計畫編號：DOH93-DC-2012

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

開發以鴨蛋生產抗飯匙倩 IgY 抗體(II)
Development of cobra antivenin from the egg yolk of immunized ducks (II)

研 究 報 告

執行機構：血清疫苗研製中心
計畫主持人：江正榮
研究人員：連偉成、楊素鈴、郭旭英
執行期間： 93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目　錄

●中文摘要…… 3
●英文摘要…… 4
●前言…… 5
●材料與方法…… 6
一、IgY 抗體製備…… 6
(一) 無毒化蛇毒抗原之製備…… 6
(二) 實驗鴨…… 6
(三) 動物免疫方式…… 6
(四) 動物免疫方式與時程…… 6
(五) 鴨蛋收取…… 7
(六) IgY(ΔFc)收取時程……7
二、IgY 之萃取(extraction)及純化(purification)…… 8
(一) 硫酸銨沈澱法(Ammonium sulfate salting out)……8
(二) 親和性管柱純化(Affinity purify purification) …… 8
三、抗體效價測定法……8
(一) 動物中和測定法…… 8
(二) 酵素連結免疫反應(ELISA)測定法…… 9
四、IgY 抗體凍結乾燥……9
(一) 抗體製備……9
(二) Glycin 製備……9
(三) 凍乾分組…… 9
●結果……11
一、鴨來源系統之確認……11
二、IgY 抗體純化系統之確認……11
三、免疫計畫之確認……11
(一) 動物中和測定法…… 11
(二) ELISA 測定法(以取單點測量)……13
四、產程檢驗系統之建立……15
(一) J03 之 EP、ES、UP 之比較圖……16
(二) J04 之 EP、ES、UP 之比較圖……16
(三) J01 之 EP、ES、UP 之比較圖……17
(四) J02 之 EP、ES、UP 之比較圖……18
五、抗飯匙倩 IgY 抗體凍乾劑型建立……18
六、成本效益評估……19
(一) 鴨 IgY 抗體分析……19

(二) 鴨飼養成本……19
●討論……20
●參考文獻……23

中 文 摘 要

本計畫初步確認鴨來源系統以由畜產試驗所宜蘭分所, 改良繁殖之二品種改鴨(俗稱大改鴨)為佳，雖然它的產蛋率不是最高，但產生之 IgY 抗體效價最好。基礎免疫以每隔 2 週分別免疫 2mg、4mg、6mg、8mg、10mg 等劑量為佳，第一次免疫以 Freund's complete adjuvant 為佐劑，肌肉注射方式免疫，第二次以後以 Freund's incomplete adjuvant 為佐劑，皮下注射方式免疫。免疫效價約從第 5 週開始到達 60 田中單位以上，力價通常只維持 2 週後就開始下降，因此每隔 2 週免疫 2mg，抗體力價就能維持，實驗結果顯示較佳抗體效價是從第 5 週到第 21 週。IgY 抗體純化時，雖然親和性管柱純化法比使用硫酸銨沉澱法效果好，但不符合成本效益，所以建議大量生產時仍使用硫酸銨沉澱法。利用 ELISA 法檢測抗體與利用動物測定抗體中和效價法時，兩者具有正相關性，所以 ELISA 測試法可做為快速篩選抗體機制時使用，並可當作動物中和抗體測定法的輔助工具。IgY 抗體凍乾後的效價會降低，而加入抗凝集劑 glycin 並無法維持原始效價。除了考量馬血清製造過程中，對人員有較高危險性以及世界動物保育的趨勢，最主要是利用鴨子取代馬匹製造抗蛇毒血清抗體，初估可節省 48%成本，所以值得進一步開發研究。

關鍵字：IgY、ELISA、大改鴨、硫酸銨沉澱法、動物中和測定法、凍乾

英 文 摘 要

The preliminary study conformed that the duck called “Big Kaiya duck” from Livestock Research Institute of I-Lan could produce higher antibody response than other kinds of duck. We suggested that the proper immunization programs for basic immunization was to administrate duck with 2mg、4mg、6mg、8mg and 10mg every two weeks. In the first immunization, we used Freund’s complete adjuvant as an adjuvant and intramuscularly injection. After the first immunization, we used Freund’s incomplete adjuvant as an adjuvant and subcutaneous injection. According to the experimental data, the proper booster program was to administrate duck with 2mg every two weeks after basic immunization and better neutralization response was from the 5th to 21st week. Although affinity column chromatography could get more pure virus than ammonium sulfate precipitation did, considering the cost and benefit, it had better use ammonium sulfate precipitin in scale-up production. We also found a good correlation between ELISA system and venin minimal lethal dose method for antibody titer. Therefore, ELISA system will be a convenient tool to screen antibody response before the animal test. After lyophilization, the neutralization titer of IgY decreased even adding glycine as disintegration. In addition to considering worker safety and animal welfare, the cost of antivenin production by duck in place of horse can save 48%. Therefore, it was worth for us to continuously study.

Keyword: cobra, IgY, Big Kaiya duck, ammonium sulfate, venin minimal lethal dose method、lyophilization.

前　言

毒蛇咬傷的急救方式以注射正確的抗蛇毒血清最為有效。急救過程中，一旦馬血清蛋白(horse serum proteins)進入人體，常引發三種副作用，即(1)抗補體反應(anticomplement reaction) [18]：馬免疫球蛋白之 Fc region結合人體之補體受體所引發的發炎反應;(2)血清病(serum sickness) [11]：大量的抗蛇毒血清蛋白誘發人體產生相對應抗體並形成複合物，而造成發炎、血管炎(vasculitis)、關節炎(arthritis)及腎炎(nephritis)等症狀；(3)過敏性休克(anaphylactic shock) [21]：大量外來抗原引發人體 IgE 活化，造成呼吸衰竭等嚴重副作用[1]。而 IgY 抗體的優點包括：(1) 安全性：較不會引發有害人體的補體反應。(2)專一性：與哺乳類的 IgG 有較少的交叉干擾[7,9,22]。(3)易生產：從家禽蛋抽取(4)較人道：European Centre for the Validation of Alternative Methods 建議使用蛋黃抗體取代哺乳類抗體。(5)低成本有報告指出，生蛋母雞一個月約可生 20 顆蛋，約可生產 2g IgY 抗體，而血清中之 IgY 濃度則為 5-7mg/ml，所以要取得與蛋相同的抗體則要採 300ml 之血清[19]。(6)易保存。

禽類屬於較低等之脊椎動物，以鴨為例，母鴨除了血清含有抗體，這些抗體也會傳送到鴨蛋的蛋黃部份，它們被稱為蛋黃免疫球蛋白 (yolk immunglobulin：IgY)，若連續施打抗原，相對應之抗體更會高度集中於蛋黃中。目前的動物實驗結果得知 IgY 可取代哺乳類因被動免疫細菌、病毒而產生之免疫球蛋白[3,4,5,6,7,15,17,23]，響尾蛇毒亦可被 IgY 中和[1,21]。此外 IgY 分子結構與哺乳類免疫球蛋白略有差異，以至於不會引發有害人體的補體反應。因此與由馬產生的抗蛇毒血清比較，鴨蛋純化所得之抗蛇毒免疫球蛋白不僅對患者副作用較小且生產成本較低。

本中心 92 年度以台灣飯匙倩毒蛇為例，初步完成鴨子免疫模式之建立、抗原最適免疫劑量分析、IgY 抗體純化條件之篩選和比較 IgY 抗體及傳統馬抗蛇毒血清之中和效價等。

本年度計畫目標為鴨來源系統之確認、免疫計畫之確認、IgY 抗體純化系統之確認、產程檢驗系統之建立、抗飯匙倩 IgY 抗體凍乾劑型之建立、進行成本效益評估。若抗飯匙倩 IgY 抗體中和效價高，成本低，將進一步探討以 IgY 方式生產其它抗蛇毒抗體並建立被動免疫抗體之生產模式。

材 料 與 方 法

一、IgY 抗體製備

(一)無毒化蛇毒抗原之製備

於免疫前一天，6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液將飯匙倩蛇毒配製成 1％溶液，慢慢滴入 2.5％戊乙醛（glutaraldehyde；GA），使蛇毒含有 GA 之最終濃度為 0.25％，充分混合 1 小時後，呈現乳白色膠狀，即可，並放置冰箱 4℃過夜。

(二)實驗鴨

由畜產試驗所宜蘭分所，改良繁殖之二品種改鴨(俗稱大改鴨)，小鴨出生後第 150 天開始產蛋，可連續產蛋 6~8 個月，一隻鴨在一年內約產 250-280 顆鴨蛋。在蛇毒抗原免疫前，先收集 20 顆鴨蛋及採血 2ml 做為實驗對照組。

(三)動物免疫方式：

第一次免疫以與蛇毒同體積之 Freund’s complete adjuvant 當作佐劑，以肌肉注射方式免疫，第二次以後之免疫以與蛇毒同體積之 Freund’s incomplete adjuvant 當作佐劑，以皮下注射方式免疫。

(四)動物免疫方式與時程：

1、免疫計畫一(鴨號 J03、J04)：

(1)礎免疫時程

Tab1：免疫計畫一基礎免疫時程

週數	0	2	4	6	8
免疫蛇毒(mg)	1	2	3	5	10

(2)補強免疫時程

A、J03

Tab2：J03 補強免疫時程

週數	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44
免疫蛇毒(mg)		10		10		10		10		10		2		2		2	2	2

B、J04

Tab3：J04 補強免疫時程

週數	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44
免疫蛇毒(mg)		10		10		10		10		10								

2、免疫計畫二(鴨號 J01、J02)：

(1)基礎免疫時程

Tab4：免疫計畫二基礎免疫時程

週數	0	2	4	6	8
免疫蛇毒(mg)	2	4	6	8	10

(2)補強免疫時程

A、J01

Tab5：J01 補強免疫時程

週數	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44
免疫蛇毒(mg)		10		10		5		5		5								

B、J02

Tab6：J02 補強免疫時程

週數	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44
免疫蛇毒(mg)		10		10		5		5		5		2		2		2	2	2

(五)鴨蛋收取時程：

使用蛋白蛋黃分離器將蛋黃分離出來。一顆鴨蛋重約 60-70g，鴨蛋黃體積約 15~ 20 ml。平均每顆蛋分離出 IgY 與 IgYΔFc 總量比，免疫前：IgY：IgYΔFc=1：1，免疫後: IgY：IgYΔFc=1：3。而樣品為 IgY 時內含有的 IgYΔFc 約為 40%，而樣品為 IgYΔFc 時內含有的 IgYΔFc 約為 95%以上。

(六)IgYΔFc 收取時程

1、動物中和測定法效價測定

將欲採該週之蛋混和，取 IgY(△Fc)60mg/1.5ml，做動物中和試驗檢測效價。

(1)免疫計畫一

A、J03

Tab7：J03 動物中和樣品收取時程

週數	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43

B、J04

Tab8：J04 動物中和樣品收取時程

週數	5	7	9	13	15	17

(2)免疫計畫二

A、J01

Tab9：J01 動物中和樣品收取時程

週數	5	7	9	13	15	17

B、J02

Tab10：J02 動物中和樣品收取時程

週數	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43

2、ELISA 效價檢測

(1)取單點測試

從第 4 週開始，採蛋時間為補強當天，取 IgY(△Fc)1mg/ml 1ml 做 ELISA 檢測效價，採至第 47 週。

(2)將測試週抗體混合測試

從第 4 週開始，將欲採該週之蛋混和，取 IgY(△Fc) 1mg/1ml 1ml 做 ELISA 檢測效價，採至第 47 週。

二、IgY 之萃取(extraction)及純化 (purification)

(一)硫酸銨沉澱法(Ammonium sulfate salting out)

將蛋黃分離出來後，經過 Delipidization、$(NH_4)_2SO_4$ salting out、Dialysis 及 Concentration 等步驟完成 IgY 初步純化。

(二)親和性管柱純化(affinity column method)

進一步純化使用 CNBr-Activated Sepharose 與 Native cobra venom protein 進行 Coupling，得到 Affinity matrix，此時再加入鴨子抗飯匙倩蛇毒抗體進行 Affinity isolation， 收集 Elution 出的抗體，再經過 Dialysis、Concentration 等步驟完成 IgY 親和性管柱純化。

三、抗體效價測定法

(一)動物中和測定法(Minimal Lethal Dose)

1、蛇毒抗原之毒力測定

將蛇毒以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液稀釋成三種等差稀釋液，每一種稀釋液由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每支 0.2ML。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數並求出最低致死劑量(minimal lethal dose)。

2、抗蛇毒血清效價測定

將抗蛇毒血清以 0.1M pH6.8 之磷酸緩衝生理食鹽液稀釋成欲稀釋倍數，取稀釋液 0.3mL 與含 4MLD/ml 之上述蛇毒溶液 0.3mL 混合，於 37℃放置 60 分鐘，以進行中和試驗。再由

皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每隻 0.2mL。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數及存活隻數，並計算其效價。

3、毒力對照

測定抗蛇毒血清中和效價之同時，另以 0.5、1.0 及 2MLD 之蛇毒溶液，由皮下注射 12-14 克重健康小白鼠 3 隻，每隻 0.2mL。觀察 48 小時，紀錄死亡隻數及存活隻數，注射 1.0 及 1.5MLD 之小白鼠應全部死亡。

4、效價計算方式

效價(U)=4MLD/0.2mL X 血清稀釋倍數

U=田中抗毒單位(Tanaka unit)

(二)酵素連結免疫反應(ELISA)測定法

純化的 IgY, IgY(ΔFc)抗體均先調整濃度至 1mg/ml 再作稀釋。抗原：蛇毒蛋白 500ug/well。一級抗體：將 AFC 抗血清和純化抗體作 1000x, 10000x 稀釋。二級抗體：HRP conj. rabbit Anti-duck IgY, 5000x 稀釋。

四、IgY 抗體凍結乾燥

(一)抗體製備

將 J02 第 5-17 週之 IgY(ΔFc)抗體混合，取濃度 40mg/ml、80mg/ml 做凍結乾燥試驗。

(二)Glycine 製備

將 glycine 泡製成 4%及 2%濃度，過濾。

(三)凍乾分組

凍乾前先測定樣品之抗體效價，凍乾時再加入與樣品同體積之 4%glycine、2%glycine 溶液及生理食鹽水，使總溶液之 glycine 濃度變為 2%、1%及 0%，凍乾後加入樣品欲回溶濃度之生理食鹽水，再進行動物中和測定法測定凍乾後之抗體效價，各組配製如下。

1、4%glycine 組

Tab11：4%glycine 配製方式

	40mg/ml(濃度)	80mg/ml(濃度)	160mg/2ml(濃度)
IgY 量(ml)	0.5	0.5	1
4%glycine(ml)	0.5	0.5	1
回溶生理食鹽水(ml)	0.5	0.5	0.5

2、2%glycine 組

Tab12：2%glycine 配製方式

	40mg/ml(濃度)	80mg/ml(濃度)	160mg/2ml(濃度)
IgY 量(ml)	0.5	0.5	1
2%glycine(ml)	0.5	0.5	1
回溶生理食鹽水(ml)	0.5	0.5	0.5

3、生理食鹽水組

Tab13：生理食鹽水配製方式

	40mg/ml(濃度)	80mg/ml(濃度)	160mg/2ml(濃度)
IgY 量(ml)	0.5	0.5	1
生理食鹽水(ml)	0.5	0.5	1
回溶生理食鹽水(ml)	0.5	0.5	0.5

結　果

一、鴨來源系統之確認

確認使用由畜產試驗所宜蘭分所，改良繁殖之二品種改鴨(俗稱大改鴨)，而不使用產蛋數較多之菜鴨，因大改鴨抗體效價比其他鴨種好。

二、IgY 抗體純化系統之確認

同時間點採的 IgY△Fc 抗體，硫酸銨沉澱法所純化的 IgY△Fc 抗體效價約為親和性管柱純化的 IgY△Fc 之 2/3，但親和性管柱純化之步驟較複雜，成本較高，不適合大量生產使用，故採用硫酸銨沉澱法當為純化抗體之法。

Tab14：純化系統之抗體力價比較

純化 IgY△Fc 抗體方法	濃度(mg/ml)	效價(U/ml)
硫酸銨沉澱法	19.23	20< X≤ 40
親和性管柱純化 IgY△Fc	18.90	60≤ X

三、免疫計畫之確認

(一)動物中和測定法

1、免疫計畫一(J03、J04)(40mg/ml)

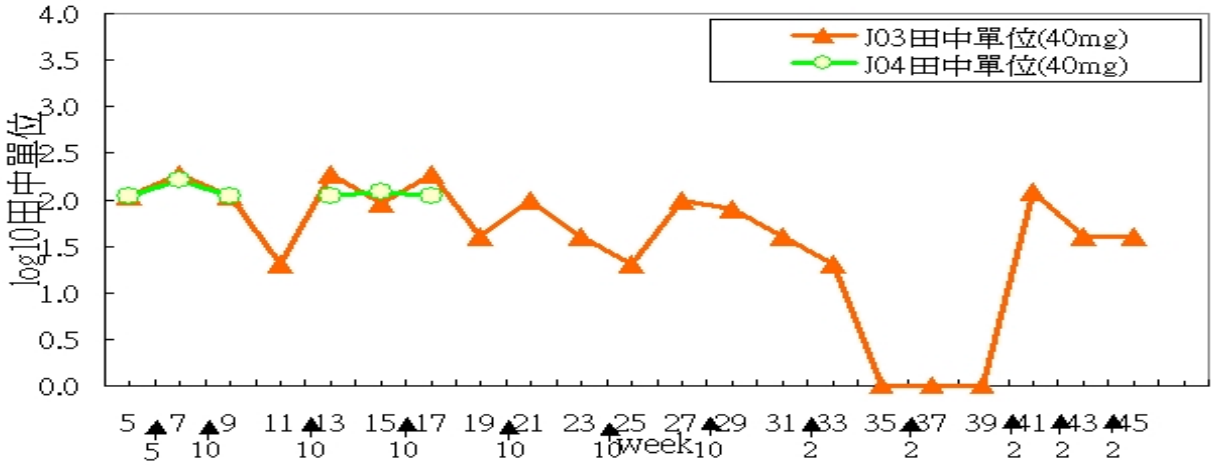

Fig1：免疫計畫一之動物中和測定

免疫計畫一分成 J03 和 J04 兩隻鴨子，J04 只取 6 個點，其效價與與 J03 相對應週數之效價相似，基礎免疫最高能到達 190U。以 J03 之結果而言，5-27 週的平均抗體力價為 115U，而通常在免疫過後，抗體力價就能上升，不過第 28 週免疫後，抗體力價呈現下降狀況，第 40 週免疫後才又上升。

2、免疫計畫二(J01、J02)(40mg/ml)

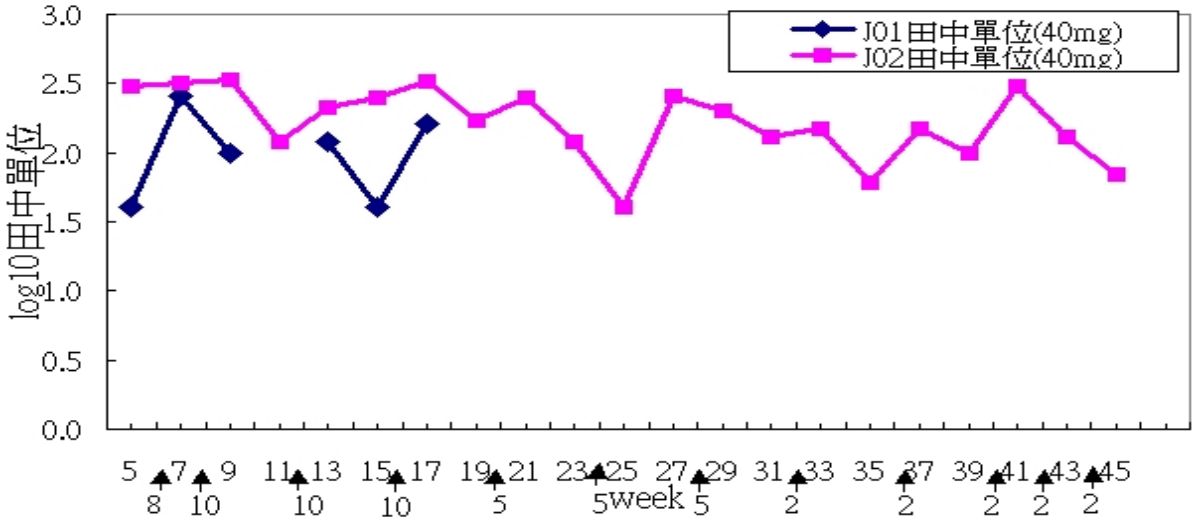

Fig2：免疫計畫二之動物中和測定

免疫計畫二分成 J01 和 J02 兩隻鴨子，J01 取 6 個點之數據雖與 J02 趨勢不類似，但基礎免疫效果最高能到達 260U，比免疫計畫一佳。以 J02 之結果而言，此鴨子免疫效果為 4 隻鴨子中最佳，5-21 週的平均抗體力價為 254U，最高抗體力價能到達 340U。與免疫計畫一之 J03 一樣，在免疫過後，抗體力價就能上升，不過也是在第 28 週免疫後，抗體力價呈現下降狀況，第 40 週免疫後才又上升，第 41 週抗體力價亦可到達 300U。

3、為進一步了解何時或何段時程為最佳收蛋時機，我們用下列統計方式比較不同時段平均中和效價，由於 J01 和 J04 之數據不夠多, 所以只比較 J02 和 J03 兩隻鴨子數據, 結果發現(Table15) 免疫計畫一和二之 5-21 週之平均抗體力價皆比 5-47 週平均抗體力價好。

Tab15：J02 和 J03 5-21 週抗體力價與 5-47 週平均抗體力價比較

鴨別	項目	5-21 週	5-47 週
J02 (免疫計畫二)	平均數(田中單位)	254.44	191.05
	標準誤差	25.45	20.71
	個數	9	19
J03 (免疫計畫一)	平均數(田中單位)	115.56	88.24
	標準誤差	21.22	14.43
	個數	9	17

4、接著利用 t 檢定測定法比較兩組免疫計畫的好壞，我們以 5-21 週這段時期的平均效價做比較，且設定α = 0.05 定，結果顯示(Table16)免疫計畫二比免疫計畫一佳。

Tab16：J02 和 J03 t 檢定測定(5-21 週)

	平均值	標準誤差	個數	T 值	臨界值(單尾)	P 值(單尾)	設定α
J02 UP 免疫計畫二	254.44	76.34	9	4.19	1.746	0.00035	0.05
J03 UP 免疫計畫一	115.56	63.66	9				

(1)H0:UPj02=Upj03、(2)H1:UPj02>UPj03
(3)設 α = 0.05、(4)統計結果接受 H1

(二)ELISA 測定法(以取單點測量)

1、免疫計畫一(J03、J04)(1mg/ml)

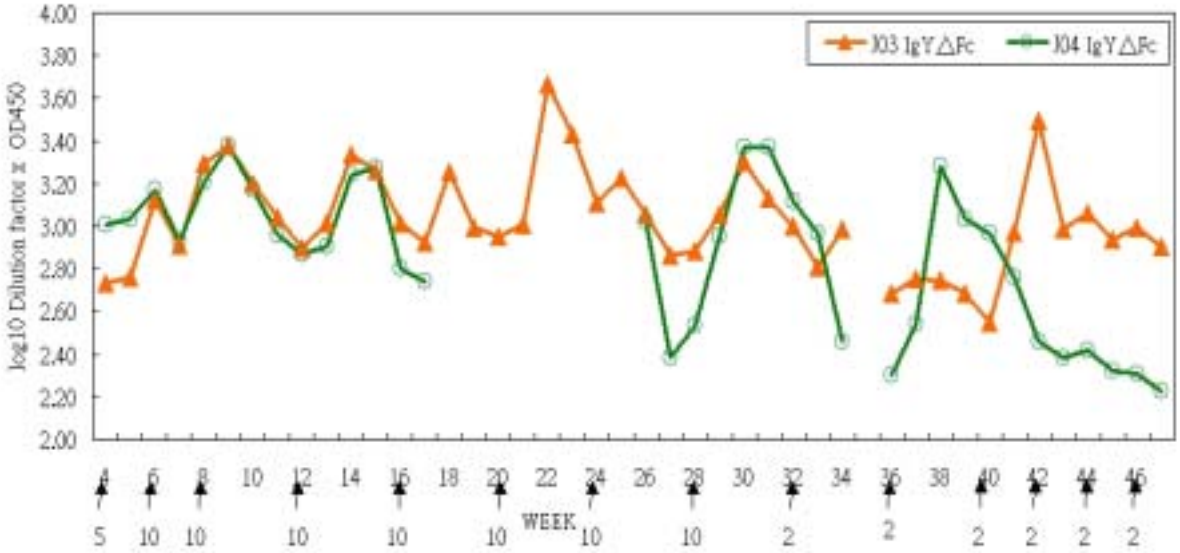

Fig3：免疫計畫一 ELISA 測定法(以取單點測量)

此實驗是利用 ELISA 測定抗體含量，抗體檢體是每週星期一取蛋然後純化分離出 IgY 抗體. 免疫計畫一 J03 和 J04 兩隻鴨子產生之抗體於 34 週以前趨勢是雷同的，由於是取單天的檢體，所以可看到每週抗體起伏狀況。例如第 6 週免疫過後，抗體量是呈現下降狀況，第 7 週才又開始上升，這是動物中和測定法無法看到的現象, 所以免疫過後第 1 至 2 週抗體量

升到最高，再來呈現下降狀況。J04 因第 28 週後就停止免疫，所以抗體呈現持續下降狀況，約 5 週降至最低，但 J04 在 38 週上升，而 J03 卻沒有上升，可能是免疫錯誤的鴨子所致，且 J03 之動物中和測定法之第 35、37、39 週抗體力價也偏低，第 40 週免疫後才又上升，J03 第 28 週後免疫後之抗體力價並無像動物中和測定法下降。

2、免疫計畫二(J01、J02)(1mg/ml)

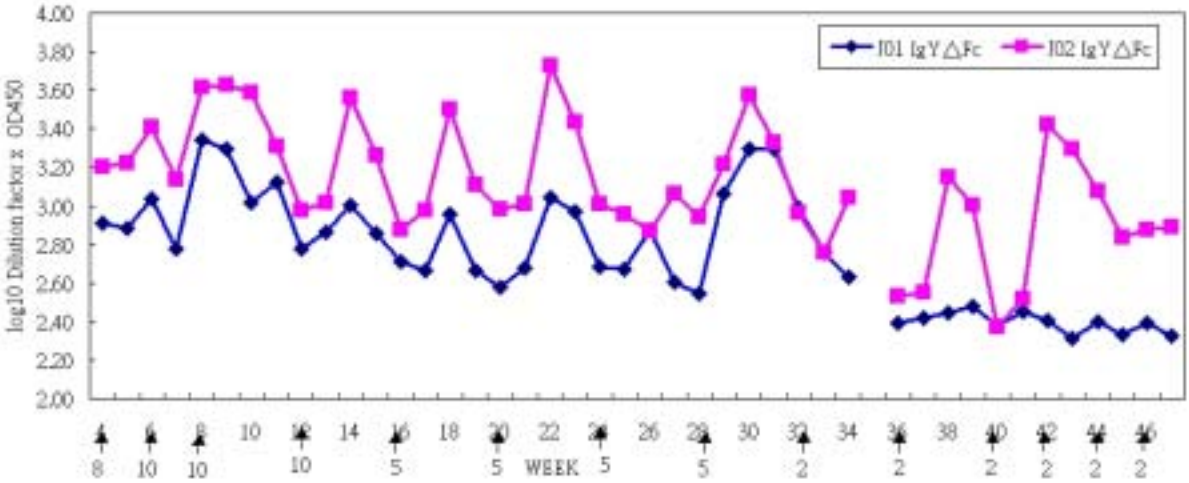

Fig4：免疫計畫二 ELISA 測定法(以取單點測量)

利用 ELISA 測定免疫計畫二 J01 和 J02 兩隻鴨子的抗體量，於 34 週以前趨勢亦是雷同的，J02 數據較高，這也符合動物中和測定法數據。J01 因第 28 週後就停止免疫，所以抗體力價呈現持續下降狀況，約 5 週降至最低。而 J02 在每次免疫過後抗體都會呈現上升狀況，第 28 週後免疫後之抗體力價並無像動物中和測定法下降，但第 32 週後每 4 週免疫 2mg 的抗體力價不如前面抗體力價升的高，但第 40 週後每 2 週免疫 2mg 的抗體力價，就能升的較高。

3、動物中和測定法得知於 5-21 週收蛋時段較佳，因此我們以 ELISA 的方式及前述相同的統計方式來證實，結果(Table17)顯示四隻鴨子 5-21 週之平均抗體量的確比 5-47 週高。

Tab17：各隻鴨子 5-21 週抗體力價與 5-47 週平均抗體力價比較

鴨別	項目	5-21 週	5-47 週
J01 (免疫計畫二)	平均數	834.57	691.82
	標準誤差	167.66	114.53
	個數	9	21

J02 (免疫計畫二)	平均數	1717.34	1416.35
	標準誤差	342.11	196.91
	個數	9	21
J03 (免疫計畫一)	平均數	1171.42	1113.85
	標準誤差	187.37	126.61
	個數	9	21
J04 (免疫計畫一)	平均數	1207.62	911.43
	標準誤差	252.47	168.94
	個數	7	17

4、動物中和測定法得知免疫計畫二比免疫計畫一佳，我門利用四隻鴨子的 ELISA 數據做比較並利用 t 檢定測定法，結果(Table18)發現以 5-21 週這段時期抗體量做比較，設定α =0.2 測定，免疫計畫二才比免疫計畫一佳，或許是因為取單天檢體，變異數較大的緣故。

Tab18：免疫計畫一(J03、J04)和免疫計畫二(J01、J02)t 檢定測定(5-21 週)

	平均值	標準誤差	個數	T 值	臨界值(單尾)	P 值(單尾)	設定α
(J01+J02)/2 (免疫計畫二)	1469.90	821.16	18	1.027	0.85	0.16	0.2
(j03+J04)/2 (免疫計畫一)	1235.06	515.94	18				

(1)H0:U(j01+j02)/2=U(j03+j04)/2、(2)H1:U(j01+j02)/2>U(j03+j04)/2
(3)設 α = 0.2、(4)統計結果接受 H1

四、產程檢驗系統之評估

為進一步評估 ELISA 檢驗系統的可行性以及確認該系統能否成為產程篩選工具，我們利用統計方式來比較 UP(一週抗體檢體混合後再進行的動物中和測定法) 、EP(一週抗體檢體混合後以 ELISA 測量抗體量) 、ES(取單天抗體檢體以 ELISA 測量抗體量)等三種趨勢是否具正相關性。

(一)J03 之 EP、ES、UP 之比較圖

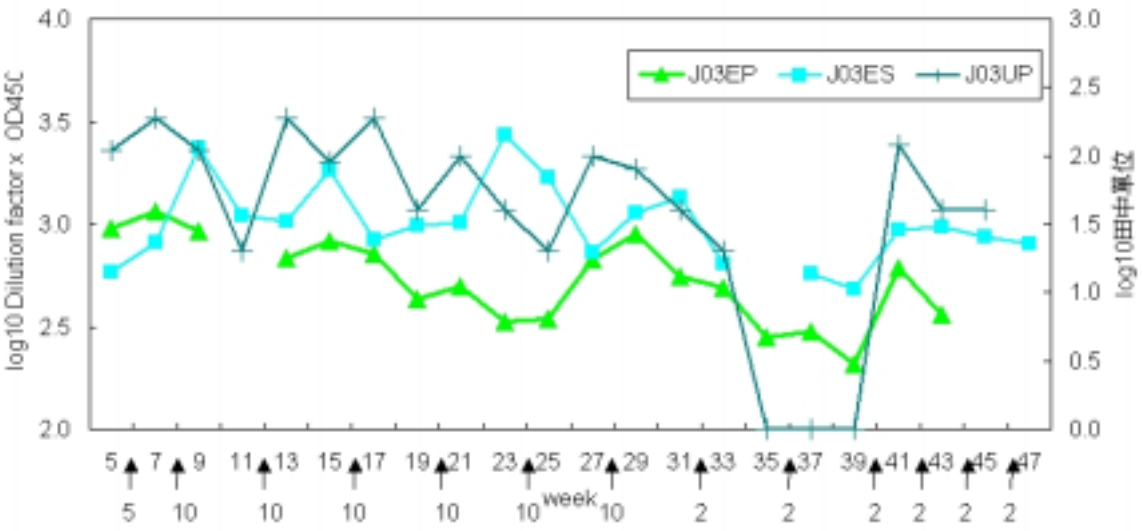

Fig5：J03 之 EP、ES、UP 之比較圖

Tab19：J03 之 EP、ES、UP 相關係數(R)

	Ep	Es	Up
Ep	1		
Es	-0.13*	1	
Up	0.60**	0.04*	1

* 有達統計意義(R＜0.4)

** 中度相關 (0.7＞R ≥0.4)

***高度相關(R ≥0. 7)

(二)J04 之 EP、ES、UP 之比較圖

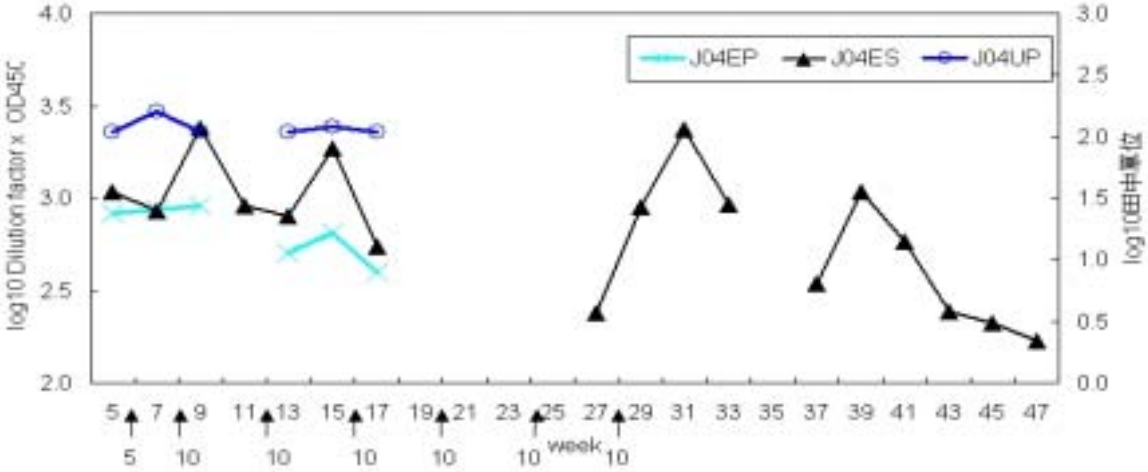

Fig6：J04 之 EP、ES、UP 之比較圖

Tab20：J04 之 EP、ES、U 相關係數(R)

	Ep	Es	Up
Ep	1		
Es	-0.12*	1	
Up	0.39*	0.66**	1

*　有達統計意義(R＜0.4)

**　中度相關 (0.7＞R ≥0.4)

***高度相關(R ≥0. 7)

(三)J01 之 EP、ES、UP 之比較圖

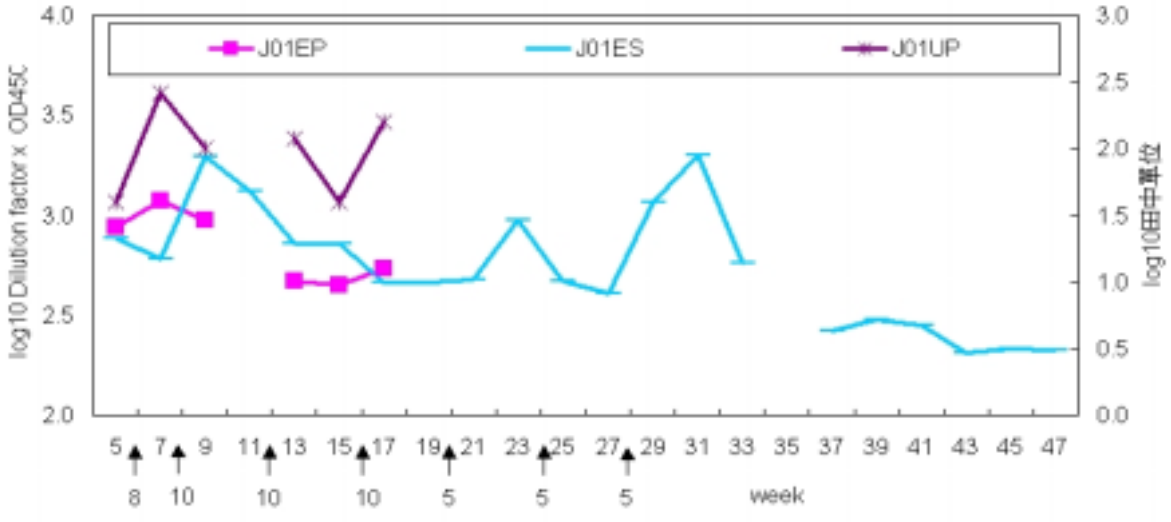

Fig7：J01 之 EP、ES、UP 之比較圖

Tab21：J01 之 EP、ES、UP 相關係數(R)

	Ep	Es	Up
Ep	1		
Es	-0.24*	1	
Up	0.33*	0.28*	1

*　有達統計意義(R＜0.4)

**　中度相關 (0.7＞R ≥0.4)

***高度相關(R ≥0. 7)

(四)J02 之 EP、ES、UP 之比較圖

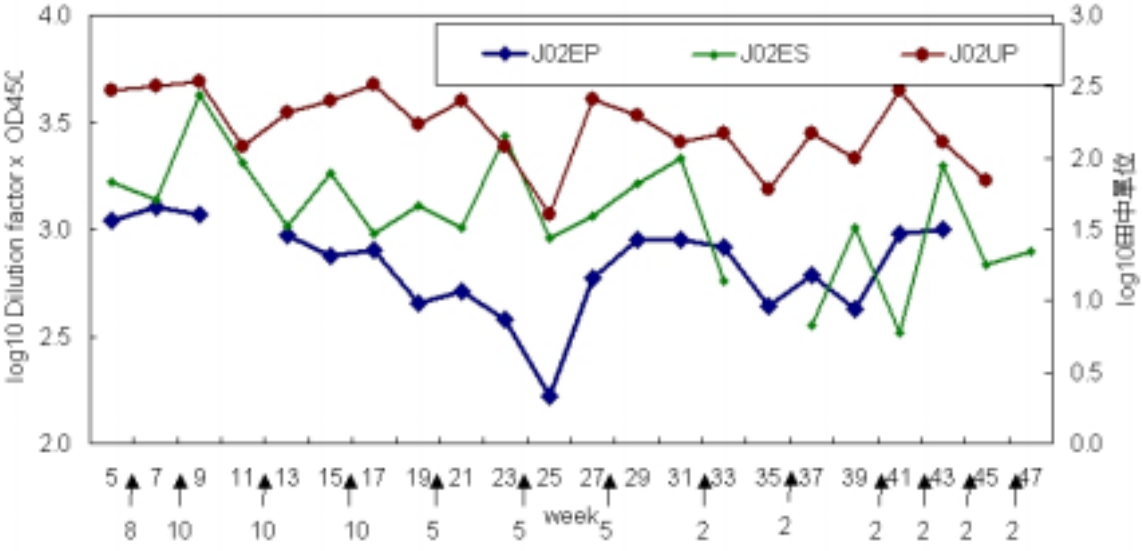

Fig8：J02 之 EP、ES、UP 之比較圖

Tab22：J02 之 EP、ES、UP 相關係數(R)

	Ep	Es	Up
Ep	1		
Es	0.07*	1	
Up	0.72***	0.45**	1

*有達統計意義(R＜0.4)
**中度相關 (0.7＞R ≥0.4)
***高度相關(R ≥0. 7)

以 5-21 週的抗體為基準，4 隻鴨子之 EP、UP 和 ES 相關性比較結果顯示，J02 EP 和 UP 有高度相關性;J03 EP 和 UP 有中度相關;J04 EP 和也 UP 有中度相關，不過 J01 和 J04 之 UP 和 EP 之樣品數只有 6 個，其數據參考性不如 J02 和 J03。綜合以上結果，EP 和 UP 的正相關性，證實我們建立的 ELISA 檢驗系統是可行的。至於 ES 和 UP 的相關性，只有 J02 有中度相關性，其原因除了 J01 和 J04 樣品數不夠多外，取單天檢體變異數較大可能是主因。

五、抗飯匙倩 IgY 抗體凍乾劑型建立

Tab23：凍乾前和後 40mg/ml 和 80mg/ml 抗體效價

濃度(mg/ml)	凍乾前效價(u/ml)	凍乾後效價(u/ml)		
		生理實驗水組	凍乾後 2% glycine 組	凍乾後 4% glycine 組
40	250≤ X＜260	210≤ X＜220	210≤ X＜220	210≤ X＜220
80	480≤ X＜490	390≤ X＜400	390≤ X＜400	390≤ X＜400

兩種 IgY 抗體濃度於凍乾之後，抗體效價皆降低，濃度 40mg/ml 效價降至凍乾前之 84％(210/250)，濃度 80mg/ml 則為 81.25％(390/480)。凍乾時加入 2％或 4％glycine，不管是濃度 40mg/ml 或 80mg/ml，皆無法有效保護抗體。

六、成本效益評估

目前馬蛇毒血清每年需求量為 6000 劑(每劑 10ml)，每瓶需有 1200U。

(一)鴨 IgY 抗體分析(以 5-21 週估，40mg/ml 有 120U)

1、採蛋：約可收蛋 119 顆
2、純化：1 顆蛋純化後約有 50mg，目前 1 瓶馬血清(1200U)約需 8 顆蛋(400mg/50mg)。
3、需求：6000 瓶抗血清，需 48000 顆蛋(6000 瓶 X8 顆蛋)
4、飼養鴨：400 隻鴨(48000 顆蛋/120 顆蛋)。
5、蛇毒用量：14400mg (以基礎免疫 2mg、4mg、6mg、8mg、10mg 補強免疫每隔 2 週 2mg 共需求 36mgX400 隻鴨)

(二)鴨飼養成本(以 400 隻估，且以馬成本比較)

1、動物一年價錢：1 萬元(20 元/隻 X400 隻=1 萬元/1 年)。
2、一年飼料：32 萬。
3、一年人工水電：48 萬。
4、動物免疫人力需求：本局人力。
5、採血或蛋：由代養人員代工。
6、一種蛇種共計：81 萬。

討　論

製造抗蛇毒血清產品，其抗體效價標準必需到達 60 田中單位(U)以上，所以鴨子免疫計畫中抗體效價高低之篩選，也是以此為標準。免疫計畫一(基礎免疫劑量為 1mg、2mg、3mg、5mg、10mg，)與免疫計畫二(2mg、4mg、6mg、8mg、10mg)之抗體效價約從第 5 週開始到達 60U 以上，免疫計畫二平均抗體力價比免疫計畫一好的原因，可能是為免疫計畫二免疫蛇毒劑量是以等差基數方式循序漸進升高，使鴨子體內抗體濃度達到穩定狀態，一旦補強注射，就能使免疫系統馬上引起較高免疫反應，所以建議使用免疫計畫二之免疫方式。補強免疫之時間間隔為 4 週，力價通常於 2 週後就開始下降，可能與免疫劑量相關，因為補強劑量為 10mg，太多蛇毒將鴨子體內部部分抗體中和。我們嘗試降低免疫劑量為 2mg，但效果也不彰。最後改變免疫間隔週數為 2 週免疫劑量為 2mg，抗體力價就能穩定維持，所以補強後抗體力價會下降主要因素可能為免疫間隔時間太長。另外發現免疫計畫一和二的動物中和抗體測定結果都有一個普遍現象，就是第 28 週後，雖有補強免疫力價卻沒顯著上升，甚至有下降的狀況，其原因可能如下：一、免疫耐受性產生：因重複大量的抗原刺激造成細胞凋亡(apoptosis)。二、免疫間格太長：因抗體約在免疫後 2 週開始下降。三、免疫低劑量抗原被體內抗體中和：第 32 週開始以 2mg 補強免疫，因免疫量比第 28 週 5 和 10mg 少，被體內的高抗體中和，而第 40 週後抗體力價又開始上升，J02 甚至到 300U，有可能體內免疫機制又開始習慣免疫抗體量。四、鴨子衰老：不過在第 40 週後抗體力價又開始上升。所以綜合以上結論建議補強劑量只要 2mg，以避免太強的抗原刺激，且免疫間隔建議為兩週。

有關建立產程檢驗系統方面，使用 ELISA 測定法的目的是希望以該方法當作篩選工具，快速得知抗體效價上升趨勢，並作為收集鴨蛋的依據。初期是以 ELISA 檢測鴨子血清中 IgY 抗體濃度，除了經常採血容易造成鴨子的緊張，進而影響產蛋率的因素外，ELISA 亦無法有效檢測抗體濃度，究其原因可能是我們所建立的檢測系統靈敏度不夠好或是血清中 IgY 的濃度相當低。例如 Rose 等人曾報告指出 IgA 和 IgM 抗體不存在於蛋黃中，而蛋白亦無 IgY 抗體[13]，Kowalczyk 等人實驗果顯示位於卵細胞的 IgY 受體會結合所有的 IgY 抗體，然後從母雞血清中運送至蛋[8]，上述報告可間接證實血清中 IgY 的濃度相當低的假設。為進一步評估確認我們建立的檢驗方法可行性，首先將一週的 IgY 抗體混合(EP)後，以 ELISA 檢測抗體濃度，其結果與動物中和試驗(UP)結果比較其相關性，實驗數據顯示其 J02 和 J03 有中度以上的相關性，所以表示 ELISA 檢測抗體測試方法有一定的準確度，但仍有許多改善空間。目前 ELISA 準確度不佳的原因可能是蛇毒的抗原成分很多，某些成分成為干擾因子，所以未來希望找到蛇毒毒素的

主要抗原因子，進而改善 ELISA 的精確度與靈敏度。為了達到快速篩選目的，本實驗後來改測單天 IgY 抗體濃度(ES)，實驗數據統計分析結果顯示，只有 J02 的 ES 與整週的抗體混合後做動物中和試驗(UP)有中度相關，另外三支鴨子的實驗結果相關性都不高。探討其原因，可能是因為抗體效價的變化每天都不同，所以單取一天的效價當然可能與整週的結果不同，加上數據收集不夠多，因此未來將進行以 2 天或 3 天的蛋混合一起做 ELISA 檢測。希望改進後之 ELISA 抗體檢測系統，可做為初期確認鴨子效價能力的快速篩選機制，但確認抗蛇毒 IgY 效價還是以動物中和測定法為主。

一般而言，凍乾劑型的添加劑主要功能為，冷凍保存(cryopreservation)、分散(disintegration)、安定(stabilization)、結晶賦形(crystallization excipient)。本局傳統馬蛇毒血清製備時添加 2%glycine，以防止血清中的抗體凝集，而本計畫在建立 IgY 抗體凍乾劑型時，亦依據傳統抗蛇毒血清產品製造方式添加 glycine，不過結果發現 glycine 並無法有效保護 IgY 抗體，即使增高 glycine 濃度，其抗體效價仍然降低。另外越高濃度的抗體，在凍乾後抗體效價下降更多，可能是凍乾造成抗體凝集或 denatured 現象，進而影響整個蛋白質結構。添加安定劑於疫苗產品中已被廣泛使用例如：培養基 199 用於日本腦炎疫苗[20]，味精(sodium glutamate)用於卡介苗[2]，各種醣類、氨基酸用於黃熱病毒[16]、化學品用於牛瘟疫苗[12,10]，Shimizu 曾報告添加 Sucrose syrup(50% w/w)可增加 IgY[14]安定性，所以未來將繼續研究添加劑種類之使用，使凍乾後的抗體效價能維持，並增加安全效期。

由於本中心為生物製劑製造廠，最重要的考量因素為成本效益，因此我們比較以鴨蛋或馬血清生產抗蛇毒血清所需經費。利用馬生產 6000 劑產品，成本約為 156 萬 8 千元，而利用鴨子生產，依目前實驗結果，由於免疫計畫仍未達到最佳條件，所以每隻鴨子只能收取第 5 至 21 週的蛋，大約 120 顆，所需經費約 81 萬，大約可約節省 48%。未來如果基礎免疫以每隔 2 週分別注射 2mg、4mg、6mg、8mg、10mg 蛇毒，然後每隔兩週補強注射 2mg，相信每隻鴨子約可收集 250 顆蛋，如此一來將可更增加抗體生產效率，飼養鴨子數減少，所需經費可降低至 40 萬 4 千元，大約節省 74%(參閱 Table24 和 25)。另外考量馬血清製程中，對馬匹及工作人員都有較高的危險性並且目前世界動物保育的方向都不建議使用馬匹來從事生產生物製劑，所以基於成本、人員安全及動物保育三方面，利用鴨子生產抗蛇毒 IgY 抗體，仍值得我們進一步繼續去開發研究。

未來鴨抗蛇毒 IgY 抗體研發工作將著重於研發神經性(抗飯匙倩和抗雨傘節)多價 IgY 抗體為主，且繼續驗證及尋找較佳的免疫模式，其主要包

括一、建立多價抗體鴨子免疫模式；二、分析多價抗原最適免疫劑量；三、建立多價 IgY 抗體純化條件；四、建立多價 IgY 抗體之抗體監測系統；五、比較多價 IgY 抗體及傳統馬抗蛇毒血清之中和效價；六、建立多價 IgY 抗體量產系統。若抗飯匙倩和抗雨傘節多價 IgY 抗體中和效價比目前馬抗蛇毒多價血清高，且成本低，將進一步探討以 IgY 方式生產其它抗蛇毒抗體並建立被動免疫抗體之生產模式。

Tab24：鴨蛋與馬血清成本比較

	馬血清抗體	鴨 IgY 抗體 (以 5-21 週估)	鴨 IgY 抗體 (未來評估)
每年需求量	6000 劑(每劑 10ml)，故需 60L		
1 瓶 10ml	1200u　800mg	1200u　400mg	
抽血或採蛋	1 年每匹馬可抽 3 次血每次 10L 共 30L(可分離 15L 粗血清)	為 120 顆	一年可採 250 顆蛋
精製	3L 粗血清可精製 1L	1 顆蛋純化後約有 50mg，1 瓶約需 8 顆蛋(400mg/50mg)	
需求	60L 抗血清，需 180L 粗血清，需採 360L 血	6000 瓶抗血清，需 48000 顆蛋	
飼養	360L 血/30L=12 匹馬	48000 顆蛋/120 顆蛋=400 隻鴨	48000 顆蛋/240 顆蛋=200 隻鴨
蛇毒用量	430mgX12 匹馬=5160mg	36mgX400 隻鴨=14400mg	62mgX200 隻鴨=12400mg

Tab25：鴨蛋與馬血清成本比較

	馬	鴨(以 5-21 週估)	鴨(未來評估)
隻數	12 隻	400 隻	200 隻
動物一年價錢(元)	35 萬/隻 x12 隻=420 萬 420 萬/3 年=140 萬元	20 元/隻 X400 隻=8 千/1 年=8 千	2 元/隻 X200 隻=4 千/1 年=4 千
一年飼料(元)	4 萬/隻 X12 隻=48 萬	32 萬	16 萬
一年人工水電(元)	1 萬/隻 X12 隻=12 萬	48 萬	24 萬
動物免疫(元)	本局人力	本局人力	本局人力
採血或蛋	本局人力	由代養人員代工	由代養人員代工
一種蛇種計(元)	156 萬 8 千	81 萬	40 萬 4 千

參 考 文 獻

1.Almeida, C. M., Kanashiro, M. M., Rangel, F. B., Mata, M. F., Kipnis, T. L. and Silva W. D. 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. Vet Rec. Nov 21;143(21):579-84

2.A stabilizer currently used in lyophilized BCG vaccine produced in NIPM.

3.Bartz, C. R., Conklin, R.H., Tunstall, C. B.,and J. H. Stesele. 1980. Prevention of murine rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins. J. Infect. Dis. 142: 439-441

4.Hatta, H., Tsuda, K., Akschi, S., Kim, M., Yamamoto, T. and Ebina, T. 1993.Oral passive immunization effect of antihuman rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzyme. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1077-1081

5.Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz, J., Childers, N. K. and Michalek, S. M. 1997. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to Streptococcus mutans.Caries Res. 31(4):268-74

6.Hideaki Yokoyama. , Robert C., et al (1991) Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Escherichia coli infection in neonatal piglets. Infection and Immunity. 60 (3) 998-1007

7.Hiraga, C., Kodama, Y., Sugiyama, T., and Y. Ichikawa. 1990. Preventive of human rotavirus infection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis. 64 : 118-123

8.Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpern, J., and Roth T.F. 1985 Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. Immunology. 54(4):755-762

9.Larsson, A., Karlsson-Parra, A., Sjoquist, J. 1991 Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rhreumatoid factors. Clin. Chem. 37: 411

10.Mariner, J. C., House, J. A., Sollod, A. E., Stem, C., ENDE, MVD., and Mebus, C. A. 1990. Comparison of the effect of various chemical stabilizers and lyophilization cycles on the thermostability of a Vero cell-adapted rinderpest vaccine. Veterinary Microbiology. 21:195-209

11.Parrisg, H. M. annd Hayes, R. H. 1970. Hospital management of pit viper venenations. Clinical Toxicology 3 (3): 501-511

12.Romabaut, B., Andries, K., and Boeye, A. 1991. A comparison of WIN 51711 and 78206 as stabilizers of poliovirus virons and procapsids. J. of General Virology 72: 2153-2157

13.Rose, M. E., Orlans, E., and Buttres, N. 1974. Immunoglobulin classes in

the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur J. Immunology: 521-523
14. Shimizu, M., Nagashima, H., Hashimoto, K., and Suzuki, T. 1994. Egg yolk antibody(IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentration. Journal of food science. 59(4) : 763-772
15. Shin, J. -H., Yang, M., Nam, S.W., Kim, J. T., Myung, N. H., Bang, W. -G., Roe, I. H. 2002 Use of egg yoke-derived immunoglobulin as an alternate to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9,5: 1061-1066
16. Sood, D. K., Aggarwal, R. K., Sharma, S. B., Sokhey, J., and Singh, H. 1993. Study on the stability of 17D-204 yellow fever vaccine before and after stabilization. Vaccine 11(11)
17. Sugita-Konishi, Y., Shibata, K., Yun, S. S., Hara-Kudo, Y., Yamaguchi, K. and Kumagai, S,. 1996. Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria.Biosci Biotechnol Biochem. May; 60(5):886-8
18. Sutherland, S. K. 1997. Serum Reactions. An analysis of commercial antivenoms and the possible role of anticomplementary activity in de-novo reactions to antivenoms and antitoxins. Med. J. Aust. 1: 613-615
19. Svendsen B. L., and Hau, J. 1996. Chicken egg inpolyclonal antibody production. Scand J. Lab. Anim. Sci. 23(1): 85-91
20. Takaku, K., Yamashita, T., Yoshida, I., Taguchi, H., Kato, M., Goda, H., Osanai, T., Amano, T., Kunita, N., Shoji, K., and Inoue, K. Stability of the ultracentrifuge-purified vaccine, In: Immunization for Japanese encephalitis
21. Thalley, B. S. and Carroll, S. B. 1991. Rattlesnake and Scorpion antivenoms from the egg yolk of immunized hens. Bio/Technology 8: 934-938
22. Webber, T.H., Kapyaho, K.I., Tanner, P.1990 Endogenous interference in immunoassays in clinical chemistry. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 50 (Soppl.201): 77-82
23. Yolken, R. H ., Leister, F., Wee, S.-B., Miskuff, R., and S. Vonderfecht. 1988. Antibodies to rotaviruses in chicken egg : a potential sourse of antiviral immunoglobulins suitable for human consuption , Pediatrics 81 : 291-295