

出國報告（出國類別：考察）

赴日本觀摩收集家禽流行性感冒診  
斷分工作業及野鳥高病原性禽流感  
監測之資訊

服務機關： 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱： 陳麗璇 助理研究員

李婉甄 助理研究員

派赴國家： 日本

出國期間： 107 年 8 月 27 日至 107 年 9 月 5 日

報告日期： 107 年 11 月 15 日

# 目錄

一、	摘要.....	2
二、	目的.....	3
三、	過程.....	4
	(一) 計畫行程.....	4
	(二) 內容重點.....	5
	1. 日本動物衛生研究部門	
	2. 茨城縣縣北家畜保健衛生所	
	3. 國立環境研究所	
四、	心得與建議.....	14

## 一、摘要

日本在家禽流行性感冒的防疫上有嚴格的規範，家禽除了不得檢出高、低病原性禽流感病毒外，其血清也不可有禽流感病毒抗體。雖然每年日本仍可在野鳥及家禽發現零星高病原性禽流感案例，但截至目前為止，皆能阻斷疫情擴散並及時將病毒清除。本次訪日行程以野鳥高病原性禽流感監測、疫情爆發時之檢驗分工以及近期禽流感研究工具為主要研習項目。日本動物衛生研究部門 (National Institute of Animal Health, NIAH) 為主要參訪機構，瞭解 NIAH 使用高通量定序儀在禽流感研究的應用、實驗室選用的前處理方法以及產出結果的分析工具；第二個參訪單位為茨城縣縣北家畜保健衛生所，收集第一線防疫單位在禽流感監測及診斷作業等相關資訊；最後拜訪國立環境研究所 (National Institute for Environmental Studies, NIES)，為主導全國野鳥禽流感監測系統的機構。較值得注意的是日本家禽場的監測及診斷業務是直接由各都、道、府、縣之家畜保健衛生所全權負責，除鑑定是否為 H5、H7 亞型禽流感病毒外，還要完成病毒分離以便後送，而該所必須依檢驗結果自行判定畜牧場的防疫處置。如此可減少檢體傳遞花費的時間及避免資訊傳遞錯誤。在野鳥監測方面，日方目前從未在排遺類檢體檢出高病原性禽流感病毒，陽性案例主要是在死亡野鳥個體被發現，且範圍不應侷限於遷徙的雁鴨科鳥類，同棲地鳥類、猛禽及烏鴉等也是常見的檢出物種。本參訪資訊可作為禽流感防疫的重要參考資料。

## 二、目的

近年 2.3.4.4 分支 H5 亞型高病原性禽流感近年已在世界許多國家造成嚴重疫情，臺灣於 2015 年初亦遭受該分支病毒入侵並首度爆發於水禽產業因而重創，該次爆發亦因水禽案例場大增而導致診斷業務量龐大，因此參訪日本相關單位並擷取寶貴經驗，以瞭解該國如何於 24 小時內迅速完成初步診斷與撲殺。日本在近幾年均有在野生禽鳥檢測到本分支高病原性禽流感的案例，由於現行日本家禽場不論高低病原性禽流感病原或是血清抗體均不得為陽性，且疫情爆發初期病毒往往都是在野生鳥類先檢測到，通常在全國多區域發現，因此病原有較大的機會是在於候鳥南遷時帶入。即使如此，病毒進入家禽場後，禽場疫情仍可在短時間內減緩或終止。因此本次參訪所要收取的資訊內容將著重在野鳥禽流感檢測檢體來源、例行監測或病例發生時各單位之診斷業務分工及該國近期用於研究分析的工具。

### 三、 過程

#### (一) 計畫行程

日期	研習單位及內容
8月27日(一)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 桃園國際機場搭機飛往日本成田國際機場。</li><li>➤ 由日本成田國際機場搭乘鐵路至筑波車站。</li></ul>
8月28日(二)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 拜訪日本動物衛生研究部門。</li><li>➤ 實驗室介紹、行程討論、解說診斷分工。</li></ul>
8月29日(三)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 日本動物衛生研究部門。</li><li>➤ 日本動物衛生研究部門研究人員示範及解說高通量定序檢體前處理。</li></ul>
8月30日(四)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 日本動物衛生研究部門。</li><li>➤ 日本動物衛生研究部門研究人員示範及解說高通量定序檢體前處理。</li></ul>
8月31日(五)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 茨城縣縣北家畜保健衛生所。</li></ul>
9月1日(六)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 整理參訪內容資料。</li></ul>
9月2日(日)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 整理參訪內容資料。</li></ul>
9月3日(一)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 上午：參訪國立環境研究所。</li><li>➤ 下午：日本動物衛生研究部門研究人員示範及解說高通量定序產出資訊分析方法。</li></ul>
9月4日(二)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 綜合討論。</li></ul>
9月5日(三)	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ 由筑波車站乘接駁車至日本成田國際機場。</li><li>➤ 搭機返國，由日本成田國際機場飛抵桃園國際機場。</li></ul>

## (二) 內容重點

### 1. 參訪日本動物衛生研究部門實際示範高通量定序儀操作及應用

日本動物衛生研究部門(National Institute of Animal Health , NIAH)現隸屬日本農研機構 (National Agriculture and Food Research Organization, NARO)，地點位於筑波研究學園都市。此都市是日本集中設置各領域重要研究和大學的科學園區，鄰近東京及成田機場。本次主要拜訪 NIAH 越境性感染研究領域下的動物流感實驗室，越境性感染研究領域的主管為西藤岳彥博士(Dr. Takehiko Saito)，西藤博士具有禽流感診斷 15 年以上的資歷，動物流感實驗室負責人為內田裕子博士(Dr. Yuko Uchida)。

該研究領域位於 NIAH 裡，使用一棟高生物安全設施建築，自 2001 年起日本檢出牛海綿狀腦病(BSE)，就於 2004 年完成建置動物生物安全第三等級實驗室，以因應各式外來或重要傳染病。高等生物安全設施均設置於一樓，含 BSL3 實驗室 5 間以及大中小家畜 ABSL3 共 15 間，每年營運費用高達 2 百萬美金。由於今年進行大型牛隻之牛海綿狀腦病試驗，該高等生物安全設施之設計使之得以單間實驗室關閉或分區關閉，以減少未使用實驗室之資源消耗。該分間/分區關閉之動物設施設計，可做為未來本所高等生物安全設施建置之參考。

目前該所之高等生物安全設施裡設有禽流感病毒攻毒專用實驗室兩間，其中一間為小型獨立換氣籠，另一間則以大型隔離籠為主。所有動物設施由專人管理負壓及電源，僅每間實驗室裡的隔離設施及生物安全操作櫃僅需由使用單位自行負責確效等維護。原則上，實驗後之動物屍體於解剖室處理後會滅菌一次；離開該建物時會再進行第二次滅菌。另該建物內建置充分之儲放空間及冷凍冷藏庫，令人印象深刻。

本次拜訪討論中現行已確認為地方(都、道、府、縣)家畜保健衛生所進行診斷。由 NIAH 所提供反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)或利用定量即時聚合酶連鎖反應(Quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)的診斷方法，地方家畜保健衛生所可依實驗室現有設備選擇合適的方法。NIAH 另提供公職獸醫教育制度，在地方家畜保健衛生所任職年限達 2 年以上人員可至

NIAH 實習，實習人員會在各疾病實驗室反覆練習診斷作業，一實驗室大約待一個月，總共為期一年。

本次由峯淳貴博士 (Dr. Junki Mine)及中山ももこ博士 (Dr. Momoko Nakayama)示範對於已知的家禽流行性感冒病毒進行全基因體定序，由於實際的原始檢體在 NIAH 多為咽喉拭子、泄殖腔拭子或排遺為主，除了動物的宿主基因外尚有許多環境微生物的干擾，因此目前高通量定序應用範圍仍以病毒分離後已確認亞型的病毒液，用於即時診斷或臨床採集病例組織檢體尚有困難。該設備的應用目的在於可降低大量檢體定序的成本以及減少傳統定序方法偶有差異較大的片段無法順利同時完成定序的弱點。進行定序前，樣材前處理的流程依目的有多種配套方式使用。

本次研習時，日方研究人員示範中使用的方法為已經在 NIAH 長期調整下來最適合該實驗室檢體類型的方式。NIAH 目前的次世代定序儀為 Illumina 公司的 Miseq 機型，檢體前處理使用 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina®套組，其原理為將從檢體純化的核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA) 利用隨機引子做成小片段並與 RNA 片段互補的第 1 股及第 2 股去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA)，上述過程中產出的雙股 DNA 接上 adaptors 及 barcodes 後進行聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)，此為上機前的製備。

製備好的產物上機前須將各個檢體的核酸濃度調整為一致，NIAH 使用 NEBNext® Library Quant Kit for Illumina®套組，原理是利用定量即時聚合酶連鎖反應 (Quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)對產物定量。所有檢體配成相同濃度並混合後即可上機。

由於次世代定序儀產出的檔案龐大，且組裝標的基因的方式也有多種，在這次示範的過程中分別使用兩套軟體，其中一套是由 NIAH 與日本國內軟體開發公司共同開發，專用於組裝流感病毒基因體序列的軟體 FluGAS (<https://www.w-fusion.co.jp>)，本程式無需設定參數，直接輸入定序儀產出之結果即可進行分析，除了 A 型流行性感冒病毒可組裝外，B 型流行性感冒病毒的基因體序列也可組裝，可連續處理多筆資料並可直接分析病毒亞型及比對資料，其產出資料為符合上傳全球共享禽流感數據倡議組織流感資料庫 (Global Initiative on Sharing All Influenza Data, GISAID) 的形式。

本軟體僅使用 mapping 的方式組裝病毒，無法應用於流感病毒以外的生物體基因組裝，較適合用在例行性定序大量 A、B 型流感病毒的實驗室。另一套軟體則為 CLC Genomics Workbench，可應用的範圍不設限於流感病毒基因體，組裝時可使用 de novo 法或 mapping to reference sequence 的方法，但在序列組裝時需依病毒一株一株的處理，也可自行設計制式流程等多種變化使用，資料產出不像 FluGas 是彙整好的格式，如有上傳資料庫需求必須自行另外處理。由於軟體運行需要效能良好的計算工具，該實驗室現行配有一組高效能電腦，另外所內有大容量的雲端儲存空間可作為研究產出資料的長期存放場所。

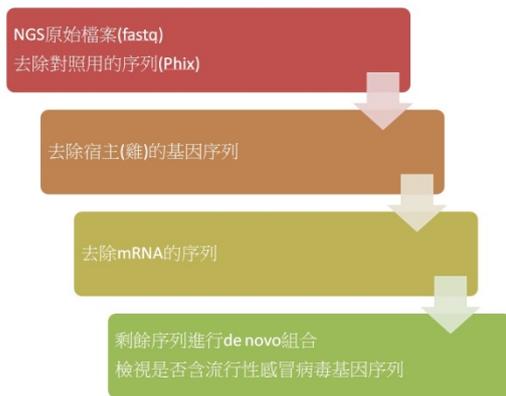
檢體前處理是決定高通量定序品質極為重要的一個步驟，NIAH 選用的方法雖然仍約有 80% 的宿主基因及其他非流感病毒基因體之序列資料，但在定序該病毒全基因之目的上，這樣的資料仍舊是相當足夠的，而且在病毒基因體的各片段所得到的的序列量較為平均，不會有基因片段前後端序列資訊較少的問題，因此近期 NIAH 均使用本流程操作。



與日本動物衛生研究部門越境性感染研究領域西藤岳彥博士合影。



配置試劑操作區，工作人員接觸過核酸檢體當日即不可再進入以避免污染。



示範 CLC Genomics Workbench 寫流程 與動物流感實驗室成員及家畜保健衛生所實習人員合影。  
方式分析資料，減少反覆操作步驟。

## 2. 參訪茨城縣縣北家畜保健衛生所之診斷業務

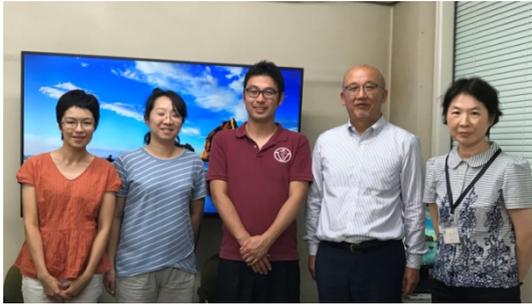
家畜保健衛生所在各都道府縣均有設置 3-4 所，其中至少 1 所需具備檢測高病原性禽流感之檢驗能力，本次拜訪茨城縣縣北家畜保健衛生所，由所方人員介紹該所與高病原性禽流感相關業務。茨城縣的畜產產出金額每年均在 1000~1500 億日圓左右，其中禽類之相關產出佔了約 550 億日圓，而雞蛋之產量更是全國第一。茨城縣共有 4 個家畜保健衛生所及一處 BSE 檢查中心，獸醫師數達 46 位。縣北家畜保健衛生所具病性鑑定之功能，獸醫師就有 20 位。而檢診則又分為基礎之血液生化、血清、病理、細菌、病毒及分生等各方面檢測設備及空間。高病原性家禽流行性感之防疫為該保健所業務其中一環，與該疾病相關之防疫措施如下：

- (1) 利用全國性之畜牧場系統，平時維護該系統之最新農戶位置及飼養資訊，該系統較特殊處為需登記畜主的電子郵件信箱、住家及飼養地地址，另需事先登錄撲殺掩埋地，畜主亦需提供自家畜舍平面圖，若畜主無能力提交平面圖時，由保健衛生所人員於地圖上協助確認。疫情爆發時，立即利用該系統之地圖圈起半徑 1 km 或 3 km 等，可將該區域內之畜牧場詳細列表，利於發布通知、知會畜主更新資料、消毒及監測等行動。目前茨城縣利用該系統進行獨創的指定性 215 處消毒地點。不過該系統尚僅限於管理，並不進行病例通報等正式案例疫情傳遞。平時日本有任何家禽流行性感發生事件，會以電子郵件信箱或寄信通知提高警覺及提升防範措施。

- (2) 每年均執行一次防疫訓練，對象為市町村等能動員之地方行政單位人員。茨城縣特別與警察單位聯合進行訓練演習，使警方也能納入疫情爆發時協助的人力。茨城縣目前在爆發時能動員的人力約在 1000 人。
- (3) 依據日本政府制定之「高病原性禽流感與低病原性禽流感相關特定家畜傳染病防疫指針」，農戶原則上須記錄牧場每日死亡數量，當有異常死亡進行通報時，該紀錄有助於判斷農戶是否為早期通報，以便判定農戶能否獲得較高的補償。但通常無法立即判定。而茨城縣對於農民有更進一步的要求，請農民每個月通報一次每週死亡數。
- (4) 茨城縣家畜保健衛生所依據日本政府制定之「高病原性禽流感與低病原性禽流感相關特定家畜傳染病防疫指針」為原則執行相關防疫措施，不過又比該防疫指針進行更嚴謹的防疫作為。例如：
- A. 按照防疫指針僅須確認掩埋地，而茨城縣更進一步設置每日可處理 10 萬隻家禽之焚化設備。
  - B. 家禽防疫資材(例如防護衣或口罩等)預備每日可處理 12 萬隻家禽之儲備量。
  - C. 指定監測量(依環境監測單位提供之風險地圖，高風險地區每戶每月須採 10 隻個體之咽喉拭子、泄殖腔拭子及血清)原為 12 戶，茨城縣提升至 14 戶；加強監測量(以茨城縣大於 101 戶的規模，每年應檢測該縣 10%農戶數)原為 30 戶，於 2005 年時發生低病原性 H5N2 亞型病毒時，進行全縣全養禽戶篩檢。
  - D. 防疫指針未規範之湖沼檢查，每池塘於 10 月至隔年 3 月期間採集 10 個排遺。流浪禽由警察單位協助捕獲，送家畜保健衛生所檢測。
  - E. 對於死亡野鳥之高病原性家禽流行感冒檢測採取積極檢測的做法，原本僅須採集咽喉拭子及泄殖腔拭子送至國立環境研究所篩檢，茨城縣縣北家畜保健衛生所積極協助高病原性家禽流行感冒檢出。該所做法為剖檢後取氣管黏液，先利用簡易檢測篩檢，陽性檢體則同步進行病毒分離及分子生物檢測 A 型流感、H5 亞型及 H7 亞型病毒核酸；陰性檢體則再進行病毒分離，完全陰性才結案。以前 (2016) 年爆發之 2.3.4.4 分支 C 群 H5N6 亞型病毒為例，茨城縣於死亡野鳥 240 隻中檢出 62 隻為陽性，陽性數量居全日本之冠；陽性檢體之

中，由簡易檢測篩出 45 件為陽性，其餘 17 件為簡易檢測陰性但病毒分離陽性。次(2017)年後再無死亡野鳥檢出高病原性家禽流行感冒案例。由於該次爆發大量之死亡野鳥，陽性檢體眾多，故該 62 隻死亡野鳥個體分散於鳥取大學、北海道大學及動物衛生研究所確診。除死亡野鳥之外，2016 年另有檢驗虛弱野生禽鳥 17 隻，均為高病原性禽流感檢測陰性。

- (5) 對家禽流行感冒病毒之檢測，茨城縣縣北家畜保健衛生所檢測能力極強，具備剖檢、病毒分離及分子生物檢測之相關設備、空間及人才，因此不管是監測、病例或是死亡野鳥之禽流感檢測，該所自主把各方面的標準提高於基本要求。茨城縣民間即有原種雞(GP)場，該所檢驗所需之雞胚胎蛋均購自該場，平時備有 7~11 日齡胚胎蛋以支應禽流感病毒分離之需求。該所於疫情爆發時亦分擔診斷業務，所內人員經常於爆發時支援動物衛生研究部門。對日本各都道府縣之地方動物檢診單位而言，不論該單位的設備及人員能力為何，最低要求為需有自行決定撲殺與否的能力，以快速應對疫情。
- (6) 簡易檢測之應用於異常死亡通報以及死亡野鳥初步篩檢。對於農戶通報異常死亡時，於現場會進行簡易檢測，呈現陽性反應時，需回實驗室進行 A 型流感、H5 亞型及 H7 亞型病毒核酸檢測，若為 H5 或 H7 亞型陽性，不論高低病原性一律進行撲殺。對畜主而言，簡易檢測反應為陽性時，需有自己畜養的家禽可能被撲殺的心理準備，同時自行移動管制。於此階段雖政府無法規規範移動管制，但若此時仍舊移出禽隻或蛋，後續確認 H5 或 H7 亞型時，須追回所有產品，並自付所有運輸費用，故多數畜主不會於此時移動任何禽蛋。若簡易檢測為陰性，則再檢測其他禽病病原。
- (7) 茨城縣水禽場極少，僅一鵝場，採室內養殖方式。日本水禽場佔產業極小部份，故水禽場之監測等級等同陸禽場。



與茨城縣縣北家畜保健衛生所大內義尚所長及工作人員合影。



大內義尚所長介紹茨城縣縣北家畜保健衛生所實驗室設施。



配合大量檢驗及篩檢工作，所內使用自動化核酸萃取套組。



茨城縣縣北家畜保健衛生所分子生化實驗室。



茨城縣縣北家畜保健衛生所實驗室設施。



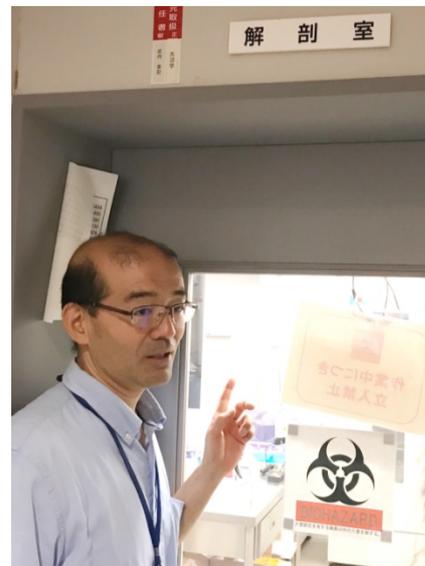
茨城縣縣北家畜保健衛生所使用的 A 型流感病毒簡易檢測套組。

### 3. 參訪國立環境研究所之野生水禽禽流感監測

日本國立環境研究所生物生態系環境研究中心為本次參訪對象之一，由大沼學博士(Dr. Manabu Onuma)介紹，本單位主要業務為致力保護生物多樣性和實現可持續利用生態系統服務，而該單位目前也主導日本野生鳥類於禽流感監測，包含採樣方式及檢測等規劃。

- (1) 檢體來源：各都道府縣之家畜保健衛生所於轄區範圍收集，由國立環境研究所決定 52 個採樣點，針對秋冬季節野生雁鴨及水鳥排遺採樣，採樣期間為 10 月至隔年 5 月，每個採樣點隔 2 個月採樣一次。
- (2) 檢驗方法：檢體送至國立環境研究所後進行篩檢，使用方法為針對禽流感病毒 matrix protein (M) 基因，以 Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 方式檢測。由於排遺檢體容易有聚合酶連鎖反應抑制物，大沼博士認為 RT-LAMP 檢測方法在抑制物存在的情況下，可能可以抵抗抑制物的作用，很適合做為類檢體的篩檢。
- (3) 非例行監測之檢驗：當家畜保健衛生所接獲通報或發現死亡野生禽鳥時，會採集咽喉拭子、泄殖腔拭子，後送至國立環境研究所進行篩檢，方法同例行監測初篩。
- (4) 陽性檢體後送：國立環境研究所檢測為陽性的原始檢體(排遺、咽喉拭子或泄殖腔拭子)將依檢體來源地區分送至各負責單位。目前分區範圍：東部為北海道大學；西部為鳥取大學；東京都鄰近地區為日本動物衛生研究部門。後續進行的檢驗為病毒分離，分離陽性後再鑑定病毒亞型及病原性。
- (5) 檢體確認為陽性後的相關處置：當確認野鳥檢出高病原性禽流感時，權責單位會發布相關訊息，並在檢出陽性案例地點周邊 10 公里觀察鳥群狀況，並沒有再主動採樣，因參考 2010 年至 2011 年爆發高病原性禽流感時，雖然對發生地的野生水鳥排遺加強採樣，當年度全國篩檢數量高達 7000 件，但均未檢出禽流感病原。
- (6) 結果：2008 年至 2017 年間共檢測 19407 件檢體，以 RT-LAMP 方法初篩之陽性件數為 352 件，陽性率約為 1.8%，後送檢體的病毒分離陽性

件數為 153 件，佔核酸陽性檢體的 43.5%，在秋季遷徙期間(每年 10 月到 11 月)是病毒陽性率最高的時間，而後病毒陽性率隨時間遞減。由排遺所檢測到的病毒均為低病原性禽流感病毒，高病原性病毒則只從死亡野鳥檢出。排遺類檢體的病毒檢出率最高的鳥種依序為綠頭鴨、尖尾鴨、小水鴨及赤頸鴨。然而在高病原性部分鳥種就更為多元，就茨城縣縣北家畜保健衛生所提供的資料表示，2016 年至 2017 年該區域檢出高病原性 H5N6 共 62 株，檢出鳥種分別為疣鼻天鵝(30 隻)、黑天鵝(14 隻)、紅嘴鷗(10 隻)、黃嘴天鵝(4 隻)、鳳頭鷺(3 隻)及紅頭潛鴨(1 隻)。依據國立環境研究所說明，2016 年至 2017 年日本全區域在 210 隻鳥檢出高病原性 H5N6，鳥種多達 25 種，主要有大型雁鳥、鴨科、鶴、猛禽、潛鴨、鷺及烏鴉。另外，國立環境研究所近期依據高病原性禽流感檢出等累積資料，更新出一份高解析度風險地圖，本份地圖提供給各都道府縣之家畜保健衛生所作為野鳥檢測採樣地點的參考。



日本國立環境研究所生物生態系環境研究中心。大沼學博士介紹實驗室。



RT-LAMP 使用的溫度循環器，左上為新版儀器，右下為舊版。



保存日本特有動物之細胞組織的液態氮筒，以中央控制系統偵測狀態及液態氮補充。

#### 四、心得與建議

家畜保健衛生所與農戶之間聯繫頻繁，疫情現況均能即時傳達至農戶端。而農戶之每日死亡數量均能落實記錄，並每週通報至家畜保健衛生所，對於掌握各農戶之現況有莫大的幫助。另日本現行系統中，登錄家禽場預訂掩埋地等撲殺後處理方式，實值得推動。又日本的家畜保健衛生所具禽流感檢診能力含括最不需要設備的簡易檢測到實驗室端的病毒分離及分子生物檢測法，以達到 24 小時內確定是否為 H5 亞型或 H7 亞型禽流感病毒入侵，並啟動該罹病家禽場撲殺行動，本次考察目的包含收集日本地方防疫單位診斷業務之相關資訊，俟我國有防疫相關需求時利於迅速提供參考。另高效率儀器於流感實驗室的應用及最合適的操作方式，本次也見習到高通量定序儀的檢體處理流程及後續資料處理方法，本所禽病診斷實驗室與 NIAH 性質相似，甚至比儀器廠商更了解如何應用於家禽流行性感冒病毒之相關研究，也不會只侷限於特定廠商的產品資訊，對於實驗室而言獲益良多，未來應與日本動物衛生研究部門保持聯繫，以利於彼此診斷技術與疫情資訊交流。