

出國報告（出國類別：實習）

赴國際分子及比較病理學系或獸醫學
中心機構實習

服務機關：核能研究所

姓名職稱：陳亮丞 研究助理

派赴國家：日本

出國期間：100年11月20日~100年12月17日

報告日期：101年1月17日

摘要

本次出國實習主要是學習符合 GLP (Good Laboratory Practice) 規範之毒理實驗室的毒理試驗資訊。實習地點為位於日本茨城縣的 Institute of Environmental Toxicology 研究機構，為日本著名之毒理學研究中心，研究成果與發表豐碩，其實驗室即為符合 GLP 規範之臨床前毒理實驗室，此行實習內容為：1. 動物照護及一般毒理學；2. 急性毒性試驗及免疫毒理學；3. 組織病理學及臨床病理學；4. 分子毒理學；5. 基因毒理學；6. 繁殖毒理學及畸胎學；7. 藥理學及神經毒理學。本次實習了解並收集藥物 GLP 實驗室的毒理試驗資訊，並建立後續的合作管道，有助於本所治療用奈米核醫藥物放射毒理實驗室之建立與藥物毒理試驗國際化。

目 次

摘 要

(頁碼)

一、目 的	1
二、過 程	2
三、心 得	3
四、建 議 事 項	8
五、附 圖	9

一、目的

核能研究所近來正致力於治療用核醫藥物之開發，其中已經有藥物在臨床前實驗動物模式中，具有治療動物腫瘤之潛力，未來將逐步進行臨床前毒理與安全性試驗，因此建立符合 GLP 規範的放射毒理實驗室及毒理試驗能力是本所執行計畫的重點。位於日本茨城縣的 Institute of Environmental Toxicology 研究機構，為日本著名之毒理學研究中心，研究成果與發表豐碩，其實驗室即為符合 GLP 規範之臨床前毒理實驗室，此行實習內容為：1. 動物照護及一般毒理學；2. 急性毒性試驗及免疫毒理學；3. 組織病理學及臨床病理學；4. 分子毒理學；5. 基因毒理學；6. 繁殖毒理學及畸胎學；7. 藥理學及神經毒理學。本次實習向 Institute of Environmental Toxicology 研究機構學習其運作 GLP 毒理實驗室之經驗，收集藥物 GLP 實驗室的毒理試驗資訊，並建立後續的試驗合作管道，實習後有助於本所治療用核醫藥物 GLP 放射毒理實驗室之建立與毒理試驗方法國際化。

二、過程

本次實習行程如下：

日期	星期	地點	內容
11月20日	星期日		去程：台北至日本茨城縣
11月21-22日	星期一~二	茨城縣	1. 辦理報到手續及製作識別證事宜。 2. 學習與討論組織病理學及臨床病理學之相關試驗技術。
11月24-25日	星期四~五	茨城縣	1. 學習與討論藥理學及神經毒理學之相關試驗技術。
11月28-30日	星期一~三	茨城縣	1. 學習與討論基因毒理學之相關試驗技術。
12月1-2, 5日	星期四~五, 一	茨城縣	1. 學習與討論急性毒性試驗及免疫毒理學之相關試驗技術。
12月6-7, 14日	星期二~三, 三	茨城縣	1. 學習與討論繁殖毒理學及畸胎學之相關試驗技術。
12月8-9日	星期四~五	茨城縣	1. 學習與討論動物照護及一般毒理學之相關試驗技術。
12月12-13日	星期一~二	茨城縣	1. 學習與討論組織病理學及臨床病理學之相關試驗技術。
12月15-16日	星期四~五	茨城縣	1. 學習與討論分子毒理學之相關試驗技術。
12月17日	星期六		回程：日本茨城縣至台北

三、心得

(一) 病理實驗室實習

病理實驗室主要是提供解剖(Necropsy)、檢體組織製備、組織病理學檢查及在不同實驗動物之毒理試驗中，出具肉眼(gross)及組織病理的病理報告。這些實驗動物包含大鼠、小鼠、狗、兔子、天竺鼠以及鸚鵡等。在大鼠之神經毒理試驗中，中樞及周邊神經組織最好使用原位全身性之灌流來進行固定，然後再小心的使用光學及電子顯微鏡來觀察判定結果。免疫組織化學及影像分析主要是用來觀察特定組織是否有組織學上特性的改變(例如：細胞增殖性、腫瘤 marker、基因表現等)。依據實驗的需求，可以進行特定組織製備、診斷性病理學及 Peer review 等項目。病理實驗室主要進行項目為：a. 解剖(Necropsy)；b. 光學及電子顯微鏡之組織製備；c. 組織病理學檢查(包含診斷性病理學)；d. 免疫組織化學及影像分析；e. TEM 及 SEM 電子顯微鏡觀察。主要的設備為：a. 光學顯微鏡之組織製備：自動組織處理器、組織包埋機 (圖一 A)、組織切片機、自動染色機 (圖一 B)及封片設備；b. 電子顯微鏡之組織製備：自動組織處理器、ultramicrotome、critical point dryer、ion sputter；c. 自動免疫染色設備及影像分析系統；d. 冷凍切片機 (Cryostat microtome)；e. 光學顯微鏡及自動對焦系統；f. 穿透式電子顯微鏡 (TEM)；g. 掃瞄式電子顯微鏡 (SEM)。

本次實習的病理實驗室之 Dr. Yoshida 教導及提供了 Repeated dose 90-day oral toxicity study in dogs and rats protocols 之兩份毒理試驗計劃書草稿，其中詳細記載了 a. 試驗目的；b. 遵循之法規 c. 委託者；d. 測試機構；e. 試驗主持人；f. 測試物質；g. 試驗期間；h. 材料及方法；i. 紀錄及樣品的保存；j. 計劃書修訂；k. 試驗報告；l. 計劃書準備。這些參考資料將可做為核能研究所未來進行重複劑量之放射性毒理試驗的進一步發展及參考資訊。除了學習及討論試驗計劃書外，還參與了大鼠之神經毒理試驗中，原位全身性之灌流固定實驗。實驗流程如下 a. 首先將大鼠麻醉後，剪開皮膚；b. 將腹腔及胸腔打開及固定好；c. 分離大動脈並用棉線穿過去暫時固定；d. 剪開左心室將灌流之管子插入大動脈後，用穿過大動脈之棉線固定；e. 剪開右心房，開始灌流；f. 灌流速度為 15 mL/min，灌流 1 分鐘；g. 灌流液使用 PBS，固定液使用 1% glutaraldehyde、2% paraformaldehyde，各灌流 1 分鐘。使用這個程序得到的神經組織切片較佳，也較好做病理學上的判定。另外還學習組織的修片、組織包埋、組織切片及組織切片封片等，並學習初步的組織學判讀，未來將繼續學習與建立相關組織病理學技術，應用於核能研究所放射毒理實驗室之毒理試驗技術。

(二) 臨床病理實驗室實習

臨床病理實驗室主要是提供在不同實驗動物 (包含大鼠、小鼠、狗、兔子、天竺鼠以及鸚鵡等) 之毒理試驗中, 血液學、血清生化學及尿液分析之資訊。使用電腦系統快速及精準的分析臨床病理學資料。臨床病理實驗室主要進行項目為: a. 血液學 (包含凝血因子); b. 骨髓細胞學 (細胞技術及型態學分類); c. 血清生化學; d. 尿液分析; e. 藥物代謝酵素活性 (microsomal, peroxisomal); f. Choline esterase 活性 (血漿、紅血球及腦)。主要的設備為: a. 自動血液分析儀 (ADVIA120 Hematology System; 圖二 A); b. 自動血液凝固分析儀 (Cagrex-800); c. 自動生化分析儀 (JCA-BM1250; 圖二 B); d. Recording spectrophotometer (UV-2450); e. Recording spectrofluorophotometer (RF-2200)。

本次實習, 主要進行臨床病理學概要解說及血液樣品如何採集。大鼠主要由下腔靜脈進行採集, 共採集 3 管, 一管為含 EDTA 之採血管作為血液學分析使用; 另一管為含 Heparin 之採血管作為血清生化學分析使用; 另一管為含 Sodium Citrate 之採血管作為血液凝固分析使用。採集完成之血液使用自動血液分析儀、自動生化分析儀及自動血液凝固分析儀進行分析並判讀資料。另外教導進行血液抹片之製作及使用 May-Grunwald 及 Giemsa stain 後進行觀察。未來可應用於增進核能研究所放射毒理實驗室之臨床病理試驗技術。

(三) 神經毒理實驗室實習

近年來神經毒理試驗被要求於常規的試驗之中, 是由於此試驗可以了解及評估藥物在神經系統中, 其不良的反應及影響。進行神經毒理試驗中, 特殊的設備及神經毒理的專家是不可或缺的。所以執行人員良好的訓練及經驗判讀是進行神經毒理試驗的先決條件。神經毒理試驗主要進行的測試為: a. 使用分數系統 (scoring system) 進行詳細臨床觀察; b. 功能性測試; c. 神經病理學檢查。詳細臨床觀察 (圖三) 包含了多種不同的觀察, 例如: 飼養籠外觀觀察 (outside of home cage)、標準區域觀察、handling 及 manipulation 等。功能性測試包含感覺運動反應 (sensorimotor reaction)、體重、體溫、前肢及後肢拉力、landing foot splay 及活動性等。額外的特別測試包含學習及記憶實驗。這些行為及物理學上的測試大約有 50 個項目, 在試驗的觀察期間必須執行 4 或 5 次。試驗的觀察期結束後, 由病理師進行中樞及周邊神經系統之神經病理學檢查。

本次實習的神經毒理實驗室之 Dr. Shutoh 教導及提供了 Acute oral neurotoxicity study in rats protocol 之毒理試驗計劃書草稿, 其中詳細記載了 a. 試驗目的; b. 遵循之法規; c. 委託者; d. 測試機構; e. 試驗主持人; f. 測試物質; g. 試驗期間; h. 材料及方法; i. 紀錄及樣品的保存; j. 計劃書修訂; k. 試驗報告; l. 計劃書準備。另外還提供了 Summary protocol of

general pharmacology study，其中記載了 a. 遵循之法規；b. 試驗目的；c. 材料及方法。這些參考資料將可做為核能研究所未來進行放射性毒理試驗之神經毒理試驗的發展及參考資訊。

(四) 基因毒理實驗室實習

基因毒理實驗室主要是執行符合法規及 GLP 規範的致突變性 (mutagenicity) 試驗。進行基因毒理實驗中，研究及執行人員必須具備有充足的經驗及知識，才能一致性的產出精確的數據。近來除了細胞培養之 *in vitro* comet assay (圖四)，還發展小鼠之 *in vivo* comet assay。另外還發展及建立大鼠之多器官染色體異常試驗 (multiple-organ chromosome aberration test)。這些廣泛新的分析技術將幫助我們評估測試物質在不同器官的基因毒性，提供較好的組織特異性預測及了解作用機制。基因毒理實驗室主要進行項目為：a. 細菌反突變試驗 (Bacterial reverse mutation)；b. 小鼠淋巴瘤突變試驗 (Mouse lymphoma reverse mutation)；c. 哺乳動物細胞染色體變異試驗 (Chromosome aberration test in mammalian cells)；d. 活體內染色體變異試驗 (*In vivo*)；e. 大小鼠之微核試驗 (Micronucleus test in mice or rats)；f. *in vitro* comet assay；g. *in vivo* comet assay；h. 多器官染色體異常試驗 (multiple-organ chromosome aberration test)。主要的設備為：a. Colony analyzer (PCA-11DA)；b. Coulter counter (Z-2)；c. PCR thermal cycler (PCR System 2400)；d. Epifluorescent microscope (BX50-34-FLAD1)；e. High-sensitive cooled CCD camera (CoolSNAP-HQ)；f. Image analysis system (MetaVue)。

本次實習的基因毒理實驗室之 Dr. Matsumoto 教導及提供了 Chromosome aberration test in cultured mammalian cells 及 Micronucleus test in mice 之兩份毒理試驗計劃書草稿，其中詳細記載了 a. 試驗目的；b. 遵循之法規 c. 委託者；d. 測試機構；e. 試驗主持人；f. 測試物質；g. 試驗期間；h. 材料及方法；i. 紀錄及樣品的保存；j. 計劃書修訂；k. 試驗報告；l. 計劃書準備。這些參考資料將可做為核能研究所未來進行放射性毒理試驗之基因毒理試驗的發展及參考資訊。

(五) 免疫毒理及急性毒理實驗室實習

免疫毒理及急性毒理實驗室主要是執行急性口服及皮膚毒性試驗、皮膚刺激性試驗、眼睛刺激性試驗、皮膚敏感性試驗、急性吸入毒理試驗及免疫毒理試驗等。急性口服及皮膚毒性試驗主要是獲得經由口服或皮膚途徑，測試物質單一或高劑量引起的急性毒性反應。所得到之結果是決定對人生物危害性的有用資訊。現今由於動物福祉的考量降低動物使用數量，目前主要測試方法是使用 Fixed Dose Procedure Method、Acute Toxic Class Method 及 Up and Down Method (Guidelines 420, 423 and 425)。皮膚刺激性試驗主要是評估測試物質接觸皮

膚後引起皮膚刺激性的潛力 (刺激的程度及可逆性)。測試物質接觸兔子皮膚 4 小時後，就可評估其皮膚刺激性的等級。另外替代的方法為使用 *In vitro* 3D 人類皮膚模式來測試皮膚刺激性或腐蝕性潛力。眼睛刺激性試驗主要是評估測試物質接觸眼睛黏膜後引起眼睛刺激性的潛力。測試物質接觸兔子眼睛後，就需週期性的評估眼睛刺激性程度。皮膚敏感性試驗主要是評估測試物質調節引起免疫反應之皮膚敏感性的潛力。天竺鼠的試驗中，主要是使用 Maximization 方法 (adjuvant test sensitized via intra-dermal and dermal routes) 及 Buehler 方法 (sensitized via dermal route)。現今有發展一新的測試方法是使用 CBA 小鼠之 Local Lymph Node Assay method。急性吸入毒理試驗主要目的是提供職業健康生物危害性的資訊。大鼠或動物接受吸入 4 小時的測試物質後，觀察其對測試物質的反應。免疫毒理試驗主要評估測試物質對免疫系統是否會造成不良的影響。主要的測試方法為 a. 細胞流式儀分析淋巴球：製備胸腺或脾臟的細胞懸浮液，使用螢光染劑的單株抗體染色 (CD3、4、8 for T 細胞；CD45RA for B 細胞；NKR-P1A for NK 細胞)。然後使用細胞流式儀技術 (圖五)，定量分析胸腺或脾臟的淋巴細胞型態 (phenotype)。b. 檢測 SRBC-特異性 IgM 抗體：大鼠經由尾靜脈給予 SRBC (Sheep Red Blood Cell) 免疫。然後收取其血清，使用 ELISA 檢測 anti-SRBC IgM 的抗體力價來決定其免疫功能。

(六) 繁殖毒理實驗室實習

繁殖毒理實驗室主要是執行大鼠兩個世代的繁殖毒理試驗 (Two-generation reproductive toxicity study)。測試物質給予動物經過 3 個連續的世代 [母系動物 (parental animal) 及第 1 及第 2 世代的子代 (first and second filial generations)]，評估其母系動物交配、懷孕、分娩及養育 (mating、pregnancy、parturition、nursing) 及子代 (pup) 生長狀況。另外還執行在大鼠及兔子之發展性毒理試驗 (developmental toxicity studies)。在母獸懷孕的全程都給予測試物質，詳細檢查胎兒外觀、內在、骨骼檢查 (圖六) (external、internal、skeletal malformations)，來預測測試物質之可能致畸胎性 (teratogenicity) 的潛力。遵循的法規主要為 OECD、US EPA、GLP 等。

(七) 動物管理及測試實驗室實習

動物管理及測試實驗室主要是提供動物管理 (husbandry)、給藥 (dosing)、臨床觀察 (clinical observation)、眼睛檢查 (ophthalmological examination)、採血 (blood sampling) 及尿液分析 (urinalysis) 等。實驗室的人員都遵守 GLP 規範及相關 SOP。毒理試驗主要使用的實驗動物為 SPF (specific-pathogen-free) 大鼠、小鼠、狗、兔子、天竺鼠及鵪鶉等。動物的詳細臨

床觀察 (home cage and open field) 必須由具有良好訓練的人員來執行，並將發現使用分數系統 (scoring system) 紀錄。另外動物管理及測試實驗室還提供測試飼料配方調配 (圖七) (formulation of test diet)，測試物質使用 gavage 或 capsule 的方式投予動物。測試飼料配方會分析其濃度及均勻性 (concentration and homogeneity)。

(八) 分子毒理實驗室實習

分子毒理實驗室主要是提供在傳統的毒理試驗之後，使用分子生物技術 (Molecular biological techniques) 來了解測試物質的作用機轉。特定組織或細胞樣品，可藉由 laser captured microdissection (LCM)方法來取得，並可用來進行西方墨點法 (western blotting analysis)、氧氣壓力分析法 (oxidative stress assay)及使用即時 PCR (real-time PCR) 定量分析基因表現。還可使用 microarray 來廣泛分析基因表現，來了解測試物質的作用機轉。分子毒理實驗室主要進行項目為：a. 西方墨點法 (western blotting)；b. 受體結合試驗 (receptor binding assay)；c. 氧氣壓力 (oxidative stress)；d. Laser Captured Microdissection；e. Bioanalyzer；f. 即時 PCR (real-time PCR；圖八 A)；g. Microarray (圖八 B)。主要的設備為：a. GS-700 Imaging Densitometer；b. Full-Range BEACON 2000；c. LM 200；d. 2100 Bioanalyzer；e. PRISM 7700；f. ScanArray Lite。

在本次日本茨城縣的Institute of Environmental Toxicology研究機構實習之後，頒發一份受訓證明 (圖九)。

四、建議事項

- (一) 日本茨城縣的 Institute of Environmental Toxicology 研究機構實習的實驗室專注於臨床前的毒理試驗研究，且其實驗室符合 GLP 精神，其試驗運作方式可做為本所 GLP 放射毒理實驗室執行毒理試驗之參考。
- (二) 本小組自執行 GLP 放射毒理實驗室迄今，已完成許多試驗相關領域之標準操作程序撰寫與討論，並進行試驗技術練習及放射毒理試驗，於 2011 年獲得 GLP 放射毒理實驗室認證，放射毒理實驗室同仁在執行研發工作之外，亦須同時執行放射毒理與轉譯實驗室工作，實屬不易，建議未來能夠投入足夠的專業人力與時間，完成進一步的毒理試驗能力與技術之建置。
- (三) 國內目前並無相關經認可 GLP 的放射毒理實驗室，故本所將核醫藥物由研發推展至臨床的過程中，GLP 放射毒理實驗室為不可或缺的一環，由於毒理試驗需具有經驗及專業人士的參與，為進一步增進毒理試驗發展與建立的效率，參考已經認證的 GLP 毒理實驗室或經由輔導單位的輔導建立，並建立國內外的研發及試驗合作管道，以獲得試驗經驗及專業意見，有助於建立良好品質的試驗與判讀結果。

A



B



圖一：病理實驗室設備 (A) 組織包埋器 (B) 組織自動染色機。

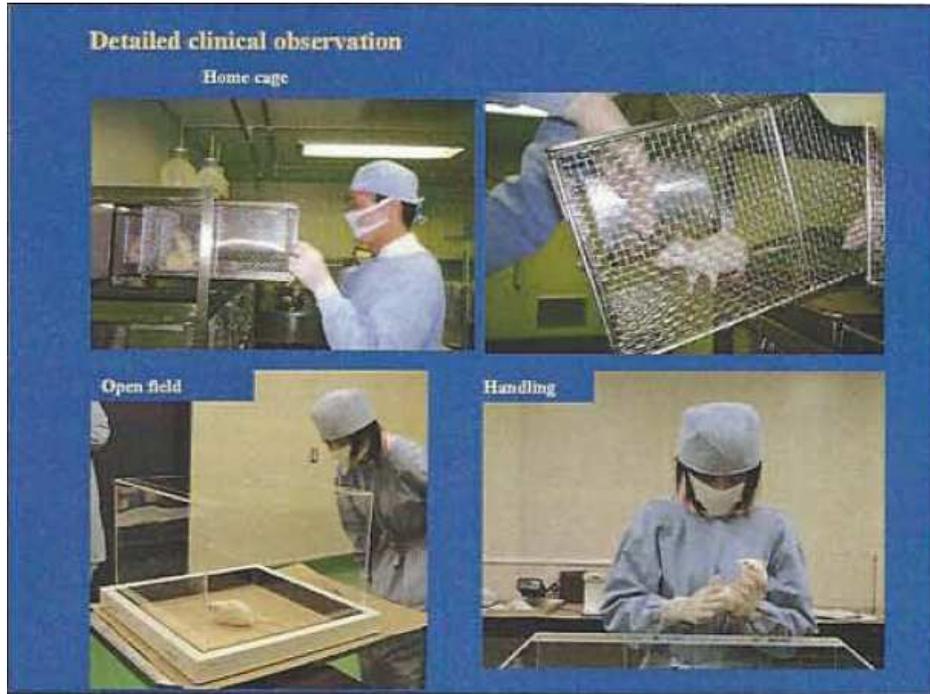
A



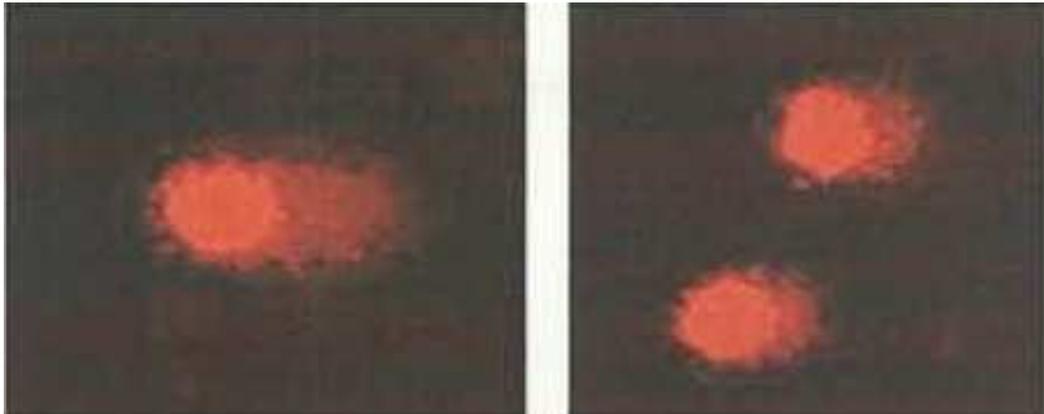
B



圖二：臨床病理實驗室設備 (A) 自動血液分析儀 (ADVIA 120) (B) 自動生化分析儀 (JCA-BM 1250)。



圖三：神經毒理實驗室，詳細臨床觀察：Home cage、Open field 及 Handling 觀察。

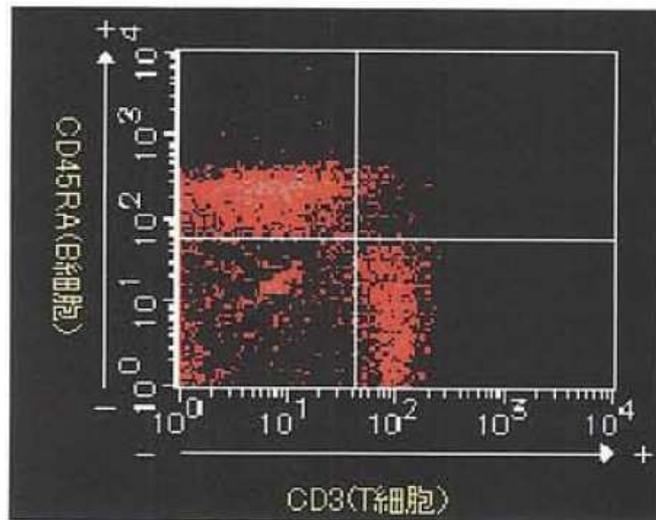


圖四：Comet assay 使用培養的人類細胞。左邊為 DNA 損傷的細胞 (tails 變長)，右邊為對照細胞 (Negative control cells)。

A



B

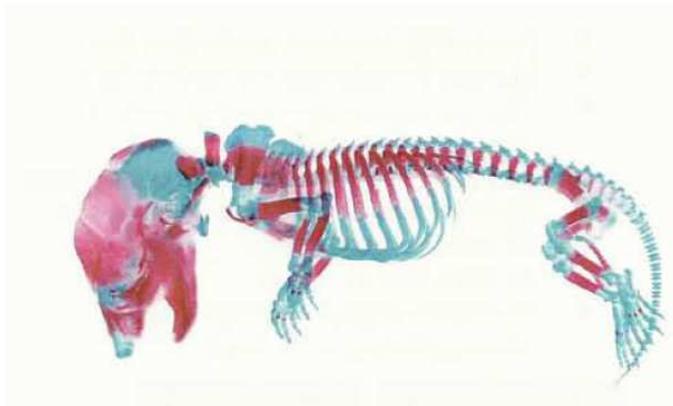


圖五：免疫毒理及急性毒理實驗室 (A) 流式細胞儀 (Flow cytometry FACS Calibur) (B) 分析結果，CD3for T 細胞，CD45RA for B 細胞。

A



B

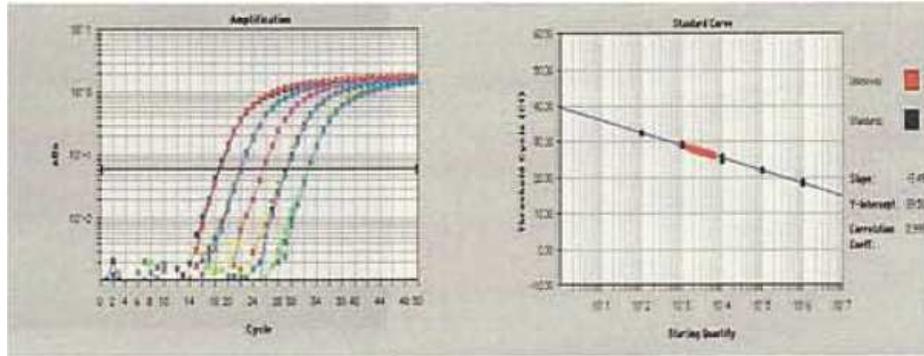


圖六：繁殖毒理實驗室 (A) 胎兒外觀及骨骼檢查 (B) 大鼠之雙重染色骨骼樣本。

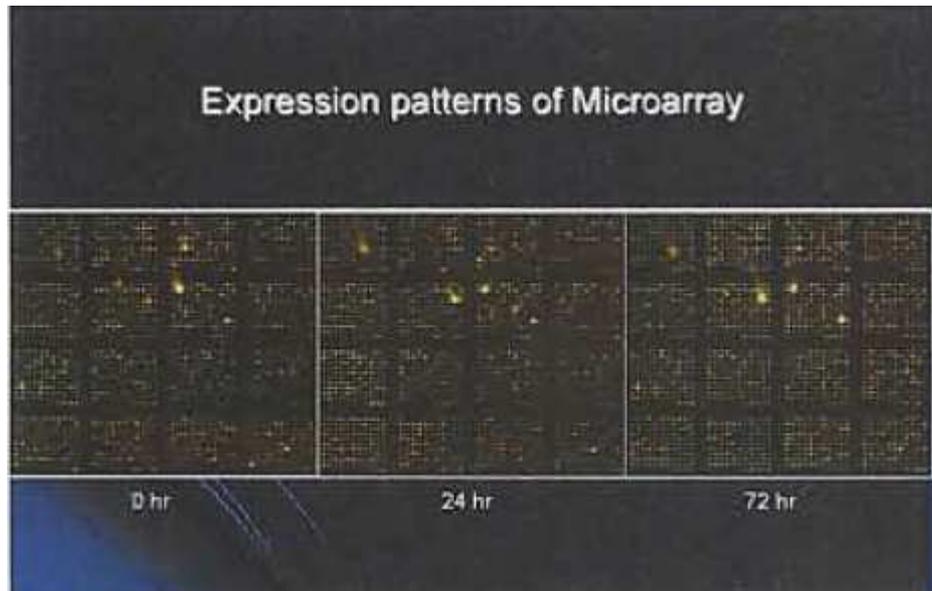


圖七：動物管理及測試實驗室，測試飼料配方調配 (Machine SS-501)。

A



B



圖八：分子毒理實驗室 (A) 即時 PCR (real-time PCR) 定量分析結果 (B) Microarray 結果。



圖九：在本次日本茨城縣的 Institute of Environmental Toxicology 研究機構實習之後，頒發一份受訓證明。