

計畫編號：DOH92-DC-1060

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

口服卡介苗製劑之開發

研究報告

執行機構：國防醫學院

計畫主持人：江樵熹

研究人員：葉明功、陳錦龍、李德政

執行期間：92年1月1日至92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 *

正文目錄

頁碼

摘要

1. 中文摘要 -----1
2. 英文摘要-----3

主文

1. 前言-----5
2. 材料與方法-----11
3. 結果-----15
4. 討論-----16
5. 結論-----18
6. 參考文獻-----19

圖目錄

圖一、天竺鼠經注射不同劑量 BCG 疫苗後，以 ELISA 分析血清中 IgG titer 所得之吸光值。
-----27

圖二、天竺鼠經注射 BCG 疫苗及口服 BCG 疫苗製劑後，以 ELISA 分析血清中 IgG titer 所得之吸光值。
-----27

圖三、天竺鼠經注射及口服給藥後三~九週，以 ELISA 分析血清中 IgG 之 titer 結果。(response ratio：實驗組之吸光值除以控制組)
-----28

圖四、天竺鼠經注射 0.5ml normal saline (控制組)，八週後進行柯霍氏試驗所得到之結果。
-----28

圖五、天竺鼠經注射接種 0.02 ml BCG 疫苗 (1mg/ml)，八週後進行柯霍氏試驗所得到之結果。
-----29

圖六、天竺鼠經注射接種 0.1 ml BCG 疫苗 (1mg/ml)，八週後進行柯霍氏試驗所得到之結果。
-----29

圖七、天竺鼠經注射接種 0.5 ml BCG 疫苗 (1mg/ml), 八週後進行柯霍氏試驗所得之結果。

-----30

圖八、天竺鼠經給予口服卡介苗疫苗製劑之賦型劑，八週後進行柯霍氏試驗得到之之結果。

-----30

圖九、天竺鼠經口服卡介苗疫苗製劑(4mg/隻)八週後進行柯霍氏試驗之結果。

-----31

表目錄

表一、天竺鼠經由不同給藥方式後所得之柯霍氏試驗結果

-----31

中文摘要

本計畫是進行口服卡介苗疫苗之製劑研發，分作三年進行，第一年進行固體微粒之製備，評估微粒之物化性質；並製備疫苗之口服劑型，經由體外溶出試驗評估製劑之釋出特性。第二年進行各種載體所含成分之影響，並評估配方因子對於疫苗製劑效價之改變，以建立最佳化疫苗製劑之配方。第三年主要進行的工作是開發評估疫苗療效的動物模式及探討口服疫苗製劑其製程之影響因子。

本年度是為第三年之計劃，在這一年度之研究，已初步建立實驗室小量製備口服卡介苗疫苗製劑之製程。並經由 Lowenstein-Jensen 斜面培養基，評估製劑之效價，探討製程之影響因子。動物實驗方面，以天竺鼠為模式動物，分別注射卡介苗或口服卡介苗疫苗製劑。給藥後三~九週，每週自耳朵採血一次，利用 ELISA 分析血清中 IgG 之 titer；並於給藥八週後，進行柯霍氏試驗。

研製之口服製劑，經由評估發現在低溫及低濕的製程環境下，具有較佳之力價。給藥後之天竺鼠，以 ELISA 分析血清中 IgG 之 titer。顯示隨注射之劑量增加，血清中 IgG 之 titer 亦越高；而口服給藥後血清中 IgG 之 titer 明顯較注射給藥的低。但經由注射及口服給藥之天竺鼠，給藥八週後，皆呈柯霍氏試驗之陽性反應；且口服給藥之天竺鼠無口咽發炎、食慾不振之現象。此結果初步驗證，本實驗室發展中之口服卡介苗疫苗製劑，

是經由黏膜免疫系統誘發免疫反應。

總結本實驗第三年之結果，在低溫及低濕的製程環境下，利用適當賦型劑，將凍晶乾燥卡介苗製備成具實用之口服製劑，經口服給藥，可到達腸道黏膜誘發免疫反應。

中文關鍵詞(至少三個)： 口服卡介苗、疫苗製劑、柯霍氏試驗

Abstract

The project attempts to develop an oral delivery system of BCG vaccine. The project is proceeded in three years. In the first year, solid dosage forms had been investigated to evaluate the physicochemical properties of developed preparations. Oral vaccine delivery systems were prepared, and the release characteristics were determined by *in vitro* dissolution method. In the second year, formulation factors potentially affecting vaccine delivery systems were assessed to establish an optimal formulation of oral vaccine preparation. In the third year, the major work is to develop an animal model to evaluate the therapeutic effect of vaccine preparations. The in-process factors related to the manufacturing procedure are evaluated.

In this year, we already established the preparing process of a laboratory-scale oral BCG vaccine delivery system. The BCG potency was determined using Lowenstein-Jensent media to evaluate the influence factors of the process. In addition, guinea pigs were used as an animal model for further assessing the immune effect. After inoculated the BCG vaccine or administrated the BCG oral vaccine, blood samples were collected from the ear vein of guinea pigs once a week during 3 ~ 9 weeks. Sera were harvested and stored at -80 before assay. Serum samples were analysed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Another, the Mantoux Test was performed at the 8th week following various administrations.

The oral BCG vaccine delivery system was prepared in low temperature and low relative humidity with higher potency. The Mantoux Test results revealed that both administrations via oral and subcutaneous routes

successfully induced immune response. The serum IgG activity in oral administration group was very low in comparison with subcutaneous administration group. It indicated that the mucosal immunization induced by the oral delivery was much different from that of the subcutaneous injection.

Overall the third year study results, we used suitable excipients, under the condition of low temperature and low relative humidity, an effective oral BCG vaccine delivery system could be developed. The delivery system demonstrated good mucosal immune response which might be potentially applied in vaccination for against tuberculosis.

Keyword: Oral BCG Vaccine, Vaccine Delivery System, Koch's Test

前言

結核病是目前全球各種傳染病中引起最多死亡的疾病。根據世界衛生組織的統計：1990 年全世界約有 750 萬的發病結核病人（每十萬人口 143 人），約有 50 萬人死於結核病。以發生率而言，男性比女性高，老年人比年輕人高，社會階層低的比社會階層高的高。台灣地區結核病死亡率由民國 36 年約每十萬人口 294.44 人逐年降低，並於民國 74 年結核病首度排除於十大死因之外，而於民國 86 年降為 7.48 人。台灣地區 20 歲以上成年人，在民國 77 年的 X 光診斷肺結核盛行率為 1.29%，民國 82 年所作 20 歲以上成人胸部 X 光診斷之肺結核盛行率為 0.65%，目前結核病的死亡率，大都維持在每十萬人口，7 人左右（1999 年為 6.88 人）。而在民國 89 年國人男性結核病死亡率更列入十大死亡原因，每十萬人男生人口，10.7 人，而世界衛生組織所訂結核病之控制標準為 0.14%，因而國人在肺結核之防治仍需努力。

一般而言，在盛行率低的已開發國家，如歐美各國，其結核病的發生大部分是內因性的（endogenous），即由舊的纖維化或鈣化病灶再活化而來，反之，在盛行率高的地區則由外在的感染而來。結核病之傳染媒介為空氣中的飛沫，當一個傳染性肺結核病人講話、唱歌、咳嗽、或打噴嚏時，含有結核菌的痰液，可在空氣中漂浮很久，經由呼吸道進入正常人的肺內

造成感染。根據研究報告顯示，和一個開放性肺結核病人，親密接觸的家人，大約有 30% 的機率會受到感染，但只有約 1.5% 會發病；對於一個受到感染的嬰幼兒而言，其一生當中會發生結核病的機率大約是 10%。通氣良好的環境可減少結核病的散佈，通氣不好的場所如監獄、安養院、避難所或 MTV、KTV 等容易造成結核菌的傳播。台灣人口密度高，都會區大樓林立，學校及辦公場所皆往立體空間發展，環境空氣品質不佳，容易造成交互感染。此外，近年來由於台灣國際化的發展，國人經常因商務或觀光出入國境，根據出入境管理局的統計資料，如以 86~88 年為例，這三年本國人出境之人數各為六百四十八萬(民國 86 年)、六百二十六萬(民國 87 年)及六百九十六萬(民國 88 年)，此數目若加上同時期之外人來台，每年大都兩百萬左右。此數目字合計每年台灣進出的人口在一千六百萬(上述數目和之兩倍)到一千八百萬，數目也相當驚人。在旅遊交通工具上，如空氣循環不佳的飛機，也常導致肺結核等流行病的傳染。這些因素或許能說明近幾年來台灣結核病死亡率無法再下降的原因。

目前肺結核的預防措施主要是施打卡介苗，其優點是沒有施打時間的限制，在出生時或以後的任何時間施打皆可以，且便宜、副作用小，並相當的穩定。但其缺點是留下疤痕。而一些研究，如美國疾病管制中心 (Centers for Disease Control)，世界衛生組織 (WHO) 及印度醫療研究機

構 (The Indian Council for Medical Research) 等的合作計劃，於 1979 年發表經歷十年(1968-1978) 在印度所作大規模臨床試驗之首次報告，顯示卡介苗之施疫於印度效果不顯著。雖然卡介苗的效果目前仍有爭論，但它對小孩子結核性腦膜炎及原發性病灶散播之預防效果卻是大家所公認。因而若能在製劑上之研究改進目前卡介苗製劑缺點增進療效，不需注射給藥，避免在接種處留下疤痕，將能獲得大家之接受，得到更佳的結核病防治效果，這也是我們計畫研究之重點。

口服疫苗製劑已是目前疫苗發展的主要趨勢。然而疫苗通常為減毒的活菌如 BCG 疫苗，或死菌如霍亂疫苗，其性質類似蛋白質藥物，在腸胃道中容易受腸胃道之酵素或酸分解而失效，且因受腸胃道排空之影響，滯留在腸胃道時間也短，不易產生免疫效果，而限制了口服疫苗製劑的發展。

疫苗經口服後，主要是在腸道區域產生免疫作用^{1,2}，特別是在 Gut-associated Lymphoid Tissues³⁻⁵，這是在腸道的大片淋巴組織，稱作皮耶氏板(Peyer's Patches, PP)，具有獨特的表皮組織，主要由 M-cells 所構成，一些抗原可經由表皮細胞所攝取。經由 M-cells 吞食的粒子，可能不被消化，而將完整的粒子被送到下面的淋巴組織，即黏液淋巴系統細胞，最後可促使腸道分泌 IgA 等產生免疫⁶。

卡介苗經注射給藥除了造成結痂留下不可磨滅之註記，且注射給藥方式僅能誘發 IgG 抗體，不能像口服直接給藥產生有效對抗感染之免疫力⁷。此外，口服疫苗具有使用方便且可在 Peyer's patches 誘發黏膜免疫系統之優點，經由黏膜免疫系統同時誘發 IgG, IgM 及 IgA⁸⁻¹⁰，因而卡介苗疫苗很適合於開發為口服製劑。然而口服卡介苗，因是為活菌抗原易被胃酸及消化酵素破壞、疫苗抗原性差且不易存活，而無法產生預期的作用，因而如何增加口服效率、保護抗原、增強腸道黏膜局部免疫反應為重要發展方向。

一種理想的疫苗製劑通常包括下列七點¹¹：一、能口服，僅需一次用藥；二、好的耐受性；三、具有高度的免疫作用，刺激產生抗菌珠及抗毒素之抗體；四、良好的效果(>85% 保護效果)；五、很快產生保護作用(施藥後四週)；六、不昂貴；七、能製成一實用製劑。本研究乃參照上述原則進行疫苗製劑之研發。

口服疫苗要能產生其效果，須能夠達到下列三項目標¹²：(1) 疫苗在腸胃道能夠維持完整性，不受胃酸或腸液的破壞；(2)疫苗能夠到達作用或吸收位置；(3)疫苗能夠滯留而有持續作用之特性。

本計畫進行口服卡介苗疫苗之製劑研發以新穎製劑技術開發卡介苗之新劑型¹³⁻¹⁶，增加療效降低副作用並增加施疫之方便性^{17,18}。由文獻資料

證實,在埃及使用碳酸氫鈉緩衝溶液的疫苗製劑在傷寒預防保護可達 90%,而在智利使用腸溶衣膠囊製劑其效果是較一般膠囊製劑為佳,對學童傷寒保護可達 66%¹⁹。在體外 CaCo-2 細胞吸收試驗中發現 dipotassium glycyrrhizinate, N-trimethyl chitosan chloride, pectin, chitosan glutamate, Pluronic P85 等材質可降低 transepithelial electrical resistance (TEER),增加 transcellular 或 paracellular absorption, 可具有增加藥物口服效率之作用²⁰⁻²³。本計畫將製備腸溶衣包覆之口服製劑,內含 BCG 疫苗及上述佐劑。其目的是消極保護疫苗不受胃酸的破壞及積極增進疫苗於 Peyer's patches 誘發黏膜免疫系統之作用。

最近幾年由於生解性高分子(Biodegradable Polymers),如: Polyesters, Polyamides, Polyorthoester and Polyanhydrides 的普遍使用,也應用在藥物製劑之製備。其中最常用是 Polyesters, 包括 Polyglycolides 及 Polylactide。此類高分子聚合物具有良好的組織相容性,無毒性,由生物可降解材質 poly(lactic acid) (PLA)或 poly(lactide-co-glycolide) (PLG)等聚合物製成的微粒,已廣泛應用於長效蛋白質或疫苗類藥物的輸藥系統設計²⁴⁻³⁶。PLG 及 PLA 化合物在 1970 年代即經過美國 FDA 核准作為吸收性縫合線。1980 年代被用作載體聚合物製備 LHRH 長效輸藥系統上市。在目前市面上以 PLG 微粒上市的產品有 Decapeptyl (Ipsen, Biotec), Lupron Depot (內含 LHRH)及 Parlodel(Sandoz,內含 bromocriptine)均為一個月的長

效釋出劑型。此類可降解聚合物材料製成的 PLG 或 PLA 微粒，具有良好的生物相容性，在臨床上使用³⁷。這些聚合物材質可經由各種技術，如溶媒抽提或揮發法、相分離法、及噴霧乾燥法等來加以製備成微球。微球的物化性質，如：粒徑、孔隙度、表面特性等皆可能影響其產生抗體的作用。在此計劃利用此類研製成製劑作深入的研究。

在研究中將利用腸溶衣材質來保護疫苗製劑免受胃酸的破壞，製備成膠囊等製劑方便口服¹。而為減少腸液對疫苗的破壞，可考慮適當之賦型劑或佐劑。如使用表面活性劑、鋁化合物、鎂化合物、碳酸化合物等增加疫苗療效^{1,38}。此外，由於食物及藥物在腸胃道停留時間一般少於 8 小時，而須延長其滯留時間，可在製劑中加入具黏膜附著性之材質，如：Carbopol, Hyaluronic acid, Hydroxyethylcellulose, Xanthan gum 等²；或是 Cholera toxin B 及 Ganglioside GM1 等，讓疫苗集中在腸黏膜細胞³⁹，使不至於受腸胃道蠕動排空的影響，乃能長時間滯留在腸道，以產生較佳的免疫作用。

本研究之目的為探討影響卡介苗口服疫苗免疫效能之各種因子，經由製劑之研究增進卡介苗之口服效率、抗原保護作用、及增強免疫反應。建立卡介苗疫苗口服製劑之製備技術，不只可直接提供疫苗使用。此外，此項技術亦可應用在其他口服疫苗之製劑開發。

材料與方法

A. 無菌製劑室

為了確保研製之 BCG 疫苗製劑免受其他微生物之污染，所作之實驗，皆在無菌區進行，在此區域為 class 10000。設備有烘箱；高壓蒸氣滅菌鍋 (TM-321D, Tomin); 水平式層流罩 (class 100 ; 炬安儀器有限公司); 垂直式層流罩 (class 100 ; 炬安儀器有限公司), 並有自動包覆機 (Hicoater, Freund, Japan), 凍晶乾燥機 (Heto, DW 6-55.1, 丹麥), 作為研究試驗場所。

B. 卡介苗口服製劑製備

a. 腸衣材質包覆

各種不同明膠材質先經不同濃度的 Glutaraldehyde (MERCK, Germany) 處理，再經由自動包覆機進行腸溶衣的包覆，使之成為具腸溶衣特性之材質。

b. 配方

以鋁鹽 (MERCK, German) 和其他賦型劑，如 Lactose (惠明製藥股份有限公司, 台灣) 等，與凍晶乾燥卡之介苗混合。

c. 混合及填充製劑

於冷房 (炬安儀器有限公司, 台灣) 及控制溫濕度之環境下，以幾何稀釋法均勻混合，混合好之 BCG 疫苗半成品與腸衣材質膜合併得到口服疫苗

製劑。

C. BCG 力價試驗

新鮮 PBS 溶液經用 PBS 錠劑(Phosphate Buffered Saline Tablets, Sigma U.S.A) 加以製備，再經高壓蒸汽滅菌器滅菌。取相當於含 BCG 1 mg 的各種檢品，置於試管內，加入 PBS 溶液 10 ml 混勻(vortex 10 sec , 3 次)，依等量稀釋，製備成濃度 2×10^{-5} 、 1×10^{-5} mg/ml，取 0.1 ml BCG 之稀釋溶液，滴在 BBL 培養基 (BBL™ Lowenstein-Jensen Medium Slant , Becton Dickinson Microbiology Cockeysville ,MD) 之斜面上端，每一檢品製備三支試管。經旋轉試管充分潤濕整個斜面，固定於試管架上 (內具有彈簧)，並將其斜面向上，調整水平。

將試管架放入塑膠袋中，並放入一杯水。將塑膠袋置於細菌培養箱中培養，設定溫度範圍為 36.8~37.2 。（二氧化碳培養箱。廠商：造鑫企業有限公司）於 24 小時將試管架反轉，斜面朝下，呈水平，開始作菌落培養，並於適當時間記錄菌落數。

D. 活體免疫誘發

健康之天竺鼠分別經由皮下注射及口服給藥。注射給藥分為四組：A 組為控制組，注射 0.5 ml 之 normal saline；B、C、D 分別注射 0.02、0.1、

0.5 ml BCG 疫苗(1mg/ml)。口服給藥分為二組：E 組為控制組，口服 BCG 疫苗製劑之賦型劑；F 組則口服 BCG 疫苗製劑(4mg/隻)。

E. ELISA 分析

a. 收集血清

給藥後之天竺鼠於第三~九週，每週自耳朵取血一次，分離血清，儲存於 -80 冰箱(NUAIRE, U.S.A.)。

b. 分析步驟

以 10%福馬林前處理 BCG，並將處理過之 BCG 溶於 PBS 中(10mg/ml)，各加入 100 μ l 於 ELISA 分析盤之每個槽中，將分析盤置於通風櫥中風乾。分析盤取出後依序加入一抗、blocking agent 及二抗，期間並利用 PBS 洗去多餘之反應物，再加入呈色反應之酵素，反應 120 分鐘 最後以 4N H₂SO₄ 終止反應，用 ELISA reader 測定 492nm 吸光值。

F. 柯霍氏試驗

a. 注射給藥：

給藥八週後，於天竺鼠背部，用剃刀剃出一個約 3cm x 3cm 之範圍，先以酒精消毒。取凍晶卡介苗以生理食鹽水分散，濃度為 BCG 0.5 mg/ml，經由皮內注射入 9 隻已經接種 BCG 之天竺鼠，每隻 0.1ml。另取兩隻未接種

之健康天竺鼠，以同法注射作為對照組。24 小時內，觀察有無紅腫之柯霍氏現象。

b. 口服給藥

給藥八週後，於天竺鼠背部，用剃刀剃出一個約 3cm x 3cm 之範圍。先以酒精消毒欲注射之範圍，再皮內注射 0.1 ml 10 T.U.之 PPD。24 小時內，觀察有無紅腫之柯霍氏現象。

結果

A. ELISA 分析

利用 ELISA 分析法，可分析血清中 IgG 之 titer。圖一為利用 ELISA 分析注射接種 0.02 ml、0.1 ml 及 0.5 ml BCG 疫苗(1mg/ml)天竺鼠血清 IgG 之 titer，由結果可知，接種 BCG 疫苗之劑量越高，誘發 IgG 之 titer 亦越高。而由圖二及圖三之比較，經由注射接種所誘發 IgG 之 titer 明顯高於口服給藥。

B. 柯霍氏試驗

經由柯霍氏試驗，評估天竺鼠是否對結核桿菌產生抗體。圖四~圖九分別為 A~F 組天竺鼠給藥八週後，進行柯霍氏試驗，24 小時內觀察之結果。圖四及圖八為注射及口服給藥之控制組，皆無紅腫之柯霍氏現象；圖五、圖六及圖七為接種不同劑量 BCG 疫苗天竺鼠紅腫之柯霍氏現象，其紅腫範圍直徑之平均值，隨著接種劑量之增加而有增加之趨勢；圖九為口服 BCG 疫苗製劑(4mg/隻)之天竺鼠，三隻皆產生紅腫之柯霍氏現象，且紅腫範圍>10 mm，呈陽性反應。柯霍氏試驗各組之結果整理於表一。

討論

卡介苗是減毒之活菌，製劑的困難度相當高。在製程中必須考量相關的問題，如無菌製備技術、BCG 菌之存活率，和增進腸道產生免疫的功效。在一般口服製劑，並不須考量無菌的問題。然而 BCG 疫苗分析，力價之測定須考量受其他雜菌之影響。因而研製時，須在無菌製造區以無菌技術來製備，以確保不會有雜菌干擾力價分析之結果。故在本計畫中首要工作是建立無菌製劑實驗室。在 10000 級之清潔區藉由二座層流罩，提供了 100 級的無菌的操作區，經由落菌實驗，確定了操作區可以達到了無菌之要求。因而在開發製劑製程，經由力價之測定，並無雜菌干擾問題之產生。

BCG 疫苗是相當脆弱的活菌，在中華藥典的記載，需於 2 ~ 4 避光貯存，有效期限為 1 年。故在製備時必須考量此方面的特性。在我們的研究過程中，發現製備環境之溫度及濕度，對於 BCG 疫苗之力價有很大的影響。於水平或垂直層流罩中，由於機器之運轉溫度較週遭環境高，約在 30 ，故需額外之空調機降低溫度，但溫度只能到 22 ，故目前於冷房中進行製劑之製備。在最近的研究常採用微粒作為口服疫苗的載體，疫苗通常是直接被包覆在微粒裡面⁴⁴，然而此製備方法並不能應用在 BCG 疫苗。由於在包覆過程中，疫苗受到有機溶媒及惡劣環境等的摧殘導致死

亡，而無法採用。

在加入賦型劑或佐劑於 BCG 疫苗中，顯示適當的佐劑如鋁化合物具有很好的保護效果，因而如何選用這類材質也相當的重要。

在血清的收集上，我們自天竺鼠之耳朵採血，此法與一般採用心臟取血相比較，對天竺鼠之傷害降低，且同樣方便快捷，雖然血量較少，但已足夠我們實驗上之需求。

ELISA 分析方面，目前我們採用的二抗為 goat anti-guinea pig IgG secondary antibody 測定血清中 IgG 之 titer。由實驗結果可知，經由注射接種誘發 IgG 抗體之 titer 明顯高於口服給藥。此結果於柯霍氏試驗之結果相對照，佐證口服給藥能產生結核桿菌之抗體，且不同於注射給藥，是經由黏膜免疫系統所誘發之免疫反應。

由於肺結核仍是目前死亡最多的傳染疾病，全球很多機構也積極進行此方面的研究。雖然受感染時病人大都可經由抗生素治療，但由於肺結核菌進入潛伏期後，症狀消失，病人不再用藥，造成疾病可能再復發及抗藥性菌種之產生⁴²。因而口服疫苗的開發將方便使用，只要能確立口服時能得到其功效，其發展的潛力是無限的。特別是 BCG 疫苗也是提供很好的模式疫苗，若能研製成功，也將能應用到其他的疫苗的開發。

結論

利用腸溶衣包覆技術之口服卡介苗製劑，能保護疫苗，降低疫苗在胃腸消化道中受到胃酸及消化酵素之破壞，到達小腸之作用區域誘發免疫反應。證實此口服疫苗製劑具有很好之發展潛能。

參考文獻

1. Lee VHL, Dodda-Kashi S, Grass GM, and Rubas W: Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery, *Peptide and Protein Drug Delivery* (VHL Lee ed.), Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 691~738.
2. Jordan D and Keynes GB: Gastroadhesives in Controlled Drug Delivery, *Bioadhesion-Possibilities and Future Trends* (R Gurny and HE Junginger, editors), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1990, pp. 165~176.
3. Johansen P, Gander B, Merkle H and Sesardic D: Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines. *Trends in Biotechnology*. 18:203-211, 2000.
4. O'Hagan DT: The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *Journal of Anatomy*. 189:477-482, 1996.
5. Lebens M, and Holmgren J: Mucosal vaccine based on the use of cholera toxin B subunit as immunogen and antigen carrier. *Recomb. Vactor's in Vaccine Development*. 82:215-227, 1994.
6. Bhagat HR, Dalal PS, and Nellore R: Oral Vaccination by Microspheres,

Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines (S Cohen and H Bernstein, editors), Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 381~399.

7. Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, and Marchal G: Immunogenicity and protective capacity of Mycobacterium bovis BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine*. 18:1186-95, 2000.
8. De SN and Chattejee DN: An experimental study of the mechanism of action of vibrio cholerae on the Intesinal mucosal membrane. *J Pathol Bact*, 66:559~562, 1953.
9. Dasgupta U, Guhathakurta I, and Das J: Excretion of cholera toxin from *Escherichia coli*: a potential oral vaccine for cholera. *Biochem Biophysical Res Communi*, 153: 967~972, 1988.
10. Chattaraj SC, Rathinavelu A, and Das SK: Biodegradable microparticles of influenza viral vaccine: comparison of the effects of routes of administration on the in vivo immune response in mice. *J Contl Rel*, 58: 223-32, 1999.
11. Khan MZI, Opdebeeck JP and Tucker IG: Immunopotential and delivery systems for antigens for single- step immunization: recent trends and progress. *Pharm Res*, 11: 2-11, 1994.

12. Levine MM and Kaper J B: Live Oral Vaccines Against Cholera: an Update. *Vaccine*, 11: 207~212, 1992.
13. Yeh MK, Coombes AGA, Jenkins PG, and Davis SS: A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *J Contl Rel*, 33: 437-445, 1995.
14. Yeh MK, Jenkins PG, Davis SS, and Coombes AGA: Improving the delivery capacity of microparticle systems using blends of poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene glycol). *J Contl Rel*, 37: 1-9, 1995.
15. Yeh MK, Davis SS, and Coombes AGA: Improving delivery of proteins from microparticles using blends of poly(DL lactide co- glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. *Pharm Res*, 13: 1693-1698, 1996.
16. Coombes AGA, Yeh MK, Eavelle EC, and Davis SS: The control of protein release from poly(DL lactide co-glycolide) microparticles by vairation of the evtanal aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method. *J Contl Rel*, 52: 311-320, 1998.
17. Jenkins PG, Coombes AGA, Yeh MK, Thomas NW, and Davis SS: Aspects of the design and delivery of microparticles for vaccine application. *J Drug Targeting*, 3: 79-81, 1995.

18. Coombes AG, Lavelle EC, Jenkins PG, and Davis SS: Single dose, polymeric, microparticle-based vaccines: the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen. *Vaccine* 14: 1429-38, 1996.
19. Holmgren J, and Svennerholm AM: Bacterial enteric infections and vaccine development. *Gastroenterol. Clin North Am*, 21: 283-302, 1992.
20. Liu P, and Krishnan TR: Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. *J Pharm Pharmacol*, 51: 141-149, 1999.
21. Kotze AF, Thanou MM, Luebetaen HL, Verhoef JC, and Junginger HE: Chitosan for enhancer intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci*, 7: 145-151, 1999.
22. McClean S, Prosser E, Meehan E, O'Malley D, Clarke N, Ramtoola Z. and Brayden D: Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles. *Eur J Pharm Sci*, 6: 153-163, 1998.
23. Batrakova EV, Han HY, Miller DW, and Kabanov AV: Effect of pluronic P85 unimers and micelles on drug permeability in polarized BBMEC and Caco-2 cells. *Pharm Res*, 15: 1525-1532, 1998.

24. Baras B, Benoit M, Poulain-Godefroy O, Schacht A, Capron A, Gillard J, and Riveau G: Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine* 18: 1495-505, 2000.
25. Pecquet S, Leo E, Fritsche R, Pfeifer A, Couvreur P, and Fattal E: Oral tolerance elicited in mice by beta-lactoglobulin entrapped in biodegradable microspheres. *Vaccine* 18: 1196-202, 2000.
26. Morris, W, Steinhoff MC and Russell PK: Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation", *Vaccine*, 12: 5-11, 1994.
27. Khang G, Cho JC, Lee JW, Rhee JM, and Lee HB: Preparation and characterization of Japanese encephalitis virus vaccine loaded poly(L-lactide-co-glycolid) microspheres for oral immunization. *Bio-Medical Materials & Engineering*. 9: 49-59, 1999.
28. Mi FL, Shyu SS, Chen CT, Schoung JY: Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. *Biomaterials*. 20: 1603-12, 1999.
29. Schwendeman SP, Tobio M, Joworowicz M, Alonso MJ, and Langer R: New strategies for the microencapsulation of tetanus vaccine. *Journal of*

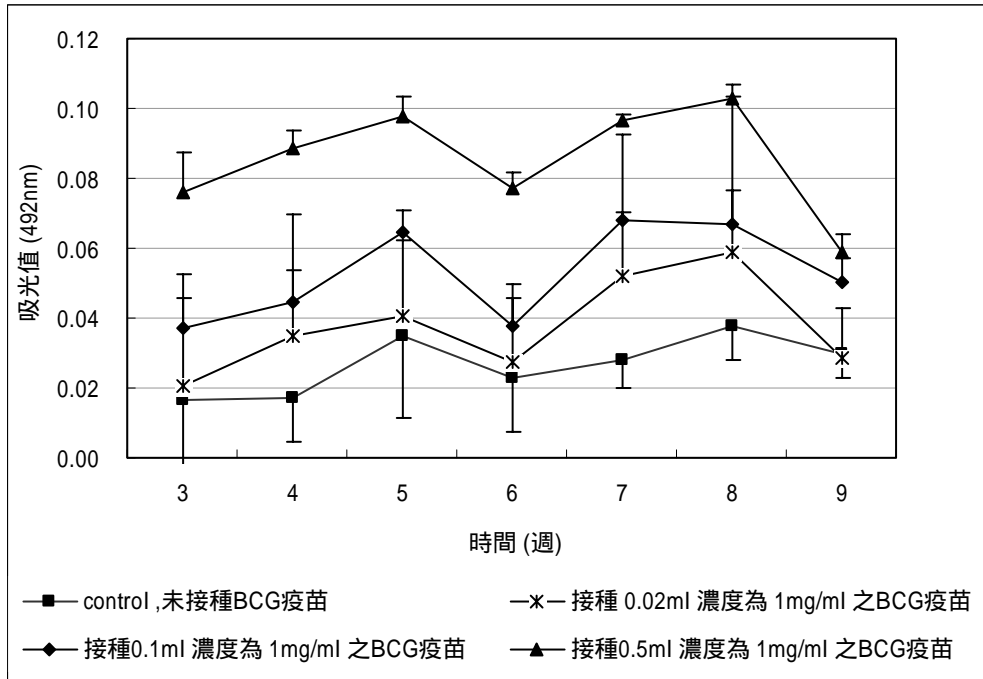
Microencapsulation. 15: 299-318, 1998.

30. Coombes AG, Tasker S, Lindblad M, Holmgren J, Hoste K, Toncheva V, Schacht E, Davies MC, Illum L, and Davis SS: Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: the surface attachment of hydrophilic species using the concept of poly(ethylene glycol) anchoring segments. *Biomaterials*. 18: 1153-61, 1997.
31. Jung T, Koneberg R, Hungerer K-D, and Kissel T: Tetanus toxoid microspheres consisting of biodegradable poly(lactide-co-glycolide)- and ABA-tirblock-copolymers: immune response in mice. *Int. J. Pharm.* 234: 75-90, 2002.
32. Venkataprasad N, Coombes AG, Singh M, Rohde M, Wilkinson K, Hudecz F, Davis SS, and Vordermeier HM: Induction of cellular immunity to a mycobacterial antigen adsorbed on lamellar particles of lactide polymers. *Vaccine*. 17: 1814-1819, 1999.
33. Williams RO, and Liu J: Influence of processing and curing conditions on beads coated with an aqueous dispersion of cellulose acetate phthalate. *European J of Pharm. & Biopharm.* 49: 243-52, 2000.
34. Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, and Nastruzzi C: Production of Eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional

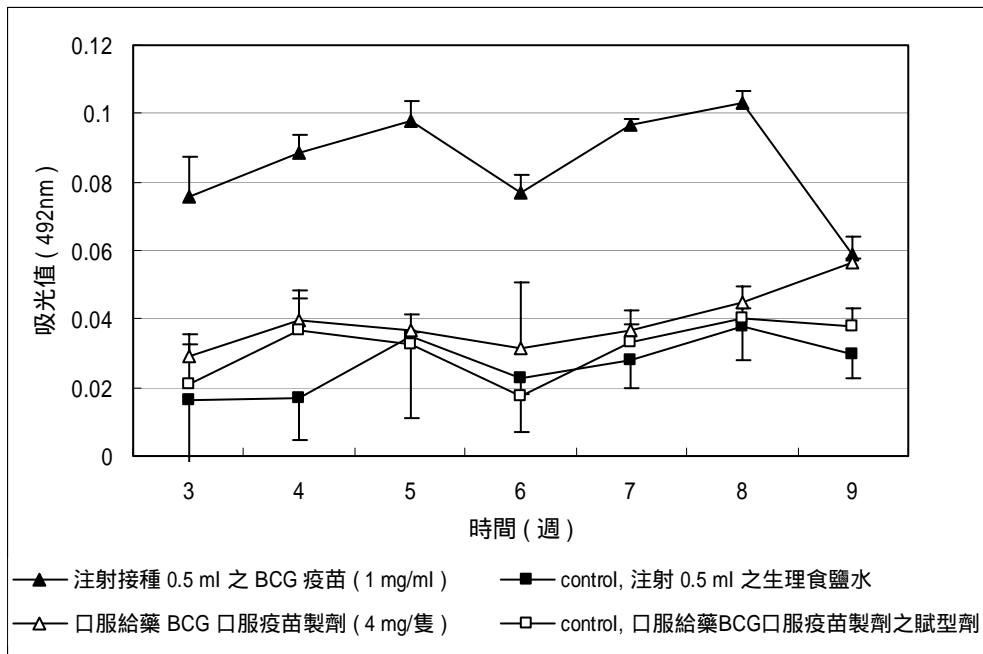
- characteristics. *Pharmaceutical Development & Technology*. 5: 267-78, 2000.
35. Sanchez A, Villamayor B, Guo Y, McIver J, and Alonso MJ: Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Intl J of Pharm*. 185: 255-66, 1999.
36. Eavelle EC, Yeh MK, Coombes AGA, and Davis SS: The stability and immunogenicity of a protein antigen encapsulated in biodegradable microparticles based on blends of lactide polymers and polyethylene glycol. *Vaccine*, 17: 512-29, 1999.
37. Tice TR and Tabibi SE: Parenteral Drug Delivery: Injectables, *Treatise on Controlled Drug Delivery* (A. Kyodenieus, ed.), Marcel Dekker, New York, 1992, p. 315.
38. Chiang CH, Shao CH, and Chen JL: Effects of pH, Electric Current, and Enzyme Inhibitors on Iontophoresis of Delta Sleep-Inducing Peptide. *Drug Dev Ind Pharm*, 24: 431-438, 1998.
39. Lian T and Ho JY: Cholera toxin B-mediated targeting of lipid vesicles containing ganglioside GM1 to mucosal epithelial cells. *Pharm. Res*, 1997 14: 1309-1315.
40. Enserink M: Driving a stake into resurgent TB. *Science* 2001;

293:234-235.

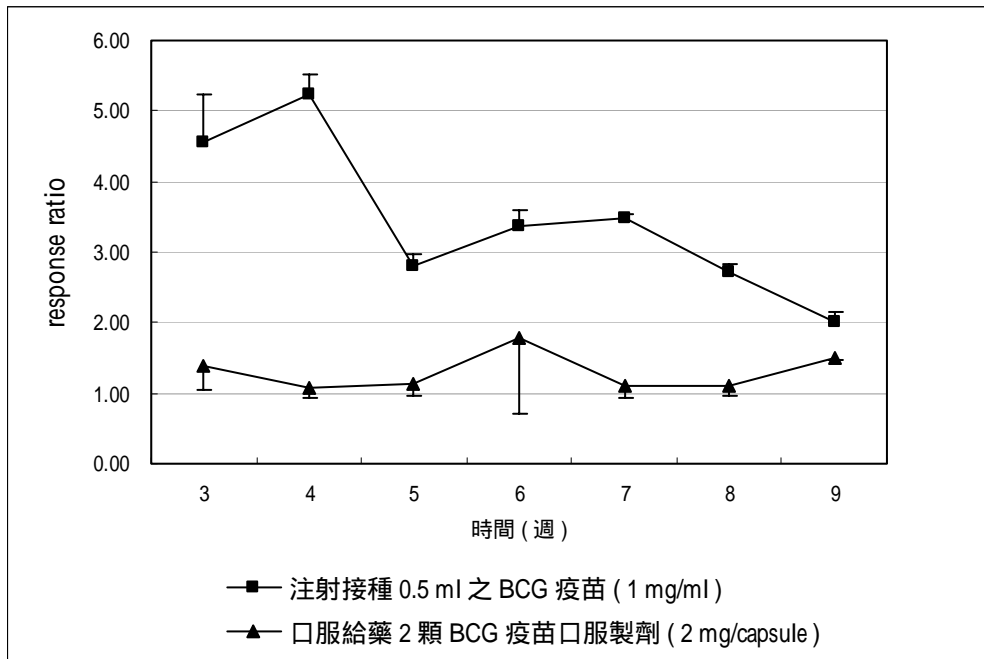
41. Chen JL, Chiang CH, and Yeh MK: The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method. *J. Microencapsulation*, 19: 333-346, 2002.
42. Yeh MK, Liu YT, Chen JL, and Chiang CH: Oral immunogenicity of the inactivated *Vibrio cholerae* whole-cell vaccine encapsulated in biodegradable microparticles. *J. Controlled Release*, 82: 237-247, 2002.



圖一、天竺鼠經注射不同劑量 BCG 疫苗後，以 ELISA 分析血清中 IgG titer 所得之吸光值。



圖二、天竺鼠經注射 BCG 疫苗及口服 BCG 疫苗製劑後，以 ELISA 分析血清中 IgG titer 所得之吸光值。



圖三 天竺鼠經注射及口服給藥後三~九週,以 ELISA 分析血清中 IgG 之 titer 結果。(response ratio : 實驗組之吸光值除以控制組)



無紅腫

無紅腫

圖四、天竺鼠經注射 0.5ml normal saline (控制組), 八週後進行柯霍氏試驗所得到之結果。



直徑=直徑=10mm 直徑=直徑=10mm 直徑=直徑=10mm

圖五、天竺鼠經注射接種 0.02 ml BCG 疫苗 (1mg/ml), 八週後進行柯霍氏試驗所得到之結果。



直徑=5mm 直徑=7mm 直徑=13mm

圖六、天竺鼠經注射接種 0.1 ml BCG 疫苗 (1mg/ml), 八週後進行柯霍氏試驗所得到之結果。

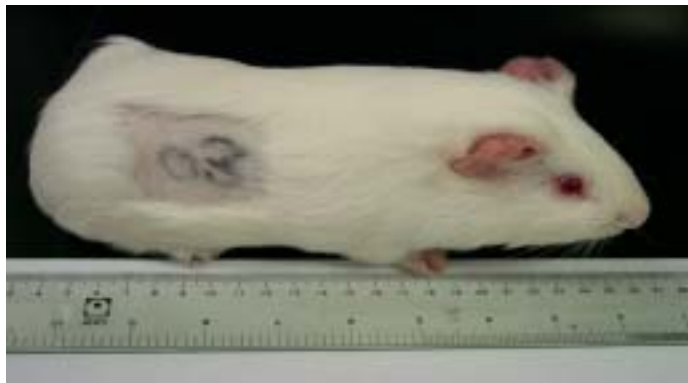


直徑=11mm

直徑=10mm

直徑=11mm

圖七、天竺鼠經注射接種 0.5 ml BCG 疫苗 (1mg/ml), 八週後進行柯霍氏試驗所得之結果。



無紅腫

無紅腫

無紅腫

圖八、天竺鼠經給予口服卡介苗疫苗製劑之賦型劑，八週後進行柯霍氏試驗得到之之結果。



直徑=12mm

直徑=10mm

直徑=14mm

圖九、天竺鼠經口服卡介苗疫苗製劑(4mg/隻)八週後進行柯霍氏試驗之結果。

表一、天竺鼠經由不同給藥方式後所得到之柯霍氏試驗結果

組別	給藥方式及劑量	紅腫範圍直徑(mm)			mean	SD
A n=2	注射 0.5 ml normal saline	—	—	—	—	—
B n=3	注射 0.02 ml BCG(1mg/ml)	10	6	4	6.67	3.06
C n=3	注射 0.5 ml BCG(1mg/ml)	5	7	13	8.33	4.16
D n=3	注射 0.5 ml BCG(1mg/ml)	11	10	11	10.67	0.58
E n=3	口服製劑賦型劑	—	—	—	—	—
F n=3	口服卡介苗製劑(4mg/隻)	12	10	14	12.00	2.00

—：無紅腫 , mean ± SD