

出國報告（出國類別：訪問）

赴日本岐阜大學狂犬病病毒實驗室 交流訪問

服務機關： 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱： 許愛萍助理研究員

派赴國家： 日本

出國期間： 105年11月6日至11月12日

報告日期： 106年1月23日

摘要

本所 104 年與日本岐阜大學應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室訂合作備忘錄以執行狂犬病病原性探討工作，本次拜訪主要是要就雙方合作的狂犬病病原性探討工作上進行研究及討論，另外經由日方豐富的反向遺傳學操作經驗協助並指導我方新城病載體疫苗平台開發等相關工作。由於前期合作發現台灣鼬獾狂犬病病毒在目前狂犬病病毒培養用的細胞皆呈現極低力價，為了使後續合作試驗可以順利進行，也同時利於我國台灣鼬獾狂犬病診斷之需，本次特地偕同伊藤直人博士拜訪了岐阜大學的諸島康雄教授及大阪大學的本田友幸博士，討論鼬獾神經元細胞株建立手續。後續將持續與伊藤直人博士及本田友幸博士在鼬獾神經元細胞株建立上合作。

目次

壹、目的.....	4
貳、過程.....	5
參、心得建議.....	12

壹、目的

本次研習主要拜訪的對象是日本岐阜大學應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室，該實驗室於狂犬病研究已二十年，具有諸多文獻發表，尤其在利用反向遺傳學技術探討狂犬病病原性上具有十餘年經驗。本所 104 年與該實驗室簽訂合作備忘錄以執行狂犬病病原性探討工作，該實驗室另於同年分讓予本所利於進行反向遺傳學操作之關鍵細胞，以使本所新城病載體疫苗平台開發工作得以順利進行。本次參訪目的有三：第一是持續在雙方合作的狂犬病病原性探討工作上進行研究及討論、第二是借助日方有關利用反向遺傳學操作探討 RNA 病毒毒力因子的深厚經驗，協助我方新城病載體疫苗平台開發工作、第三是鼬獾神經原細胞株建立之合作。

貳、過程

一、行程安排

本次研習自民國 105 年 11 月 6 日至 105 年 11 月 12 日止共計 7 天 (詳如行程表)。

派赴人員為本所許愛萍助理研究員。

行程表

日期	內容
11 月 6 日	抵日 (臺北-名古屋機場-岐阜火車站-岐阜大學)。
11 月 7 日	正式拜會應用生物科學部人畜共通感染症學研究室，進行合作之狂犬病試驗目前階段性結果討論
11 月 8 日	進行新城病疫苗專利申請之試驗設計討論
11 月 9 日	拜訪岐阜大學豬島康雄教授請益細胞株建立手續
11 月 10 日	赴大阪大學進行神經原細胞株建立之合作討論，並參觀大阪大學微生物疾病研究院
11 月 11 日	與伊藤直人博士彙整神經原細胞株建立工作之相關材料與程序準備之討論，以及總結未來狂犬病合作試驗與新城病試驗相關後續規劃
11 月 12 日	返台 (岐阜大學-岐阜火車站-名古屋機場-臺北)

二、訪問機構簡介

1. 岐阜大學應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室

日本岐阜大學應用生物科學部首創於 1923 年，前身為岐阜農業及森林學院，1940-1942 開始有獸醫學系及農業工程學系的加入，1949 年岐阜大學正式成立後而併入。其中應用生物科學部的人畜共通感染症學研究室（由杉山誠博士及伊藤直人博士負責），以輪狀病毒和狂犬病病毒等病毒之致病性研究為主要方向，成立三十年以上。在狂犬病的研究已持續二十年，主要是探討狂犬病病毒的分子致病機轉，尤其伊藤直人博士建立一株可穩定表現 T7 RNA 聚合酶的細胞，非常適合應用在狂犬病病毒的反向遺傳學操作。本次請益細胞株建立手續的諸島康雄教授也同樣隸屬於日本岐阜大學應用生物科學部。

2. 大阪大學微生物疾病研究院

大阪大學的微生物疾病研究院（其涵蓋領域有微生物學、免疫學、腫瘤學），是成立於 1934 年，是大阪大學的第一個研究院，同時該研究院也擁有一個公立的疫苗廠 Biken（Biken 的人用疫苗產品不僅供應國內亦供應國外，目前主要的產品有水痘疫苗、流感的 HA 疫苗、麻疹弱毒疫苗、日本腦炎不活化疫苗、百日咳疫苗；公司資金約是五億日圓，員工有八百多人）。微生物疾病研究院的院長是松浦好治教授，1980 畢業於北海道大學獸醫學系，曾經於國家衛生研究院擔任十年的研究員，有非常多享譽國際的研究成

果，包含出血熱腎病的病毒分離 (hemorrhagic fever with renal syndrome)，而在 NIH 的肝炎實驗室當了八年的主持人，最重要的成就是在 C 型肝炎病毒上的分子研究非常卓越。本次非常幸運地由伊藤直人博士之友人 Wataru Kamitani 博士 (隸屬該研究院，主要研究題目是 MERS，Middle East respiratory syndrome coronavirus) 介紹下去參觀松浦好治教授的實驗室，該實驗室具有深厚的實驗背景及充裕的實驗設備 (包含兩台共軛膠顯微鏡、兩台定序儀、四台超高速離心機)，足顯其為國際上卓越之實驗室。

大阪大學的微生物疾病研究院亦在國際合作上非常的活躍，每年平均有 20-40 個國際合作計畫，並與泰國、印尼及烏干達的大學及醫院簽訂有合作協議。此外，他們非常歡迎研究機動性高、深具熱忱的海外學生加入。

三、參訪內容

1. 有關新城病專利申請之實驗設計規劃：

本所在新城病的專利申請上的相關試驗，105 年度因為依照伊藤直人博士的建議建構出七株重組新城病病毒，進一步經病原性分析後釐清出主要的毒力減毒因子發生在特定的蛋白上。為了使後續的專利申請能夠完善，伊藤直人博士建議首先要釐清剩下的七個胺基酸何為主要的毒力因子；於是伊藤直人博士也不吝慷慨地與我們分享後續應該如何進行質體架構策略，才可以順利較快達成相關病毒的回收。

另外，有關後續應進行的相關動物試驗或分子機制探討試驗，伊藤直人博士也建議我們、給我們方向與實驗設計上的指導。

2. 有關狂犬病合作試驗之進行

在病原性試驗上，伊藤直人博士原先建議我們以 focus assay 進行病毒力價測定後，標準化病毒接種量來進行相關病毒的病原性比較試驗。然而初步合作試驗結果顯示，由於台灣鼬獾狂犬病病毒在目前狂犬病病毒培養用的細胞皆呈現極低力價，為避免因力價過低而致接種量的估計偏差太大，故伊藤直人博士進一步建議我方在病原性試驗的接種應以病毒 RNA 拷貝數為接種計量單位。

由於我方發展出來的 real-time RT-PCR 系統是偵測包含病毒 RNA、mRNA 及 cRNA，在經過詳細討論後，伊藤直人博士特地調整我們的整個操作程序，採分階段進行定量 real-time RT-PCR，以針對病毒 RNA 進行定量，以使病原性試驗之接種計量更可信；目前返國後已經依照伊藤直人博士的建議準備並購買相關的試劑。

3. 有關鼬獾神經元細胞建立工作

由於前期合作試驗結果顯示，台灣鼬獾狂犬病病毒在目前狂犬病病毒培養用的細胞皆呈現極低力價，為使後續合作試驗可以順利進行，也同時利於我國台灣鼬獾狂犬病診斷之需，我們與伊藤博士便興起了建立鼬獾神經元細胞之想法。為了進行此項工作，本次特地拜訪了兩個實驗室，一個是岐阜大

學的諸島康雄教授，另一個是大阪大學的本田友幸博士。

諸島康雄教授的研究領域是動物科學及動物病毒學，並曾經在美國進行癌症相關之研究，因此他具有細胞生物學相關的研究背景；此外，他曾經成功地建立羊的動脈內皮細胞株，因此具有將初代細胞建立成細胞株的經驗。

諸島博士提供了細胞株建立流程的一些建議，包含細胞分離並轉染

immortalization 質體後並不要急著進行單株化，可待繼代 40 代以上再開始，並建議用培養 N2a 的培養基即可，而後應該要有識別的 marker 來挑出神經元細胞。他同時也提供我們一個許多日本學者的想法，他表示如果我們後續目的並不需要非常純的細胞株（例如倘若只是要進行病毒的培養、增幅），極限稀釋單株化這個手續並非一定要進行，因為極限稀釋手續可能會讓細胞生長地不理想，導致最後細胞株建立失敗。

本田友幸博士是大阪大學醫學院微生物及免疫研究所的副教授，他本身畢業於大阪大學醫學院，並擔任過住院醫師，而後攻讀博士進行神經性病毒相關之研究，之前也曾在東京大學醫學院及京都大學擔任過助理教授，其優秀的學術研究亦曾發表於 Nature 期刊上。因其本身主要是進行神經性病毒培養工作，本田博士有著豐富的神經元初代細胞培養經驗，其建議我們優先使用胚胎小鼠進行操作練習，並且用電穿孔的方式將質體送入細胞，當細胞可以培養超過一個月即成功，而後才將成熟的操作手續應用在鼯獾進行神經元細胞株建立工作。此外，本田博士亦提供其用來進行海馬迴組織神經初代

細胞培養時的培養基配方，讓我們可嘗試應用於鼬獾神經元細胞株之建立。

此外，本田友幸博士亦帶領我們參觀他的實驗室，並展示後續建立細胞株過程中會用到的儀器設備及耗材，以便我們返台後準備。

4. 返國後之後續準備工作與交流

- a. 由於本田博士提出我們要釐清哪一部分的鼬獾腦組織是最適合台灣鼬獾狂犬病病毒複製生長的，應針對該部分的腦組織進行細胞株建立，因此返台後我們已就過去收得不同部分之腦組織的病毒核酸拷貝數結果與本田博士交流，目前已決定針對哪一部分的鼬獾腦組織進行細胞株建立。
- b. 已根據和伊藤直人博士之討論結果進行 immortalization 質體、識別 marker 之抗體之購買相關程序；亦已根據本田博士的建議完成解剖顯微鏡、電穿孔儀之準備。



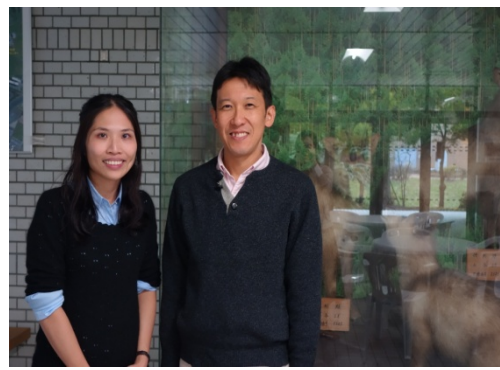
本次的行程的主要拜訪單位，岐阜大學。



許愛萍助理研究員與岐阜大學杉山誠教授合影。



伊藤直人博士與本田友幸博士合影。



許愛萍助理研究員與岐阜大學諸島康雄教授合影。



參觀大阪大學微生物疾病研究院，與院長松浦好治教授的主要博士後負責人合影。



參觀大阪大學微生物疾病研究院，此為 Biken 的疫苗產品。

參、心得建議

感謝農委會及本所計畫經費支持得以持續與岐阜大學及大阪大學等相關學者深入討論、設計與規劃實驗收穫良多，對本所之相關研究很有助益。

本次出訪機會更深刻感受日本學者的實驗思維明顯地與歐美學者不同，其實驗規劃更為細緻，但也因為跟隨伊藤直人博士在反向遺傳學的腳步，本所這一兩年在新城病疫苗開發相關工作有更明顯的結果。

未來鼬獾神經元細胞株建立完成後，可被應用於兩個層面，一是與岐阜合作的病原性試驗的病毒複製動力學分析，二則可應用於台灣鼬獾狂犬病的 RTCIT (Rabies Tissue Culture Infection Test) 診斷 (病毒分離診斷)。另外，目前國際上最常使用的細胞株為 N2a 及 BHK21 (皆嚙齒類動物來源細胞)，其次基礎研究有些是利用 SK-N-SH (人的神經元細胞瘤來源)，並無野生肉食獸來源之細胞株；也許是物種/宿主的差異性導致病毒分離的敏感性不足，RTCIT 的診斷有時需要盲目繼代 2-3 代 (對於台灣鼬獾狂犬病病毒甚至需要更多代)，因此倘若鼬獾神經元細胞株建立成功，將可提供國際上狂犬病病毒診斷另一選擇，也將大幅降低本所病毒分離診斷的時間及人力等成本，同時避免多次盲目繼代可能之污染或誤判。由於細胞株建立手續細膩且繁複，需進行多種條件嘗試，然目前每年可獲得之鼬獾仔胎數有限，將依日方伊藤直人博士及本田友幸博士的建議，先於小鼠進行建立流程的最佳化，待條件就緒後，再評估是否應用在鼬獾神經元細胞株建立。