

## 初代無特定病原兔設施及種原建立之研究

林榮培\*、陳玫雅、邱顯閔、梁奇鳳、許天來  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所 苗栗縣

**摘要** 為提昇實驗用兔之品質至無特定病原(specific pathogen free；SPF)等級，本分所於 93 年 2 月新建完工乙棟正壓密閉之 SPF 實驗動物舍，進入之空氣先經高效率濾網濾除微塵與微生物，再經空調降溫至攝氏 25°C。其中供 SPF 實驗用兔繁殖生產之用的面積約 200 坪，隔間設有手術室、繁殖室、種兔室、育成室、洗滌室、飼料間、穿牆式雙門滅菌鍋等。手術室備有無菌操作手術箱及動物隔離箱 (animal isolator) 等設備，以供初代 SPF 實驗用兔生產之用。為生產初代 SPF 實驗用兔，選取傳統清淨等級懷孕母兔，以帝王切開術 (Caesarean section) 取出仔兔，置隔離箱實施人工哺乳，並於 21 日齡至 33 日齡投予 Bacteroides 等特定細菌或乳酸菌，以建立腸道正常菌群。其後，將仔兔從動物隔離箱移出飼養，所用的飼料、飲水及物品器具等均經滅菌處理，空氣經低、中、高效能之濾網過濾，採全換氣方式並保持室內正壓。總計進行五胎次剖腹產，成功育成初代 SPF 實驗用兔 31 隻。經健康監控與監測 10 種兔病結果皆陰性，顯示其健康合乎 SPF 兔之標準。這些初代 SPF 實驗用兔將進一步進行選育與二代 SPF 實驗用兔生產與供應。

**關鍵詞：**無特定病原，兔，實驗動物

### 緒言

民國七十一年五月，政府實施優良藥品製造規範 (good manufacturing practice；GMP) 以規範藥品製造商，所有動物用藥品均須依該標準生產製造。為配合 GMP 之實施，藥品檢驗、生物藥品之檢定也必須提升使用無特定病原 (specific pathogen free；SPF) 等級實驗動物，因此，生產及供應藥品製造、檢定所需之 SPF 實驗動物，為必然之趨勢。此外，配合發展生物醫藥產業的國家既定政策，於行政院生物技術產業指導小組的積極規劃與推動下，由各相關的部會分工辦理臺灣優良實驗動物的生產與供應體系，以建構生物醫學、生物技術產業的研究與發展的環境。

臺灣試驗用 SPF 畜禽的生產，1960 年代家畜衛生試驗所 (4, 7, 11) 或台灣糖業股份有限公司 (9) 曾飼養過初代及二代 SPF 豬，目前則僅有台灣動物科技研究所 (12) 繼續供應 SPF 豬。此外，家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所 (以下稱本分所)

自民國八十一年起生產 SPF 雞及蛋，其供應、需求量逐年增加。配合優良實驗動物的自家與市場需求，本分所為進一步提升既有實驗動物品質，增加 SPF 實驗動物的種類，建立疾病監控系統 (3, 6, 15)，將本分所原生產供應的傳統清淨實驗用兔與天竺鼠 (5, 6) 提升至 SPF 等級，並逐步建立自有的種原，確有其必要性與迫切性。

依據本分所既定的實驗動物發展規劃，以及配合行政院生物技術產業指導小組的 SPF 兔生產與供應分工，本報告的目的，在於總結過去 3 年 SPF 兔設施與初代 SPF 兔種原建立等研究發展的經過與成果。

### 材料與方法

**SPF 實驗動物舍：**經參考國內外 SPF 試驗動物舍之設計 (7, 12, 18)，規劃、設計與工程發包，本分所於 93 年 2 月新建完工新的 SPF 實驗動物舍

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

一棟 400 坪。SPF 實驗動物舍採密閉正壓方式，進入動物房之空氣先經高效率濾網濾除微塵與微生物，再經空調降溫至攝氏 25℃。飲水則以逆滲透過濾後供飲用。工作人員進入 SPF 動物舍前必須脫除全身衣物，經淋浴室徹底清洗並更換舍內清潔工作服後才能進入工作。

**初代 SPF 兔生產設備與技術：**本項新的 SPF 實驗動物舍內，用於 SPF 兔生產之面積 200 坪，經隔間設有手術室、繁殖室、種兔室、育成室、洗滌室、飼料間、穿牆式雙門滅菌鍋等。手術室備有無菌操作手術箱及動物隔離箱 (animal isolator) 等設備，以供初代 SPF 實驗用兔生產之用。同時加強人員訓練及飼養管理技術，擬訂標準作業流程 (1)。所用的兔飼料以幅射線照射滅菌 (14)，照射劑量範圍為 25kGy-45kGy。同時改善飼料保存環境，以冷藏除濕設備儲存飼料而保持其品質。

**初代 SPF 兔生產：**選取健康清淨之紐西蘭品系孕母兔進行剖腹取胎、建立剖腹取胎流程、環境參數、人工哺育等初代 SPF 種兔之育成試驗與技術手冊 (1-2, 6-10, 12, 16-19)。初代 SPF 實驗用兔育成方式 (10, 16, 19) 為選取預產期前一天或預產期當天之懷孕傳統清淨母兔，進行帝王切開術 (Caesarean section) 無菌操作取出仔兔，其方式如下：(1) 將臨盆前的母兔浸入水溫 36℃ 之 2% 艾司浦 200 (Astop200) 液中清洗 1 分鐘。(2) 將母兔麻醉。(3) 麻醉後之母兔腹部朝上放置手術台上，腹部噴灑 2% 碘酒，沿中線剪開皮膚並鈍剝，翻開至兩側。(4) 鋪上無菌洞巾，沿中線剪開腹肌，以止血鉗固定洞巾與腹肌。(5) 以 75% 酒精噴灑後將子宮移出，以止血鉗夾住兩端，噴灑 2% 碘酒後剪斷。(6) 將整個子宮放入 2% 艾司浦 200 液中，送入無菌室。(7) 無菌室操作人員剪開子宮取出仔兔，以無菌紗布拭去仔兔口鼻及全身黏液膜，並使其呼吸。(8) 先以止血鉗夾住臍帶後將臍帶剪斷，剪斷處以噴灑 2% 碘酒之紗布擦拭消毒。仔兔置於動物隔離箱實施人工哺乳，人工乳係以市售羊乳添加綜合維

生素劑胖維他 (100ml/5000mg) 調配而成。人工哺乳工具為玻璃滴管接微型乳頭中間塞泡棉而成，人工乳哺育前先加溫至 37℃，每日早晚各餵乙次，哺乳量由初生 2ml 至最高 25ml。於 21 日齡至 33 日齡投予 *Bacteroides* 等特定細菌或乳酸菌。其後移出無菌隔離箱飼養，期間之飼料、飲水及送入之物品器具等均經滅菌處理，空氣經低、中、高效能之濾網過濾，全換氣並保持室內正壓。

**初代 SPF 兔腸內菌之培養與定著：**於 21 日齡、33 日齡投予市售之 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli* 及 *Yeast* 等腸內菌 (13, 16, 19)。投予方式為哺乳時將前述腸內菌適量稀釋後加入人工乳中，立即哺乳。本試驗中，亦以腸內菌用培養基參照林等 (4) 之方法，自清淨兔之盲腸便中分離 *Bacteroides*, *Streptococcus* 及 *Escherichia coli* 等腸內菌，同上方式投予仔兔。

**初代 SPF 兔健康監控與監測：**參考林等 (3) 以及 OIE 標準診斷手冊 (15) 等施行初代 SPF 兔之健康監控與監測。初代 SPF 兔的健康監控與監測共計 10 項。其中 8 項，包括 *Pasteurella*、*Salmonella* 等委外檢驗 (財團法人台灣動物科技研究所)，結果列入管理紀錄包存。自行於本分所 SPF 兔品質監測實驗室檢驗的項目，包括兔出血熱等，採取初代 SPF 兔血清樣本，利用商業性兔出血熱等 ELISA 抗體、抗原檢測試劑 (INGENASA 出品) 進行檢驗，檢測方法概述如下：打開 96 孔 ELISA 抗體檢測盤並加以標記，置室溫 15 分鐘；加入 100 $\mu$ l 陽性對照血清和陰性對照血清於 A1 及 B1；將稀釋好的被檢血清以 12 爪微量稀釋器每孔 100 $\mu$ l 轉吸入抗體檢測盤其餘各孔；將抗體檢測盤置 37℃ 感作 60 分鐘；甩除抗體檢測盤內之溶液入含消毒水之容器內；甩乾之抗體檢測盤以 12 爪微量稀釋器每孔加 300 $\mu$ l 清洗液，靜置 3 分鐘，甩乾清洗液；重複清洗 3 次；以 12 爪微量稀釋器每孔加 100 $\mu$ l conjugate 溶液；將

抗體檢測盤置室溫感作 60 分鐘；清洗(方法同前述) 5 次；以 12 爪微量稀釋器每孔加 100 $\mu$ l substrate 溶液；將抗體檢測盤置室溫感作 10 分鐘；以 12 爪微量稀釋器每孔加 100 $\mu$ l 停止液；置免疫酵素判讀機以 OD (405nm) 判讀，並依其 kit 之計算公式計算其陽性值。

## 結果

**新建 SPF 實驗動物舍：**新建 SPF 實驗動物舍一棟 400 坪 (圖 1)，其中 SPF 兔舍 200 坪、SPF 天竺鼠舍 200 坪。購置安裝完成手術操作台、動物隔離箱 (圖 2)、簡易飼育箱 (圖 3) 兔飼育箱 (圖 4, 5) 及洗籠機 (圖 6) 等設備。本 SPF 實驗動物舍為密閉正壓之動物房，進入之空氣經初級、中級及 99.97% 高效率濾網濾除微塵與微生物，再經空調降溫至攝氏 25 $^{\circ}$ C。飲水則以逆滲透過濾處理後供飲用。工作人員進入 SPF 動物舍前必須脫除全身衣

物，經淋浴室徹底清洗並更換舍內清潔工作服後才能進入工作。

**初代 SPF 兔生產設備與技術：**SPF 兔動物房部分，區分為煙燻室、飼料冷藏室、準備室、手術室、穿牆式雙門滅菌鍋與傳遞箱 (圖 7)、2 間人工飼育室、1 間離乳區、2 間種兔室、2 間育成室 (由圖右往左看)。人員進出區有內外更衣室，中間夾著淋浴室。SPF 兔動物房內尚有器材室、洗滌室 (1 台洗籠機) 等，動物出口有 1 間緩衝室 (圖最左邊)。SPF 兔動物房配置獸醫師與技術人員各乙名，期間邀日本 SPF 兔專家來本分所辦理 SPF 兔的管理實務操作訓練，研訂完成本動物房各項標準作業流程 (1, 10)。所用的兔飼料經以冷藏除濕設備儲存飼料，可有效保持飼料品質，飼料以紙箱包裝送往工廠進行  $\gamma$  照射滅菌 (6,14)，照射後再供飼養 SPF 兔之用。

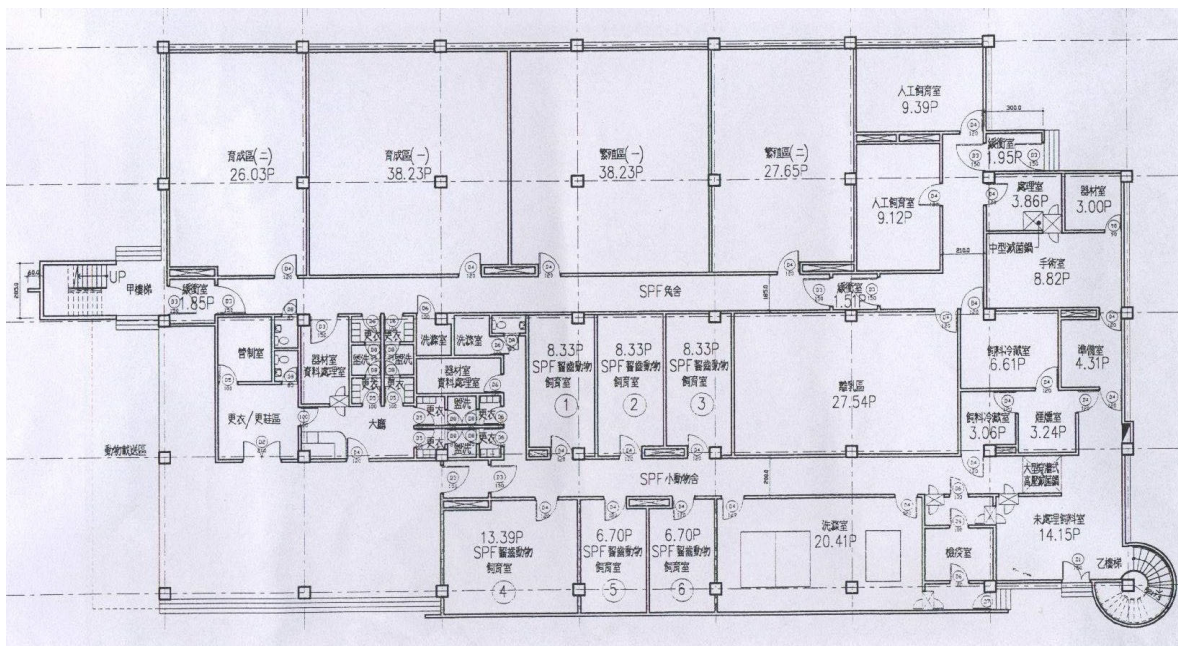


圖 1 SPF 實驗動物舍



圖 2 動物隔離箱



圖 4 SPF 兔飼育箱



圖 6 洗籠機



圖 3 簡易飼育箱



圖 5 SPF 兔飼育箱



圖 7 傳遞箱及雙門滅菌鍋

**初代 SPF 兔生產：**從本分所傳統清淨等級繁殖母兔中，選取預產期前一天或預產期當天之紐西蘭品系懷孕母兔，行帝王切開術以無菌操作取出仔兔以育成

初代 SPF 兔，總計剖腹產五胎次，育成初代 SPF 兔 31 隻詳如表 1。其體重增重情形如圖 8。

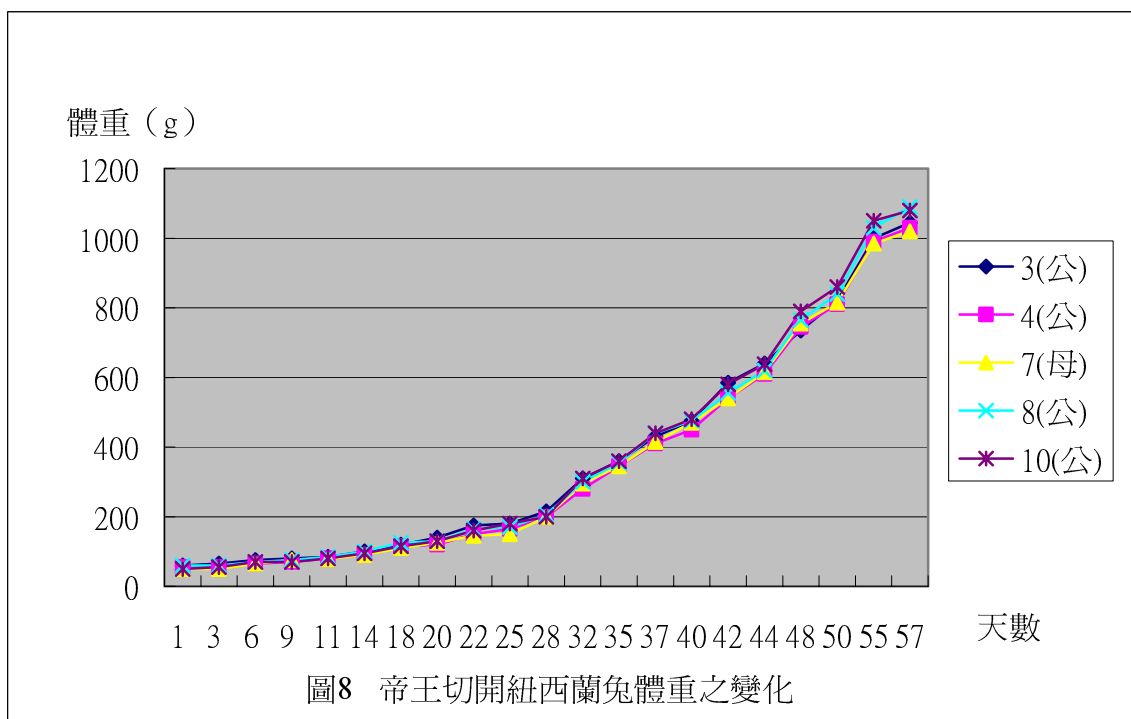


Table 1. Summarized Results of Hand-reared Rabbits

剖腹產次	胎兒數	育成頭數
1	9	4
2	10	6
3	8	5
4	9	8
5	10	8

**初代 SPF 兔腸內菌之培養與定著：**子兔於 21 日齡至 33 日齡投予 Bacteroides 等特定細菌或市售 Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, Escherichia coli 及 Yeast 等腸內菌後，順利育成初代 SPF 兔，成功地完成仔兔腸內菌接種。

**初代 SPF 兔健康監控與監測：**以表 2 所述之

方法採樣檢測兔的主要病原 10 種，除委外檢測外，並購入兔出血熱等 ELISA 抗體檢測試劑及免疫酵素判讀機等檢測儀器，建立 SPF 品質監測實驗室，施行 SPF 實驗動物及其產品之自家品管。經以兔出血熱 ELISA 抗體檢測試劑自行檢測初代 SPF 兔血清樣本結果均為陰性。詳如表 2。

Table 2. Test methods and results of health surveillance and monitoring of primary SPF rabbits

Diseases or pathogens	Test methods	Results
Rabbit hemorrhagic fever	ELISA	—
Tularemia	細菌分離	—
Myxomatosis	ELISA、PCR	—
<i>Pasteurella multocida</i>	細菌分離	—
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	細菌分離	—
<i>Salmonella spp.</i>	細菌分離	—
<i>Pseudomonas spp.</i>	細菌分離	—
<i>Eimeria spp.</i>	浮游法	—
<i>Passulrus ambiguum</i>	鏡檢	—
<i>Psorotes cuniculi</i>	鏡檢	—

備註：ELISA：enzyme-linked immunosorbent assay

## 討論

臺灣 SPF 實驗動物於 1965 年由徐等 (9) 及 1968 年林等 (7) 首先開發初代及二代 SPF 豬以來，一直穩定地發展著，其間也對其所帶之微生物進行探討 (4,11)。1992 年本分所開始生產供應 SPF 雞蛋及雛雞以來不但提升檢定、試驗研究及生物藥品製造水準，更是供不應求 (6)。為提供更多種類的優良實驗動物，本分所規劃與推動興建新的 SPF 實驗動物舍，同時亦邀請國外專家來台指導 SPF 兔之育成 (10)。此對我國 SPF 級實驗動物的需求確有一定程度的緩解。

兔奶之蛋白質及脂肪等營養成份較高，人工兔奶配方也有研究報告 (19)，較省工之方法是以羊乳添加維他命 (10)，也可飼育成功，本計畫的初代 SPF 兔育成亦証實此人工乳的可行性。此外，以哺乳中之 SPF 母兔代養也是方法之一。初代 SPF 仔兔於 21-33 日齡的腸內正常菌群接種與其正常菌群的建立，關係剖腹產仔兔的育成，本計畫經 5 胎次的初代 SPF 兔育成，已能掌握其操作。

本計畫所開發完成的初代 SPF 兔，連同自日本引進的日本兔品系 SPF 兔，將可使本分所具有兩種的 SPF 兔品系，使臺灣實驗用兔的水準從傳統乾淨等級提升至無特定病原等級，我國亦可保有自己的

SPF 種原。此外，配合發展生物醫藥產業的國家既定政策，於行政院生物技術產業指導小組的積極規劃與推動下，本分所於未來數年仍須肩負 SPF 兔的生產與供應的角色，這些開發的初代 SPF 實驗用兔將進一步進行選育與二代 SPF 實驗用兔生產與供應，強化我國生物科技或生醫產業之發展環境，有利於生物學、生物醫學或動物醫學之研究與發展。對生物醫學、生物技術產業的研究與發展的環境建構，提供其應盡的一份職責。

本計畫之推展，以培育相關的人才，建立相關的飼養管理技術，未來市場需求的增加時，預期有部分的兔農或廠商願意投入 SPF 兔的生產與供應行列，必要時本分所可提供其種原或協助其進行初代 SPF 兔代生產服務，從而使 SPF 兔的生產商業化。至於對已開發的 SPF 兔種原，本分所亦應繼續加以選育，同時進行其基本生物學性狀、飼養條件、正確操作、疾病控制、麻醉、止痛、緊迫與動物行為等研究，以建立此實驗動物的基礎資訊，以利動物試驗結果的評估。

## 參考文獻

1. 日生研株式會社小淵澤支社。SPF 雞之維持、繼代及生產系統。日生研附屬實驗動物研究所資料，日本，2003。
2. 余玉琳。實驗動物管理與使用指南。中華民國實驗動物學會，台北市，2001。
3. 林榮培、李龍湖、謝快樂。應用三明治式酵素結合免疫吸附法檢測雞華氏囊病毒抗原。中華獸醫誌 18：25-32，1992。
4. 林榮培、林再春、陳清、林地發。第二代無特定病原豬微生物之研究。台灣省畜衛試研報 9：57-62，1972。
5. 林榮培、邱顯閱、梁奇鳳、林春基、蘇杰夫。天竺鼠之飼養繁殖、供應與常見疾病。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告 40：75-80，2004。
6. 林榮培、梁奇鳳、陳玫雅、邱顯閱、蘇杰夫、許天來。2001-2005 年間試驗研究用 SPF 雞蛋生產供應與疾病監測。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告 41：183-191，2005。
7. 林再春、程永昌、楊火松、賴俊雄。無特定病原 (Specific pathogen-free) 豬生產之研究，第 1 報。台灣省畜衛試研報 5：59-70，1968。
8. 洪昭竹。獸醫學要覽(實驗動物醫學)。中華民國實驗動物學會，台北市，1992。
9. 徐興鎔、許淑英、張聯欣、周凝元、李崇道。無特異傳染病豬之育成。台糖公司種畜場，53-54 年期研報告 1-5，1965。
10. 唐澤茂。兔 SPF 化手續。研討會指導資料，2004。
11. 楊火松、林再春、林榮培。無特定病原 (Specific pathogen-free) 豬之微生物檢索。台灣省畜衛試研報 7：65-76，1970。
12. 蔡清恩、翁仲男、楊平政、許桂森、朱瑞民。SPF 實驗室設備和初步豬隻飼養成績。中華民國獸醫學會會報 143-151，1990。
13. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. Control of the SPF status in laboratory animals. Bacteriological examinations in mice, rats, guinea pigs and rabbits. Nov 1;83: 422-424, 1970.
14. Chen, Q., Y. Ha and Z. Chen. A study on radiation sterilization of SPF animal feed. Radiation Physics and Chemistry 57:329-330, 2000.
15. Office International des Epizooties. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE, Paris, 2000.
16. Pleasants, J.R., B.S. Wostmann and D.R. Zimmerman. Improved hand rearing methods for small rodents. Laboratory Animal Care 14：37-47, 1964.
17. Syukuda, Y. Rearing of germfree guinea pigs and establishment of an SPF guinea pig colony. Jikken Dobutsu 28：49-56, 1979.
18. Theodorus Ruys, AIA. Handbook of facilities planning. Volume 2 laboratory animal facilities. Van Nostrand Reinhold. New York, 1991.
19. Yukio Mrata, Yoshicoro Katumata, Mayumi Tada, Shota Suzuki and Toru Yui. Experimental trials on the establishment of breeding colony of the Specific-Pathong-Free rabbit I. Procedures for establishment and maintenance. Journal of the Takeda research laboratories 31：(1) 42-55, 1972. (in Japanese)

## Production of Primary Specific Pathogen Free Rabbits for Experimental Use

Y. P. Lin\*<sup>1</sup>, M. E. Chen<sup>1</sup>, H. M Chiu<sup>1</sup>, C. F. Liang<sup>1</sup> and Tien-Lai Hsu<sup>1</sup>

Branch Institute for Animal Drugs Inspection, Animal Health Research Institute  
21 Mochang, Ciding Village, Chunan Township, Mioli County, Taiwan 35054

**Abstract** For upgrading the quality of experimental rabbits from conventional clean to specific pathogen free (SPF) levels, a new animal building for the production of SPF rabbits was established at the Branch Institute for Drugs Inspection, Animal Health Research Institute in 2004. This animal building has about 660 square meters in size and contains a closed system with positive air pressure system. The air entering the house is filtered by a high efficiency special air filter to prevent it from carrying pathogens and dusts, and the room temperature is kept at 25°C by air-conditioning. Rooms inside the animal facility are allocated for surgery, breeding, breeder, nursery, wash and preparation, feed and through type steam sterilization. In the surgery room, biosafety cabinets for surgery and animal isolator are equipped for primary SPF production. For technical establishment and production of primary SPF rabbits, conventional clean does of New Zealand breed, at the last day of gestation or at the day of laboring, are selected for Caesarean delivery of kittens by aseptic techniques. The kittens are kept in animal isolator first and raised by artificial suckling method. On Day 21 to 33 after birth, kittens are fed with lactobacilli and bacteroides for developing normal intestinal flora. Then the rabbits are transferred from animal isolator to cage unit for further raising. Feed, water, and materials used for primary SPF rabbits are all sterilized. We have performed Caesarean section on five breeding does and got 31 SPF rabbits. The results of health surveillance and monitoring of primary SPF rabbits showed that the animals were free from 10 common rabbit pathogens, and this indicated that the health status of primary rabbits has met the SPF criteria. These primary SPF rabbits will be further bred to generate the secondary SPF rabbits. In addition to SPF rabbits of the Japanese breed, we now have a new choice of laboratory New Zealand breed SPF rabbits for research in biology, biotechnology and biomedicine in Taiwan.

**Key words:** *SPF, Rabbit, Laboratory animal*

---

\*Corresponding Author  
Animal Health Research Institute