

病毒檢驗及臺灣地區首例 成功分離SARS冠狀病毒經驗

文·圖/高全良

在微生物學檢驗的領域，相較於細菌檢驗，病毒檢驗之發展啟蒙較晚。早年由於技術不成熟，幾乎都是以動物接種方式來分離致病性病毒，因此病毒檢驗並不普遍，只在特殊研究單位使用。直到1949年Dr. Enders 以猴腎細胞培養技術，成功分離小兒麻痺病毒並得以大量增殖，隨即成功發展出小兒麻痺病毒疫苗，Dr. Enders因此獲頒諾貝爾獎。1950年代之後，以細胞培養技術成功分離病毒的報告逐漸增多，也成為病毒檢驗之核心技術，由於病毒檢驗漸受重視，相關人才培育成為當務之急。

臺大醫技系病毒檢驗教學建置及臨床應用發展

1969年，臺大醫學院醫事技術學系（現為醫學檢驗暨生物技術學系）自美國聘請系友夏璇老師回國，首創將臨床病毒學及實習列為必修課程，每位學生均得以學到病毒檢驗基本理論與技術。為與實務接軌，同時也在臺大醫院實驗診斷科設立病毒檢驗室，由夏璇老師主持，進行臨床檢驗的服務。當時剛好遇上流感病毒基因大突變，由A/H2轉變成A/H3型並引發全球大流行，臺灣亦受波及，新建立的病毒檢驗技術適時發揮作用，分離出許多Influenza A/Hong Kong/1968/H3N2病毒株，對當時疫情之了解及監控提供很大的助益。

筆者於1972年承夏璇老師教導，開始參與臨床病毒教學，爾後夏璇老師再度赴美，即由筆者接棒本系病毒教學、研究及檢驗之工作，之後陸續有李君男老師及張淑媛老師加入教學陣容。為了製備可以用於檢驗用途之細胞株，我們也開始建立細胞庫，收集如HEp-2, PMK, HEL, Vero, RK 等細胞株。筆者及李君男老師在細胞株之建立及庫存投入不少心力，特別是初次猴腎細胞及人類胎兒肺細胞株之製備，以及建置雞胚胎蛋病毒分離系統。本系教師在病毒研究各有專精，本人著重在呼吸道病毒、登革病毒及腸病毒之分子流行病學及快速診斷，李君男老師以輪狀病毒及愛滋病毒見長，張淑媛老師則為愛滋病毒、抗病毒藥物之篩檢及流感病毒為主要研究重點。於1999年8月本系榮獲當時之衛生署指定，成為國內四個病毒感染症合約實驗室之一，

協助疾病管制局進行病毒疫情監控，受理檢體的第一線篩檢單位。臺大的責任區涵蓋臺北市、宜蘭縣及金馬地區等，合約實驗室由筆者主持至2012年，而由張淑媛老師接棒至今。

首例成功分離SARS冠狀病毒，對SARS疫情之監控貢獻良多

2002年秋廣東爆發非典型肺炎疫情造成多人死亡，大陸當局初期報導致病原可能與披衣菌感染有關。2003年2月一位受感染的大陸學者住宿香港旅館，因而引爆世界各地之流行，成為著名的Hotel M事件，後續於該旅館九樓居住之旅客或訪客，將這個病散發至香港、越南、加拿大、新加坡、德國等地。臺灣因與大陸、香港商旅往來頻繁，終究不免亦遭此疫病之肆虐，而成為旅遊警示區。直至2003年7月4日才成為全球最後被世界衛生組織宣布為非疫區，以及解除旅遊警戒區者。

猶記得2003年3月14日下班時刻，接到臺大醫院感染控制委員會緊急會議通知之情景，召集人林副院長說明整個緊急狀況，知道可能收治臺灣首例非典型肺炎（數日後由世界衛生組織統一稱為嚴重呼吸道症候群，SARS）患者。由於當時大家對非典型肺炎之成因並不清楚，因此醫院除採取嚴格之管制措施外，並要求盡一切可能找出致病原。

這個任務確實是極大的挑戰，我們與檢醫部細菌科主任薛博仁醫師合作，他主持細菌、黴菌等方面之檢查，我則負責病毒致病原之尋找。除了傳統的培養方法，亦啟動了快速抗原或核酸分子檢查。數日後，檢驗初步結果排除了幾種常見引起呼吸系統感染之微生物（細菌、黴菌、病毒）等。然而一直無法找出病原，所面臨的壓力也逐漸增高。當時國外爆發數例以前未曾感染人類之禽流感病毒（Influenza A/H5N1, H9N2）侵襲人類之事件，因此我們也開始往是否為跨物種之病毒方面思考。相當於大海撈針的實驗，數日下來仍然一無所獲，每天觀察細胞培養後的心情總是非常低落。於是借助更多文獻閱讀找出良策，除了使用常用細胞外，也開始到處收集細胞株，希望藉由細胞培養種類之增加，以提高培養成功機會。此時，香港中文大學的譚教授提出SARS是一種新的副粘液病毒（human metapneumovirus）所引起，我們也因此增加分離此類相關病毒之細胞培養，曾一度使用高達12種細胞之多，連鵝鶉、小雞、貓之細胞、小雞氣管培養等都派上用場。

由於整個疫情發展趨向，很有可能係跨宿主間傳染，聯想到十多年前，筆者進行臺灣首度漢他病毒血清流行病學調查，曾使用非洲綠猴腎臟細胞（Vero E6）成功的培養漢他病毒。漢他病毒係由老鼠傳給人之感染，為跨宿主傳播之實例，或許可用這種細胞找尋病毒之存在？趕緊

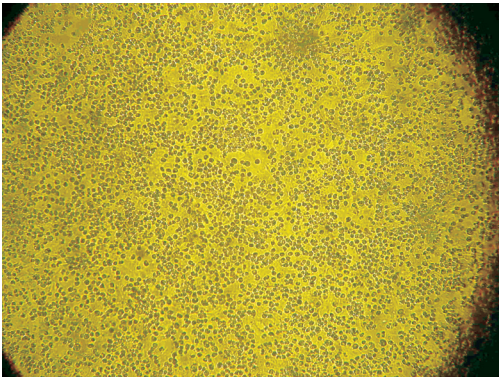
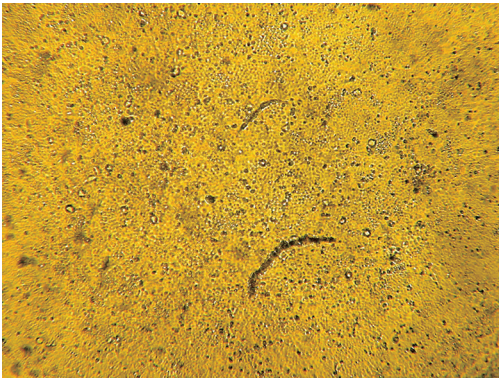


圖1：SARS冠狀病毒在Vero E6細胞產生之細胞病變

上圖為正常未受感染之Vero E6 細胞；
下圖為病毒感染Vero E6細胞所產生之細胞病變

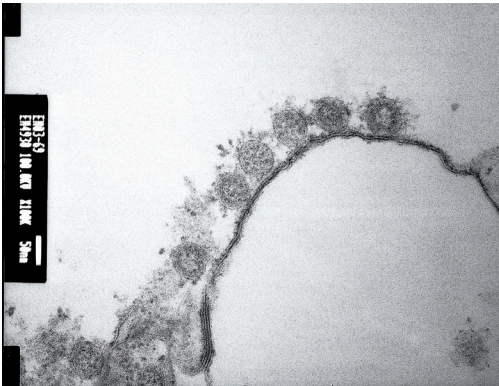


圖2：SRAS冠狀病毒在細胞繁殖後由細胞膜釋出之情形（電子顯微鏡）

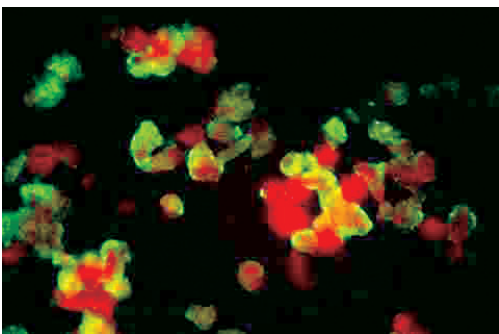


圖3：SARS冠狀病毒抗體陽性之反應（免疫螢光抗體染色法）

將儲存於液態氮桶內多年之Vero E6細胞株解凍復原，加入細胞培養陣容中。皇天不負苦心人，接種檢體數日後終於出現了眉目。各種細胞接種中唯獨只有在Vero E6株觀察到細胞病變（圖1），目睹細胞病變出現時，內心震撼非筆墨所能形容。但看到細胞病變只是初步，還需要進一步鑑定才能確認。

此時國際間透過WHO的12個國家級實驗室通力合作，宣布找到了一個新品種之冠狀病毒，並將其全長基因完全解碼。這些資訊對於我們分離的病毒進一步鑑定助益甚多。同時傳出美國疾管局也使用Vero E6細胞分離出病毒，此消息印證了我們的方向正確，也說明我們所具有的實力。在進一步鑑定為冠狀病毒時，我們使用了RT-PCR（逆轉錄聚合酶鏈式反應）、電子顯微鏡及免疫螢光染色技術，猶記得第一株冠狀病毒分離株，是由病理部蕭正祥醫師親自來我研究室取得固定好的病毒細胞，在深夜11點多進行電顯觀察，終於在顯微鏡下露出了SARS冠狀病毒之廬山真面目（圖2）。看起來確實相當可愛，就像幼稚園小寶寶般手牽手，剛好在細胞膜上冒出來。這張相片也成為國內曝光率最高之病毒相片。而醫學院陳定信院長認為須再將整個病毒基因解碼才算完美，拜科技進步之賜，不到一個月陳培哲教授及葉秀慧博士就解碼成功，最後由本院召開記者會宣布成功分離出臺灣第一株SARS冠狀病毒。病毒的分離成功對往後檢驗試劑研發、疫苗研發均產生重大影響，筆者除成功分離出SARS冠狀病毒外，並在很短之時間內成功建立免疫螢光染色抗體檢測系統（圖3），除了對正在發病之患者

可以藉由抗體之變化幫助確診外，並可協助檢測隔離的接觸者體內是否有SARS冠狀病毒抗體產生，如無抗體表示未受感染，可以解除隔離管制。

回想當年參與研究及檢驗過程，有些心得與各位分享：

1. 國內病毒檢驗技術經多年努力已有一定水準。經此事件，更增加信心。個人在此期間受到醫學院陳定信院長、醫院李源德院長及研究團隊召集人楊泮池教授之指導與肯定，證明醫檢人員也可在醫療團隊中扮演重要之角色。可做為醫檢學生在畢業後選擇工作之思考方向。
2. 此次研究團隊合作精神之發揮，彼此協助發揮所長、提供經驗，實為成功關鍵。
3. 平時應厚植檢驗實力，過去累積之經驗將是未來面臨挑戰之利器。
4. 現在分子生物技術固然重要，但傳統病毒培養及鑑定仍然很重要，不可偏廢，特別是針對人類新興病毒性感染疾病時，傳統技術常成為尋找致病原一種不可或缺之重量級武器。

對於臨床病毒檢驗之未來發展，個人以為有幾個重點方向：1.病毒分離培養之基本技術要扎實；2.病毒檢測應結合分子生物技術；3.發展病毒之快速診斷，縮短檢驗時間；4.病毒分子流行病學；5.抗病毒藥物對病毒感受性之分析及相關藥物之研發；6.病毒疫苗之開發及協助臨床試驗之評估。圖（本期專題策畫／醫技系方偉宏教授）



高全良小檔案

臺大醫學院醫事技術學系畢業（1969），臺大公共衛生學院流行病學及預防醫學研究所博士（2012），哈佛大學醫學院附設波士頓兒童醫院進修研究（1982-83）。曾任母校醫事技術學系助教、講師、副教授；臺大附設醫院檢驗醫學部副主任、病毒檢驗科主任；臺灣大學環安中心生物污染防治組組長；中華民國醫檢師公會全聯會理事長、臺灣醫事檢驗學會理事長、世界醫檢總會理事等職。2012年2月退休後，續任母系兼任副教授，教授臨床病毒學及實驗室管理，並擔任國際醫檢科學期刊 International Journal of Biomedical Laboratory Science (IJBL) 主編、生檢雜誌主編，TAF 醫學實驗室 ISO15189 實驗室認證資深評審員、技術委員、生物實驗室 17025 實驗室認證評審員。服務期間曾獲獎勵有 2003 年醫檢學會醫檢貢獻獎、臺大 2014 年研究貢獻獎、臺大 2008 年傑出校外服務獎、臺大公衛學院 2011 學年度傑出畢業生獎、2013 年亞洲醫檢學會傑出貢獻獎。