

建國飛

生技建基夢想起

中華實驗動物學會

第24期會訊



目 次

✚ 專題報導

小鼠胚胎致死表現型分析	靖永浩助理教授
基礎行為表現型分析技術-SHIRPA	林相汝助理技術師
無菌鼠如何應用於基因表現型分析	黃彥智組長
小鼠病理表現型分析策略	梁鍾鼎副研究員
第五十八屆日本實驗動物學會(JALAS)年會與會心得	林進裕研究生

✚ 會 務

中華實驗動物學會第十一屆第五次理監事會議紀錄
中華實驗動物學會第十一屆第六次理監事會議紀錄
中華實驗動物學會第十一屆第七次理監事會議紀錄
中華實驗動物學會第十一屆第八次理監事會議紀錄

中華實驗動物學會第十一屆理監事暨各委員會總召集人名錄

✚ 理 事 長：余俊強
常 務 理 事：梁善居、洪昭竹、陳炯東、王明升、王繼廣、毛嘉洪。
理 事：王銘富、王繼廣、方柏雄、廖欽峯、廖俊旺、蔡倉吾、蔡清恩、 鍾昆金、劉福華、洪志駿、張秀鑾、林子恩、萬灼華、吳文勉。
常 務 監 事：張秀鳳。
監 事：梁鍾鼎、陳振忠、方美佐、張家宜、李勇陞、莊秀琪。

✚ 褒揚/傑出貢獻獎委員會總召集人：陳常務理事炯東。
✚ 學術委員會總召集人：蔡理事倉吾、廖理事欽峯、梁監事鍾鼎。
✚ 出版委員會總召集人：張理事秀鑾、梁監事鍾鼎。
✚ 祕 書 長：張維正



建國飛

生技建基夢想起

專題報導



小鼠胚胎致死表現型分析

靖永皓 博士

慈濟大學分子生物暨人類遺傳系助理教授

自從小鼠基因體於 2002 年被定序完成後，對基因體的註解 (annotation) 持續進行至今。根據 2011 年 11 月 16 日 Mouse Genome Informatics (MGI) (<http://www.informatics.jax.org/>) 最新的估計，小鼠共有 37,346 個基因，其中有 28,932 個 protein-coding 基因。而目前所知有 15,318 個基因已經有已知的相對應之突變鼠。若是利用 Mammalian phenotype browser (http://www.informatics.jax.org/searches/MP_form.shtml) 使用 "embryonic lethal" 查詢 mammalian phenotype ontology，則會得到目前共有 2,645 個基因型 (genotypes) 會導致胚胎致死。根據 MGI 2011/11/16 的統計資料，全世界有 29,268 個小鼠突變對偶基因 (mutant alleles)，由此得知，約有 9% 的小鼠突變對偶基因會導致胚胎致死。另外根據 (Wilson, 2005) 的估計，小鼠胚胎致死基因數目在基因體中根據位置 (chromosomal location) 的不同，約佔在 8.2% 到 20.8% 之間。若是將不同文獻的結果合併估計，在整個小鼠基因體中，大約 13.7% 的基因若是突變會導致胚胎致死。因此可以合理推算出中約有 3,963 個 protein-coding 基因，若是突變時會導致胚胎死亡。

因此當面對一隻新的突變小鼠 (無論是使用 gene targeting、ENU 化學致變，自發性突變，或是其他的方式所得到) 將有 13% 的機會遭遇到同型合子 (homozygote) 在胚胎時期死亡。因此研究早期胚胎致死 (embryonic lethality) 的基因及其相關連的表現型，對後基因體時代了解功能性基因體至為重要。

本文將依胚胎死亡時期簡介如何進行胚胎致死基因的表現型分析：

1. 突變同型合子 (Homozygous mutants) 是否出生？

首先要了解的是突變同型合子在出生時是否存在，通常發現突變同型合子消失是在仔鼠 10 天大，或是在離乳時。因此在仔鼠的基因型知道後，必須要利用 Chi Square Test 計算突變同型合子出現的機率是否符合孟德爾定律。計算的方式為將每一個基因型 (genotypic class) 計算如下：

$$(\text{觀察值} - \text{期望值})^2 / \text{期望值}$$

若是突變同型合子出現的機率遠低於孟德爾定律所預測，則需要進行下一步。

2. 評估突變同型合子在哪一個胚胎發育時期死亡：

胚胎死亡時間的確定有助於了解胚胎死亡的原因。通常只需用少數幾胎，在幾個重要而且可以進行基因型鑑定的胚胎發育期，直到可以得到統計上的顯著差異，就可以定出胚胎死亡時間。

2.1. 定時交配 (Timed mating)

建立異型合子之公鼠、母鼠之間配對，並於檢查母鼠，若是發現母鼠陰道口有交配過後的精栓 (plug)，則視為胚胎期第 0.5 天 (E0.5)。並且計算所需之孕期，在適宜的時期犧牲母鼠予以解剖並用 Chi Square Test 分析胚胎中突變同型合子出現的比例是否符合孟德爾比例。

2.2. 胚胎之基因型

胚胎源的卵黃囊 (yolk sac) 通常會在 PBS 中清洗數次以避免母體 (異型合子) 組織污染，並作為胚胎組織 DNA 的來源。並且需要建立一個穩定且靈敏的基因型鑑定方法。

2.3. 黃體數 Corpora lutea (CL) count

每次解剖時左、右卵巢上的黃體 Corpora lutea (CL) 數量也會分別計算，以確定排卵數與胚胎數是否一致。CL 非常容易計算，而且提供許多珍貴的資訊，避免珍貴的異型合子母鼠犧牲，所以非常建議每次解剖時均收集此資訊。

2.4. E12.5 解剖胚胎

通常一開始會犧牲 3 隻懷孕 12.5 天的母鼠。會選擇這個時期是因為胚胎在此時容易解剖，而且這個階段提供了許多有關孕期前半的豐富資訊。一般而言會將左、右子宮角分開，分別解剖及分析每一個胚胎，並詳細記錄胚胎彼此之間的相對位置與外觀，胚胎來源的卵黃囊 (yolk sac) 也會保留下來進行基因型鑑定。胚胎的外觀與基因型鑑定的結果一並評估。通常要觀察到 Chi Square 檢測為顯著，每一個孕期需要至少要 3 隻懷孕母鼠提供 15 隻以上的胚胎才能下結論。

2.4.1. 無 E12.5 突變同型合子胚胎

如果在 E12.5 無法得到任何的突變同型合子胚胎，而且黃體數也比著床數 (implantation sites) 多了 25%，則突變同型合子極有可能死於受精與著床 (E4.5) 之間。表現型分析見 Pre-implantation lethality。

2.4.2. 突變同型合子胚胎已經退化 (degenerated)

如果胚胎死於 E4.5 - E9.5，由於是在胚胎建立尿囊循環 (allantoic circulation)之前，所以會見到著床處 (implantation sites) 剩下的蛻膜化 (decidualization) 的子宮組織，但是無胚胎或是胚胎退化只剩下 extraembryonic structures: trophoblast giant cells、卵黃囊、Reicher's membrane，或是 ectoplacental cone。

2.4.3. E12.5 退化胚胎

如果胚胎死亡時間是在建立尿囊循環之後，但是在 E12.5 出現不同程度的退化 (degenerated)。如果胚胎沒有心跳，其發育所到的時期 (developmental stage) 就可以用來推測死亡發生的時期。之後根據基因型鑑定的結果與觀察到的同型合子胚胎的表現型，在決定後續需要解剖定時交配母鼠的懷孕天數 (通常會選擇 E7.5 與 E9.5)。

2.4.4. E12.5 活的胚胎

若是所有的胚胎在 E12.5 都是活的，則胚胎死於 Mid-gestation 至 Late gestation。因此需要解剖更多較晚期的懷孕母鼠 (例如 E16.5) 才能精確定出死亡時間。

2.4.5. 發育地標

時期	事件
E4.5	著床
E5.5 -E8.5	Circumferential embryonic-extraembryonic constriction
E8.5	尿囊絨毛膜融合 5-8 個體節
E9.5	胚胎由 dorsal curvature 轉向成 ventral curvature 6-16 個體節
E8.5-E12.5	計算體節數 <ul style="list-style-type: none">• 前 10 個體節：每 1 小時 1 節• 體幹 (trunk)：每 1.5~2 小時 1 節• 尾部 (tail)：每 2~3 小時 1 節
E10.5	眼色素
E10.5-E15.5	中腸疝氣 (midgut hernia)
頭部的發育包括 branchial arches, 嘴、鼻、眼以及外耳均遵循嚴謹的發育順序，可以用來決定發育的時期。	

2.5. 死亡時間分期

2.5.1. Pre-implantation lethality (排卵日 - E4.5)

受精卵在此時會進行定時的分裂，在著床前的形態評估非常直接了當。在 E3.5 這時期可以將囊胚 (Blastocysts) 由子宮沖洗出，或是在較早的時期由輸卵管沖洗出來 (one-ore two-cell stage)。此時受精卵外依然包覆著透明帶 (zona pellucida)。在 E0.5 之後的胚胎均可以在試管內培養到 pre-implatation 時期。培養的胚胎可以從透明帶中孵化 (hatching)，並且黏著 (Attachment) 到培養皿中進而生長 (outgrowth) 並表達發育階段的特定的基因。基因型鑑定可以利用 PCR 進行。此時期需要大量的胚胎以準確的觀察到突變的缺陷是否符合孟德爾定律。在此時期需要至少 30 個以上的培養胚胎來觀察。

2.5.2. Peri-implatation Lethality (E4.5 - E5.5)

在 E12.5 解剖的胚胎若是只見到著床處 (implantation sites) 剩下的蛻膜化的子宮組織，或是只有滋養層巨大細胞 (trophoblast giant cells)，則胚胎在著床後不久就死亡。不論胚胎發育如何不良，只要胚胎能由透明帶中孵化出來，便可以刺激子宮內膜的蛻膜化 (decidualization) 而產生出肉眼可辨認的著床處。加上 *in vitro* 培養 E3.5 的胚胎所得到的資訊，也可以幫助評估著床的過程是否正常。另外子宮序列切片 (serial sections) 分析，也可以幫助了解此時期的發育缺失。

2.5.3. Post-implatation lethality (E5.5 - E12.5) 與 Mid-gestation lethality (E9.5 - E12.5)

成功發育到著床需要 extraembryonic tissues、滋養層 (trophoblast, 或是叫做 trophoctoder, 或是 TE)、primitive endoderm 等成功的發育來起始胚胎與母體組織的“對話”，在此時，胚胎也經歷發育最重要的時期 - 原腸形成 (gastrulation)，而形成三個胚層：primary germ layers，包括 外胚層 (ectoderm)、中胚層 (mesoderm)、內胚層 (endoderm)，以及由中胚層發育來且未來會發展成卵黃囊及 chorioallantoic placenta 的外胚胎構造 (extraembryonic structure)。

胚胎的循環系統從 allantois 與 chorion 融合形成 umbilical vessels 與 chorioallantoic placenta 的建立開始 (E8.5-E9.5)，此時胚胎的養分與氧

氣供應由胎盤開始供應。若是此時胚胎死亡，extraembryonic tissues 依然能存在一段時間。但是胚胎與 extraembryonic tissues 的互相依存的關係，因此其中一個的發育問題會造成另一個的發育受到影響，進而影響胚胎的發育。

到了 E12.5 天，血液由原先的卵黃囊的血液島產生 (yolk sac blood islands)，改由肝臟接手產生。心臟發育接近完成並開始將血液在快速成長的胚胎與胎盤之間運送。此時胚胎死亡的原因多為胎盤功能不足 (placental insufficiency)、心臟血管 (cardiovascular) 或是造血 (hematopoietic)。此時胚胎發育非常快速，有時 E9.5、E10.5、E11.5 與 E12.5 都需要分析，每一個孕期通常需要至少要 3 隻懷孕母鼠提供 15 隻以上的胚胎才能下結論。而且需要與同胎的胚胎相比較。

2.5.3.1. 胎盤功能不足 (placental insufficiency)

在此時期，最常造成胚胎死亡的原因是胎盤功能不足導致的胚胎發育遲緩與死亡。原因顯而易見：自 E9.5 到孕末期滿，胎盤負責供給胚胎所有的養分與廢物的排除。但是胎盤卻常常在研究胚胎致死時被忽略。胎盤功能不足的原因可能是卵黃囊的不正常發育，在這種情況下多會導致卵黃囊的血管構造不正常或是卵黃囊蒼白。另一原因為滋養層細胞分裂與分化異常或是功能不足。此外還有是 allantois 與 chorion 融合不正常。

2.5.3.2. 心臟血管 (cardiovascular)

心臟血管發育不良是此時期第二常見的死亡原因，通常可以觀察到伴隨的型態上的不正常，胚胎發育因此會被嚴重地影響，不但如此，心臟血管發育不良也常常伴隨著胎盤功能與型態的不良。在解剖分析時須注意胚胎是否仍有心跳、是否有血球、血液的循環狀況、心臟 looping 的方向、胚胎轉的方向以及體節數與發育期是否吻合。

2.5.3.3. 造血 (hematopoietic)

胚胎蒼白或是肝臟發育不良則是指向造血問題。造血不良會導致氧氣不足進而造成組織生長遲緩，發育延遲、甚至導致死亡。

2.5.4. Late gestation stage (E12.5 - 出生)

通常胚胎發育至 Mid-gestation 之後一般多能發育到出生。但此時期的胚胎致死通常會發現突變造成型態上的異常。此時期常需要將個別器官逐一由胚胎中分離出來觀察，因此要對突變基因表現的組織、器官、時間有所了解。可以在 E13.5、E15.5 及 E17.5 解剖懷孕母鼠，每一個孕期需要至少要 3 隻懷孕母鼠提供 15 隻以上的胚胎才能下結論。

參考資料及延伸閱讀

1. Random mutagenesis of proximal mouse chromosome 5 uncovers predominantly embryonic lethal mutations. Wilson L, Ching YH, Farias M, Hartford SA, Howell G, Shao H, Bucan M, Schimenti JC. *Genome Res.* 2005 Aug; 15(8): 1095-105. Epub 2005 Jul 15.
2. Early Embryonic Lethality in Genetically Engineered Mice: Diagnosis and Phenotypic Analysis. Papaioannou VE, Behringer RR. *Vet Pathol.* 2011 Jan 13. [Epub ahead of print]
3. Mouse Phenotypes. A handbook of mutation analysis. Papaioannou V and Behringer R. Cold Spring Harbor Laboratory, 2005. (ISBN 978-087969640-5)

基礎行為表現型分析技術-SHIRPA

林相汝 助理技術師

財團法人國家實驗研究院實驗動物中心 種原服務組

一、 簡介

隨著人類疾病研究發展，科學家們利用各種不同的基因改造技術(ENU、基因轉殖、基因剔除等)，產製大量的基因修飾小鼠，並開發成疾病模式動物，期能利用這些模式動物分析人類疾病的成因與治療方式，因此研究些小鼠的「表現型」成為重要的課題；然而表現型分析領域相當廣泛，舉凡只要能夠檢測的“表現”都可以進行分析，例如：外觀形態、行為、基礎生理值、血液生化值、免疫反應、病理解剖...等，若每隻動物都進行完整測試，則需投入相當多的成本與時間，因此研究人員開發出一種快速、有系統的初步行為表現型分析操作技術-SHIRPA。

SHIRPA (SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine; Royal London Hospital; Phenotype Assessment)的概念類似人醫體檢系統，將一些簡易、可快速操作的表現型分析項目並安排適宜之操作流程，整合成為一套操作技術，使技術人員可以有系統的操作與比較，並以協同開發之單位命名。這套系統最早發展於歐洲地區(Rogers *et al.*, 1997)，因 SHIRPA 利用非侵入性的方式針對小鼠進行觀察與記錄，其觀察項目目前有多種版本，但主要包含外觀形態、反射與感官、神經精神、運動行為、自主神經、肌肉張力與肌力等方面(表1)，其操作簡單、快速、全面且低成本，所得的結果可有效輔助科學家們歸納出一個值得深究與投入的分析方向，目前在國際間已被廣泛應用；而在許多大型的表現型分析單位中，SHIRPA 也常被設定為完整分析流程的第一步分析項目，其結果亦可輔助後續較為深入的分析項目。

表1. modified-SHIRPA v1.分析項目(取自Japan Mouse Clinic,日本小鼠診所)

功能類別	項目
外觀形態	毛色(Q1)、毛長(Q2)、毛形態(Q3)、頭部形態(Q26)、耳形態(Q28、Q29)、身長(Q32)、尾長(Q33)、尾部形態(Q34)、鬍鬚形態(Q36)、齒形態(Q37)、膚色(Q42)、肢形態(Q43~Q46)、體重(Q58)
反射與感官	驚嚇反應(Q15)、視覺(Q23)、耳翼反射(Q27)、角膜反射(Q30)、趾痛覺(Q31)、正向反射(Q49)、接觸正向反射(Q50)
神經精神	自發性活動(Q7)、開始移動時間(Q10)、行動力(Q11)、移動覺醒(Q12)、接觸退避(Q19)、被動性(Q20)、咬合抵抗(Q38)、恐懼(Q52)、刺激感受性(Q53)、攻擊性(Q54)、發聲(Q55)

運動行為	顫動(Q5)、姿態(Q6)、步態(Q16)、骨盤高度(Q17)、尾巴高度(Q18)、身體捲曲(Q21)、四肢抓握(Q22)、鐵絲攀爬(Q48)、背地性(Q51)、奇特之行為(Q56)
自主神經	呼吸速率(Q4)、排便(Q8)、排尿(Q9)、毛髮豎立(Q13)、閉眼(Q14)、流淚(Q35)、唾液(Q39)、心率(Q40)、痙攣(Q57)
肌肉張力與肌力	握力(Q24)、身體堅硬度(Q25)、後肢力(Q47)、腹部堅硬度(Q41)

二、 操作方式

目前國內所應用之 SHIRPA 技術主要是向日本小鼠診所(Japan Mouse Clinic)所習得，在此介紹該單位之 modified-SHIRPA v1.操作方式(Masuya *et al.*, 2005)，其操作項目共為 58 個表現型(Q1~Q58)，所使用的設備相當簡易(如圖 1)，操作時利用設備依序操作、觀察與評分即可(詳如表 2)，所有過程中僅利用非侵入性的操作方式，技術人員進入之門檻並不高，只要能穩定移動及保定小鼠即可，但操作人員之熟練度相當重要，因測定項目中包含多項運動行為與神經精神項目，如果操作人員動作緩慢，造成操作時間過長，小鼠可能會感到疲憊而無法表現出正常之表現型，一般建議 58 項操作項目，應於 10~15 分鐘內完成。

另外本技術主要依賴人為判定與評分，故操作人員對於評分標準之明確定義相當重要，以「Q26 頭部形態」為例，需先觀察小鼠之頭部形態，若為正常則評予 0 分，異常則評予 1 分，但是何謂「正常」與「異常」，則有賴操作人員長期累積判讀經驗，才能精準且快速的判定，另外每位操作人員應受統一且完整的訓練，才能使所有人員具一致的判讀標準，如此所得之分析數據才可信賴。

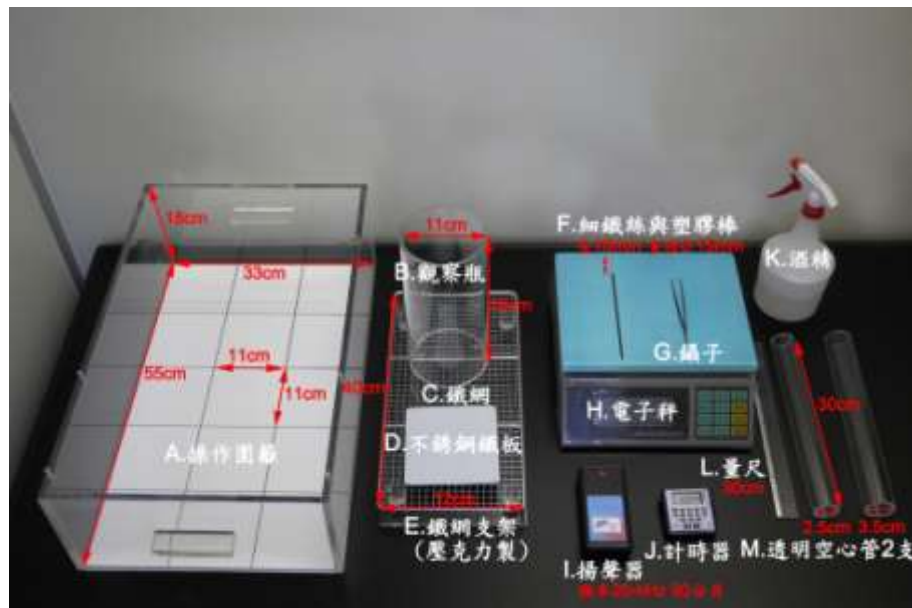


圖 1. SHIRPA 之操作設備

表 2. SHIRPA 之操作流程

	說明	操作項目
觀察瓶中 (Q1~Q9)	放入後前 5 分鐘	Q1 毛色、Q2 毛長、Q3 毛形態、Q4 呼吸速率
	放入 5 分鐘後	Q5 顫動、Q6 姿態、Q7 自發性活動、Q8 排便、Q9 排尿
操作圍籬內 Part I (Q10~Q19)	移入小鼠後計時 30 秒	Q10 開始移動時間、Q11 移動格數、Q12 移動覺醒
	利用揚聲器、手指進行操作與觀察	Q13 毛髮豎立、Q14 閉眼、Q15 驚嚇反應、Q16 步態、Q17 骨盤高度、Q18 尾巴高度、Q19 接觸退避
操作圍籬上 Part I (Q20~Q31)	自尾巴抓起小鼠進行觀察	Q20 被動性、Q21 身體捲曲、Q22 四肢抓握、Q23 視覺
	將小鼠置於鐵網上，抓握尾部固定之，並利用細鐵絲、鑷子進行操作	Q24 握力、Q25 身體堅硬度、Q26 頭部形態、Q27 耳翼反射、Q28 右耳型態、Q29 左耳形態、Q30 角膜反射、Q31 指痛覺
操作圍籬上 Part II (Q32~Q47)	保定小鼠，利用尺、塑膠棒、手指進行操作與觀察	Q32 身長、Q33 尾長、Q34 尾形態、Q35 流淚、Q36 鬍鬚形態、Q37 齒形態、Q38 咬合抵抗、Q39 唾液、Q40 心率、Q41 腹部堅硬度、Q42 膚色、Q43~Q46 肢形態、Q47 後肢力
操作圍籬內 Part II (Q48~Q51)	小鼠前肢抓握鐵絲，30 秒內觀察攀爬情況	Q48 鐵絲攀爬
	將小鼠向後空翻	Q49 正向反射
	將小鼠放入透明管中後，翻轉成腹部朝上，觀察其反應	Q50 接觸正向反射
	將小鼠垂直放置於鐵網上，將鐵網轉向使小鼠頭部朝下	Q51 背地性
綜合評估 (Q52~Q58)	根據操作過程之情況判定	Q52 恐懼、Q53 被刺激性、Q54 攻擊性、Q55 發聲、Q56 奇異的行為、Q57 痙攣
	體重計測量	Q58 體重

三、 分析方式

SHIRPA 所有的項目皆需獨立分析比較，而分析項目可分為三大類：類別尺度(Nominal scale)、順序尺度(Ordinal scale)、比率尺度(Ratio scale)。類別尺度指的是在評分時，不同的分數代表不同類別的表現，例如 Q2 毛長，觀察後評分，0 分代表正常毛長，1 分代表脫毛、2 分代表短毛、3 分代表長毛，這類分析項目，在進行統計計算時，可以 X²-test 分析；順序尺度則是指在評分時，不同的分數代表其在表現型上，是有程度性上的差異，其分數的高低，同時也代表了該項表現型的表現程度，例如 Q14 閉眼，評定 0 分代表全開、1 分代表半閉、2 分代表全閉，此類項目，在統計計算時，是採用 Kruskal-walis rank sum test；而比率尺度的項目，是可經測量得到實際數值的項目，例如 Q32 身長，可實際測量得身長為幾公分，此類的項目則用 ANOVA 來進行統計分析。

SHIRPA 所得的數據能了解一個品系 58 項表現型之表型分布比例(例如圖 2)，再經由上述分析，可比較不同品系或不同基因型動物之表現型(例如表 2)，例如 Hatcher *et al.* (2001)即利用 SHIRPA 分析具 *Snap2* 突變之小鼠，結果發現該小鼠顯著較正常小鼠過動，並再輔以專門儀器與相關研究驗證後，發現此動物的過動行為可發展成為「過度活躍症」(Attention deficit hyperactivity disorder, ADHD，亦即俗稱之「過動兒」)之疾病模式鼠，此外也有許多類似的例證，肯定了 SHIRPA 的實用性。

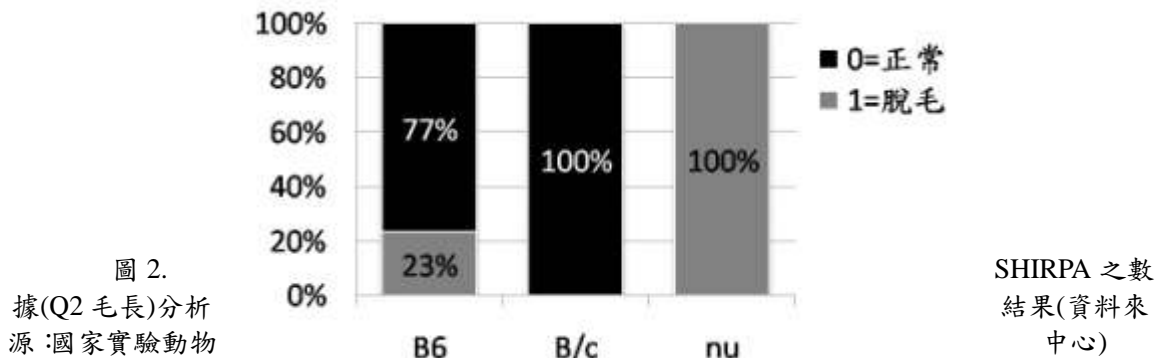


圖 2. 據(Q2 毛長)分析
源: 國家實驗動物

表 3. 比較品系間之表現型(Q11 行動力、Q12 移動覺醒、Q38 咬合抵抗)是否具統計差異(資料來源: 國家實驗動物中心)

品系	行動力(Q11)	移動覺醒(Q12)	咬合抵抗(Q38)
B6	21±1.2 ^a	3(2-3)	1(1) ^a
B/c	16.8±1.5 ^a	2.5(1-3)	1(0-1) ^b
nu	3.6±0.6 ^b	1(1-2)	1(0-1) ^b

Data are expressed either as mean±SEM or median followed by score range in parentheses.

^{a-c} Different superscript letter means significantly different (P<0.05) among strains according to X²-test or ANOVA result.

Shaded boxes mean that there are statistical among strains according to Kruskal-Wallis test.

四、 結語

SHIRPA 是一種可大量、快速且全面分析小鼠表現型之技術，其分析的項目亦可以進行有系統分析與比較，並獲得初級的表現型分析資料。此外，本技術之應用性相當高，每個項目皆可視為一獨立的表現型操作技術，另又具操作簡易、對動物無傷害性等特點，可於日常飼養時輔助進行動物觀察、選育種、建立基礎資料等，因此 SHIRPA 除用以進行表現型分析外，亦適合第一線之飼育人員與獸醫師應用於日常工作中，是一值得於國內推廣之操作技術。

五、 參考文獻

1. Hatcher JP, Jones DN, Rogers DC, Hatcher PD, Reavill C, Hagan JJ, Hunter AJ. Development of SHIRPA to characterise the phenotype of gene-targeted mice. *Behav Brain Res.* 2001 Nov 1; 125(1-2):43-7.
2. Masuya H, Inoue M, Wada Y, Shimizu A, Nagano J, Kawai A, Inoue A, Kagami T, Hirayama T, Yamaga A, Kaneda H, Kobayashi K, Minowa O, Miura I, Gondo Y, Noda T, Wakana S, Shiroishi T. Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program. *Mamm Genome.* 2005 Nov;16 (11):829-37. Epub 2005 Nov 11.
3. Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome.* 1997 Oct;8(10):711-3. 3.

無菌鼠如何應用於基因表現型分析 -無菌及已知菌動物模式對人類疾病研究的貢獻

黃彥智 博士研究員兼技術服務組組長

財團法人國家實驗研究院實驗動物中心

應用於人類疾病的模式動物(animal models of human diseases)，可維持在無菌(germfree)條件(無菌鼠飼養於 isolator)及給予特定的微生物(gnotobiotics 含目前無法人工培養的常在菌)。我們可以在無菌及定殖(colonization)微生物後，觀察比較不同微生物狀態下，模式鼠疾病的起始與維持，以了解基因表現型的機制。根據文獻及國家實驗動物中心無菌鼠經驗，此動物模式已證明細菌或某些成份，參與自體免疫反應、風濕病、慢性腸炎或誘發腸腫瘤形成(例如：人慢性直腸炎或結直腸癌)。相對地，也發現某些細菌可預防非肥胖糖尿病 (non-obese diabetic, NOD) 鼠發生自體免疫糖尿病。此外，apolipoprotein E 缺陷(*ApoE*^{-/-})鼠餵食低膽固醇標準飼料，有趣的是動脈硬化症(atherosclerosis)發生於無菌條件下竟然比一般(conventional)條件下嚴重，證明有些細菌具有預防或治療疾病的功能。因此，我們可以藉由無菌及已知菌動物模式，進一步探討細菌或其成份干擾動物基因表現型(含疾病變化或疾病預防)作用的分子機制，應用於人類疾病預防與治療。

腹腔性疾病(Celiac disease)

主要是用來描述病人其小腸切片組織中發現不正常發炎細胞(intraepithelial lymphocytes, IEL)浸潤及迴腸黏膜萎縮，若接受不含有麩質(Gluten 存於大麥、燕麥、黑麥)之飲食治療，此種不正常自體免疫反應會消失，病患臨床症狀也會改善。

動物模式： Wistar-AVN rats

將 Wistar-AVN 大鼠於仔鼠初生時，開始長期管餵麩質，會造成 IEL 數量增加、腺窩增生、迴腸粘膜絨毛縮短等病理表現。若將 IEL 接種於無菌大鼠或無菌大鼠餵食麩質(非白蛋白)，在缺乏細菌條件下可產生腹腔性疾病，推測單純食物蛋白即可活化腸道免疫細胞(Stepankova *et al.*, 1996)。

但最近發現接受不含有麩質(Gluten-free)之飲食治療的病人，某些特定部位腸道細菌可以誘發腹腔性疾病(Collado *et al.*, 2009)。也發現 *Escherichia coli* 會促使藉由 gliadin (麩質主要構成的蛋白)活化免疫細胞而誘發腹腔性疾病，但 *Bifidobacteria* 會抑制此反應(de Palma *et al.*, 2010)。

風濕病(Rheumatic diseases)

是波及全身器官的免疫病變，是一種多器官免疫傷害疾病，與遺傳有關，也可能是環境因素造成。病人臨床表現多變，相當複雜。如系統性紅斑狼瘡、類風濕關節炎、硬皮症、多發性肌炎/皮肌炎、血管炎、僵直性脊椎炎(ankylosing spondylitis, AS)...。已知某些腸道菌會誘發風濕性關節炎，如 *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*...，相對地增加抗菌(anti-*Proteus*, anti-*Klebsiella*)抗

體可緩解風濕病(Toivanen *et al.*, 2003, Ebringer *et al.*, 2010)。與遺傳疾病有關的風濕病基因，如 HLA-B27 gene (37%)、HLA-B60、DRB1*0101、CYP2D6...

動物模式一：HLA-B27 transgenic Lewis rat

以基因轉殖技術將人風濕病 HLA-B27 基因轉殖於 Lewis 大鼠。將此基因轉殖大鼠飼養於一般環境下，會自發產生僵直性脊椎炎及結腸炎的表現型，若轉置於無菌條件下，則該基因轉殖大鼠會喪失腸道及關節的炎症變化(Taurog *et al.*, 1994)

動物模式二：K/BxN mouse (KRN/B6 and NOD mice)

將人 KRN TCR 基因轉殖於 B6 小鼠製作 KRN/B6 轉殖鼠，再將 KRN/B6 母鼠與 NOD 公鼠交配產製 K/BxN 小鼠。此基因轉殖小鼠表現型與上述 HLA-B27 基因轉殖大鼠相同。當 K/BxN 小鼠飼養於無菌條件下，自發性關節炎比飼養於一般環境下顯著減輕。實驗亦證明給與抗白介素 17 (interleukin 17, IL-17) 抗體，中和無特定病原(specific-pathogen-free, SPF) K/BxN 小鼠的 IL-17，可預防關節炎發生。因無菌鼠沒有微生物刺激導致免疫構造發育不全或缺乏免疫細胞，進而分析無菌鼠腸壁也缺乏 Th17 淋巴球。當給予 segmented filamentous bacteria (SFB) 單一菌，會使無菌鼠腸壁聚集大量 Th17 淋巴球，很快產生自體抗體造成自發性關節炎，這是第一篇報告單一常在腸道菌(normal intestinal flora, NIF)具有促進特定 Th-cell subset 形成的功能及誘發自體免疫疾病(Wu *et al.*, 2010)。

發炎性腸道疾病 (Inflammatory Bowel Disease)

簡稱 IBD，是一個概括性的名稱，在人是 Crohn's disease 加上 ulcerative colitis 的集合，因其相似性且有時無法區分。在狗可能因為主要症狀不同，又被稱為：慢性結腸炎、腸躁症、淋巴球性漿細胞性腸炎、局部性腸炎、肉芽腫性腸炎或痙攣性腸道症候群。IBD 致病機轉可能與免疫、環境、遺傳因子有關，由於這些因子導致腸道粘膜不斷地重覆發炎病變及修復所造成。但 IBD 確實的病因及致病機轉目前仍不明確。就現有發表的數種自發性腸炎動物模式，推測 IBD 可能與初級(innate)免疫、腸粘膜障壁缺損、T 細胞調控功能異常等，導致慢性腸炎。

動物模式一：IL-2、IL-10、TCR targeted mutant mice

IL-2、IL-10、TCR...等基因剔除鼠(Elson *et al.*, 2005)，會有自發性慢性腸炎的表現型。當把這些基改鼠產製成無菌鼠時，這些疾病表現反而消失不見(Sellon *et al.*, 1998, Dieleman *et al.*, 2004)。相同地，以化學法(dextran sulfate sodium, DSS)誘發 BALB/c 小鼠直腸炎動物模式，在無菌環境下直腸炎表現型遠比飼養在一般環境下症狀顯著輕微(Hudcovic *et al.*, 2001)。

動物模式二：SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells

將 CD45RB^{high} CD4⁺ T cells 接種於免疫缺陷(severe combined immune- deficient, SCID)鼠，並飼養於含有 segmented filamentous bacteria (SFB) 的 SPF 環境下，可產生嚴重自發性 IBD 表現型。相對地，飼養於 SPF 環境下 SCID 小鼠，不具有功能免疫細胞，不會產生腸炎；另一方面，將接種具有 CD45RB^{high} CD4⁺ T cells 的 SCID 小鼠製成無菌鼠、或雖再給予單一 SFB 菌、或雖飼養於不含 SFB 菌的 SPF 環境，仍無 IBD 表現；證明 IBD 必須有特定細菌性抗原及免疫細胞同時參與，才能形成慢性炎症反應，最終產生 IBD (Stepankova *et al.*, 2007)。

胃腸道腫瘤(gastrointestinal cancer)

腸道腫瘤發生與炎症反應有高相關性，特別是 IBD 往往會演變成腸癌，而潰瘍性直腸炎已被確認為導致胃腸道腫瘤發生的因子(McConnell & Yang, 2009)。某些腸道厭氧菌會產生大量致癌物，而活乳酸菌萃提取物可減弱這些致癌物產出。目前已知幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)可造成胃潰瘍、腺癌、胃 B 細胞淋巴瘤。細菌可持續刺激腸粘膜維持免疫活化狀態，協助代謝膽汁及食物。因此，缺乏細菌刺激的無菌鼠，可供作研究細菌在腸癌所扮演角色的有效工具。已有多個實驗室證明：與一般環境大鼠比較，不論自發或誘發腫瘤發生率，無菌大鼠明顯比一般環境大鼠低(Reddy *et al.*, 1975, Sacksteder 1976)。無菌基改鼠腫瘤小與發生率低，推測與無菌鼠的局部或全身性免疫反應未被活化，或活性低所造成；相對地，SPF 基改鼠的腫瘤發生率高且病變表現明顯，可能與免疫活化、慢性發炎、重複發炎刺激有關(Vannucci *et al.*, 2008)。

動物模式一：IL-2、IL-10、TCR targeted mutant mice

同 IBD 模式動物，IL-2、IL-10、TCR...等基因剔除鼠，在 SPF 環境下飼養 3 週，會有自發性慢性腸炎的表現型。約至 6 月齡則陸續發生腸腺癌。相同地，當把這些基改鼠產製成無菌鼠時，IBD 及腸癌疾病表現反而消失不見。有趣的是 Uronis 等發現無菌級 IL-10 基因剔除鼠，餵食 *Bacteroides vulgatus* 單一菌就可直接造成腸炎/腸癌的表現(圖 1)(Uronis *et al.*, 2009)。

動物模式二：mice with disrupted *Gpx1* and *Gpx2* genes

Gpx1 及 *Gpx2* 雙基因剔除小鼠。朱等發現此基改鼠在一般飼養環境下，約 24% 小鼠有自發性腸腺癌。而在 SPF 環境下減少至 9%，當把 3 週齡 SPF 基改鼠移送到一般環境下飼養，則腸腺癌發生率恢復到 27%。若把雙基因剔除小鼠無菌化，則無腸腺癌表現型。相對地，wild-type 小鼠不論飼養在何種環境下皆無腸腺癌表現型(Chu *et al.*, 2004)。該實驗室最近發現是病原性大腸桿菌參與此動物模式的腸癌表現(Esworthy *et al.*, 2010)。

以腸炎/腸癌動物模式為例，由於一般開放飼養條件，這些基改鼠會有嚴重直腸炎/直腸癌表現型，且因肛門嚴重脫出造成繁殖困難，必需採用雜合子配對法(heterozygous breeder pairs, m/+ x m/+)來產製所需基改鼠。期間基改鼠產量少且需遺傳鑑定來保種及維持動物表現型。若將基改鼠改為無菌或已知菌飼養條件，則無症狀並且無保種問題，可直接以 inbred 育種方式(homozygous breeder pairs, m/m x m/m)大量且容易繁殖。當研究者需要時，只要從無菌 isolator 環境移到 SPF 飼育環境，即可獲得具表現型的基改鼠。國家實驗動物中心為服務國內珍貴基改鼠的保種，自 2011 年元月起提供以子宮摘除術建立無菌級基改鼠，除了復育保種外、可適時適量繁殖生產無菌級或已知菌級的基改鼠，並可作為表現型分析比較、確認，甚至於進一步研究表現型的機制。

目前有多位學者參與無菌鼠應用研究，如中央研究院生醫所開發 *ZDhhc13* 基因突變鼠(Saleem *et al.*, 2010)的表現型機制探討。本實驗發現在無特定病原環境下，*ZDhhc13* 基因突變鼠有脫毛、骨質疏鬆、類澱粉症等表現型。但建立為無菌 *ZDhhc13* 基因突變鼠，則喪失所有表現型，若再接觸無特定病原環境 2 週，則再現脫毛等表現型。而 wild-type 小鼠不論在何種環境下

皆無變化。推測需常在腸道微生物或環境菌參與，而能促使 *ZDhhc13* 基因突變鼠表現。

已上是介紹細菌或其成份增強動物基因表現型，達成人疾病動物模式，但無菌化後反而喪失表現型，證明部份基改鼠動物模式的表現型是需細菌參與。相對地，有些無菌鼠的表現型，在飼養 SPF 環境下而無法表現，可能有細菌協助預防此疾病發生有關。這現象可考量衛生假設「Hygiene hypothesis」，David P. Strachan 於 1989 年研究過敏病流行狀況時，發現生長在大家庭的孩子，其花粉熱 (hay fever) 以及接觸性皮膚炎 (eczema) 之罹患比率，小於獨生子女。他提出：「如果兒童在生命早期，就因接觸到兄弟姐妹傳遞的感染病原而致病，而這些疾病又能防止日後的過敏症，那麼我這觀察就得以合理地解釋了。」(Okada *et al.*, 2010)。是否無菌鼠因未接觸任何微生物，而不具耐受性而有疾病表現，但飼養 SPF 環境下，則具有耐受性而減弱或無疾病表現，值得進一步探討。分別舉例說明如下：

第一型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus, T1D)

第一型糖尿病九成與自體免疫破壞有關，有可能是遺傳，也可能是環境因素，是因經自體免疫 T 細胞攻擊破壞胰島 beta 細胞，導致絕對胰島素缺乏，因此被稱為胰島素依賴型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)，由於患者多是兒童、青少年，也被稱為幼年型糖尿病。

動物模式一：Nonobese diabetic (NOD) mice

NOD 小鼠自發性糖尿病(Type 1 diabetes mellitus, T1D) 發生率與動物設施的衛生條件有直接相關。有趣的是，與前述風濕病等自體免疫疾病不同，飼養在一般環境下或感染、經細菌成分免疫的 NOD 小鼠自發性 T1D 發生率很低。相對地，若飼養在相對乾淨的 SPF、ASF 環境、或經抗生素治療、核心種原經淨化復育(rederivation)，則糖尿病發生率增加。甚至無菌級 NOD 母鼠，自發性 T1D 發生率達 100% (Pozzilli *et al.*, 1993, Okada *et al.*, 2010)。推測感染多種細菌、病毒、寄生蟲具有完全預防糖尿病的能力。相同地，結核菌(含佐劑)可預防實驗誘發自體免疫腦脊髓炎(autoimmune encephalomyelitis)，及卵蛋白誘發過敏性氣喘。資料顯示，並不一定要活病原，細菌萃取物就有保護自體免疫疾病的功能(Okada *et al.*, 2010)。台灣阿嬤常說：髒髒養，髒髒大。小孩不要過度保護，是有學術基礎。

除飼育環境會影響 NOD 小鼠 T1D 的表現型外，食物也可能是影響因子。源自天然植物蛋白(非碳水化合物)可增加 NOD 小鼠 T1D 的表現(Hoorfar *et al.*, 1993)。然而前述可誘發腹腔性疾病的麥麩質(Gluten)，卻可明顯降低 NOD 小鼠 T1D 的表現(Funda *et al.*, 2008)。因此，除遺傳因素外，環境因素影響 NOD 小鼠 T1D 的表現非常複雜，可能有多種不同機制。

動物模式二：NOD mice lacking MyD88

由於已證明經細菌免疫的 NOD 小鼠自發性 T1D 發生率很低，Wen 等將辨識微生物刺激初級免疫接受體的抗原蛋白 MyD88 基因，自 NOD 小鼠剔除以產製 NOD- MyD88^{-/-}來驗證阻止細菌訊息傳遞，可否如缺乏細菌刺激的無菌鼠一樣，增加 T1D 發生率。結果發現 NOD- MyD88^{-/-} 基改鼠，飼養於 SPF 環境接受細菌刺激，雖無 MyD88 蛋白質參予訊息傳遞，卻無如預期產生

T1D，即 SPF NOD- MyD88^{-/-} 基改小鼠，無 T1D 表現型。然而產製無菌化 NOD- MyD88^{-/-} 基改小鼠，卻有極嚴重糖尿病表現型。再者，若將無菌 NOD- MyD88^{-/-} 小鼠餵食源自人腸道菌(human associated flora, HAF)，卻明顯減弱 T1D 症狀(Wen *et al.*, 2008)。推測細菌可不經由 MyD88 路徑參予訊息傳遞，而另有其他路徑。本動物模式也證明人常在腸道微生物具有保護糖尿病發生的功能。至於是那些 HAF 或其成分具有保護糖尿病功效，值得進一步研究。

動脈粥狀硬化(atherosclerosis)

好發於動脈的慢性發炎疾病，最終導致病患心臟病及中風。此緩慢且複雜的發生機制是由內皮細胞、血管平滑肌細胞、巨噬細胞、血小板，及其他蛋白質因素如低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein; LDL)、生長因子及細胞激素所共同參與在動脈粥狀硬化形成過程。

動物模式：apolipoprotein E deficient (ApoE^{-/-}) mice

將活化的血小板打入 ApoE^{-/-} 小鼠體內，發現活化的血小板會與白血球（以單核球為主）及內皮細胞作用互相作用，會釋放 RANTES 及 PF4 沈積在單核球及內皮細胞上，並影響單核球細胞 VLA-4 與 VCAM-1-IgG 結合的親和力。此外，反覆的給予活化態的血小板，確實提高 ApoE^{-/-} 小鼠動脈粥狀硬化的程度；但若打入 P-selectin 缺陷的的血小板，則無此現象。這些結果顯示白血球可藉由活化態血小板之交互作用，聚集到發炎的內皮細胞上，而血小板上之 P-selectin 在此一過程當中，扮演了重要的角色(Hou *et al.*, 2003)。

雖然已知動脈粥狀硬化是慢性發炎反復刺激所造成。有趣的是，Wright 等證明 ApoE^{-/-} 小鼠餵食高膽固醇飼料誘發動脈粥狀硬化斑(atherosclerosis plaques, ASP)的形成，竟與感染刺激無關(Wright *et al.*, 2000)。最近才應用無菌鼠驗證此現象，用相同的低膽固醇標準飼料餵食 ApoE^{-/-} 小鼠，發現飼養在一般環境下的 ApoE^{-/-} 小鼠，如預期不發生 ASP；反而在無菌 ApoE^{-/-} 小鼠的主動脈產生嚴重的 ASP。餵食高膽固醇飼料則不論環境皆有 ASP。有趣的是，不論餵食低或高膽固醇飼料，血中膽固醇在一般環境下的 ApoE^{-/-} 小鼠顯著比無菌 ApoE^{-/-} 小鼠低(圖 2)(Stepankova *et al.*, 2010)。證明細菌具有保護動脈避免發生 ASP 的功能。

總之，我們可以藉由無菌及已知菌動物模式，進一步探討細菌或其成份干擾動物基因表現型(含疾病變化或疾病預防)作用的分子機制，應用於人類疾病預防與治療(Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2011)。除了上述疾病模式外，尚有肥胖、腦神經發育、行為學、益生菌、生理代謝、維生素、過敏、免疫學等機制探討，皆可應用無菌及已知菌動物模式。因篇幅限制，歡迎有興趣先進，與筆者連繫。

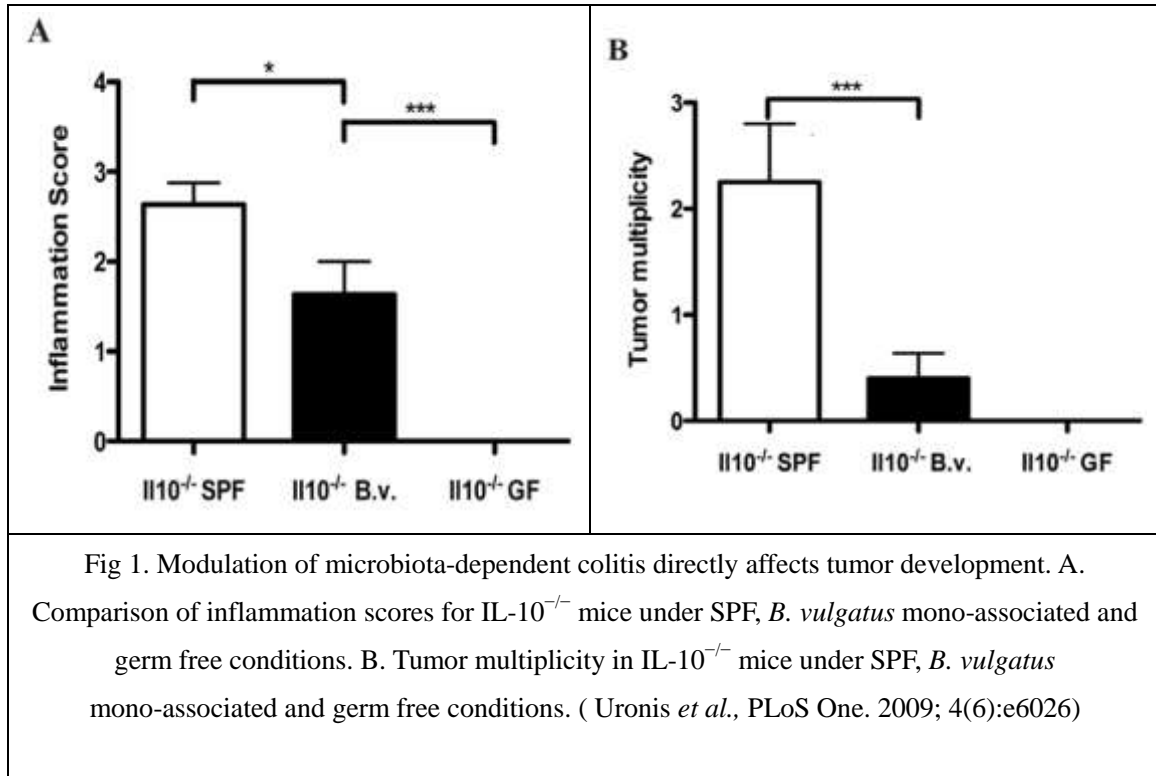
參考文獻：

1. Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshov JH. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted *Gpx1* and *Gpx2* genes. *Cancer Res.* 2004; 64(3):962-8.
2. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009; 62: 264–269.
3. de Palma G, Cinova J, Stepankova R, Tuckova L, Sanz Y. Pivotal advance: *Bifidobacteria* and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *J Leukoc Biol* 2010; 87: 765–778.
4. Dieleman LA, Hoentjen F, Qian BF, Sprengers D, Tjwa E, Torres MF *et al.* Reduced ratio of protective versus proinflammatory cytokine responses to commensal bacteria in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 30–39.
5. Ebringer A, Rashid T, Wilson C. Rheumatoid arthritis, proteus, anti-CCP antibodies and Karl Popper. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 216–223.
6. Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005; 206: 260–276.
7. Esworthy RS, Smith DD, Chu FF. A Strong impact of genetic background on gut microflora in mice. *Int J Inflam.* 2010(2010):986046.
8. Funda DP, Kaas A, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 59–63.
9. Hoorfar J, Buschard K, Dagnaes-Hansen F. Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Nutr* 1993; 69: 597–607.
10. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, *et al.* Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003; 9(1):61-7.
11. Hudcovic T, Stepankova R, Cebra J, Tlaskalova-Hogenova H. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiol (Praha)* 2001; 46: 565–572.
12. McConnell BB, Yang VW. The role of Inflammation in the pathogenesis of colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2009; 5: 69–74.
13. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol.* 2010; 160:1-9

14. Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world—recent facts and figures. *Immunol Today* 1993; 14: 193–196.
15. Reddy BS, Narisawa T, Wright P, Vukusich D, Weisburger JH, Wynder EL. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res* 1975; 35: 287–290.
16. Sacksteder MR. Occurrence of spontaneous tumors in the germfree F344 rat. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57: 1371–1373.
17. Saleem AN, Chen YH, Baek HJ, Hsiao YW, Huang HW, Kao HJ, *et al.* Mice with alopecia, osteoporosis, and systemic amyloidosis due to mutation in *Zdhhc13*, a gene coding for palmitoyl acyltransferase. *PLoS Genet.* 2010; 6(6): e1000985.
18. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5224–5231.
19. Stepankova R, Powrie F, Kofronova O, Kozakova H, Hudcovic T, Hrnecir T *et al.* Segmented filamentous bacteria in a defined bacterial cocktail induce intestinal inflammation in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1202–1211.
20. Stepankova R, Tlaskalova-Hogenova H, Sinkora J, Jodl J, Fric P. Changes in jejunal mucosa after long-term feeding of germfree rats with gluten. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 551–557.
21. Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, Nedorost L, Rossman P, Poledne R *et al.* Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 796–804.
22. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL *et al.* The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180: 2359–2364.
23. Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, *et al.* The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011; 8(2):110-20.
24. Toivanen P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 807–811.
25. Uronis JM, *et al.*, Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 2009; 4(6):e6026.
26. Vannucci L, Stepankova R, Kozakova H, Fiserova A, Rossmann P, Tlaskalova-Hogenova H. Colorectal carcinogenesis in germ-free and conventionally reared rats: different intestinal environments affect the systemic immunity. *Int J Oncol* 2008; 32: 609–617.
27. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC *et al.* Innate

immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455: 1109–1113.

28. Wright SD, Burton C, Hernandez M, Hassing H, Montenegro J, Mundt S *et al.* Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *J Exp Med* 2000; 191: 1437–1442.
29. Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y *et al.* Gut-residing segmented



filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010; 32: 815–827.

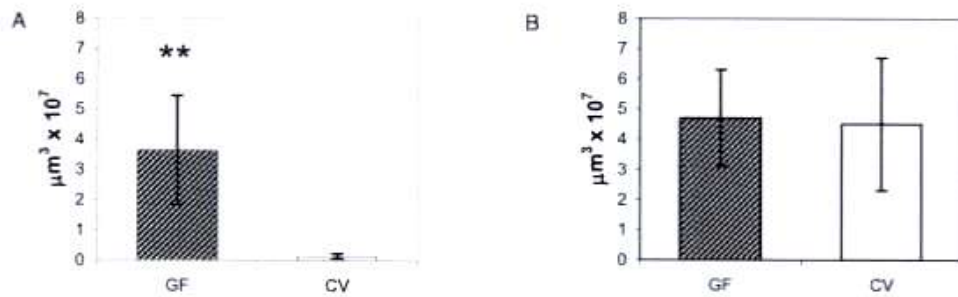


Fig. 4. Volume of an atherosclerotic plaque.

Estimated volume of atherosclerotic lesions (estV μm^3). The results are expressed as the means \pm SEM

A) Breeding on a low cholesterol diet GF ($n=5$) and CV ($n=6$). Statistical significance: GF versus CV (** $p < 0.001$)

B) Breeding on a hypercholesterol diet - GF ($n=8$) and CV ($n=6$). NS (not significant)

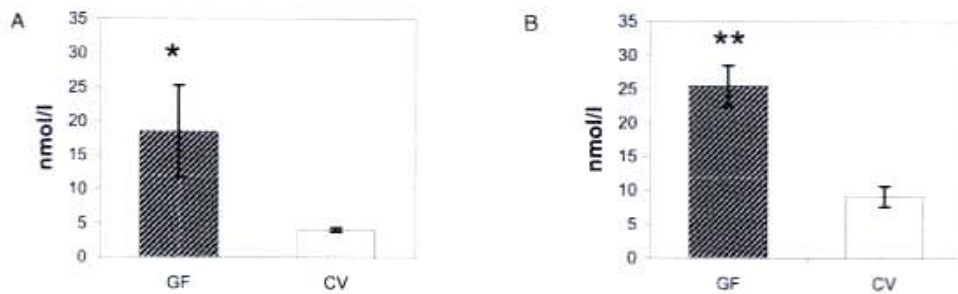


Fig. 5. Quantity of cholesterol in sera nmol/L.

The results are expressed as the means \pm SEM

A) Low cholesterol diet GF ($n=5$), CV ($n=6$) (* $p < 0.05$)

B) Hypercholesterol diet GF ($n=8$), CV ($n=6$) (** $p < 0.001$)

Fig 2. Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in *ApoE*-deficient mice fed standard low cholesterol diet. (Stepankova *et al.*, *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 796–804.)

小鼠病理表現型分析策略(I)

梁鍾鼎博士 副研究員

財團法人國家實驗研究院實驗動物中心 首席獸醫師

前言

廣義的說，表現型分析包括了臨床觀察、行為學、形態學、生理及細胞學變化，這些變化最可能受遺傳性影響，但也可能受任何實驗因子操弄，這些包括飼養條件、藥物、感染、物理或外科手術等因子 (Brayton et al.,2001)。如果時間許可，未來將陸續介紹表現型分析相關報導或論文。

策略

病理表現型 (Pathologic Phenotyping) 是分析遺傳改造小鼠 (Genetically Engineered Mice, 以下簡稱 GEM) 很重要的一項方法。分析正常遺傳改造組之初生仔鼠如果完全沒有 GEM 同型基因型動物出生，可能表示有胚胎致死性。注意離乳前各種基因型同窩仔鼠之生長、監測體重、是否公母性別有異常。最簡單的方式是拿一隻鉛筆，將小鼠放在上面，觀察其反應是否異常。檢查上下腭門齒是否有齒型不整 (malocclusion)。有些遲發性表現型，動物可能要至 1-2 歲齡才能觀察出異常。觀察這些老化 GEM 表現型時，正常 (wild type) 及 GEM 小鼠的公母數目須維持在相同，因為老年性表現型分析，小鼠常因其它突變以外的原因死亡，有些表現型如淋巴瘤好發於公鼠等。如果你發現某一項異常表現型病變或症狀時，繼續追蹤或觀察下去，儘可能在動物接近死亡或瀕死狀態前進行完整病理解剖。即使是突發死亡的情況，如果沒有死後變化，也要儘量收集檢體。

表現型如果不是在每一隻 GEM 同型基因型小鼠、同一年齡層皆發展出類似病變時，是最令人挫折的。此時必須對不同年齡的小鼠進行解剖及組織病理檢查。但病變輕微時有時不一定能看出差異。越是如此，越需要解剖各種不同年齡層的動物。但基本上在初期的動物解剖及組織病理檢查不需要具統計分析顯著之數目，僅需要少量的動物。

在突變動物病理表現型分析常假設某一表現型是由一個基因改變所造成，其實不然。環境及健康狀況常會造成表現型因動物品系不同而有截然不同的結果。最有名的例子是炎症性大腸炎模式，IL-10 基因剔除之突變鼠，其盲腸及末端結腸之大腸炎病變會因螺旋桿菌 (*Helicobacter spp.*) 感染而更加嚴重 (Burich et al.,2001)(圖 1)。一旦找出某一項表現型病變時，必須蒐尋資料，找出這項表現型在所有動物及人類的研究論文，比較其異同點及病變之細微變化。但常常犯的錯誤是將一些非特異的病變例如小鼠的肝臟壞死 (hepatic necrosis)，當作是大發現，如果稱之為人類疾病的肝臟壞死模式，別人會誤會此二同名的病變致病機制是相同的，實則不然。

病理解剖及組織採樣需要有標準操作程序 (SOP)，不管你使用那一種解剖方式，有些原則是不變的，例如肺臟及消化道解剖時要先做灌流固定 (infusion) 動作，進行組織病理檢查之屍體絕不可以先冷凍。有些器官 (肝臟、脾臟、心臟、左右腎) 最好

能在新鮮狀態下分別稱重，每一種基因型動物皆需稱體重；如果要進行心臟灌注(perfusion)，則所有器官之重量及體重會有所改變。避免人為因素造成之偽性病變(artifact)，例如腦部在固定之前不當之接觸壓力或解剖時間太久，常造成神經元之嗜鹼性皺縮神經元 (dark shrunken neuron)(Jortner, 2006)；或神經組織放在酒精中固定太久，造成白質或神經氾空泡化 (white matter or neuropil vacuolation)。

組織整修有一定的厚度及方向，一般在 0.3-0.4 公分厚，且想要切的切面或病變朝下放在組織包埋盒 (cassette) 中。因為如果不是如此，每一切片的厚度只有 4-6 μm ，所以往往不易切出病變。特殊染色可以輔助傳統 HE 染色的不足。臨床血液生化分析、血液學及免疫化學染色(Immunohistochemistry, 簡稱 IHC)也是很重要的病理表現型分析工具之一。但是在應用這些工具時，一定要有基本的概念，例如某些抗體在進行 IHC 染色時，其辨認勝肽的能力是非特異性，會與其它蛋白質呈交叉反應。因此陰性對照是很重要的；一種是其它非相關基因剔除的動物組織陰性對照；另一種則是不加初級抗體進行 IHC 染色的陰性對照。因此最好能同時切一批連續切片，反覆對照 IHC 陽性部位及 HE 染色相對部位，才能確認這些訊號是否有意義。如果 HE 與 IHC 結果不一致時，先捨棄 IHC 的結果，重新檢討抗體濃度是否合宜？是否使用 MOM 染色套組去除非特異性反應？抗原復原過程是否完全？如果小鼠來源單株抗體所辨識之蛋白質太過特異性，IHC 染色呈陰性。可考慮先用兔多株抗體做組織 IHC 染色，如果染色呈陽性，再縮小抗體染色辨識範圍。

實驗隻數

一般而言，每個性別、基因型或年齡層需要 4-10 隻小鼠。如果測試條件有測量上變異或誤差，則需要多一點動物。公母鼠隻數最好相等，如果能使用同窩或同一品系的正常對照組最好。如果對照組與遺傳改造 GEM 組差異越大，則所須分析的隻數越多。進行表現型分析之實驗設計，同表 1。必須要注意的是使用同品系對照組，仍有可能有品系內變異，而影響表現型分析結果。當樣本數小於 30，且結果不是呈常態分佈者，常有偏差結果產生(Zeiss et al., 2011)。

早期胚胎死亡

胚胎(E) 12.5 日齡是一般建議研究胚胎致死性的起點(Papaioannou and Behringer, 2011)。如果子代數目比例是 GEM 雜合子與正常對照 2:1，完全沒有 GEM 同型合子，表示有胚胎致死性表現型存在。如果所有子宮著床點(implantation)皆是正常或 GEM 雜合子，表示致死性發生在著床 4 天以前，所以沒有造成蛻膜(decidua)的腫大。如果子宮可見蛻膜腫大，但卻找不到胚胎，表示胚胎死亡於著床前後期(E4.5—E5.5)。如果有些著床點是含少量退行性組織，表示胚胎是死於著床之後，但在絨毛膜尿囊(chorioallantoic)胎盤前後期，約 9.5 日齡。

如果胚胎在 12.5 日齡，分不出正常及 GEM 胚胎的差異，那更後期的胚胎死亡是有可能的。但要注意的是不是每一個異常死亡或空的蛻膜組織皆是突變所致。著床後(E5.5—E12.5)胚胎死亡的原因很多，主要是胎盤功能障礙間接導致胚胎生長遲緩及死亡。其它原因包含滋養體分化增生及功能異常，尿囊膜(allantois)無法與絨毛膜(Chorion)癒合等。另一個常見的原因是心血管功能不全，間接導致心臟、血管發育缺陷。造血功能缺陷可能發生於卵黃囊(Yolk sac)或胚胎的肝臟造血功能。所以此類表現型可見胚胎蒼白缺乏血液，肝臟較小。重要的是在這些形態學表現型異常之

前，某些胚胎或胎兒的體內分子表現型已異常，可利用如原位雜交(ISH)，免疫化學染色(IHC)等技術加以分析。

死亡原因分析(正常與 GEM)

在評估 GEM 老化研究中，很重要的一項數據是存活及死亡原因分析，必須要比較 GEM 及背景品系正常對照組其壽命長短，腫瘤種類及發生率，主要器官之退行性病理變化及其它臨床病理數據。

正確的結果判讀

許多發表於著名期刊之表現型分析結果，病理部份的結果可能是錯誤的。如同下表 2 數據顯示（2 篇不同論文研究同一種藥物）。分析某藥物之致癌性病理報告，使用盲樣分析法(blind)論文所得到之前胃潰瘍病變在對照組、低劑量組、高劑量組發現高劑量組易誘發胃潰瘍；反之已知組別差異(informed)的論文，其分析結果認為高劑量組，其胃潰瘍組發生率比其它組別差異不大(2,7,9)。

使用盲樣分析法，發現在三個組別間，前胃因藥物誘導而產生的腫瘤沒有組間差異(0,1,0)，但另一篇已事先知道組別差異的論文，則一面倒地的認為高劑量藥物誘導前胃良性腫瘤之發生率較高（對照組、低劑量組、高劑量組腫瘤頭數依次為 2,14,29）。以上可知這篇已事先知道組別差異的論文，刻意在強調某藥物高劑量誘發前胃腫瘤之發生率，但却忽略高劑量組誘發胃潰瘍比例之可能性(表 2) (Holland und Holland, 2011)。我們在判定原始對照品系，異型合子基因型及同型合子基因型之病理表現型時要留意。

(未完待續)

參考資料

1. Burich A, Hershberg R, Waggle K, Zeng E, Brabb T, Westrich G, Viney JL, and Maggio-Price L. Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G764–G778,2001.
2. Brayton C, Justice M., Montgomery CA. Evaluating mutant mice: anatomic pathology. *Vet Pathol* 38: 1-19, 2001.
3. Holland T, and Holland C. Unbiased histological examinations in toxicological experiments (or, the informed leading the blinded examination) *Toxicol Pathol* DOI: 10.1177/0192623311406288, 2011.
4. Jortner BS. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. *Neurotoxicology* 27 : 628–634,2006.
5. Papaioannou VE and Behringer RR. Early embryonic lethality in genetically engineered mice: diagnosis and phenotypic analysis. *Vet Pathol* DOI: 10.1177/0300985810395725, 2011.
6. Zeiss CJ, Ward JM and Allore HG. Designing phenotyping studies for genetically engineered mice. *Vet Pathol* DOI: 10.1177/0300985811417247, 2011.

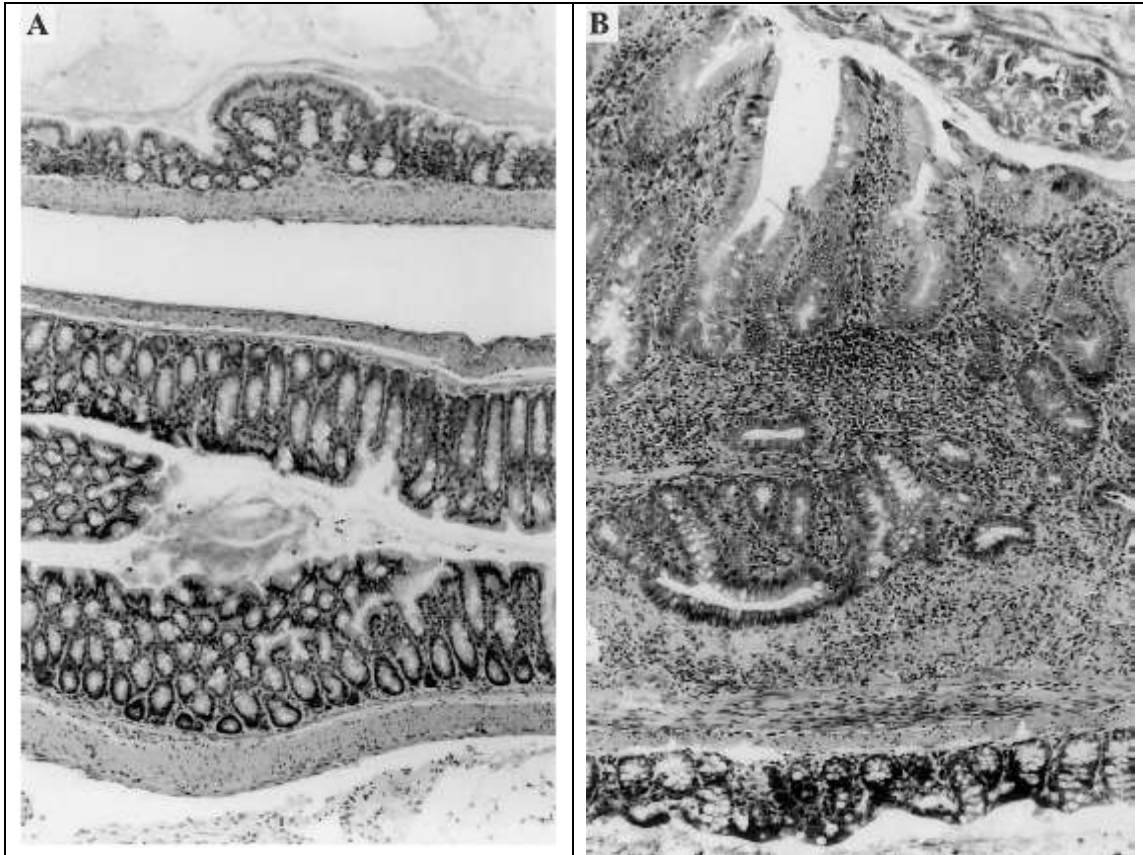


圖 1. 炎症性腸炎實驗。圖 A 為 IL-10 剔除(C57BL/10J IL10^{-/-})小鼠，沒有人工感染螺旋桿菌 (*H. bilis*) 12 週後之末段結腸，無腸炎病變；圖 B 為 IL-10 剔除小鼠，人工感染螺旋桿菌(*H. bilis*) 12 週後之末段結腸，腸炎病變程度顯著嚴重。(Burich et al.,2001)。且正常對照品系 (C57BL/10J)感染螺旋桿菌(*H. bilis*) 12 週後，末段結腸亦無腸炎病變。

表 1. 進行表現型分析之實驗設計

<ol style="list-style-type: none">1. 假說<ol style="list-style-type: none">1-1 實驗結果可以統計方式加以驗證?1-2 實驗方式與最終結果之關連是否界定?2. 動物變數<ol style="list-style-type: none">2-1 動物的隻數、年齡、性別、背景品系及來源說明清楚?2-2 飼養管理條件如飼養方式、光照條件、飼料、健康狀況、獸醫照顧條件說明清楚?3. 實驗設計<ol style="list-style-type: none">3-1 實驗方式是否加以界定?3-2 對照組及實驗組之定義是否與實驗方式相關?3-3 對照組與實驗組除了在實驗方式之外，其餘條件類似?3-4 對照組動物隻數是否能符合統計上雙尾或單尾檢定?3-5 是否有動物隻數計算之說明?3-6 是否在測試時，為盲樣測試3-7 隨機採樣的原則，是否描述?3-8 是否有記錄結果之方式或技術?3-9 如果表現型與老化或動物疾病有關，是否有人道終止的計劃?4. 分析方法<ol style="list-style-type: none">4-1 測試假說的統計方法是否恰當?4-2 結果是否滿足(符合)測試本身的假設?4-3 有任何其它方法可以分析小規模或線性分佈的數據?4-4 測試所得結果本身是否獨立，如果不是，是否有修正方式?4-5 是否所有動物皆包含在分析中，如果不是，必須說明理由?5. 報告<ol style="list-style-type: none">5-1 樣本數，結果分佈及變異數分析是否包含在報告中?5-2 每一項分析的單位是否說明清楚?5-3 如果結果相關，是否能解釋?5-4 如果統計差異顯著性，是否能提供 <i>P</i> 值?5-5 是否能在圖表中，表示誤差範圍?5-6 動物命名是否正確?5-7 外在變異之可能性有多大?(由不同實驗室重覆進行實驗之結果)
--

(Zeiss et al.,2011)

表 2. 以 F344 大鼠進行某毒物對胃黏膜潰瘍及腫瘤發生率之病理分析結果

	Method	Control group	Low dose	High dose
Forestomach ulcers	Blind	2	8	17
	Informed	2	7	9
Forestomach benign tumors	Blind	0	1	0
	Informed	2	14	29

(Holland und Holland, 2011)



建國飛

生技建基夢想起

第五十八屆日本實驗動物學會 (JALAS) 年會與會
心得報導



第五十八屆日本實驗動物學會(JALAS)年會與會心得

2011年6月29日

國立清華大學化學工程學系博士班研究生 林進裕

會議資訊

Congress: The 58th Annual Meeting of Japanese Association for Laboratory Animal Science.

President: Hiromichi Yonekawa, Ph.D.

Date: May 25th (Wed) - May 27th (Fri), 2011.

Venue: Tower Hall Funabori, 4-1-1 Funabori, Edogawa-Ku, Tokyo 134-0091, Japan.

與會雜感

一切故事的開端要從清華大學實驗動物中心開始說起。不曉得哪一天開始，動物房的入口張貼了一張醒目的「4th AFLAS Congress Meeting」的海報。詢問過楊明彬獸醫師後，決定投稿試試看囉！孤陋寡聞的我，也從沒聽過這會議，也或許是因為唸化工科系的原因，若不是論文裡有動物實驗的關係，大概也沒有機會參加此AFLAS盛會。而來到了報告當天，帶著忐忑不安的心情進入國際會議中心。我是第一個報告的學生，自然沒什麼比較的對象。而座長分別是中興大學的毛嘉洪院長與鄭旭辰教授，問了我很多問題，當然我也有吃驚答不出來的時候，當下覺得完了。再者，聽過其他學生的報告之後，覺得在座的許多同學真的都是臥虎藏龍、高手雲集，所做的研究也都相當精彩傑出。然而，最後在會員大會公布獲獎名單時，由於演講時座長們的青睞，我意外的獲取了第一名，得以受學會推薦去日本參加此次的JALAS年會。

參加JALAS年會前，余俊強理事長也不停的幫我聯繫以及寫推薦書。學會的張維正秘書長也抽空聽取我即將於JALAS年會報告的簡報練習，給予我許多相當寶貴而且真誠的建議。讓我不僅於此次的JALAS年會報告受用，更多於往後的演說或報告機會裡可以應用得到。在張秘書長修正過我的簡報後，以及秘書張瑋玲小姐給我洪志駿理事的日本聯絡電話後，我即隻身前往日本了。飛機上我當然還是不停的練習我要演說的簡報，俾使其臻至完美、演說流暢，在有限的時間內，把一篇論文講得大家都聽得懂。

日本人的做事態度以及待人的方式，我相信不用我說大家也都知道或耳聞過。唯獨讓感到我好奇的是，我是在日本經歷過此次的福島千年大地震之後，來到這個離受創災區很近的東京。不曉得他們昔日的繁榮是否仍在？是否會見到如台灣921大地震後，滿街的帳棚景像？是否因為恐懼核災，而東京的人民變得驚慌，秩序變得雜亂？是否我會倒楣的遇到地震？是否東京會出現暴動...？這一切的猜想在我不安的出了成田(Narita)機場，平順的搭上京成電鐵(Keisei Skyliner)，東問西找的情況下找到馬喰橫山駅(Bakuro-yokoyama Station)附近的便宜飯店後，一切一切的猜

想都化為烏有。東京人民依舊守秩序、馬路上的汽車不慌亂、市集裡頭的人們依舊笑容可掬，沒有帳篷，大型賣場依舊人聲鼎沸，服務人員依舊親切迎人。東京似乎沒變，唯一改變的就是限電措施吧！

我懷著一點點的疑問先去 JALAS 會場報到再說。會議的重頭戲在第二天才開始，我們來自各國的代表在 JALAS 會員大會裡頭接受表揚，而我的演說則是排在



來自各國的代表於 JALAS 會員大會上接受表揚

第三天的早上。這樣的場合更令我感覺到我自己的渺小，我們站在世界的舞台上，真的是小到不能再小。有多少巨人站在我們前方，我們的競爭對象，絕對不僅止於小小台灣島內的同領域夥伴們。而是更須放眼國際，跟國際上這些頂尖的人才同相抗衡。

我要感謝我的指導老師 胡育誠教授對於論文研究上的悉心指導。此次我的報告內容是 **Baculovirus-Engineered Mesenchymal Stem Cells Heal the Critical-Sized Femoral Segmental Bone Defects in Rabbits**。我們應用基因重組桿狀病毒攜帶骨生長刺激因子 cDNA，轉導紐西蘭兔骨髓間葉幹細胞(BMSCs)，並且同種異體(allogeneic)移植到紐西蘭兔的股骨大範圍缺陷，可以成功修復癒合此應力承受區域骨的大範圍缺陷。研究中我們並用許多分子影像技術與電腦斷層方法，分析骨缺陷修復的狀況。我報告的場次座長是池田卓也(Takuya Ikeda)先生，他是日本 Charles River 公司的副社長，Charles River 是世界上最大的動物培育、育種與研究中心，他們也開發了許多的基因轉殖動物，目前也已經發展為一成功的跨國企業。Ikeda 先生更是對於我使用的動物模式感到好奇，會後與我討論一些將來大型動物模式的建議與交換名片予我。未來有機會的話，倘若我進展到大型動物實驗的話，或許可以請教一些更寶貴的意見。

我也要感謝與我參加會議的洪志駿理事，對我在日本當地的照顧，使我在這英語不是那麼受用的環境裡，可以感到稍微舒坦一些。此次的 JALAS 年會，因為算是日本當地的國內型會議，所以他們的溝通與報告語言幾乎全是用日語。我並不熟稔日語，僅能從報告的簡報與摘要字裡行間猜測一些他們的研究成果。而因為本身日本的市場夠大，所以會場參展的廠商非常多。參加次會議的日本研究人員相當多，報告的題目也是包羅萬象。此外，會議中認識一些人，包括吉木淳(Atsushi Yoshiki)先生，是日本 RIKEN BioResource Center, Experimental Animal Division 室長，我也與他談了許多動物實驗的經驗。日本 FujiFilm 研究事業部的陳忠正先生，與他訪談更近一進步了解許多目前使用於動物實驗的分子影像試劑與未來發展。

最後，我也和與會的一些日本學者談到大地震的事。我體悟到他們對於國家認同感之深切，愛這個國家、愛這片土地，國家有難，他們不知逃往何方也沒想過逃去哪裡。每個人盡本分，將屬於自己扮演的一小根螺絲釘給盡全力扮演好，這就是日本人。一路走來，還有許多人我需要感謝。真的，出了國門才知自己渺小，我還有許多待努力的地方。



建國飛

生技建基夢想起

學會 2011 年會務



中華實驗動物學會第十一屆第五次理監事會議紀錄

時 間：民國一百年二月十日（星期四）上午十時整
地 點：國家實驗動物中心 B1 小會議室
主 席：余俊強 理事長 紀 錄：張維正 秘書長

出席人員：理 事—王明升、王銘富、王繼廣、方柏雄、廖欽峰、
洪昭竹、洪志駿、梁善居、張秀鑾、陳炯東、
萬灼華、蔡倉吾、蔡清恩、鍾昆金。

監 事—方美佐、張家宜、張秀鳳、梁鍾鼎、陳振忠。

請假人員：毛嘉洪、林宗德、林子恩、吳文勉、李勇陞、廖俊旺、
劉福華、莊秀琪。

壹、 主席致詞：略

貳、 會務報告：

1、會員狀況（詳附件一）P.5 - P.6。

110 位會員三年未繳會費者，已依會員大會決議，予以執行除名，並完成會員資料更新。略

2、第四屆亞洲實驗動物學會聯盟大會財務報告(詳附件二) P.7 略

3、99 年度學會財務報告（詳附件三）P.8。略

4、100 年 1 月份學會財務報告(詳附件四) P.9。略

5、99 年農委會各計畫結案報告。略

(1)農委會補助案-推動動物保護計畫(已印成冊，待 2 月中結案)。

(2)農委會委辦案-查核輔導(已結案)。

(3)農委會委辦案-生醫畜禽(完成 3/4 年度計畫成果結案)。

(4)與台大合作案-實驗用畜禽之生醫用途研究及品質驗證制度之建立計畫(完成 1/3 年度計畫成果結案)。

(5)翻譯「實驗動物福祉-評估並緩解實驗動物的疼痛與評估」並列印成冊，於 99 年 11 月 AFLAS 上發送會員。

6、2011年 JALAS 將由 2010 AFLAS 口頭論文第一名得獎者-林進裕 先生，出席領取“日本實驗動物學會論文發表國際獎”。略

參、100年農委會計畫提案申請：

1、農委會補助案-推動動物保護計畫：

(1)實驗動物管理監督報告及犬貓猿猴類動物使用申請審查費。

(2)實驗動物人道管理中文年報。

提報計畫預算總金額\$1,436,000 元。

2、農委會委辦案-查核輔導：

(1)完成 100 年度經農委會指定之 40 場次動物科學應用機構進行查核輔導及評比作業。

(2)舉辦行前會議暨訓練，以建立查核小組成員共識及提升專業水準，並於查核輔導全程結束後評比暨檢討會議。

(3)審查評比為較差機構之書面複審改善資料。

提報計畫預算總金額\$1,200,000 元。

3、農委會委辦案-生醫畜禽：

提報計畫預算總金額\$3,040,000 元。

4、與台大合作案-實驗用畜禽之生醫用途研究及品質驗證制度之建立計畫：提報計畫總金額\$700,000 元。

肆、提案討論：

提案一、為籌畫辦理第四屆亞洲實驗動物學會聯盟大會，學會與動物中心共同聘用張家脩小姐協助辦理相關業務推動，99 年度薪資之支付 1 月份至 7 月份由學會負擔，8 月至 12 月則由動物中心支付。有關該員在學會服務期間之年終獎金，擬請同意依任職月份比例核發，請討論。

決議： 同意通過此一提案。

提案二、為使學會業務得以永續推動，擬請同意調整執行秘書楊青青小姐薪資，請討論。

說明：

1. 楊青青小姐於 95 年起至學會擔任會計，協助學會處理預算帳務等業務。在學會任職 5 年期間，其業務職掌從會計帳務逐年調整變更至目前所擔任多元性質之職務，業務內容包括：

- 農委會計畫撰寫、監督執行及結案報告等業務
- 兼辦會計出納業務
- 人事管理
- 協助辦理例行業務與年會活動籌備等事宜

2. 楊青青小姐在學會任職期間，處事積極，任勞任怨，對學會業務均能戮力以赴，成效卓著。

3. 擬請同意調整執行秘書楊青青小姐薪資，以資鼓勵。

決議：理監事會同意執行此一調薪案，並授權由理事長與楊青青小姐討論工作內容後，決定薪資調幅及金額。

提案三、原常務監事劉文彬先生轉任學會研究員，由莊秀琪小姐遞補監事職缺，並請 7 位監事，於本次會議依學會章程選舉一名常務監事。

決議：應到監事 7 名，實到監事 5 名。

投票結果如下：

方美佐 1 票

張秀鳳 2 票

陳振忠 1 票

梁鍾鼎 1 票

由張秀鳳監事出任常務監事職缺。

提案四、2011 年年會籌備會議分工，提請討論。

決議：

學會 2011 年各委員會總召集人及委員名單

項 目	總 召 集 人	委 員
褒獎委員會	陳炯東	
學術委員會	蔡倉吾	萬灼華、梁鍾鼎、廖欽峰
出版委員會	張秀鑾	

決議：

2011 年會員大會各小組成員及職掌

組別	成員	職 掌	預定完成時程
褒獎委員會	陳炯東	1.遴選實驗動物科學模範 從業人員及表揚	10 月
學術(外賓 接待)組	萬灼華 梁鍾鼎 廖欽峰	1.演講主題構想擬訂 2.演講者推薦與邀約 3.論文摘要、演講摘要等 截稿 4.主持人安排連絡 5.論文評審委員之遴選 6.大會所有內容之確定 7.國內外來賓邀約、接待	5 月 6 月 7 月邀稿 ;9 月完成 7 月 7 月 8 月
招商組	陳振忠 鍾昆金	1.廣告邀約截稿 2.贊助者及贊助攤位廠商 邀約	7 月開始邀稿 ; 9 月截稿 9 月完成

秘書處	1. 會場規劃佈置圖 2. 海報及宣傳資料製作完成 3. 海報及宣傳資料寄發 4. 年會報名 5. 大會手冊截稿、編排與印刷	7月 9月 9月 9月 10月
-----	--	-----------------------------

提案五、今年會員大會適逢選舉第十二屆理監事，是否請會員繳交積欠會費，

始享有理監事選舉權，請討論。

決議：秘書處將事前轉知會員此一規定。並於今年度會員大會提出修改章程。

伍、臨時動議

中華實驗動物學會第十一屆第六次理監事會議記錄

時間：民國一百年五月二十三日（星期一）下午二時整
地點：國家實驗動物中心 B1 小會議室
主席：余俊強理事長 紀錄：張維正秘書長

出席人員：理事—王繼廣、方柏雄、林宗德、林子恩、洪昭竹、
梁善居、萬灼華、蔡倉吾、蔡清恩、劉福華、
鍾昆金。

監事—方美佐、張家宜、張秀鳳、梁鍾鼎、陳振忠。

請假人員：王明升、王銘富、毛嘉洪、廖欽峰、吳文勉、洪志駿、
張秀鑾、陳炯東、廖俊旺、李勇陞、莊秀琪。

壹、 主席致詞：

貳、 會務報告：

1. 會員狀況（詳附件一）P.3 - P.4。略
2. 100 年 2 至 4 月份學會財務報告(詳附件二) P.5-P.7。略
3. 本會 100 年度承接政府經費專案計畫共下列 4 項：略
 - (1)委辦案-查核輔導、生醫畜禽及台大科專計畫。
 - (2)補助案-推動動物保護計畫。
4. 100 年農委會生醫畜禽及台大科專計畫進度報告-專案助理王俊欽報告。略
5. 農委會委辦案-今年度查核輔導工作事項：略
 - (1)訂定 SOP，標題如下：
 - A.農委會標案投標標準作業程序書
 - B.遴選年度受查單位標準作業程序書
 - C.行前安排標準作業程序書
 - D.查核小組成員執掌
 - E.查核輔導行程變更標準作業程序書
 - F.綜合評述表撰寫標準作業程序書
 - G.查核小組成員現場開立缺失標準作業程序書
 - H.查核輔導評比標準作業程序書

(2)查核標準擬訂-方美佐主任報告。

決議：請劉文彬研究員將最終討論之查核標準附件
mail 予各理監事，並請各理監事協助給予建議。

(3)本年度查核小組成員建議名單（詳附件三）。略

6. 100年10月8日應消化系內視鏡醫學會邀請舉辦專題演講，排定課程

如下：

(1)法規

(2)計劃書撰寫

(3)動物研究設施概論

(4)實驗用豬隻應用介紹、照護與管理、手術準備

(5)廢棄物處理

(6)研究者實驗動物照護之執掌與義務

7. 6月16日、6月17日假中央研究院人文社會科學館舉辦
「實驗動物手

術照護研討會」。

目前報名狀況-會員報名人數：98人

非會員報名人數：203人

總計報名人數：301人。

叁、提案討論：

提案一、會員大會籌備進度報告-由年會籌備工作小組分別於
4月14日、5月9日召開工作小組會議。目前已完
成場地、時間、大會議程等初步規劃。請理監事就
下列議題進行討論：

1. 場地遴選、經費預估表：略

2. 會員大會報名費收費：

建議可收費300元

可享有權利：

(1)參加兩天大會會議議程

(2)午餐、點心

(3)大會贈品：書籍、提袋

(4)晚宴(是否另行收費)

3. 會員大會學術活動規劃進度-蔡倉吾理事報告

4. 會員大會將於中研院人文館舉辦

該場地 12 月初僅剩 12 月 5.6.7 日能租借，

會員大會舉辦時間是否更改為 12 月 5、6 日或
12 月 6、7 日舉行？

5. 會員投票資格訂定於今年會員大會決議是否變更章程與會會員過半數通過(以往是以實際會員過半數)？

決議：今年度將於 12 月 6 日、7 日舉行會員大會；會員大會延續往例不另行收費；晚宴於第二天下午五點舉行至晚上七點，會員收費 200 元、非會員收費 600 元，並舉辦摸彩；學術議程請年會工作小組會議召集人蔡倉吾理事規劃安排，並將草案轉理監事參閱。洪昭竹常務理事建議向人文所爭取免費停車優惠。會員投票資格將於今年度會員大會上提出修改章程內容，修改為「選舉理監事將以當年度實際繳費人數，過半數投票之同意行之。」因，原為章程之規定，需於會員大會提出並經所有會員通過才可以執行。故將列入今年會員大會的議題，如下：

原學會章程：

第十九條 會員（分區選舉會員代表）大會之決議，以會員（會員代表）過半數之出席，並經出席人數過半數之同意行之。但左列事項之決議以出席人數三分之二以上同意行之。

修改後學會章程：

第十九條 會員（分區選舉會員代表）大會之決議，以當年度實際繳費人數，過半數投票之同意行之。但左列事項之決議以出席人數三分之二以上同意行之。

提案二、行政院農業委員會來函-善待動物組織建議我國醫學大學以替代方案取代活體動物教學相關資料。請理監事評估其推廣應用於國內相關醫學大學之可行性，俾作為未來農委會建請相關單位推廣應用之參考。

決議：本案擬建議主管機關以年度專案計畫方式進行國內醫學大學教學現況及未來替代案之需求評估，本會可配合主管機關進行該計畫之執行。

提案三、說明：本會目前為 AFLAS 及 ICLAS 會員，AFLAS 不需繳交年費、學會於 96 年 9 月 5 日開始繳交 ICLAS 2004-2008 費用，平均一年為新台幣 6618 元、2009 年及 2010 年繳交美金 264 元，今年度繳交之費用為 212 歐元，新台幣 9275 元。另。今年度美國 AALAS 公開徵求 Global Partnership Membership (詳附件四-略)。本會是否考慮加入？請理監事針對本會加入國際學術團體之必要性及效益進行討論？

決議：

- 維持繳交 ICLAS 年費費用與會員資格。
- 將附件四提供理監事先行過目，並就參與與否提建議。
- 代表與出國費用補助部份再行討論。

伍、臨時動議

無。

中華實驗動物學會第十一屆第七次理監事會議紀錄

時間：民國一百年八月十七日（星期三）下午二時整
地點：國家實驗動物中心 B1 小會議室
主席：余俊強理事長 紀錄：張維正秘書長

出席人員：理事—梁善居、王銘富、王繼廣、方柏雄、毛嘉洪、
廖欽峰、吳文勉、洪昭竹、洪志駿、張秀鑾、
蔡倉吾。

監事—梁鍾鼎、莊秀琪、陳振忠。

請假人員：王明升、林宗德、林子恩、張秀鳳、方美佐、李勇陞、
張家宜、廖俊旺、劉福華、鍾昆金、蔡清恩、陳炯東、
萬灼華。

參、主席致詞：略

肆、會務報告：

- 1、會員狀況（詳附件一）P.4。略
- 2、100 年 5 至 7 月份學會財務報告（詳附件二）略
- 3、100 年度農委會生醫畜禽及台大科專計畫進度報告。略
- 4、100 年度委辦計畫-查核輔導計畫進度報告：略
 - (1) 今年度更改查核行程聯絡方式
 - (2) 已完成 21 場次現場查核輔導
 - (3) 於現場查核執行查核標準（詳附件三）略。
- 5、100 年度補助計畫-99 年度監督審查及年報製作。（格式修訂）請農委會仔細說明填寫方式。
學會已在執行填寫標準方式將與農委會協調溝通。
- 6、年度監督報告單機光碟版檢討與未來可行之方案。略
- 7、10/8 消化系內視鏡學會/實驗動物研討會。略
- 8、年會籌備進度報告（如附件 ppt 資料）。略
- 9、2012 AFLAS 會前會 9/15、16 將在泰國召開。略

叁、提案討論：

提案一、於第十一屆第六次理監事會議之提案三、說明：本會目前為 AFLAS 及 ICLAS 會員，AFLAS 不需繳交年費、學會於 96 年 9 月 5 日開始繳交 ICLAS 2004-2008 費用，平均一年為新台幣 6618 元、2009 年及 2010 年繳交美金 264 元，今年度繳交之費用為 212 歐元，新台幣 9275 元。另。今年度美國 AALAS 公開徵求 Global Partnership Membership (詳附件四略)。本會是否考慮加入？請理監事針對本會加入國際學術團體之必要性及效益進行討論？

第六次理監事會議決議：

- 維持繳交 ICLAS 年費費用與會員資格。
- 將附件四提供理監事先行過目，並就參與與否提建議。
- 代表與出國費用補助部份再行討論。

煩請就附件四之參與與否及代表與出國費用補助部分進行討論。

決議：加入 Global Partnership Membership，並成立國際事務組，召集人為王繼廣常務理事，日本代表為洪志駿理事，美洲與歐洲代表授權由王召集人延攬。

提案二、請提名 2011 中華實驗動物學會第十一屆學術研討會傑出貢獻獎、褒揚獎得獎名單。

歷年得獎名單：

(98 年)第十屆學術研討會暨 20 週年會員大會傑出貢獻獎	
行政院農業委員會	許桂森處長
國家實驗研究院實驗動物中心	梁善居主任
(99 年)2010 會員大會傑出貢獻獎	
財團法人振興復健醫學中心	葉明陽行政副院長
台灣大學畜產系	宋永義教授

	王明升理事
--	-------

(98年)第十屆學術研討會暨 20週年會員大會褒揚獎	
國立台灣大學醫學院動物中心	李碧珍 技士
(99年)2010會員大會褒揚獎	
	余玉林老師

2011 提名人選： 略

決議：名單將開放至 11 月份理監事會議前，擬由褒揚獎召集人陳炯東常務理事審閱後，於第八次理監事會議中決議。請秘書處先行查明傑出貢獻獎提名人選是否為會員身份。

提案三、請提名第十二屆理監事候選人名單。

決議：E-Mail 請辭之理監事於大會選舉後若依舊在選出理監事之名單內，屆時可向理事會提出請辭函。學會章程第九條內明列：本會得由理事會聘請名譽理事長一人，名譽理事、顧問若干人，其聘期與同屆理事、監事之任期同。針對已卸任或退休之資深理監事，將以此條例延聘。協助本學會會務之監督與規劃。請各位理監事多多提名年輕新血。

肆、臨時動議

10/3 梁主任感恩茶會及主任交接暨佈達儀式，邀請所有理監事踴躍參加。

中華實驗動物學會第十一屆第八次理監事會議記錄

時間：民國一百年十一月二十八日（星期一）下午二時整
地點：國家實驗動物中心 B1 小會議室
主席：余俊強理事長 紀錄：張瑋玲助理

出席人員：理事—王銘富、方柏雄、毛嘉洪、廖欽峰、
洪志駿、梁善居、蔡倉吾、劉福華。

監事—方美佐、張家宜、梁鍾鼎。

請假人員：王明升常務理事、王繼廣常務理事、林子恩理事、吳文勉理事、
洪昭竹常務理事、林宗德理事、張秀鑾理事、陳炯東理事、
廖俊旺理事、萬灼華理事、鍾昆金監事、莊秀琪監事、
蔡清恩理事、李勇陞監事、張秀鳳監事、陳振忠監事。

壹、 主席致詞：

貳、 會務報告：

1. 會員狀況 (詳附件一) P.4-P.6。略
2. 100 年 10 月份學會財務報告、100 年度經費收支表、100 年度歲出歲入概
算表(詳附件二) P.7-P.13。略
3. 100 年度農委會生醫畜禽及台大科專計畫進度報告-專案助理王俊欽報
告。略
4. 100 年度農委會專案計畫經費補助新台幣 140 萬元，計畫執行內容包括：
實驗動物人道管理中文年報製作分析。
實驗動物管理監督報告及犬貓猿猴類動物使用申請審查。略
5. 完成農委會委辦計畫，工作內容如附件(詳附件三) P.14-P.16。略
6. 完成實驗動物手術照護研討會。略
7. 完成與消化系醫學會合辦研討會。略

參、 提案討論：

提案一、請討論第十二屆理監事候選人名單(詳附件四) P.17。

決議：詳附件。

提案二、請提名 2011 中華實驗動物學會第十一屆學術研討會傑出貢獻獎、
褒揚獎得獎名單。

決議：傑出貢獻獎-王銘富校長(元培科技大學)、戴謙校長(南台科技大學)、
毛嘉洪院長(國立中興大學)。
褒揚獎-陳振忠董事長(樂斯科生物科技股份有限公司)、
廖俊旺教授(國立中興大學)、
梁鍾鼎博士(國家實驗研究院實驗動物中心)。

提案三、有關本會理監事選舉之有效投票人數部分，將依據本會組織章程第二
十六條規定「凡會員連續一年不繳常年費者，即予停止權利，但經補
繳後，得恢復之」辦理清查。

決議：同意依章程規定辦理。

提案四、97、98、99 三年未繳費名單

呂車鳳、徐興鎔、林昭信、李振明、李德南、詹吟菁、賴春福、
謝佳立、邱健昭、陳至吟、林姿吟、黃子豪、謝岱諮、楊凱傑、
何勝裕、王豐彬、張惠華、葉偉夫、姜延年、廖文進、劉青山、
陳美枝、陳淑娟、江秀梅、溫小娟、李志鵬、張劍明、徐成金、
馬秀華、蔡東益、卓宜興、賴義隆、蔡家添、李文權、李欣學、
陳金超、呂淑芬、鄭位明、王果行、吳餘輝、吳欣怡、廖羿涵、
林致帆、李政亨、林獻珍、方健宇、張達昇、伍書亭、陳祐祥、
陳玉鈴、錢宗良、周秀慧、韓君容、吳滄榮、楊正男、劉雅惠、
陳玫雅、林頂理、焦玉中、雲天福、鍾元祐、王俊欽、沈凱倫、
楊良友、楊世仲、蕭瑞康、游書珊、張益銓、余雪筠、張議云、
王麗惠、梁健成、江尚宜、巫常誠、姜淑媛、吳詩南、郭惠凱、
謝松裕、李成枝、陳信銘、陳豐文、林明煊、林武霆、陳婉琪、
林君穎、李木村、王思涵、謝長奇、連偉成、連淑培、王國新、
李芷葶、許修誌、何恭聖、許妙甘、何蓓茵、鄭卜鈺、賴祐暘、
周春婷、許美芳、楊啟涼、紀宜君、謝清河、卓益立、張哲銘、
武家慶、關智尤、王裕榮、許明滿、冉玫凌、陳宗立、陳如玉、
林師儀、林有良、袁忠豪、邱文鴻、楊宜叡、陳賽君、俞篤文、
張証凱、蕭富林。

決議：請理監事協助聯絡，學會也將發送通知提醒繳費。

肆、臨時動議

- 一、建議海報及口頭論文摘要，於徵稿前先分類主要議題，並列出作為宣傳。
- 二、寄出第十二屆理監事候選人建議名單(含候選者之學經歷資料)，同時寄出委託書，並提醒第二十六條章程「凡會員連續一年不繳常年費者，即予停止權利，但經補繳後，得恢復之」。

。