

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000120

衛生福利部疾病管制署 106 年度署內研究計畫

題目：不同飯匙倩蛇毒抗原免疫劑量誘導馬匹

產生中和抗體的影響評估

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署

計畫主持人：謝文欽

研究人員：陳昭宏、許靜侖、王瓊儀、劉健信

執行期間：2017年01月01日至2017年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本部意見，如對外研究成果應事先徵求本部同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	3
中文摘要	4
英文摘要	6
壹、前言	8
貳、材料與方法	10
參、結果	13
肆、討論	19
伍、結論與建議	23
陸、計畫重要研究成果及具體建議	24
柒、參考文獻	25
捌、附件	27

共 (28) 頁

中文摘要(字數以不超過六百字為原則)

研究目的：

飯匙倩是台灣六大毒蛇之一，其蛇毒主要為神經毒，包含cobratoxin及cardiotoxin等，其蛇毒特性是毒性強，分子量小，也因此免疫動物實常有免疫性不佳狀況產生。另一方面抗蛇毒血漿的生產以免疫馬匹為主，因為馬匹較其他動物容易操作、適合大多數環境及氣候、血漿產量較大，以及馬血漿抗體純化已廣為接收並行之有年。本研究之重要目標為減少飯匙倩蛇毒的使用量，並產出高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，藉此提升本中心產製抗血漿之能力。

研究方法：

以免疫過抗龜殼花及赤尾鮫(出血性)蛇毒抗原，但無出血性蛇毒抗體表現之馬匹為實驗對象，建立低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫計畫，並利用戊二醛(glutaraldehyde)無毒化飯匙倩蛇毒抗原後，混合不同佐劑免疫馬匹；免疫期間定期分析免疫馬匹之抗體效價，並監測馬匹健康指數。

主要發現：

本研究利用低劑量的蛇毒抗原免疫馬匹，配合佛式佐劑的使用可使馬匹產生高效價的抗蛇毒抗體，在追加免疫期間更可於4週內即可達到本中心採血效價標準 ≥ 40 TU(Tanaka Unit)/mL的抗飯匙倩蛇毒抗體效價。而使用MONTANIDE™ GEL的組別，則無法產生達到本中心採血效價標準 ≥ 40 TU/mL的抗飯匙倩蛇毒抗體效價。

使用佛式佐劑的組別，雖然對馬匹產生血球容積比(Hematocrit; HCT)降低、白血球(WBC)升高及傷口較多等等健康的影響，但從本研究可知追加免疫時期只需免疫2次，亦即約4周時間，即可使抗體效價提升至可達到符合本中心抗血漿產製收集的標準 ≥ 40 TU/mL；因此，對於已完成基礎免疫並有抗體效價之馬匹，可藉

由減少免疫期程，延長馬匹休息期，使馬匹恢復健康後，再行追加免疫。

結論及建議事項：

本研究成功利用免疫不同蛇毒抗原、經休養且健康的馬匹，成功產出高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，對本中心抗飯匙倩蛇毒血漿供應產能確有提升，且有助於本中心馬匹服役管理、調配，如此可降低採購馬匹的成本。此外，建立低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹，減少飯匙倩蛇毒抗原的使用量，並獲得高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，對於減少蛇毒抗原耗損及紓緩馬匹不適感，有其顯著貢獻。

關鍵詞：抗蛇毒血漿、馬匹免疫

英文摘要(字數以不超過六百字為原則)

Purpose :

Naja atra, Cobra, is one of the most 6 important poisonous terrestrial snakes in Taiwan. Venoms of *Naja atra* possess neurotoxic, inducing by cobratoxin, cardiotoxin, et al. The property of these venoms are highly-toxic and low molecular weight which lead to low immunogenicity in horses. In the other hand, horse is the most preferred choice of animal for the commercial production of antivenin worldwide. The horses are preferred over other animals because they are easy to handle, thrive in all climates, yield large volume of serum and also the methods of purification of horse antibody are well standardized. The main objective of this study is to reduce the use of *Naja atra* snake-venom, and produce hyper-immune anti-plasma against *Naja atra* snake-venom, thereby enhancing the center's ability to produce anti-plasma.

Methods and materials :

This study use the horses immunized with anti-*Protobothrops mucrosquamatus* and *Trimeresurus steinegeri* snake-venom, but no neutralized antibody was produced. In terms of reducing the amount of venom, with reference to foreign immunity way, immunize of horses by use low doses venom-antigen, the other will also be different adjuvant venom-antigen horses, analysis of potency and monitoring of horses health index.

Results :

In this study, the use of low doses of snake venom antigen immunization of horses, with the use of Freund's adjuvants can make horses produce high potency of anti-snake venom antibodies. During the additional

immunization within 4 weeks can be achieved the titers of blood collected standard $\geq 40\text{TU}$ (Tanaka unit)/mL. However, the use of MONTANIDE™ GEL group failed to produce the titer of anti-*Naja atra* snake venom antibody.

Although the group with the Freund's adjuvant had a health effect of lowering the HCT, increasing the WBC and having more wounds in the horses, it can be known from this study that the immunization only requires two immunizations, and it takes about 4 weeks. The antibody titers can be raised up to the standard of $\geq 40\text{TU} / \text{mL}$ which is in line with the center's anti-plasma collection system. Therefore, the horses' rest can be prolonged by reducing the immunization schedule and the horse can recover healthy if they have completed basic immunization and the antibody titers.

Conclusion and suggest :

In this study, we reduce the *Naja atra* snake venom dose to immune horses, and the successful produce the high potency plasma. For our anti-plasma supply capacity has indeed improved. In addition, the successful use of horses immunized with different snake venom antigens to produce a high-potency anti- *Naja atra* plasma have contributed significantly to the efficiency of horses management. Lower venom immunization doses can improve the health condition of horse during immunization period.

Key worlds : hyper-immunized plasma · horse immunization

壹、前言

世界衛生組織(WHO)統計全世界每年蛇咬傷的總數超過500萬人，其中有125,000人致死案件，而尤其在亞洲最為嚴重，約有200萬件毒蛇咬傷案例，以及100,000件致死個案[1]。在臺灣，因氣候溫暖潮濕適合蛇類繁殖，早期生態未破壞前處處可見蛇類出沒，全國毒蛇約23種，臨床上較常見的六大毒蛇分別是出血毒性的龜殼花、赤尾鮎及百步蛇；神經毒性的兩傘節及飯匙倩(眼鏡蛇)；混合毒性之鎖鏈蛇。被毒蛇咬傷之後臨床上的症狀，輕者造成疼痛、瘀血、出血，嚴重者會造成肌肉麻痺、呼吸衰竭，嚴重者會導致死亡。治療蛇毒咬傷使用正確種類的抗毒蛇血清是最佳的治療方式，國內該血清為本署提供。在神經性蛇毒方面目前本中心以減毒過的蛇毒粗毒免疫馬匹，經採血及純化等步驟，以完成生產抗神經性蛇毒血清。

飯匙倩是台灣六大毒蛇之一，每年需製造大量的抗蛇毒血清，供應治療被該種毒蛇咬傷的病患。飯匙倩蛇毒主要屬於神經性毒，包含：cobratoxin 及 cardiotoxin 等，其毒性強，分子量小，抗原免疫性不佳，因此不易產製具有高效價的抗蛇毒血漿。目前本中心以戊二醛(Glutaraldehyde；GA)無毒化神經性蛇毒，不但減弱蛇毒毒性，且增加了該蛇毒抗原的免疫性。目前為達蛇毒蛋白產生足夠的抗原性，使用較高劑量的蛇毒抗原，進行馬匹免疫，雖然蛇毒蛋白已經由戊二醛無毒化，但較高劑量的蛇毒抗原，對於馬匹的健康仍另人擔憂，且飯匙倩為保育類蛇類之一，其蛇毒取得不易。另一方面，為提升免疫效益，本中心目前使用佛式佐劑，藉以提升馬匹免疫反應，然而佛式佐劑經常伴隨局部傷口潰爛、肉芽腫及無菌性膿瘍等過度發炎反應。近年來，已有許多安全且具免疫誘導效果的免疫佐劑上市，其中由賽彼科公司發展出的免疫佐劑 MONTANIDE™ GEL 是一系列即時分散的創新聚合物佐劑，旨在提高水性疫苗的安全性和功效，此佐劑的特點在於高度穩定的聚丙烯酸鈉凝膠顆粒在水中的分散，藉由聚丙烯酸鈉凝膠顆粒聚合物吸附性質，以及其聚合物具有緩慢釋放的功能，提升了先天性免疫系統的辨識效果，此佐劑提供了相當於鋁鹽(aluminum salt)佐劑的安全性及顯著增強的免疫反應，並可降低其中免疫主成分的黏性及免疫油性佐劑所引起的不良反應[2-4]。

利用馬匹免疫蛇毒抗原，仍是現今國內外生產抗蛇毒血清之主要製造方法。但是馬匹採購及飼養所費不貲，因此有健全的馬匹健康監控，以避免身體損傷甚至死亡，進而影響抗蛇毒血漿之品質及產量。

因此本研究之重要目標為減少飯匙倩蛇毒的使用量，並產出高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，藉此提升本中心產製抗血漿之能力。此外，定期監測馬匹健康指數及降低馬匹不適應，維持抗蛇毒血漿之品質，也本研究之重要目標之一。

本研究所要完成之工作項目，包含：

1、建立低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹：

目前飯匙倩馬匹，以3、5、8、12及15mg劑量開始免疫，當到達15mg後，以5mg為單位向上增加至40mg為止。每次免疫及追加免疫不完全佐劑(Freund' s incomplete adjuvant)等體積混合，每處免疫點約進行0.1-0.2mL免疫，每匹馬每次總免疫體積約3-5mL。本研究計畫參考國外免疫方式，以低劑量即可達到免疫效果，因此計畫將降低免疫劑量，以新的免疫時程免疫馬匹[5-9]。

2、以不同佐劑混合飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹：

目前馬匹免疫無毒化後，再與佛式佐劑混合之成為免疫用抗原，由於佛式佐劑免疫後副作用常造成馬匹表皮局部傷口潰爛、肉芽腫及無菌性膿瘍等過度發炎反應[10]。為了減少馬匹發炎情形，本研究計畫將以新的佐劑(Gel)配合減少劑量，免疫馬匹。

3、分析免疫馬匹之效價。

產出高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿是本研究之重點，因此無論以低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫之馬匹，還是以不同佐劑混合飯匙倩蛇毒抗原免疫之馬匹，本研究計畫將利用田中單位(Tanaka unit; TU)效價檢測法，定期檢測馬匹血漿抗體效價，期能產出高效價的抗蛇毒血漿。

4、監測馬匹健康指數。

為了解蛇毒抗原與佐劑對馬匹健康的影響，本研究計畫將定期監測馬匹健康狀況，預計監測指標包含：HCT、WBC、肝功能、CPK、ALP等。以分析低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫與不同佐劑組別間對馬匹健康之影響。

貳、材料與方法

一、蛇毒：

每次採毒前檢視毒蛇活動力及進食情形，以評估是否可進行才採毒 (milking)。蛇毒新鮮採集後，立即進行凍結乾燥。凍結乾燥後之蛇毒存放於 -20°C 冷凍保存待用。

二、蛇毒無毒化：

取出凍結乾燥飯匙倩蛇毒，於生物安全櫃內、室溫下靜置約 30 分鐘待其回溫。依免疫組別秤取所需之蛇毒量後，將蛇毒溶液集中至塑膠注射針筒中，以磷酸緩衝液(DPBS; Hyclone/GE)進行溶解，目視溶解完全後，以 $0.22\ \mu\text{m}$ 針頭過濾器進行無菌過濾至已滅菌之玻璃試管中。將含已過濾蛇毒溶液之玻璃試管安置於震盪器上，輕微搖晃，於搖晃同時，取溶液體積為 1/10 的 2.5% 戊二醛一滴一滴地加入蛇毒溶液中，使戊二醛最終溶度為 0.25%。滴完並輕微搖晃均勻後，於室溫下避光靜置作用約 45 ± 15 分鐘。再加入總體積 1/10 之 1M 甘氨酸溶液，用以中止無毒化反應，輕微搖晃均勻後，避光冷藏待用。

三、蛇毒抗原製備：

依免疫組別使用量進行調整無毒化蛇毒抗原溶液體積(每匹馬所需溶液體積量約為 1.5mL)。已完成無毒化抗原溶液體積調整之蛇毒溶液，與等體積比例之佛氏佐劑進行，混合完成後，即為蛇毒免疫抗原。另本研究計畫 MONTANIDE™ GEL (批號：L00217，由 Seppic 公司製造，針對動物所開發的 ready-to-disperse polymeric adjuvant) 組，則以 5:1 的體積比例混合即為蛇毒免疫抗原。

四、實驗動物：

- 1、馬匹：採購國外非馬匹法定傳染病疫區之健康馬匹。本研究挑選年齡介於 8~15 歲之健康狀況良好，免疫過抗龜殼花及赤尾鮫(出血性)蛇毒抗原，但

無出血性蛇毒抗體表現之馬匹。

2、小鼠：品系為 ICR，向樂斯科生物科技公司採購。

五、馬匹免疫：

先進行馬匹保定後，欲免疫之部位進行剃毛及以 75%酒精清潔。免疫部位以馬匹軀幹兩側為主，避開曾經免疫過之疤痕組織部位。注射方式為皮下注射 (subcutaneous injection)。每點注射點體積：基礎免疫第 0 週次每一注射點之注射體積為 0.1mL/每點注射部位，並將注射量分散於馬匹之免疫部位。其餘之基礎免疫週次及追加免疫之注射體積為 0.2mL/每點注射部位，並將注射量分散於馬匹之免疫部位。

六、馬匹試血：

採集馬匹頸靜脈之血。試血前先進行馬匹保定後，以 75%酒精在欲試血馬匹頸部部位進行消毒，然後以 10mL 含促凝珠之採血管，抽取全血 10mL。血清處理：採完血後，將輕柔的將採血管上下倒置數次後，於室溫直立靜置至少一小時，再放入 4°C 冰箱存放。待隔天回到實驗室後，將採血管以 3,000rpm, 4°C，離心 10 分鐘。離心後取上層血清，分裝至 1.5mL 抗凍管中，並標示試血馬匹編號及試血日期，置於 -20°C 冰箱保存，待用。

七、效價測定：本研究計畫區分之組別，每間隔 4 周進行馬匹試血，分析免疫馬匹之抗體效價，本研究利用田中單位效價檢測法檢測馬匹血漿抗體效價，操作方法說明如下：

1、檢體配製：

以 0.2%明膠磷酸緩衝生理氯化鈉溶液 (M/75; pH7.0)，將檢定用蛇毒溶解稀釋成 4MLD/mL (Minimal lethal dose; 最小致死劑量) 濃度之蛇毒溶液 (以下稱甲液)。再以等差方式將甲液稀釋成乙、丙、丁及戊四組，其濃度依序分為 1.50MLD、1.00MLD、0.80MLD、0.50MLD，即完成對照組配製。將待測檢體置於室溫回溫後，以 0.2%明膠磷酸緩衝生理氯化鈉溶液 (M/75; pH7.0) 依倍數比例稀釋，稀釋後與甲液 1:1 混合，即完成實驗組配製。將完成配製的對照組及實驗組置於 37°C 恆溫槽內，靜置 60 分鐘後，進行小鼠注射。

2、小鼠注射：

以 1mL、29 號 insulin 注射用針進行小鼠注射。注射部位為皮下注射。

對照組及實驗組每組均注射 3 隻體重 11~13 g 健康且不限公母的 ICR 小鼠，每隻注射體積為 0.2 mL。24 小時後觀察紀錄死亡隻數、存活隻數及計算其效價。

3、力價判讀對照組判讀：

對照組中 $\geq 1\text{MLD}$ 的劑量小鼠組別（即乙及丙組），每組小鼠需全部死亡；而 $< 1\text{MLD}$ 的小鼠組別（即丁組及戊組），每組最好有 1 隻以上小鼠存活，若有符合上述現象，則本次對照組力價可判定為”適”，且可進行下面的實驗組判讀，若無符合上述現象，則本次力價測試應重新進行。實驗組判讀：以實驗組別中存活小鼠數目 ≥ 2 隻的最高稀釋組別做為該血漿力價判讀組。

八、監測馬匹健康指數。

為了解蛇毒抗原與佐劑對馬匹健康的影響，本研究計畫將定期監測馬匹健康狀況，預計監測指標包含：免疫傷口之觀察、體重、CBC、腎功能、肝功能、CPK、ALP 等。以分析不同組別間對馬匹健康之影響。

本研究計畫馬匹免疫傷口之觀察及體重量測，委託馬匹飼養人員協助觀察及每月定期測量體重。血液及生化分析部分，則委託嘉義市博愛家畜診所進行血液及生化檢驗分析，所使用儀器為：血液分析儀：IDEXX VetAuotread；生化分析儀：SPOTECHEM EZSP-4430。每次進行分析前均要求需通過品管檢測，並針對馬匹檢驗標準進行判讀。

九、圖表繪製、數字統計，以 Microsoft excel 2013 分析執行。

參、結果

本研究挑選健康狀況良好，免疫過抗龜殼花及赤尾鮫(出血性)蛇毒抗原，但無出血性蛇毒抗體表現之馬匹 7 匹。在使用低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫的組別一開始選用了 4 匹馬，但於基礎免疫後休息期間有一匹馬死亡，因此排除該匹馬的資料不列入統計分析，故共分析了 3 匹馬之資料；在以不同佐劑混合飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹的組別同樣分析了 3 匹馬之資料。

1、建立低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹：

本計畫收集文獻後，建立低劑量免疫期程，詳如下表一及表二，與目前製造抗飯匙倩血漿之免疫期程比較，在基礎免疫計畫上可節省 65mg 之蛇毒，約減少 1/3 之用毒量；而再追加免疫計畫上可再減少 1/3 蛇毒用量，節省了 30mg 之蛇毒。

表一：飯匙倩蛇毒抗原基礎免疫馬匹計畫期程

飯匙倩蛇毒	週 次	
	每 2 週免疫一次	總使用量
SOP 免疫期程	起始劑量為 3mg，逐步增加，最終劑量為 40mg。	196
本計畫免疫期程	起始劑量為 3mg，逐步增加，最終劑量為 22mg。	131

表二：飯匙倩蛇毒抗原追加免疫馬匹計畫期程

飯匙倩蛇毒	週 次	
	每 2 週免疫一次	總使用量
SOP 免疫期程	起始劑量為 15mg，逐步增加，最終劑量為 30mg。	90

本計畫免疫期程	起始劑量為 12mg，逐步增加，最終劑量為 18mg。	60
---------	-----------------------------	----

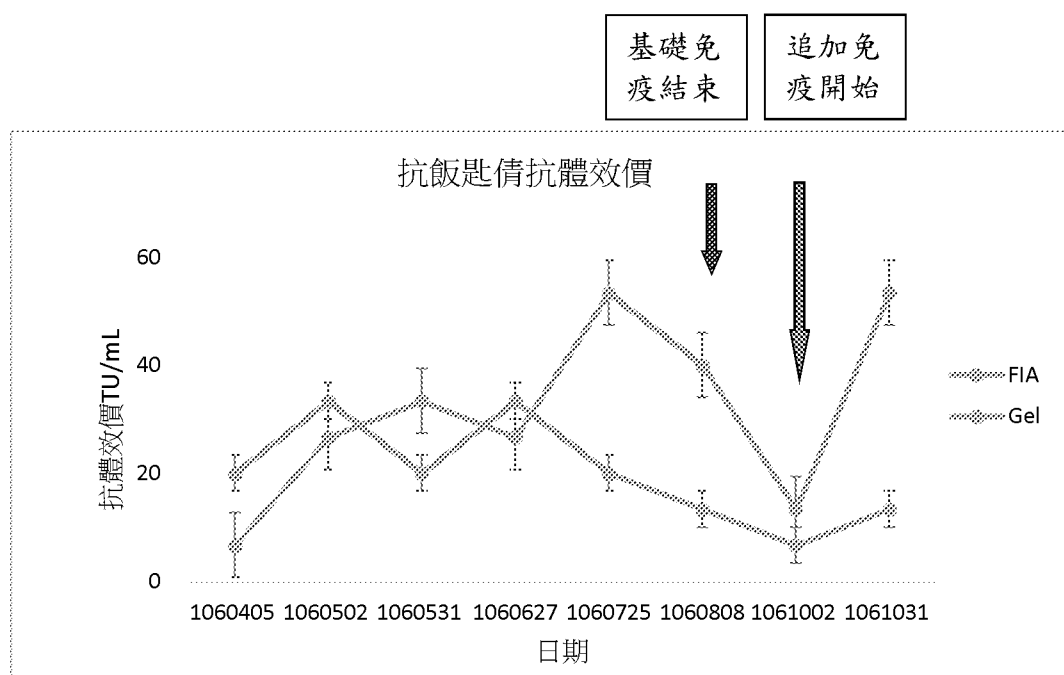
2、以不同佐劑混合飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹：

本計畫亦規劃使用新的免疫佐劑，依表一及表二的免疫計畫期程進行免疫，以比較不同佐劑混合飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹之效果。

3、分析免疫馬匹之效價：

利用低劑量的蛇毒抗原免疫馬匹，確實可使馬匹抗蛇毒抗體效價產生。觀察使用佛式佐劑的組別剛開始第 6 周沒有明顯上升，但 10 週前持續上升，並在第 14 週上升至最高，已達本中心採血效價標準($\geq 40\text{TU/mL}$)，可收集其馬匹血漿，產製抗飯匙倩蛇毒血清製劑；則當基礎免疫結束後，沒有免疫的休息期間抗體效價則減低，在追加免疫開始時降到最低，但於追加免疫後 4 週抗體效價即上升與基礎免疫的第 14 週相同效果，如圖一。

反之，觀察使用 MONTANIDE™ GEL 的組別，免疫 6 週後即有抗飯匙倩抗體效價產生，10 週後抗體效價持續維持，但 14 週後馬匹抗體效價反而下降，於追加免疫後 4 週抗體效價，依然沒有達到本中心採血效價標準。



圖一：抗飯匙倩蛇毒抗體效價分析。依計畫免疫佛式佐劑(FIA)及

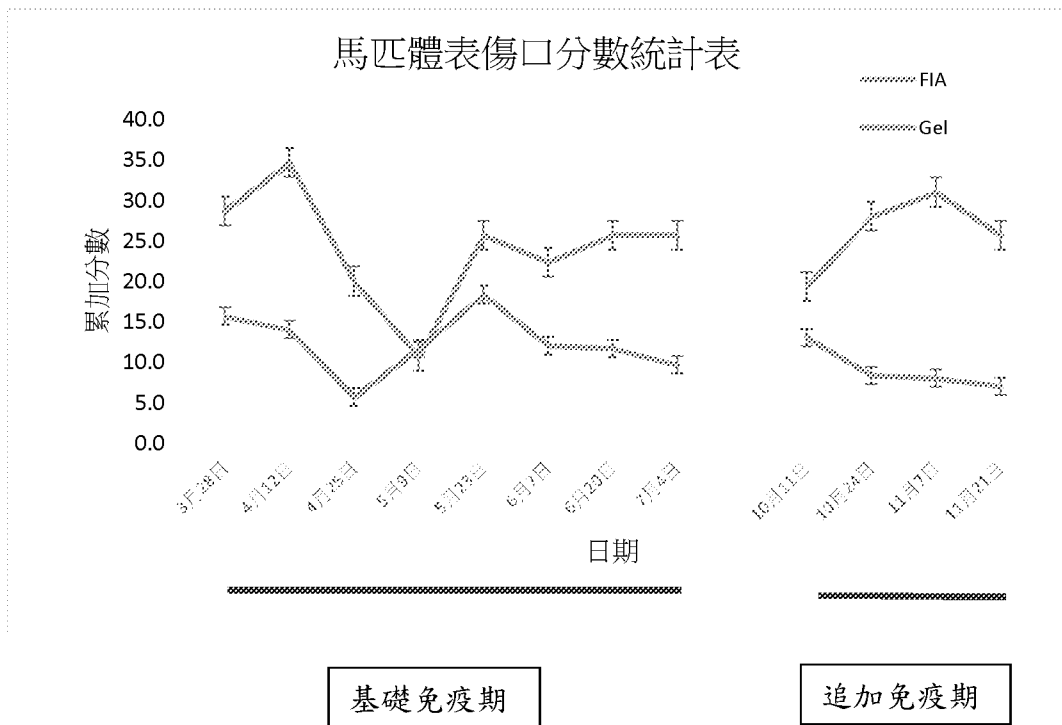
MONTANIDE™ GEL(Gel)兩組；每組三匹馬；抗體效價單位為田中單位 (TU)/mL。

4、監測馬匹健康指數。

免疫傷口之觀察：馬匹體表免疫傷口委託馬場飼養人員於免疫後隔周(間隔7天)進行觀察及計數，計分方式及分數統計結果，如表二及圖二。觀察結果顯示，利用低劑量的蛇毒抗原免疫馬匹，在主觀觀察上馬匹體表免疫傷口有減少情形。觀察使用低劑量的蛇毒抗原混和 MONTANIDE™ GEL 佐劑的組別，明顯比佛式佐劑的組別傷口要少。

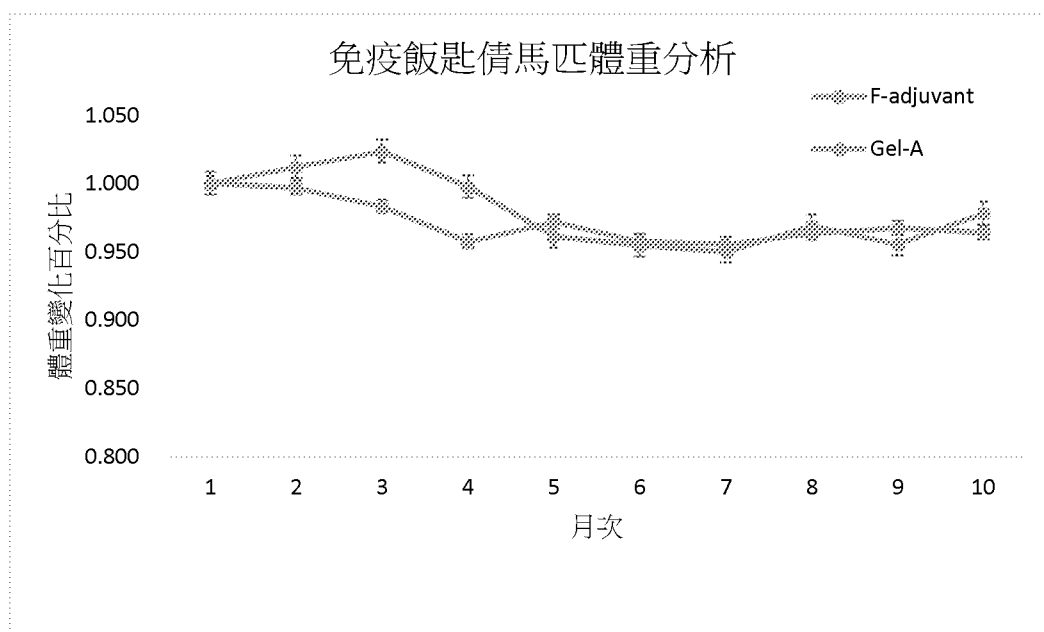
表二：免疫傷口計分說明：

傷口說明	分數
開放式傷口	3
免疫部位腫超過3公分	2
免疫部位腫小於等於3公分	1



圖二：馬匹體表免疫傷口平均積分統計，依低劑量計畫免疫佛式佐劑(FIA)及 MONTANIDE™ GEL(Gel)兩組；每組三匹馬。

馬匹體重量測方面：以校正完成之地磅，委託飼養人員於每月進行馬匹體重測量，以馬匹免疫前的體重為基礎，每月紀錄體重增減變化的百分比，繪製如圖三。利用低劑量的蛇毒抗原加佛式佐劑免疫馬匹的組別，一開始體重並無明顯變化，於免疫後3個月後體重開始下降情形發生，約減少至免疫前的體重5%後體重則持續維持。觀察利用低劑量的蛇毒抗原加 MONTANIDE™ GEL 免疫馬匹的組別，一開始體重就逐步減少，而後約減少至免疫前的體重5%後體重則持續穩定；兩組最後體重減少的比例相當均約免疫前的體重5%。

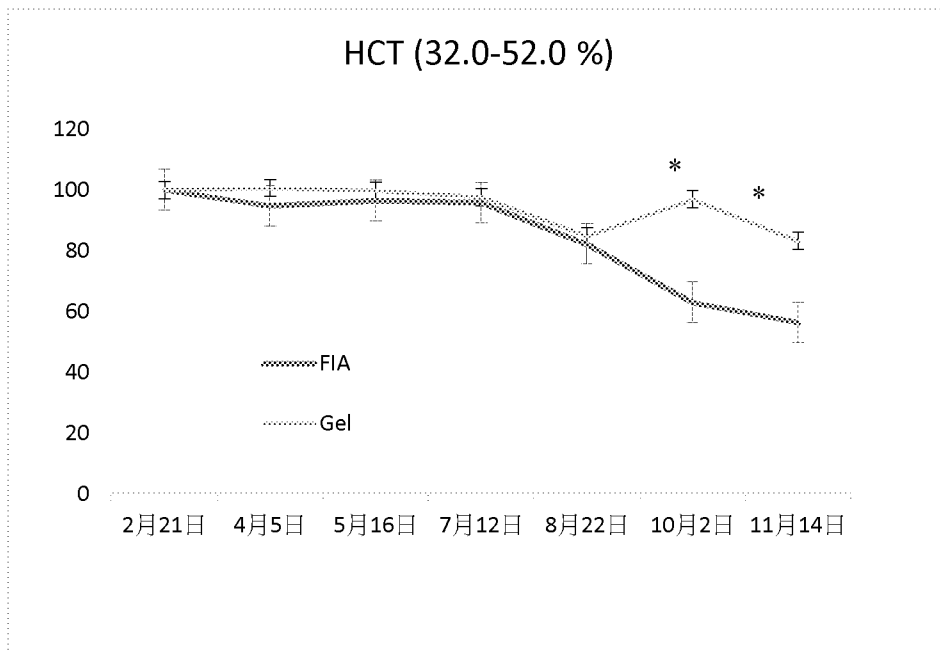


圖三：馬匹體重分析，依低劑量計畫免疫佛式佐劑(FIA)及 MONTANIDE™ GEL(Gel) 兩組；每組三匹馬。

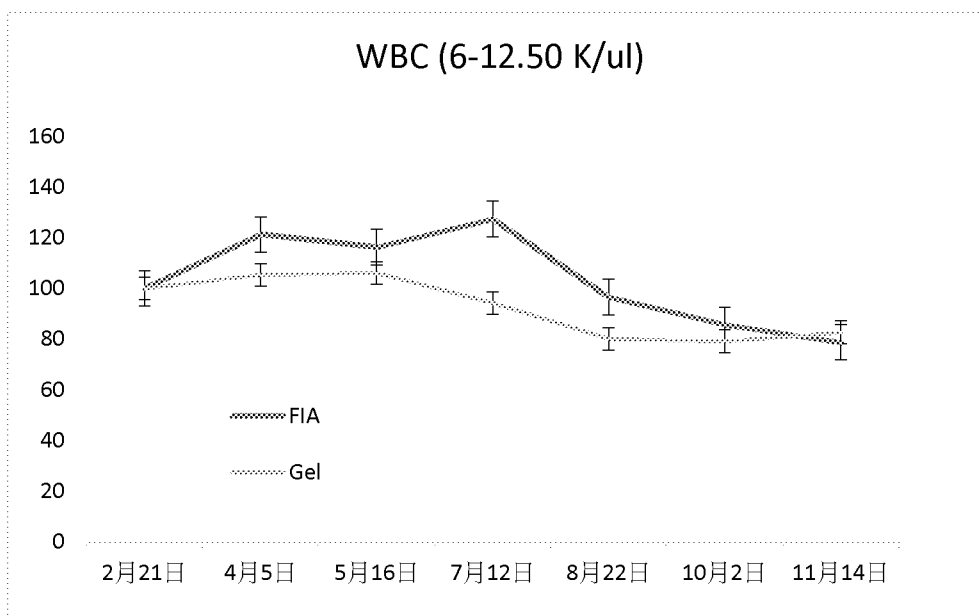
血液及生化檢驗分析：本計畫進行監測項目，包含：血球計數(CBC)：HCT、HGB、WBC、PLT；及血清生化值：BUN、CREA、TP、ALB、GLOB、AST、ALKP、GGT、TBIL 及 CK。

血球計數研究結果顯示：在紅血球分析方面，兩組佐劑免疫馬匹的組別，一開始 HCT(血球容積比)並無明顯變化，但於基礎免疫後期(免疫後 6 個月後)，開始下降，約減少至免疫前的 80%。觀察利用低劑量的蛇毒抗原加 MONTANIDE™ GEL 免疫馬匹的組別，基礎免疫完成休息後，HCT 即恢復免疫前的健康狀況，但反觀，加佛式佐劑免疫馬匹的組別基礎免疫完成休息後，不但沒有回復健康，HCT 減少的情形在追加免疫後，更加嚴重，與免疫前相比減少了 44%，以 student t-test 檢定兩組，則有統計上意義($P < 0.05$)。在白血球分析不同組別顯示，使用 MONTANIDE™ GEL 的組別，無明顯變化；而在使用佛式佐劑的組別，白血球指數與免疫初期相比則明顯上升約 20%，且持續整個基礎免疫的期間，但基礎免疫結束並休息後，白血球指數有恢復至免疫前的健康狀況。

血清生化值研究結果顯示：TP、GLOB 大部分馬匹均有升高，推測免疫的正常反應；ALKP、GGT 及 CK 也有部分馬匹升高，推測為免疫發炎反應所造成；其餘生化值如：腎功能(BUN、CREA)、肝功能(AST、TBIL)等均無明顯變化(圖表資料未顯示)。



圖四：馬匹 HCT 分析，依低劑量計畫免疫佛式佐劑(FIA)及 MONTANIDE™ GEL(Gel)兩組；每組三匹馬。*表：student t-test 檢定有統計上意義 (P<0.05)。



圖五：馬匹 WBC 分析，依低劑量計畫免疫佛式佐劑(FIA)及 MONTANIDE™ GEL(Gel)兩組；每組三匹馬。

肆、討論

飯匙倩是台灣六大毒蛇之一，每年需製造大量的抗蛇毒血清，供應治療被該種毒蛇咬傷的病患。飯匙倩蛇毒主要屬於神經性毒，包含：cobratoxin 及 cardiotoxin，其毒性強，分子量小，因此不易製造高效價的抗蛇毒血漿。目前世界其他國家，以及早期本中心未建立無毒化飯匙倩蛇毒抗原時期，馬匹服役期短、折損率(死亡率)高，同時馬匹的飯匙倩抗體效價也不高，需同時飼養及免疫眾多馬匹才可供應市場需求，形成人力、物力及成本的增加；目前本中心已研發利用戊二醛(Glutaraldehyde, GA)無毒化神經性蛇毒，不但減弱蛇毒毒性，且增加免疫抗原性，並獲取高抗體效價的馬血漿，因此得以滿足市場供應需求。但依目前免疫規劃需使用較高劑量的飯匙倩蛇毒抗原，以產生足夠的抗原性，進而產生抗體；雖然蛇毒蛋白已經由戊二醛的無毒化大大降低了蛇毒毒性，但對於馬匹的健康仍另人擔憂，且飯匙倩為保育類蛇類之一，其蛇毒取得不易。

抗體效價的提升，是一個複雜的過程，包含抗原的選擇、抗原製備、免疫部位的選擇，以及良好的免疫計畫，包含注射劑量及免疫注射間隔等，每一個環節均會影響抗體效價的表現。再參考國外經驗，飯匙倩抗蛇毒血漿的製造，其免疫期程埃及與越南約需 30 週，泰國 38 週[6-7]，每次免疫周期總蛇毒量約 27~31mg，相較本中心基礎免疫時程只需 22 周，本中心免疫時間較短有時間上的優勢，但本中心目前完成一次完整基礎免疫周期需要 196 mg 的飯匙倩抗蛇毒，蛇毒使用量較其他國家要高出許多，因此本研究在目前的免疫計畫基礎上，規劃以減少約 1/3 之用毒量，亦既在基礎免疫計畫上可節省 65mg 之蛇毒，同時再追加免疫計畫上再規劃減少 4 成蛇毒用量，節省了 63mg 之蛇毒，如此對於毒蛇數量的需求、毒蛇飼養成本的減少、採毒之風險降低、馬匹體力上的負擔及延長馬匹服役(免疫)期、減少馬匹的耗損，尤其對於台灣不生產馬匹的國家，有其必要性。

承上所言，台灣馬匹大部分仰賴進口，因此減少服役馬匹體力上的負擔、改善免疫不適應及減少馬匹的耗損，亦是本研究目標之一。首先在馬匹的選擇上，本研究挑選年齡介於 8~15 歲之健康狀況良好，免疫過抗龜殼花及赤尾鮫(出血性)蛇毒抗原，但無出血性蛇毒抗體表現之馬匹，再次使用這些馬目的在於期望研究結果表現良好，則可活化不適任馬匹的使用，方便服役馬匹管理。惟使用免疫過出血性蛇毒抗原但無法產生出血性蛇毒抗體表現之馬匹，是否會

有減少神經性抗體表現?考量出血性蛇毒包含：龜殼花及赤尾鮫蛇毒抗原，以 Phospholipase A2(PLA2)、Snake venom metalloproteinases(SMVP)、Fibrinogenases、Antiprothrombin...等為主；而飯匙倩蛇毒抗原則以 cobrotoxin、cardiotoxin...為主，兩大類蛇毒成分不同，且神經性蛇毒經戊二醛(Glutaraldehyde, GA)無毒化，增加了免疫抗原性，且為減少馬匹採購，因此經評估嘗試馬匹轉換不同免疫組別；本研究結果顯示，利用低劑量的蛇毒抗原混合佛式佐劑免疫馬匹的組別，於基礎免疫後第 22 週，及追加免疫後 4 周後，均達到符合本中心抗血漿產製收集的標準 $\geq 40\text{TU/mL}$ ；因此從研究結果顯示未來馬匹可轉換不同免疫組別，亦既可從免疫出血性蛇毒轉換成神經性蛇毒。

其次在考量減少服役馬匹體力的負擔上，本研究除了規劃減少蛇毒抗原免疫劑量，使馬匹受到飯匙倩蛇毒的傷害得以減輕，同時也考量佛式佐劑經常伴隨局部傷口潰爛、肉芽腫及無菌性膿瘍等不良反應，因此規劃 MONTANIDE™ GEL 之聚合物佐劑，藉此提升先天性免疫系統的辨識效果，提供相當於鋁鹽 (aluminum salt) 佐劑的安全性及免疫反應，並期望水性佐劑可降低其中免疫主成分的黏性及免疫油性佐劑所引起的過度發炎反應。本研究結果顯示，利用低劑量的蛇毒抗原免疫馬匹，確實可使馬匹抗蛇毒效體產生，並有隨著免疫劑量的增加及時間的遞延，抗體效價亦逐步的向上增加，基礎免疫完成及休息後，抗體效價則隨之下降，但追加免疫開始後，抗體效價旋即快速上升，可能以誘發其免疫記憶細胞，該組馬匹已成功的完成免疫計畫。本研究參考幾篇泰國、越南及埃及的文獻，均以最後可「中和多少毫克之蛇毒」為研究成果，因研究論文不會書寫過程，另外免疫計畫及過程可能涉及商業機密，因此本研究無法對於蛇毒免疫後之抗體效價變化做出相關文獻比較及探討。相對地，觀察使用 MONTANIDE™ GEL 的組別，在 14 週後效價不升反降，並且該組別馬匹均無達到符合本中心抗血漿產製收集的標準 $\geq 40\text{TU/mL}$ ，推測原因包含：MONTANIDE™ GEL 是藉由聚丙烯酸鈉凝膠顆粒聚合物吸附抗原，以提高小分子抗原呈現性，但本中心之飯匙倩蛇毒抗原已經由戊二醛(Glutaraldehyde, GA)無毒化神經性蛇毒，聚合了蛇毒抗原，因此 MONTANIDE™ GEL 失去了原有功效；另外，配合本中心免疫的間隔為 2 星期(14 天)免疫作業一次，MONTANIDE™ GEL 所形成的水性抗原，是否已被馬匹吸收代謝為其中原因之一。

目前研究結果僅比較利用低劑量的蛇毒抗原配合佛氏佐劑免疫馬匹及配合 MONTANIDE™ GEL 的兩組結果比較，無法與既有高劑量免疫方法組別比較，最大

原因為馬匹的條件不同，之前本中心均以 3~5 歲新馬為免疫對象，以此方法免疫舊馬(免疫過其他蛇毒)則為第一次，目的有所不同因此無法與既有免疫方法組別比較，在既有免疫方法新馬的組別，以 103~104 年的結果來看免疫 4 匹馬(馬匹編號：406、407、412 及 413)，其結果 100%均可達到符合本中心抗血漿產製收集的標準 $\geq 40\text{TU/mL}$ 。

在馬匹健康觀察上：觀察使用 MONTANIDE™ GEL 的組別，明顯比使用佛式佐劑的組別傷口統計分數要少，配合觀察白血球上升比例使用 MONTANIDE™ GEL 的組別，亦比使用佛式佐劑的組別要少，因為蛇毒的免疫的劑量與無毒化的程度均相同，因此推論免疫傷口增加及白血球上升比例是由佛式佐劑所造成，這也符合之前文獻對於佛式佐劑副作用的描述。在血球容積比(HCT)方面，使用佛式佐劑的組別在基礎免疫末期及追加免疫期間，逐步下降，並且與使用 MONTANIDE™GEL 的組別達到統計上顯著差異，推論佛式佐劑副作用已對馬匹健康造成嚴重傷害，使用馬匹後期回復功能無法趕上耗損的速度，因此造成在血球容積比(HCT)逐步下降。

馬匹體重量測表現方面，儘管最後使用佛式佐劑與 MONTANIDE™ GEL 的組別分別均下降了約 5%左右的體重，大致上兩組的馬匹呈現穩定的狀況，但觀察下降的模式：使用佛式佐劑的組別，在 8 週後有下降情形發生，16 週後則維持穩定，另使用 MONTANIDE™ GEL 的組別一開始體重則明顯下降，12 週後維持穩定。對此本研究推論：使用佛式佐劑的組別儘管免疫傷口增加、白血球明顯上升，但馬匹初期只要食慾正常，體重變化不大，而 8 週後健康耗損逐漸增加促使體重下降，而 16 週後雖然體重穩定，但血球容積比(HCT)方面，則逐步下降，再次顯現馬匹後期回復功能無法趕上耗損的速度；至於使用 MONTANIDE™ GEL 的組別一開始體重即明顯下降，對此本研究推論：因 MONTANIDE™ GEL 佐劑為水劑，因此在皮下釋放的速度原比佛式佐劑快，造成一開始馬匹免疫後不適，影響食慾所造成。

本研究中有一匹馬匹(編號：350)於實驗過程中死亡，經委託國立中興大學獸醫學院動物疾病診中心進行解剖，綜合判斷結果死亡原因為肝臟破裂造成血腹疝痛以及低血量休克而死亡。解剖報告對於死亡原因陳述如下：「此匹馬肝臟因多次出血後造成肝細胞壓迫性死亡，使肝臟有效細胞量愈來愈少，出血也造成凝血因子消耗而逐漸無法止血，剖檢時腹中大量未凝固血也顯示凝血功能嚴重受損(馬匹死亡至剖檢至少已經過七小時)。多次出血也造成肝和橫膈黏連。根據疾管

署提供 7 月 11 日此馬的血檢數值可知當時已呈慢性肝病。最終大量出血造成肝壓力過大使肝包膜破裂，大出血形成血腹」。因本次研究馬匹之前均免疫過抗龜殼花及赤尾鮫(出血性)蛇毒抗原，因此此匹馬匹死亡是否為本次實驗所造成，亦或長期免疫蛇毒後造成肝臟的損傷得結果，無法定論。

伍、結論與建議

本研究成功利用免疫不同蛇毒抗原、經休養且健康的馬匹，成功產出高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，對本中心抗飯匙倩蛇毒血漿供應產能確有提升，且有助於本中心馬匹服役管理、調配，如此可降低採購馬匹的成本。此外，建立低劑量飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹，減少飯匙倩蛇毒抗原的使用量，並獲得高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，對於減少蛇毒抗原耗損及紓緩馬匹不適感，有其顯著貢獻。

雖然本研究嘗試以新的佐劑混合飯匙倩蛇毒抗原免疫馬匹，最後結果並沒有有效的提升馬匹抗飯匙倩之抗體效價，但本中心未來將持續的嘗試對馬匹副作用少，身體負擔輕的新興佐劑，期能找出既可產生高效價的抗飯匙倩蛇毒血漿，又可對馬匹無副作用的免疫方式。

使用佛式佐劑的組別，雖然對馬匹產生HCT降低、WBC升高及傷口較多等等健康的影響，但從本研究可知追加免疫時期只需免疫2次，亦即約4周時間，即可使抗體效價提升至可達到符合本中心抗血漿產製收集的標準 $\geq 40\text{TU/mL}$ ；因此，對於已完成基礎免疫並有抗體效價之馬匹，可藉由減少免疫期程，延長馬匹休息期，使馬匹恢復健康後，再行追加免疫。

陸、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 建立新的免疫時程，達到減少蛇毒的使用量，減少毒蛇飼養，並減緩毒蛇損耗及採毒之風險，進而達到毒蛇保育之效果。
- (二) 產製合格的抗蛇毒血漿，提升產能，增進抗蛇毒血清凍晶注射劑供貨之能量。
- (三) 減少馬匹蛇毒接受量及免疫副作用，提升馬匹生活品質，促進馬匹健康。
- (四) 本計畫研究同仁也可藉由參與此計畫學習 PIC/S GMP 規範中有關法規及精神，及學習相關之實驗設計及執行，提升對實驗之興趣及能力。

柒、参考文献

- 1、WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenin Immunoglobulins Number of pages: 141 Publication date: May 2010。
- 2、R. Parker, S. Deville, L. Dupuis, F. Bertrand, and J. Aucouturier. Adjuvant formulation for veterinary vaccines: MONTANIDE™ Gel safety profile. *Procedia in vaccinology* 1, 2009, 140~7.
- 3、A.B. Waghmare, N.C. Salvia, R.L. Deopurkarb, P.A. Shenoyc, J.M. Sonpetkarda. Evaluation of health status of horses immunized with snake venom and montanide adjuvants, IMS 3012 (nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (emulsion based) during polyvalent snake antivenin production: Hematological and biochemical assessment. *Toxicon* (82), 2014, P83~92.
- 4、A. Waghmare, R.L. Deopurkarb, N. Salvia, M. Khadilkara, M. Kalolikara, S.K. Gadea. Comparison of Montanide adjuvants, IMS 3012 (Nanoparticle), ISA 206 and ISA 35 (Emulsion based) along with incomplete Freund's adjuvant for hyperimmunization of equines used for production of polyvalent snake antivenin Vaccine Volume 27, Issue 7, 11 February 2009, P1067~72.
- 5、S. Sapsutthipas, P.K. Leong, S. Akewan, R. Pratanaphon, N.H. Tan, K. Ratanabanangkoon. Effective Equine Immunization Protocol for Production of Potent Poly-specific Antisera against *Calloselasma rhodostoma*, *Cryptelytrops albolabris* and *Daboia siamensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* March 2015。
- 6、E. M. El-Kady, N.M. Ibrahim, A.F. Wahby. Assessment of the anti-Naja haje antibodies elicited in a low dose multi-site immunization protocol. *Toxicon* Volume 54, 2009, P450~9.
- 7、C. Chotwiwattanakun, R. Pratanaphon, S. Akewan, S. Sriprapat, K. Ratanabanangkoon. Production of potent polyvalent antivenom against three elapid venoms a low dose, low volume, multi-site immunization protocol.

Toxicon Volume 39, 2001, P1487~94.

- 8、繆柏齡、廖明一、黃瑞禎等台灣飯匙倩蛇毒類毒素之製備中華醫學雜誌 1990；46：1~6。
- 9、劉健信、李佳蓉、李蓉、許靜倫、陳昭宏、張筱琦、謝文欽；蛇毒蛋白應用研究及抗蛇毒血清製造技術，疫情報導；2015；31 卷 4 期，P76~85。
- 10、P. Leenaars, M. A. Koedam, P. W. Wester, V. Baumans, E. Claassen, C. F. Hendriksen. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. Laboratory Animals Volume 32, 1998, P387-406.

行政院衛生署疾病管制局 106 年度科技研究發展計畫

期中報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000120

計畫名稱：不同飯匙倩蛇毒抗原免疫劑量誘導馬匹產生中和抗體的影響評估

委員一

順序	審查意見	答復說明
1	單一抗眼鏡蛇血清：本案使用單一眼鏡蛇毒製造抗毒血清，對臨床具有幫助，因為兩傘節咬傷較為罕見，且極易從臨床症狀區別兩者；若能製造單一血清、提高效價、減少蛇毒用量、與馬匹受傷，實務上符合世界潮流。	抗蛇毒血清之製造，飯匙倩的抗原性兩傘節比差，因此本研究以探討飯匙倩蛇毒為主。
2	單一馬匹免疫時程 20 週，共可減少蛇毒用量 65 mg 是很好的。	謝謝委員指導。
3	使用無出血性蛇毒抗體表現之馬匹，是否也會有減少神經性抗體表現？建議同意見 4. 在期末報告時，嘗試作合理的探討。	謝謝委員指導，已於討論中探討。
4	使用 IMS 3012 佐劑免疫組別，在 14 週時效價不升反降，可能原因為何？馬匹因素、蛇毒抗原因素、抑或蛇毒與 IMS 3012 混合比例因素，應考慮在期末報告時探討。	謝謝委員指導，已於討論中探討。
5	實驗結束後，假設效價確實無法升高，未來應可考慮以其他物種(例如兔子)、或正常產生效價的馬匹來做類似實驗，以確認原因並改良免疫程序。	謝謝委員指導，未來新馬仍為產製抗血清的主力。
6	目前僅提供兩組別的比较（低劑量蛇毒-Freud' s adjuvant vs. 低劑量蛇毒-IMS 3012），建議期末報告時，可與既有免疫方法(SOP)產生之效價作一初步的比较，以便了解本案可能之優缺點。	既有免疫方法(SOP)，因馬匹條件不同，未來有更多數據時再行比較。
7	建議期末報告時，可將各組馬匹總數、折線圖或長條圖的範圍定義註記說明(例如 95% Confidence Interval or Standard Deviation)，以利判讀。	已於圖型中說明標記 SD。

疾病管制局 106 年度科技研究發展計畫

期中報告審查意見回覆

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000120

計畫名稱：不同飯匙倩蛇毒抗原免疫劑量誘導馬匹產生中和抗體的影響評估

委員二

順序	審查意見	答復說明
1	飯匙倩蛇毒抗原雖然成分不是很複雜，但是中和抗體確受其免疫劑量影響，如果能找出關鍵劑量將可省去不少工夫。這些成果的產出將值得推薦的。	謝謝委員指導。