

計畫編號：DOH92-DC-1045

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

黃病毒單株抗體製備之研究

研究報告

執行機構：財團法人佛教慈濟綜合醫院

計畫主持人：陳立光

研究人員：楊惠華

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

目次	頁數
摘要	(3)
(一) 前言	(7)
(二) 材料與方法	(10)
(三) 結果	(13)
(四) 討論	(14)
(五) 結論與建議	(15)
(六) 參考文獻	(17)
(七) 圖表	(20)

中文摘要

黃病毒家族有七十三個病毒，其中三十四個經由蚊子傳染、十七個由壁蝨傳染，另外造成人畜共通之二十二個黃病毒的媒介則是未知的。可造成人類疾病的有四十個黃病毒，當然包括了已知最重要的三個人類病媒傳染病：黃熱病、登革熱及日本腦炎。在最新公佈的傳染病防治法中，我國衛生署也將這三種病列為第一級及第三級的法定傳染病。本計劃之目的在研究如何製備單株抗體可以辨認造成上述三種疾病之黃病毒，以及近來正快速新興的另一個黃病毒--西尼羅病毒，供行政院衛生署疾病管制局應用於對黃病毒的流行病學研究及疾病之控制與預防。

本計畫將在三年中將以上四種黃病毒或其抗原分別免疫小鼠後，取其脾臟細胞製成融合瘤細胞，經篩選出可以生產辨認黃病毒抗體之單株細胞株，大量繁殖產製純化之單株抗體之後，更進一步對小鼠單株抗體的種類及辨認之抗原定性，最後再測定這些單株抗體對其他種黃病毒之交叉反應性。有實用價值的抗黃病毒單株抗體將進行高純度的量產，提供疾病管制局使用於黃病毒感染症的研究及管制。

在過去一年中，本實驗室也將第一年得到之抗登革熱第三型之 16 株單株抗體之抗原性研究完成，其中 9 株具登革三型特異性之單株抗體均辨認 E 蛋白上的抗原。本實驗室也順利得到 5 株可作用於黃熱病毒之單株抗體，其中三株辨認 NS1 蛋白，另外兩株辨認 E 蛋白。按照計畫完成預訂進度。

中文關鍵詞(至少三個)：黃病毒、單株抗體、流行病學、疾病控制

Abstract

The genus *Flavivirus* is composed of about 73 viruses. Of these viruses, 34 are mosquito borne, 17 are tick borne, and 22 are zoonotic agents transmitted with now known vector. Forty species of the flavivirus family have been associated with human disease. Yellow Fever, Dengue Fever, and Japanese Encephalitis, are the most important arboviral infectious diseases across every continent and have been legitimized into Class I and Class III transmissible disease, must be reported, in current issue of Regulation of Prevention and Control for Transmission Disease at Taiwan. The specific aim in this proposal is generation of monoclonal antibodies (MoAb)s against four flaviviruses, including the emerging West Nile in addition to the three viruses mentioned above for CDC at Taipei.

In this three-year proposal, BALB/*cJ* mice will be immunized by these 4 different flaviviruses and hybrids will be generated by fusion of myeloma cells and immunized splenocytes. After selection the virus-specific antibody-producing hybridoma in HAT culture medium, cloning will be done with limiting dilution method. The virus-specific MoAb s will be purified from ascites of NOD/*scid* mice injected intraperitoneally with hybridoma cells. The antigenic specificity and typing of immunoglobulin subclass of MoAb will be characterized and optimal sandwich ELISA pairing between MoAbs will be crossmatched.

In the first year, 16 monoclonal antibodies were generated against type 3 dengue virus and this year, further characterization of antigenic molecule showed that epitope(s) on E

protein of only Den 3 were specifically recognized by these monoclonal antibodies. In addition, 5 monoclonal antibodies reacting to Yellow Fever virus were obtained in the 2nd year. The NS 1 protein was identified as antigenic molecule recognized by three of the five monoclonal antibodies, and viral protein E was recognized by other two. As far as date, this project was progressed on the trail of schedule.

Keyword: Flavivirus, Monoclonal Antibody, Epidemiology, Disease Control

前言

政策或法令依據

根據民國八十八年六月四日在立法院三讀通過之中華民國行政院衛生署傳染病防治法⁽¹⁾，第三條中將黃病毒引起的黃熱病毒列為第一類傳染病，登革熱及日本腦炎列為第三類傳染病。第二十九條中明定疑似這三種傳染病必須通報的時限。而感染黃熱病的患者第三十五條中更被規定必需接受強制隔離治療。當然檢驗黃熱病的任務也在第三十六條中確定為中央主管機關之職責。若違反以上等規定，則在第四十條至第四十四條定有嚴重的罰則。由以上法令規定可見我政府對黃病毒引起之上述三大傳染病之重視。本計劃之提出是反應行政院衛生署疾病管制局於九十年九月二十八日在網站 <http://www.cdc.gov.tw> 上公開徵求「九十年度科技發展研究計劃」而提出。

問題狀況

黃病毒家族有六十九個病毒，其中六十七個均經由病媒傳染。可造成人類疾病的有三十八個黃病毒，當然包括了已知最重要的三個人類病媒傳染病：黃熱病、登革熱及日本腦炎⁽²⁾。至目前為止，對黃病毒引起的疾病並沒有治療的特效藥，在傳染的控制方面，有些黃病毒如黃熱病毒、日本腦炎病毒有疫苗可以施打；但其他黃病毒引起的流行病如登革熱就只有靠早期準確的診斷後，儘速撲殺病媒蟲來中止流行的傳染。在診斷時要測定標本中是否有病毒抗原或要測定病人血清中是否有抗病毒的抗體存在，都要先有可辨認病毒抗原所必須的試劑——病毒抗原特異性抗體。而要減少錯誤診斷，就必須使用背景值極低的病毒抗原特異性純化單株抗體。可惜這類產品在市面上並無成品發售，少數可由 ATCC 取得之單株抗體，因結合力差而診斷效果不佳，國際

雜誌上有些外國實驗室雖報導有可用之單株抗體⁽³⁾，但大都吝於贈予。因此對想要診斷用黃病毒特異性單株抗體有取得困難之問題。

發展需求

黃熱病毒近年來流行的區域是南美洲及非洲^(2,4)，為何同樣緯度的亞洲卻未見感染報告？一直是個有趣的問題，但在交通如此快捷方便的今天，世界已相對地縮小了，黃熱病毒在東南亞是被低估的結果或是真的不存在，已經不重要了。反而是黃熱病在傳染病防治法中被列為第一類（最可怕的）法定傳染病卻是即定政策。所以發展黃熱病的診斷及控制方法是不可推卸的責任。台灣地處日本腦炎及登革熱的流行地區，日本腦炎雖有疫苗的施打多年，但每年仍有數十個確定病例，而且年齡層有增高的趨勢⁽⁵⁾。登革熱並不是年年大流行，但流行之頻率有逐年增加的趨勢。尤其是今年高雄縣市流行的登革疫情，依據衛生署疾病管制局截至 91 年 10 月 29 日為止⁽⁶⁾，已共計超過 4000 個登革熱確定病例數了，因此流行的病毒也由以前的境外移入漸漸變為在此生根的本土型登革病毒。加上日本腦炎及登革熱均被傳染病列為第三類法定傳染病⁽¹⁾，既然自國外取得辨識黃病毒之單株抗體困難，自己產製就是當務之急。因此六年前在本計劃主持人的實驗室就開始產製抗日本腦炎及登革病毒之單株抗體，並慷慨的贈與國內外各黃病毒研究單位共享，因使用本實驗室提供的單株抗體得到結果而寫成文章也已陸續刊出。

西尼羅病毒是近來再新興的一個黃病毒⁽⁷⁾，中東是最早流行的地區，但近十年來迅速的向北擴展至東歐、俄國，向南擴展至幾乎整個非洲，向西延伸至中歐、西歐，甚至渡過大西洋，在 1999 年於美國紐約州造成腦炎的大流行^(8,9)，截止至 2001 年 7 月的最新資料顯示最少感染了十四個州的鳥類⁽¹⁰⁾。從美國 CDC 網站上公佈的西尼羅病毒 2000 年及最近 2002 年之地理分佈（圖

一)₍₁₁₎，可看出此病毒正以極快的速度從東西兩方面向我國夾殺而來。所以為了不久的未來，可能將面臨要控制西尼羅病毒的感染，在此計劃中特別將之納入要生產單株抗體辨認之黃病毒之一。

材料與方法

1.方法：

單株抗體之製備：

六至八週齡之 BALB/cJ 雌性小鼠經由腹腔內免疫注射 3×10^6 pfu 的黃病毒，加等體積之 Freund's 完全佐劑。追加免疫注射三次，分別間隔兩週，但改加不完全佐劑。免疫四次後隻小鼠抽取眼窩血，以免疫酵素法 (ELISA) 測定血清中抗黃病毒抗體之效價⁽¹⁸⁾。高效價小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 NS-1 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中融合，在經含有 HAT 之培養液篩選⁽¹⁷⁾，會分泌抗黃病毒抗體之融合瘤細胞用免疫酵素法⁽¹⁸⁾挑選出來，以限制稀釋法進行單一細胞培養成單細胞株，再一次使用免疫酵素法⁽¹⁸⁾找出能分泌辨識黃病毒單株抗體的融合瘤細胞株。

能生產單株抗體的融合瘤細胞株冷凍保存在液態氮中，當要生產時取出解凍培養至足夠的數目後， 1×10^7 個細胞注射入經 Freund's 不完全佐劑刺激過的多產 NOD/scid 母鼠腹腔中，等待腹腔漲大時，定時抽取腹水。收集起來的含單株抗體腹水將經含 Protein A 或 Protein G 之親和性層析管柱吸附後沖下，純化之單株抗體以抗體純化液相層析系統 (AKTA Prime System) 收集後，再以光譜儀及蛋白質分析法定量保存於-80 凍箱中。

單株抗體種類之定性：

經黃病毒免疫小鼠脾臟細胞融合瘤產生之單株抗體之種類或亞種，將用小鼠融合瘤亞種分型組件 (Borehringer Mannheim 公司) 來測定⁽¹⁹⁾。這是實驗室採用免疫酵素法來區別單株抗體是小鼠抗體種類中的 IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 或 IgM，其詳細步驟將依據廠商隨附之使用方法手冊。單株抗體為何種類決

定其吸附實驗時使用 Protein A 或 Protein G。

單株抗體結合黃病毒抗原之定性：

對黃病毒抗原呈免疫酵素反應陽性的單株抗體將進一步進行所結識黃病毒抗原之定性。本計劃將採用輻射免疫沉澱法⁽²⁰⁾測定病毒抗原之分子量大小，推算出是黃病毒抗原中的那一個。黃病毒感染細胞在無 Methionine 及 Cysteine 的 RPMI-1640 中培養一小時後，加入 50 μ Ci 的 ³⁵S Pro-Mix (Amersham) 再培養四小時。細胞經 PBS 經 PBS 洗淨後溶解在含有蛋白酵素抑制劑的細胞溶解緩衝液中。細胞溶液中加入待測單株抗體及 Protein A (或 Protein G) 包裹之 Sepharose (Pharmacia 公司) 後在室溫中作用一小時。免疫複合物吸附之 Sepharose 以 RIPA 緩衝液沖洗後煮沸，釋出之抗原分子再經 10% SDS-PAGE 後，自我輻射顯影找出抗原分子量之大小。

單株抗體對不同黃病毒抗原之交叉反應定性：

已經測知抗原性的黃病毒單株抗體經量產純化後，將進一步以免疫墨漬法 (Immunoblot) 測定是否會交叉反應其他黃病毒抗原⁽²⁰⁾。要點如下：不同黃病毒感染之細胞以溶解緩衝液溶解，其蛋白質經 SDS-PAGE 分開後轉漬至 Nitrocellulose 膜 (Hybond-C Super; Amersham 公司) 上，經含 5% 脫脂奶粉之 PBS 阻斷非特異結合後，加入待測單株抗體及 HP 酵素結合之山羊抗小鼠免疫球蛋白反應後，轉變受質 4-chloro-1-naphthol 呈色。

2.材料：

病毒及培養細胞：

本計劃中所將使用的黃病毒說明劍下表：

病毒	株名	來源	參考資料
日本腦炎病毒	NT109	自有	12, 13
登革病毒第一型	HAWAIIAN	自有	ATCC
登革病毒第二型	PL046	自有	14
登革病毒第三型	H-87	自有	ATCC
登革病毒第四型	H-241	自有	ATCC
黃熱病毒	17D	衛生署疾病管制局	15, 16
西尼羅河病毒	VR-1510	衛生署疾病管制局	ATCC

以上黃病毒的增殖將以昆蟲細胞株 C6/36 或哺乳類動物細胞株 BHK-21 在添加胎牛血清及 L-Glutamine 的 RPMI-1640 培養液中進行。

結果

一、黃熱病毒的製備：

黃熱病毒株 17D 由衛生署疾病管制局提供，在本實驗室中以 BHK-21 細胞大量增殖後，低溫保存於-80 冰箱中，被感染 30 小時的 BHK-21 細胞，用黃質病毒特異性的單株抗體 YF081 進行免疫螢光染色，結果顯示於圖二。

二、抗黃熱病毒單株抗體的產生：

四週齡的 BALB/cJ 母鼠經黃熱病毒與佐劑混合液以腹腔內注射免疫四次後，血清中抗黃熱病毒的抗體效價高達 1：4000 後，予以犧牲並取其脾臟細胞與骨髓瘤細胞 NS1 進行融合，融合後以 HAT 培養液篩選融合瘤細胞，會產生對抗黃熱病毒抗原的融合瘤以倍數稀釋法進行單株培養。結果共有 21 株融合瘤可產生抗體，以免疫螢光染色法偵測出有 12 株融合瘤可與黃熱病毒抗原結合，結果顯示於圖三，此 12 株融合瘤再以 ELISA 方式偵測出有 9 株融合瘤可與黃熱病毒抗原結合，此 9 株融合瘤中有 4 株因也會與 Mock 細胞結合，因此得到了 5 株抗黃熱病毒的單株抗體。

三、抗黃熱病毒單株抗體之抗原性研究：

表一及表二為以免疫螢光測定法及免疫酵素測定法檢測上述五株抗黃熱病毒單株抗體與黃熱病毒家族中與其他成員交叉反應之結果。由此結果顯示此五株單株抗體對其他黃熱病毒家族成員之交叉反應程度均不相同。而根據西方墨點實驗證實 YF018，YF134 及 YF382 作用於分子量為 46kDa 之 NS1 蛋白上（圖四），而 YF271 及 YF365 辨認分子量為 50kDa 之 E 蛋白（圖五）。

四、抗第三型登革病毒單株抗體抗原性之研究：

經過西方墨點實驗，上一年得到之抗第三型登革病毒之 16 株單株抗體均作用於分子量 50 kDa 之 E 蛋白，由此可知其中 9 株登革第三型特異性之單株抗體辨認 E 蛋白上登革第三型才有的 epitope。

結論與建議

結論

- A. 已完成日本腦炎病毒之培養與抗原的製作
- B. 已完成登革病毒第一型之培養與抗原的製作
- C. 已完成登革病毒第二型之培養與抗原的製作
- D. 已完成登革病毒第三型之培養與抗原的製作
- E. 已完成登革病毒第四型之培養與抗原的製作
- F. 已完成黃熱病毒之培養與抗原的製作
- G. 已完成西尼羅病毒之培養與抗原的製作
- H. 已完成抗登革病毒第三型單株抗體融合瘤之篩選與單株培養
- I. 已完成抗登革病毒第三型單株抗體抗原性之研究。
- J. 已完成抗黃熱病毒單株抗體融合瘤之篩選與單株培養。
- K. 已完成抗黃熱病毒單株抗體抗原性之研究。

建議

透過主管機關認證 B S L - 3 實驗室, 向國外研究單位要求轉移國內沒有之黃質病毒。如 Murray Valley , St. Louis 及 Tick-born 腦炎病毒, 可進一步測定本計畫中生產之單株抗體在完整的黃

質病毒家族中之專一性。

參考文獻

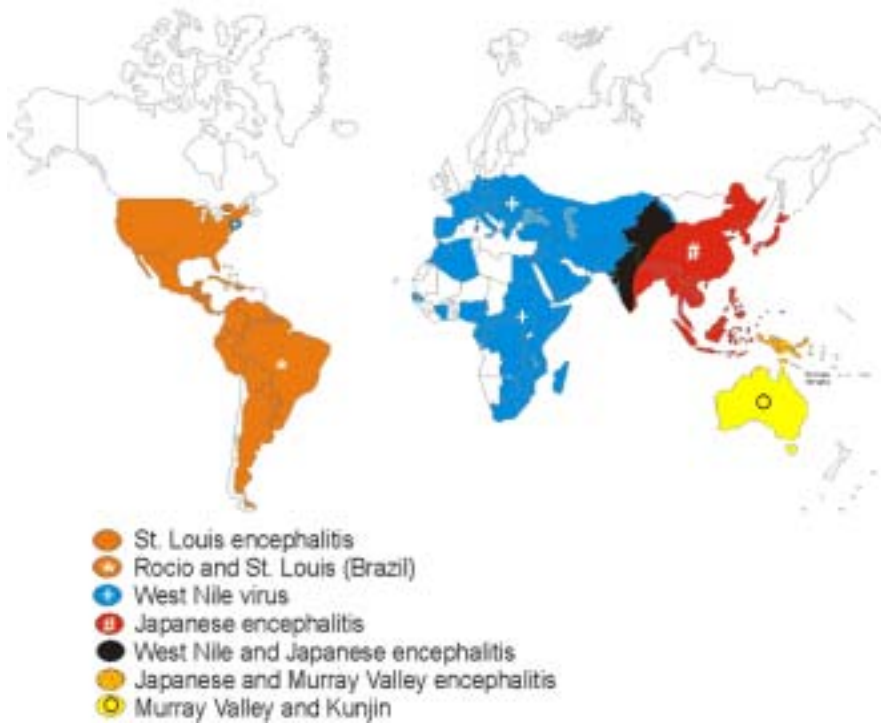
1. 中華民國行政院衛生署傳染病防治法。一九九九年六月四日立法三讀通過。
2. Monath, T.P. and F. X. Heinz. Flaviviruses. Chapter 31, In: *Field Virology* 3rd ed., 1996; 961-1034.
3. Berret ADT, Mathews JH, Miller BR et al. Identification of Monoclonal antibodies that distinguish between 17D-204 and other strains of yellow fever virus. *J.Gen. Virol* 1990; 71: 13-8.
4. Monath, TP. Yellow fever and dengue—the interaction of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Seminars Virol* 1994; 5: 206.1-206.13.
5. 台灣地區傳染病統計暨監視年報 中華民國八十八年，行政院衛生署疾病管制局，中華民國九十年三月，75 頁。
6. 行政院衛生署疾病管制局網站 <http://www.cdc.gov.tw/> 91 年 10 月 29 日發佈之新聞稿。
7. Special West Nile Virus. Edition of *Emerging Infectious Disease Journal* 2001; 7(4): 1-161.
8. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutami PT, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lacent* 2001; 358: 261-4.
9. Nash D, Mostashari F, Fina A, et al. The outbreak of West Nile virus infection in New York City area in 1999. *New England Journal of Medicine* 2001; 344: 807-14.
10. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* 2001; 50 (29) : 617-9.

11. [http:// www.cdc.gov/ ncidod/dvdid/ westnile](http://www.cdc.gov/ncidod/dvdid/westnile) Last reviewed Dec.11, 2002.
12. Lin, Y.-L., C.-L. Liao, C.-T. Yeh, C.-H. Chang, Y.-L. Huang, Y.-Y. Huang, J.-T. Jan, C. Chin, and L.-K. Chen. 1996. A Highly Attenuated Strain of Japanese Encephalitis Virus Induces the Protective Humoral and Cellular Immunities in Mice. *Virus Research* 44:45-56.
13. Chen. L.-K., Y.-L. Lin, C.-L. Liao, C.-G Lin, Y.-L. Huang, C.-T. Yeh, S.-C. Lai, J.-T. Jan, and C. Chin. 1996. Generation and Characterization of Organ-tropism Mutants of Japanese Encephalitis Virus in vivo and in vitro. *Virology* 223:79-88.
14. Lin, Y.-L. C.-L. Liao, L.-K. Chen, C.-T. Yeh, C.-I. Liu, S.-H. Ma, Y.-Y. Huang, C.-L. Kao, and C.-C. King. 1998. Study of Dengue Virus Infection in SCID Mice Engrafted with Human K562 Cells. *J. of Virology* 72(12):9729-9737.
15. Stokes A, Bauer JH, Hudson JH. Transmission of yellow fever to Macacus rhesus, preliminary note. *JAMA* 1928; 90: 253-4.
16. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65: 787-800.
17. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature (London)* 1975; 256:495-7.
18. Heinz FX, Berger R, Tuma W, Kunz C. A topological and functional model of epitopes of the structural glycoprotein of tick-borne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies. *Virology* 1983; 126:525-37.
19. Manufacture Instruction for Mouse-IgG ELISA (Catt. No. 1 333 151), Roche (Germany) Version 3, July 1999.
20. Huang, J.-H., J.-J. Wey, H.-F. Lee, T.-L. Tsou, C.-S. Wu, J.-R. Wu, H.-M. Chen, C. Chin, L.-K. Chen, M.-J. Pan, and T.-M. Wang. 1996. Identification of

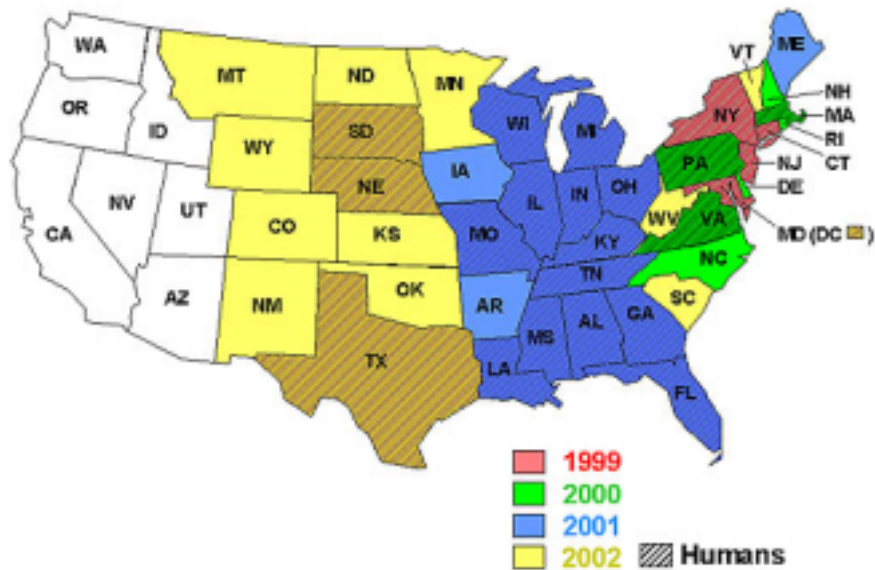
Immunodominant, Group-specific and Subcomplex-specific Continuous Epitopes
in the Core Regions of Japanese Encephalitis Virus Using Synthetic Peptides.
Virus Research 41:43-53.



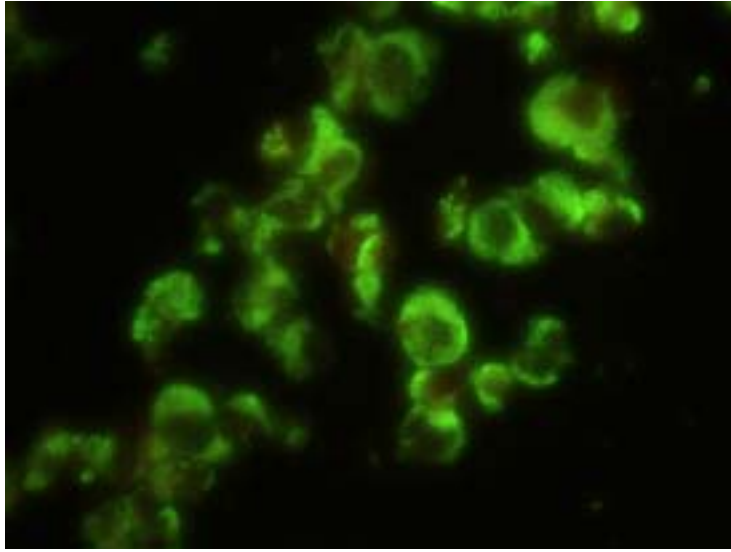
The Geographic Distribution of the Japanese Encephalitis Serocomplex of the Family Flaviridae, 2000.



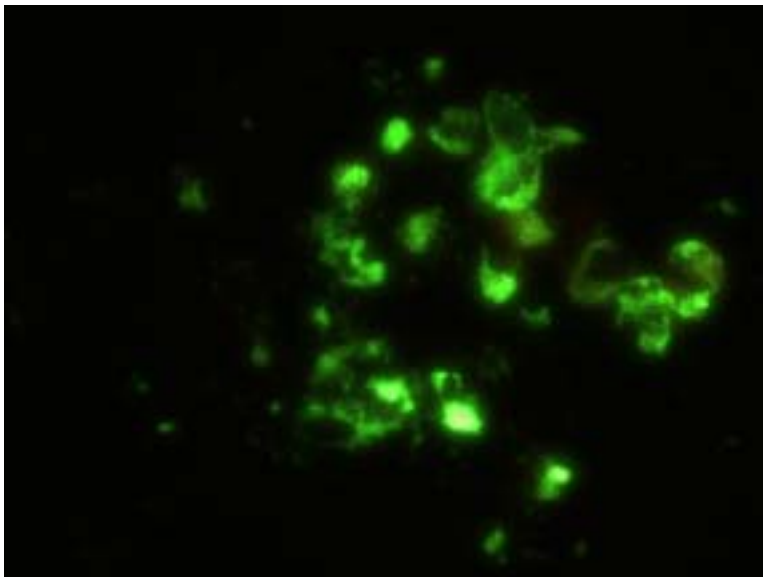
West Nile Virus in the United States, 1999 - 2002



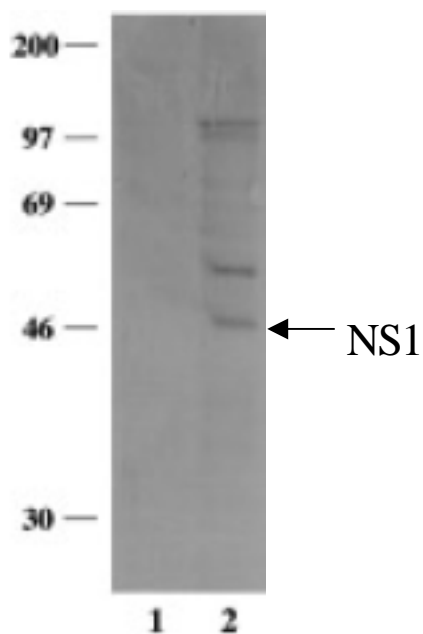
圖二：被黃熱病毒感染的 BHK-21 細胞與黃質病毒
特異性單株抗體 (YF018) 之免疫螢光反應



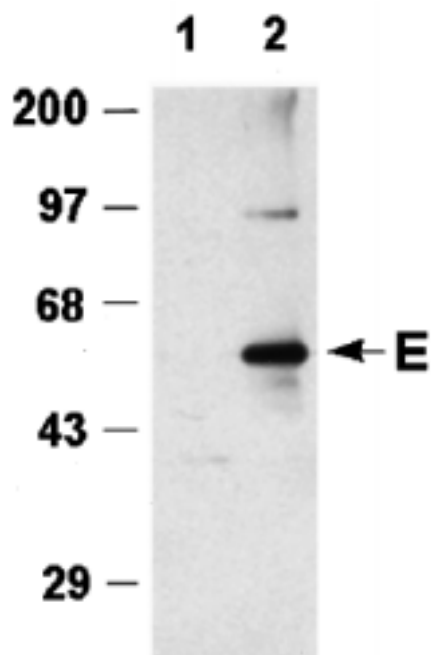
圖三：被黃熱病毒感染的 BHK-21 細胞與黃質病毒
特異性單株抗體 (YF365) 之免疫螢光反應



圖四：西方墨點實驗結果得知抗黃熱病毒單株抗體(YF018)作用於分子量為 46kDa 的 NS1 蛋白(Lane 2, 箭頭所示)；Lane 1 為 mock 細胞。



圖五：西方墨點實驗結果得知抗黃熱病毒單株抗體(YF365)作用於分子量為 50kDa 的 E 蛋白(Lane 2, 箭頭所示)；Lane 1 為 mock 細胞。



表一 使用免疫螢光法測試單株抗體與黃病毒屬抗原交叉反應之結果

	D1	D2	D3	D4	JE	YF	WN
YF018	1+	3+	3+	3+	2+	2+	3+
YF134	3+	3+	2+	-	-	4+	-
YF382	-	-	-	-	3+	3+	3+
YF271	-	2+	2+	1+	2+	2+	3+
YF365	-	-	2+	3+	3+	3+	4+

表二 使用酵素免疫分析法測試單株抗體與黃病毒屬抗原交叉反應之結果

	D1	D2	D3	D4	JE	YF	WN	MOCK
YF018	1.841	2.806	1.778	2.014	2.700	0.046	0.042	0.065
YF134	3.126	3.349	2.958	0.146	3.192	1.573	0.077	0.056
YF382	0.102	0.064	0.117	0.111	2.291	0.078	0.072	0.057
YF271	0.274	1.971	0.374	0.488	1.390	0.868	1.078	0.080
YF365	0.662	2.569	0.814	0.908	1.914	1.601	2.283	0.097