指紋許可，才能以指紋辨識進入 BSL 3 實驗區。在橫山博士的帶領下，本參訪團順利地觀摩整個 Prion 研究主體建築及其他維持負壓、相關排氣、排水及廢棄物相關設備。排水及滅菌室、廢棄物滅菌室及電氣室位於地下室，其中的排廢水設備亦有負壓設施，以預防洩露時直接危害到整個環境。大型高壓滅菌屍體處理裝置稱做 cooker，進行 prion 動物試驗結束後，需銷燬之屍塊及廢棄物皆需置於 cooker 內，以 135℃ 高壓處理 4 個小時後，再將殘餘物質送置該所之焚化爐完全銷燬。



圖十六、大門進出需有感應卡。



圖十七、指紋辨識器。



圖十八、大型屠體滅菌裝置(Cooker)。

二樓的供氣排氣 HEPA 過濾系統，有數量龐大的管道，除了供應 prion 病原使用的齧齒動物實驗室及大型反芻動物實驗室之外，在整個 BSL3 區域尚有供家禽流行性感冒實驗室及動物實驗室各一間，觀摩的當下，正值家禽流行性感冒實驗室進行福馬林煙薰消毒。BSL3 區域的二樓設計使用實驗室消毒非常方便，可以不需更換衣服進入管制區，在二樓空調供氣排氣 HEPA 過濾系統即可接上煙薰器的管線進行煙薰，煙薰後也在二樓將通氣管道再度打開，以便福馬林氣體排除。而動物實驗室裡的燈具，也是於二樓進行更換，不需搬大型階梯進入負壓大型動物實驗室以傳統方式進行更換，對實驗是否進行中都不影響。



圖十九、數量龐大的 HEPA 過濾系統。



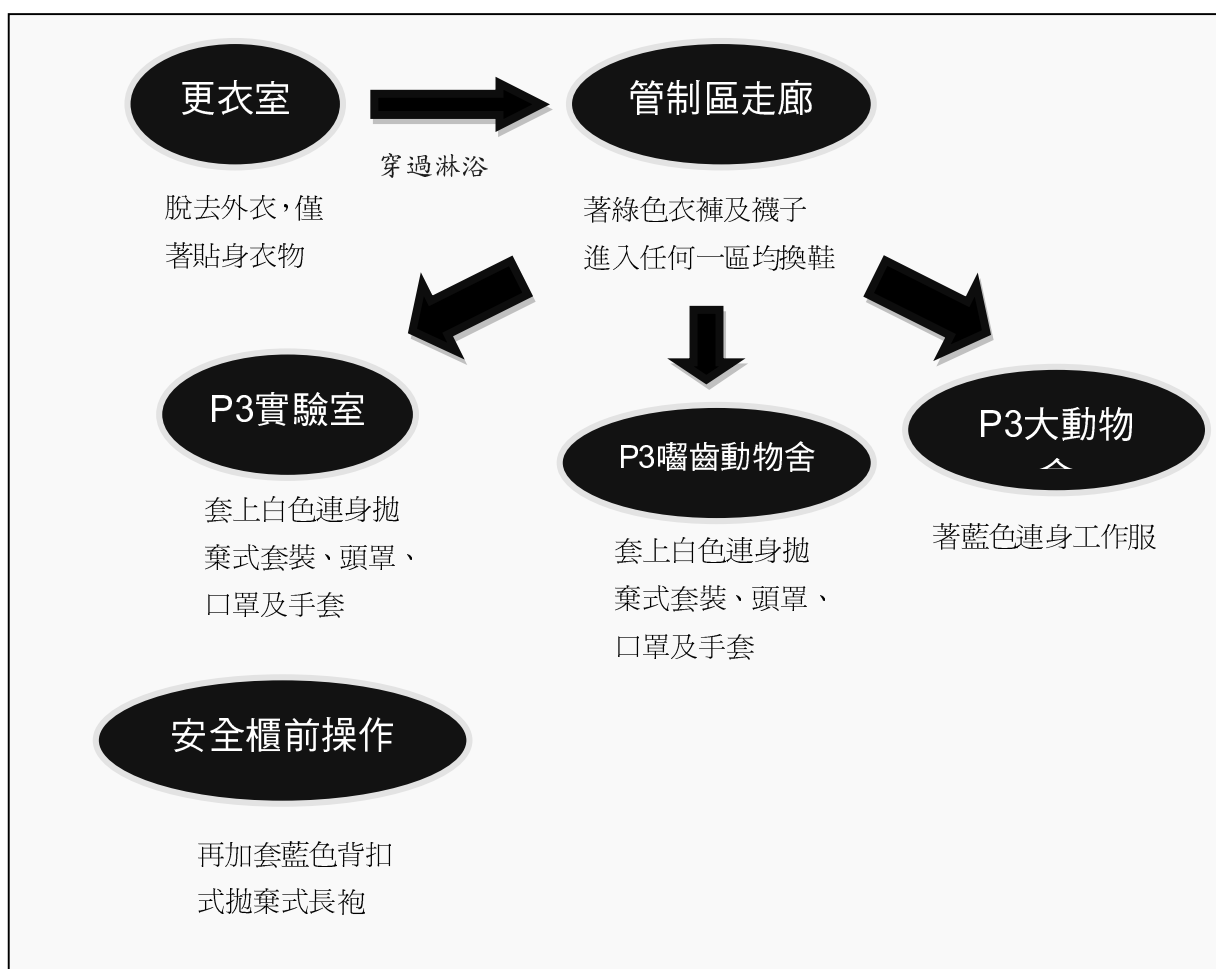
圖二十、福馬林煙薰器，大管子接於實驗室主體供氣管道，小的紅色管子則接在緩衝區。



圖二十一、實驗室供氣管道特別以保溫裝置包覆，防止溫度散失。

### (3) Prion 疾病研究中心高生物安全實驗室管理動線：

該實驗室管理採顏色區分，實地進入 BSL 3 管制區必須更衣，並且再進入任何一區需依規定更換鞋子、帽子、手套、口罩及拋棄式套裝，而不同區域則是著不同顏色的衣物，方便管理及進出控制。茲將其基本流程匯整成簡單流程圖，詳如下圖。其實驗室詳細之標準操作流程。





圖二十二、更衣室入口。



圖二十三、經由窗口拍得更衣室出口。

#### (四) 圓桌討論日本家禽流行性感冒及牛海綿狀腦病診斷體系及研究成果：

12 月 7 日上午 8:00-10:00，橫山隆博士安排與家禽流行性感冒研究團隊主任研究員西藤岳彥討論日本家禽流行性感冒相關疫情控制策略及研究。10:00-14:00 橫山隆博士介紹其 BSE 相關研究最新成果及日本之監測體系。

由於獨立行政法人動物衛生研究所對於高病原性家禽流行性感冒之研究有卓越的成就，Prion 疾病研究中心中設有該疾病的 BSL 3 實驗室及動物實驗室，並於 2004 年及 2007 年高病原性家禽流行性感冒 H5N1 病毒爆發時快速地診斷，並分析 2004 年的 H5N1 病毒與當時中國和南韓爆發的 H5N1 為同一株，疑似侯鳥帶毒造成日本當時的爆發，但苦無證據。而 2005 年茨城縣爆發低病原性 H5N2，動物衛生研究所貢獻甚大，雖診斷為低病原性，但惟恐經家禽潛伏感染與多次繼代，易轉為高病原性家禽流行性感冒病毒，因此採取撲殺策略。

家禽流行性感冒病毒的研究，屬人畜共通感染症研究團隊的業務，不僅禽流感，豬 E 型肝炎、西尼羅熱及壁蝨攜帶病原亦為研究範圍。2006 年更於泰國的國立家畜衛生研究所內設立人畜共通感染症共同研究中心，因此人畜共通感染症研究團雖有 5 位正式研究人員，但並非完全專注於家禽流行性感冒，更需要有研究人員前往泰國的人畜共通感染症共同研究中心，顯示出他們在研究人員上的不足與迫切需求。

## 心得

對於此次參訪的兩處高生物安全實驗室及實驗動物的相關設備，印象最深刻之處為實驗動物舍之乾淨、明亮及人性化，所使用的隔離籠設計，不但維持實驗室及研究人員之安全並兼顧實驗動物之生活品質，讓人感覺到日本對於實驗動物的尊重程度一如對實驗品質的堅持。實地進入 BSL 3 實驗室時，帶領的研究人員在進入不同區域時，對參訪人員不時糾正進入步驟，即使只是小小的一步踏錯位置或是脫下手套或口罩、頭罩的順序，也讓人感到他們對標準流程的嚴謹與重視。

筑波市的動物衛生研究所 Prion 疾病研究中心其實在實驗動物的餵食與維持上相當吃重，由於有大型反芻獸的實驗動物舍，凡攻 Prion 病原之後，於 ABSL 3 裡飼養一個月之後，才移出至 ABSL 1 裡飼養至發病，其間可能需三百多天。小鼠實驗動物在攻病原之後，亦需飼養三百多天，因此實驗動物大多需餵養至一年，當不同試驗累積的實驗動物，小鼠可能累積至 2 萬隻上下，而齧齒餵養人員至多三人的情形下，工作不能不說吃重。但可貴的是他們仍能將實驗環境維持得相當整潔。

北海道大學人畜共通感染症研究中心今(2007)年才建置完成，雖總面積不及茨城縣筑波市的動物衛生研究所，但在整體的設計上較細緻，尤其是監視系統可避免一日只進 BSL 3 實驗室一次，觀察不夠完整的缺點，特別是當進行高病原性家禽流行性感冒試驗時，病程進展迅速，其可利用即時監測系統，完整記錄全部過程，可避免一日只觀察一次，無法完整記錄之缺點。人畜共通感染症研究中心也預留未來可能調整的空間，增加使用的彈性。另一方面也可能是使用的實驗動物以家禽為主，與筑波動物衛生研究所齧齒動物及大型反芻獸為主不同。

另外可感受到兩處實驗室的開放程度不同，在喜田教授實驗室裡可感到有許多他國研究人員，在新建置研究中心裡離開幕短短 2 個月亦有不少外國研究人員，研究中心裡的英文標示也較完整。雖同為參考實驗室，筑波的動物衛生研究所就沒有相同的開放程度，及完整英文標示。

由於經濟迅速發展社會環境變遷，政府實施兩岸小三通，國民境外觀光旅遊以及加入世界貿易組織(WTO)等措施，致使海外動物傳染病入侵台灣之威脅與日俱增。再環視東南亞諸鄰國之動物飼養衛生條件普遍低落，以致諸如口蹄疫、家禽流行性感冒(禽流感)、立百病、狂犬病等疫病叢生，而中國大陸對其地區內所發生之前述動物疾病疫情，一向採取諱莫如深與隱匿之消極作為，更嚴重威脅著國內動物產業的發展與國人的健康安全。為因應此一與日俱增之危機，家畜衛生試驗所除分別加強儲備禽流感、狂犬病等疫苗與各種檢測試劑、培育診斷人才以及建立標準診斷操作程序外，並蒙農委會全力支持，於 2005 年 4 月完成興建符合動物生物安全實驗室三級(ABSL-3)國家動物傳染病檢驗實驗室及負壓動物解剖實驗室，對研究人員安全及環境污染提供完善的保障。鑒於近年來新浮現人畜共通傳染病與日俱增，尤其繼 SARS 疫情發生後，偶有少數國家高生物安全等級實驗室有病毒外洩污染事件，因此之故，高生物安全等級實驗室之管理實務及操作安全極其重要。經由此次赴日研習之經驗，特別歸納下列 12 點，供動物生物安全第三等級實驗室操作人員及管理人員之參考。

1. 應先確立實驗室之操作步驟及流程 SOP，再設計高生物安全實驗室。

2. 正確觀念及操作步驟優於一切。
3. 正確壓差之觀念。
4. 確實瞭解面對何種威脅：需確定欲操作之病原為何？
5. 瞭解操作病原之特性：瞭解敵人的弱點，充份瞭解欲操作病原之特性及致病機轉。
6. 熟悉實驗室之設計及環境特色：知己知彼，熟悉環境遇危機時易於掌握時效。
7. 定期維護、早期預警：預防勝於一切，建立良好的監控制度，提早發現危機。
8. 正確觀念之建立：勿自視藝高膽大，操作人員需擁有熟練之技巧，且確實遵守全部法則。
9. 設立實驗室 SOP 要以容易遵守、容易執行為原則，且要澈底執行。
10. 盡量避免過度要求，以免因做不到而有所疏漏。
11. 堅持原則、吸收新知，實驗室管理人員需依實驗室生物安全相關新知，適時修正管理法則。
12. 盡量做到危機管理而非危機處理。

## 建議

為使新浮現人畜共通疾病之診斷與監測業務，順利推展，高生物安全等級動物實驗室之使用頻率趨於頻繁，故為保障操作人員及環境之生物安全，持續培育相關之專業技術人才及管理人員，刻不容緩，爾後建議持續進行相關人才培育及教育訓練。