

計畫編號：DOH95-DC-2032

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

開發以鴨蛋生產抗飯匙倩及抗雨傘節多價 IgY 抗體 (II)  
Development of cobra and krait bivalent 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：李政道、連偉成、張正鵬、古華蓉

執行期間：95 年 1 月 1 日至 95 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	4
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	11
一、蛇毒抗原之製備	11
二、實驗鴨	11
三、動物免疫方式	11
四、建立抗飯匙倩IgY抗體鴨子免疫模式	11
(一) 僅免疫飯匙倩蛇毒	11
(二) 免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒	12
五、建立抗雨傘節IgY抗體鴨子免疫模式	12
六、建立抗飯匙倩與雨傘節多價IgY抗體鴨子免疫模式	13
(一) 先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒	13
(二) 先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒	13
七、鴨蛋收取時程	14
八、尋找多價IgY抗體純化最適條件	14
九、IgY抗體蛋白質濃度調整與測定	15
十、建立抗體產程檢驗系統	15
十一、分析IgY抗體對不同蛇毒之專一性	15
(一) 雙向免疫擴散試驗 ( Ouchterlony double diffusion )	15
(二) 西方墨點法 ( western blotting )	16
十二、測定IgY中和蛇毒之效價	17
十三、檢測被免疫鴨抗體效價之持續性	17
十四、檢測抗體效價之安定性	17
結果	18
一、IgY之萃取與純化	18

二、分析IgY抗體對不同蛇毒之專一性.....	18
(一)雙向免疫擴散試驗( Ouchterlony double diffusion ).....	18
(二)西方墨點法( western blotting ).....	18
三、免疫計畫之確認.....	18
(一)動物中和效價測定法.....	18
1、抗飯匙倩IgY抗體效價 ( 20mg/ml ) .....	18
(1) 僅免疫飯匙倩蛇毒 .....	18
(2) 免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒.....	19
2、抗雨傘節IgY抗體效價 ( 20mg/ml ) .....	19
3、抗飯匙倩及雨傘節IgY抗體效價 ( 20mg/ml ) .....	19
(1) 先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒.....	19
(2) 先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒.....	19
四、以ELISA檢測法建立抗體產程檢驗.....	20
五、檢測抗體效價之安定性.....	20
六、成本效益評估.....	21
(一)抗飯匙倩蛇毒.....	21
1、IgY抗體分析.....	21
2、鴨隻飼養成本.....	21
(二)抗雨傘節蛇毒.....	21
1、IgY抗體分析.....	21
2、鴨隻飼養成本.....	22
(三)總計.....	22
討論.....	23
參考文獻.....	29
圖表.....	32
圖一、抗飯匙倩蛇毒 IgY 抗體與馬血清雙向免疫擴散試驗之比較.....	32
圖二、抗雨傘節蛇毒 IgY 抗體與馬血清雙向免疫擴散試驗之比較.....	32
圖三、抗蛇毒 IgY 抗體與馬血清西方墨點法之比較.....	33
圖四、免疫計畫 A 抗飯匙倩 IgY 抗體之動物中和效價測定.....	33

圖五、免疫計畫 A 與 C 抗飯匙倩 IgY 抗體之動物中和效價測定之比較.....	34
圖六、免疫計畫 B 抗飯匙倩 IgY 抗體之動物中和效價測定.....	34
圖七、免疫計畫 D 抗飯匙倩與雨傘節 IgY 抗體之動物中和效價測定.....	35
圖八、免疫計畫 E 抗飯匙倩與雨傘節 IgY 抗體之動物中和效價測定.....	35
圖九、五組免疫計畫之抗蛇毒 IgY 抗體 ELISA 測定法與動物中和效價測定之比較.....	36
圖十、比較 94 年與 95 年先免疫飯匙倩再免疫雨傘節之動物中和效價.....	37
表一、五組免疫計畫第 6 週至 32 週 IgY 抗體平均效價之比較.....	38
表二、IgY 抗體與馬血清抗體需求量比較.....	38
表三、IgY 抗體與馬血清抗體飼養成本比較 ( 不含產品精製之費用 ) .....	39

## 中 文 摘 要

以雙向免疫擴散試驗及西方墨點法皆證實以硫酸銨沈澱法純化之 IgY 抗體對所免疫之蛇毒具有專一性及可辨識性。本年度單獨免疫飯匙倩蛇毒所得之抗體平均效價為 190U，與去年 170U 類似，收蛋的截止日同樣可至第 32 週，顯示免疫劑量及時程具有高度的穩定性。另修正 94 年度單獨免疫雨傘節蛇毒為每隔 4 週追加免疫，第 6 週到第 32 週間之抗體效價皆可達 700U 以上，如此可節省人力和材料成本。此外在免疫飯匙倩蛇毒同時免疫少量雨傘節蛇毒，結果顯示第 10 至 20 週之抗體效價較單獨免疫飯匙倩蛇毒高。我們今年分別測試先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒及先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒等兩種多價抗體生產的免疫設計，結果發現若先免疫雨傘節蛇毒，抗雨傘節蛇毒抗體效價於基礎免疫可達 900U 以上，但第 18 週至第 32 週平均效價僅 450U，遠低於單獨免疫雨傘節蛇毒的 740U；另抗飯匙倩蛇毒抗體平均效價約為 40U，亦遠低於單獨免疫飯匙倩蛇毒的 190U。若先免疫飯匙倩蛇毒，抗飯匙倩抗體效價於第 8 至 12 週之平均效價（270U）高於單獨免疫飯匙倩蛇毒（110U），第 14 週至 32 週則相似；而抗雨傘節蛇毒之平均效價為 40U，卻是遠低於單獨免疫雨傘節蛇毒的 780U。ELISA 測定法檢測鴨子血液中的抗體效價與動物中和試驗結果可互相平行驗證。綜合以上的結論，分別免疫抗飯匙倩與雨傘節蛇毒 IgY 抗體，所得到之抗體效價較兩種蛇毒一起免疫佳，因此若改以鴨蛋分別生產抗飯匙倩與雨傘節蛇毒抗體取代馬血清初步可節省約 85 % 的經費。

**關鍵字：**雙向免疫擴散試驗、西方墨點法、IgY 抗體、硫酸銨沉澱法、ELISA 測定法、動物中和試驗

## 英文摘要

Using Ouchterlony double diffusion and Western blotting assay, the antibody of IgY purified by ammonium sulfate precipitation is shown to be specifically recognized against the snake venom. The average antibody titer and the period of egg collection are similar to the results of last year, therefore, it implies that the immunization dose and time course are stable. The krait venom immunization schedule from last year is modified to boost every 4 weeks, and the antibody titer from week 6 to week 32 still can reach above 700U, this will save manpower and budget. Comparing with the IgY antibody titer from week 10 to 20, the results from immunization of cobra venom with less krait venom are higher than those from immunization of cobra venom alone. This year we have designed different immunization procedure (immunize cobra venom first then krait venom and vice versa), and the results show that the immunization of krait venom then cobra venom, the antibody titer against krait venom can reach 900U, but at week 18 to 32 the average titer is only 450U, which is less than the titer 740U immunized with krait venom alone; and the titer against cobra venom is 40U, which is less than the titer 190U immunized with cobra alone. If cobra venom is immunized first, the average titer from week 8 to 12 against cobra venom is 270U which is higher than immunized with cobra venom alone (110U), but from week 14 to 32 is similar; however the titer against krait venom is 40U, which is much lower than the titer 780U immunized with krait venom alone. The IgY antibody titer detected by ELISA assay and neutralization test is parallel correlated. The preliminary results shows that the IgY antibody titer from immunization of snake venom separately is higher than that from immunization of combination, therefore, if we can produce different IgY antibody from duck egg instead of horse by using the immunization of snake venom separately, it can decrease the budget up to 85%.

**Key word : Ouchterlony double diffusion ,Western blotting assay, IgY  
antibody, ammonium sulfate precipitation, ELISA assay ,  
neutralization test**

## 前 言

毒蛇咬傷屬於急症，最有效的治療方式是注射正確的抗蛇毒血清。目前世界各國抗蛇毒血清之製造多以減毒性蛇毒免疫馬匹，經採血分離出血清，純化精製得之。由於蛇毒具有地域性，以致不同地區之蛇毒有不同的抗原性(antigenic variation)，故抗蛇毒抗體往往由當地自行生產。目前本局利用各種減毒過的蛇毒免疫馬匹後，經採血及硫酸銨鹽沈澱精製等步驟，已生產四種抗蛇毒血清產品，分別為：(1)出血性抗蛇毒血清，可抗龜殼花及赤尾青竹絲，(2)神經性抗蛇毒血清，可抗雨傘節及飯匙倩，(3)抗百步蛇毒血清，(4)抗鎖鍊蛇蛇毒血清，其中抗鎖鍊蛇蛇毒血清產品正進行臨床試驗中，總共累計 39 個病例，治癒率為 100 %。

毒蛇咬傷的臨床治療以使用的抗蛇毒血清最為有效。治療過程中，一旦馬血清蛋白(horse serum proteins)大量進入人體，經常誘發三種免疫副作用，即(1)補體反應(complement reaction)：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)：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；及(3)過敏性休克(anaphylactic shock)：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<sup>(1,18)</sup>。另外目前生產抗蛇毒血清所使用馬匹需由國外進口，馬匹單價高，且需要寬闊場地進行飼養管理等工作，每年有關動物飼養相關費用約需新台幣 800 萬元，所以製造每一劑抗蛇毒血清成本高達新台幣 5700 元。且利用馬匹生產相關血清製劑過程需定期抽血，屬於侵入性的性質，在操作過程中對人員潛藏有極大的危險性。而實驗動物保育問題也日益受重視，因此開發符合經濟性、兼具安全性與有效性之新一代高效價抗蛇毒抗體有其重要性與必要性。



除了馬匹之外，羊亦是生產抗蛇毒血清的主要動物之一，因為照顧羊比馬匹容易且成本較低，但近來由於從羊身上發現傳染性海綿狀腦病愈來愈多，因此限制了其應用性。不僅哺乳類動物免疫抗原後，可產生相對應之抗體，其它的脊椎動物如鴨、雞，被免疫抗原後，亦會產生抗體，除了可在血液中被檢測到外，這些抗體也會傳送到蛋的蛋黃部份，稱之為蛋黃免疫球蛋白 (yolk immunoglobulins, IgY)，若連續施打抗原，相對應之抗體更會高度集中於蛋黃中<sup>(19,20)</sup>。就製程而言，IgY 經由蛋黃中分離出，是一種不需經由採血即可得到的抗體，與抗蛇毒馬血清抗體相較，具有以下的優點：

一、 安全性： 蛋的 IgY 在結構上與哺乳類 IgG 相類似，並可分為兩種形式：IgY 與 IgY( Fc) <sup>(21)</sup>。前者之分子量大約 180KDa，後者約為 120KDa，兩者之不同在於後者在抗體分子之結構上仍包含二個重鏈(heavy chain)與二個輕鏈(light chain)部分，由於 mRNA 選擇性切割(alternative splicing)之緣故，所表現出之免疫球蛋白較一般抗體分子在重鏈部分缺少約 60KDa 之 Fc 片段( IgY( Fc) )，也因此不易誘發上述之補體反應。

二、 專一性：

(一) 與哺乳類的 IgG 抗體有較少的交叉反應作用：哺乳類產生之抗體常使用於酵素免疫反應試驗法中，但在檢測反應中之試劑常與檢體發生內在性之干擾<sup>(10,20)</sup>。鴨子 IgY 抗體對於哺乳類之 IgG 血緣關係較遠，故交叉性反應低，因此當利用於免疫反應試驗中時，可降低一些不必要之干擾反應發生，進而提昇準確度。

(二) IgY 與人類的種別差異性大：人類使用 IgY 抗體進行治療時，

因與禽類的種別差異性大，所以 IgY 抗體會針對所需治療的抗原進行反應，較不易有其他物質的干擾。

(三) IgY 在檢測系統中對干擾較少：鴨子 IgY 抗體不會與補體系統、類風濕因子和蛋白質 A 反應，所以更可去除發生偽陽性的機率<sup>(6,7)</sup>。所以在建立靈敏、準確及檢測範圍寬廣的檢驗系統，一方面可提供產程最適化條件篩選的工具，另一方面亦是提供準確免疫劑量評估之重要工具之一，如能達到上述要求，將可達成減少成本的目的。

三、易生產：禽類產蛋率高，且可經由蛋黃中輕易分離出，據統計一隻雞每個月可生產的 IgY 約為兔子的 10-20 倍。

四、較人道：因 IgY 是由蛋黃取得，不是由抽血等侵入性步驟取得，而且 European Center for the Validation of Alternative Method 也建議使用蛋黃抗體取代哺乳類抗體。

五、低成本：鴨隻購買與飼養成本較低，且收取鴨蛋比採血的人力需求也較低。

六、安定性高：有非正式報告指出 IgY 若以液態形式儲存於 4℃ 中，其安定性可達十年之久。

由目前 IgY 抗體相關的運用研究的文獻得知，被動免疫之實驗動物所分離出之 IgY 可對抗 rotavirus<sup>(9)</sup>、Enterotoxigenic *E. coli*<sup>(8)</sup>、*Helicobacter pylori*<sup>(14,16,17)</sup>、*Dental caries*<sup>(10)</sup>、*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*<sup>(19)</sup>、*Streptococcus mutans*<sup>(3)</sup> 的感染，Motoi (2005) 等人以狂犬病毒的重組蛋白免疫母雞，將得到的 IgY 抗體與狂犬病毒對 BALB/c 小鼠進行中和效價試驗，結果發現 80IU/kg 劑量的抗體對 75 % 的小鼠有保護效價，130IU/kg 劑量的抗體則對所有的小鼠皆有保護效

價<sup>(11)</sup>，此外，IgY 抗體亦可中和有毒動物之毒素，如 Thalley (1990)等人以響尾蛇蛇毒及黃蠍毒液免疫母雞，動物實驗結果得知 IgY 抗體具有良好的中和效價<sup>(17)</sup>，Devi( 2002 )等人以 0.6mg 的鎖鏈蛇蛇毒免疫母雞，於第 12-90 天間每顆蛋可純化出約 75-100mg 的 IgY 抗體，且具有高度專一性與免疫活性<sup>(4,5)</sup>，Almeida(1998)等人以巴西的金矛頭蝮蛇毒和響尾蛇毒免疫來亨雞後，發現純化出的 IgY 抗體可以遮蔽住的 phospholipase A<sub>2</sub> 以阻止出血，且 1ml 的抗體分別可中和 0.0675mg 的金矛頭蝮蛇毒及 0.075mg 的響尾蛇毒<sup>(2)</sup>。另有非正式文獻指出，以響尾蛇蛇毒及青竹絲蛇毒免疫母雞，所純化出之 IgY 抗體的中和毒素效價比馬血清好 6.3 倍及 2 倍。目前澳洲的 Antiven 公司正在進行 *Pseudonaja nuchalis*、*Pseudonaja affinis*、*Pseudonaja inframacula* 三種蛇毒 IgY 抗體的測試，並已於 2004 年中申請核准動物用抗東部擬眼鏡蛇 IgY 抗體產品上市。

依據本中心 94 年自行研究計畫評估，國內一年約需 4500 劑抗飯匙倩蛇毒血清及 1500 劑抗雨傘節蛇毒血清，以抗蛇毒馬血清抗體之蛋白質濃度為 80 mg/ml(一劑為 1200u)計算，一年需 60L 馬血清(約為 3 匹馬之產量)，抗飯匙倩蛇毒 IgY 抗體一劑需  $20 \text{ mg/ml} \div 170\text{u/ml} \times 1200\text{u} = 140\text{mg}$ ，一隻鴨子一年最少可提供  $180\text{eggs} \div (140\text{mg} \div 50\text{mg/egg}) = 60$  劑，抗飯匙倩蛇毒 IgY 抗體的部分只需飼養  $4500 \div 60 = 75$  隻鴨子；抗雨傘節蛇毒 IgY 抗體一劑需  $20 \text{ mg/ml} \div 400\text{u/ml} \times 1200\text{u} = 60\text{mg}$ ，一隻鴨子一年最少可提供  $180\text{eggs} \div (60\text{mg} \div 50\text{mg/egg}) = 180$  劑，抗雨傘節蛇毒 IgY 抗體的部分則更只需飼養  $1500 \div 180 = 9$  隻鴨子，故從飼養成本來比較，鴨 IgY 抗體遠較傳統馬血清的成本低。

## 材 料 與 方 法

### 一、蛇毒抗原之製備：

於免疫前一天以 0.1M pH6.8 之 PBS 將飯匙倩蛇毒或雨傘節蛇毒配製成 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，使其呈現乳白色膠狀即可，並置於 4 °C 中過夜。

### 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)，鴨隻出生後第 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。在進行免疫前，先收集 IgY 抗體及採血 2 ml 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，經混合均勻後，以皮下注射方式免疫，第二次以後之免疫以與蛇毒同體積之 Freund's incomplete adjuvant 當作佐劑，混合均勻後，以皮下注射方式免疫。

### 四、建立抗飯匙倩 IgY 抗體鴨子免疫模式：

#### (一) 僅免疫飯匙倩蛇毒：

使用無毒化之飯匙倩蛇毒，每兩週免疫一次鴨子，共進行四次基礎免疫，之後每隔兩週進行一次補強免疫，共免疫兩隻鴨子，於免疫隔週採蛋，每隔四週取血清以 ELISA 測定抗體效價，並根據 ELISA 結果，取較大量的 IgY 抗體進行動物中和試驗，檢測效價。免疫時程及劑量如下表(鴨隻編號為 A-Q01、A-Q02)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
蛇毒(mg)	2	4	6	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	—
IgY 純化 ( 20mg/ml )	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
血清收集	√		√		√		√		√		√		√		√		√

(二) 免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒：

使用無毒化之飯匙倩蛇毒，每兩週免疫一次鴨子，並於第四次基礎免疫時，同時以定量無毒化之雨傘節蛇毒 ( 0.2mg ) 免疫，之後每隔兩週同時以兩種蛇毒進行一次補強免疫，共免疫兩隻鴨子，於免疫隔週採蛋，每隔四週取血清以 ELISA 測定抗體效價。免疫時程及劑量如下表(鴨隻編號為 C-Q05、C-Q06)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
飯匙倩蛇毒(mg)	2	4	6	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	—
雨傘節蛇毒(mg)	—	—	—	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—	—	—	—	—	—	—	—
IgY 純化 ( 20mg/ml )	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
血清收集	√		√		√		√		√		√		√		√		√

五、建立抗雨傘節 IgY 抗體鴨子免疫模式：

使用無毒化之雨傘節蛇毒，每兩週免疫一次鴨子，共進行四次基礎免疫，之後每隔四週進行一次補強免疫，免疫時程及劑量如下表，免疫兩隻鴨子(鴨隻編號為 B-Q03、B-Q04)，於免疫隔週採蛋，每隔四週取血清以 ELISA 測定抗體效價，並根據 ELISA 結果，取較大量的 IgY 抗體進行動物中和試驗，檢測效價。

週數	0	2	4	6	8	12	16	20	24	28	32
蛇毒(mg)	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
IgY 純化( 20mg/ml )	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
血清收集	√		√		√	√	√	√	√	√	√

## 六、建立抗飯匙倩與雨傘節多價 IgY 抗體鴨子免疫模式：

### (一) 先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒：

先使用無毒化之雨傘節蛇毒，每兩週基礎免疫鴨子一次，並於第四次基礎免疫時，同時以無毒化之飯匙倩蛇毒免疫，之後每隔兩週同時以兩種蛇毒進行一次補強免疫，免疫兩隻鴨子，於免疫隔週採蛋，每隔四週所取之血清以 ELISA 測定抗體效價，並根據 ELISA 結果，取較大量的 IgY 抗體進行動物中和試驗，檢測效價。

免疫模式如下表(鴨隻編號為 D-Q07、D-Q08)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
雨傘節蛇毒(mg)	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
飯匙倩蛇毒(mg)	—	—	—	2	4	6	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	—
IgY 純化( 20mg/ml )	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
血清收集	√		√		√		√		√		√		√		√		√

### (二) 先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒：

先使用無毒化之飯匙倩蛇毒，每兩週基礎免疫鴨子一次，並於第四次基礎免疫時，同時以無毒化之雨傘節蛇毒免疫，之後每隔兩週同時以兩種蛇毒進行一次補強免疫，免疫兩隻鴨子，於免疫隔週採蛋，每隔四週所取之血清以 ELISA 測定抗體效價，並根據

ELISA 結果，取較大量的 IgY 抗體進行動物中和試驗，檢測效價。

免疫模式如下表(鴨隻編號為 D-Q09、D-Q10)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
飯匙倩蛇毒(mg)	2	4	6	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	—
雨傘節蛇毒(mg)	—	—	—	0.2	0.4	0.6	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	—
IgY 純化 ( 20mg/ml )	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
血清收集	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓

註一：五個免疫計畫採蛋時間皆為補強免疫一週後至下一次補強免疫當天，取補強免疫當天的蛋進行抗體純化，取 IgY 20 mg/ml 進行動物中和試驗，以檢測抗體效價。

註二：五個免疫計畫採血時間為補強免疫當天，以 ELISA 檢測血清抗體效價。

#### 七、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 60-70 g，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。

#### 八、尋找多價 IgY 抗體純化最適條件：

近年來以 polyethylene glycol (PEG)<sup>(8)</sup>及沉澱法水稀釋法(water dilution method；WD)<sup>(9,10)</sup>萃取 IgY 的成本最低、回收率最佳。依據本中心 93 年及 94 年自行研究計畫之純化成果，持續使用硫酸銨沈澱法進行多價 IgY 抗體純化，方法如下：

蛋黃及蛋白分離→蛋黃水解→抗體吸附→抗體溶出→鹽析→透析→測定→濃縮。

## 九、IgY 抗體蛋白質濃度調整與測定：

將經硫酸銨沈澱法純化之IgY抗體以Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices進行抗體濃縮，再以Bradford reagent 測試抗體蛋白質濃度：先用二次蒸餾水將2 mg/ ml 之 Bovine Serum Albumin ( BSA ) 標準液進行序列稀釋，取測試樣品及標準液各50  $\mu$ l，置入96孔微量盤中，至少3重複。分別加入 Bradford reagent 150  $\mu$ l，震盪30秒。以ELISA吸光儀 ( Molecular Device , SPECTRA MAX 340pc ) 讀取波長595 nm吸光值，以得到蛋白質濃度。

## 十、建立抗體產程檢驗系統：

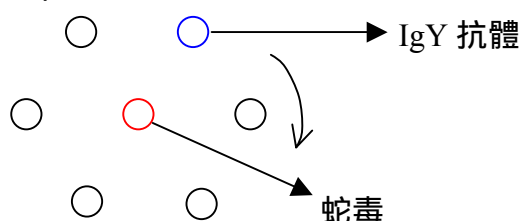
使用 ELISA 檢測方法測定鴨隻血液中之抗體效價。以蛇毒蛋白為黏覆之抗原。首先於 96 孔微量滴定盤上，黏覆經黏覆緩衝液適當稀釋之純化蛇毒蛋白，4°C 隔夜反應。實驗前使用 ELISA 清洗儀，以 0.05% Tween20 / PBS (PBST20)清除未黏覆之抗體 3 次，然後以 1% BSA/PBS 進行 Block，37°C 反應半小時，清洗 3 次後，加入以 PBST20 適當稀釋之待測或對照組抗蛇毒抗體 IgY 樣品，放置於 37°C 保溫箱中二小時。清洗 3 次，再加入兔子抗鴨二次抗體馬山葵過氧化酵素複合體 (Rabbit anti-duck IgG HRP)於 37°C 保溫箱中反應一小時，清洗 3 次。最後，在每孔中加入 100ml OPD(o - phenylenediamine dishydrochloride) 酵素受質體，放置於室溫暗處，呈色反應 25 分鐘，以 ELISA 吸光儀讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值。

## 十一、分析 IgY 抗體對不同蛇毒之專一性：

- (一) 使用雙向免疫擴散試驗(Ouchterlony double diffusion)，依形成的抗原-抗體複合物之沈澱線圖，可檢驗 IgY 抗體是否對蛇毒具有專一性，其原理為可溶性抗原與已知可溶性抗體分別加入相鄰的瓊脂



糖凝膠板上的小孔內，在電解質存在下讓它們相互向對方擴散。當兩者在最適當比例處相遇時，即形成一條清晰的沈澱線，方法如下為在 0.05-0.075M 的 TBE ( Tris-borate ) 中加入適量 NaCl 使含 0.1-0.15M NaCl，泡製 1-1.5 % 的瓊脂糖凝膠板，並以微波爐加熱溶解，待冷卻至 60 左右，倒入 petri dish 中使成為厚度約 2-3mm 瓊脂糖凝膠板 ( 約 12ml )，待其冷卻後，以適當工具在瓊脂糖凝膠板挖取適當小孔，如下圖：



挖孔時須注意小孔周圍之切面要整齊，以免液體漏出至瓊脂糖凝膠板平面而影響擴散，且瓊脂糖凝膠板與容器接觸面間不能有氣泡或裂縫，每一小孔加入 10  $\mu$  L 之蛇毒或抗體，中間為蛇毒蛋白抗原，環繞的六個小孔內均為抗體，但濃度自右上第一個小孔起，以順時針方向以生理食鹽水作二倍序列稀釋。置於室溫中反應 24 小時後以 Coomassie blue 進行染色。

- (二) 以西方墨點法 (western blotting) 比較 IgY 及抗蛇毒馬血清對蛇毒抗原之結合種類，作定性分析。蛇毒蛋白經過蛋白質電泳後，利用 Semi - phor 半乾式轉移槽，將蛇毒蛋白樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入 5% 脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪 30 分鐘後以 0.1% Tween20/PBS 清洗之後加入經過適當稀釋的 IgY 抗體及抗蛇毒馬血清於纖維膜上，在 37 保溫箱中作用 2 小時，以 0.1% Tween 20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 HRP - conjugated goat anti - mouse IgY 抗體，在 37 恆溫箱中作用 1 小時，以 0.1% Tween20/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。

將 TMB 置於纖維膜上，震盪 5 10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

## 十二、測定 IgY 中和蛇毒之效價：

將 20 mg/ml 之 IgY 抗體以生理食鹽水稀釋為不同濃度後與 4MLD 之蛇毒液混和均勻後，置於 37 恆溫箱內反應，靜置作用 1 小時，再以皮下注射體重 12 14 克之 ICR 小鼠，觀察 48 小時，並紀錄動物死亡數目，計算抗體效價。公式為：效價(MLD/ml)(田中單位)(U) = 4 MLD/0.2 ml x IgY 稀釋倍數。

## 十三、檢測被免疫鴨抗體效價之持續性：

分別以動物中和試驗及 ELISA 檢測法追蹤經基礎免疫後，鴨蛋及血液中抗體效價可維持的天數及後續追加免疫(booster)之結果。

## 十四、檢測抗體效價之安定性：

將 IgY 抗體置於-20 冰箱中保存一年，進行動物中和試驗，計算抗體效價，藉以評估其安定性。

## 結 果

### 一、IgY 之萃取與純化：

本中心於 93 年及 94 年計畫中考量未來若需大量製造 IgY 抗體的成本與步驟簡便性，故利用硫酸銨沉澱法純化抗蛇毒 IgY 抗體，可得到純度 90 % 以上的抗體，今年仍持續使用硫酸銨沉澱法來進行抗體純化，且其抗體純度更可達 95 %。

### 二、分析 IgY 抗體對不同蛇毒之專一性：

#### (一) 雙向免疫擴散試驗：

單獨免疫飯匙倩及雨傘節蛇毒之抗體皆可產生沈澱線 (圖一及圖二)，但抗雨傘節 IgY 抗體之沈澱線較飯匙倩明顯，且僅需 4 mg/ml 之抗體即可產生沈澱線，遠低於抗飯匙倩抗體的 30mg/ml 及抗蛇毒馬血清的 20 mg/ml。

#### (二) 西方墨點法：

鴨 IgY 抗體及血清與馬血清抗體對所免疫之蛇毒皆具有高度的專一性 (圖三)。

### 三、免疫計畫之確認：

#### (一) 動物中和效價測定法：

##### 1、抗飯匙倩 IgY 抗體效價 (20mg/ml)：

##### (1) 僅免疫飯匙倩蛇毒：

由圖四得知經基礎免疫後 (第 8 週)，抗飯匙倩 IgY 抗體可達 60U 的保護效價，經持續進行追加免疫，抗體效價仍會繼續維持，截至第 32 週為止，2 隻免疫鴨之平均抗體效價約為 190U，顯示免疫此一劑量及時程具有高度的穩定性。

(2) 免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒：

於第 6 週最後一次基礎免疫飯匙倩蛇毒時同時免疫少量雨傘節蛇毒 ( 共進行 6 次免疫至第 16 週 ), 結果發現第 10 至 20 週所收取之抗體平均效價 ( 130U ) 確較單獨免疫飯匙倩蛇毒高 ( 90U ) ( 圖五 ), 但第 22 及 24 週 ( 150U ) 反而卻比單獨免疫飯匙倩蛇毒低 ( 300U ), 第 26 至 32 週 ( 410U ) 又較單獨免疫飯匙倩蛇毒高 ( 290U ) 。

2、抗雨傘節 IgY 抗體效價 ( 20mg/ml ):

2 隻鴨子都是第 6 週所收取的抗體效價最高 ( B-Q03 為 1650U , B-Q04 為 910U ), 然後效價呈現些微下降, 雖然基礎免疫所收取的抗體效價有高低不同的差異, 但在追加免疫期間所得之抗體效價是相似的, 皆可達 700U 以上 ( 圖六 ), 顯示免疫此一劑量及時程具有高度的穩定性。

3、抗飯匙倩及雨傘節 IgY 多價抗體效價 ( 20mg/ml ):

(1) 先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒：

2 隻鴨子於第 6 及 8 週基礎免疫所得抗雨傘節蛇毒抗體效價為最高, D-Q07 第 6 週最高 1030U , D-Q08 第 8 週最高 970U ( 圖七 ), 第 10 至 16 週雖有下降的趨勢, 但其抗體效價與免疫計畫 B 是相似的, 不過從第 18 週開始至第 32 週的效價卻有很顯著的下降 ( 平均效價為 450U ), 且遠低於免疫計畫 B 之效價 ( 平均效價為 740U ), 此外此免疫計畫之抗飯匙倩蛇毒抗體平均效價約為 60U , 遠低於單獨免疫飯匙倩蛇毒之平均效價 190U。

(2) 先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒：

飯匙倩抗體效價於第 6 週時已可達 60U 以上的保護效價 (E-Q09 為 390U, E-Q10 為 230U)(圖八), 且其第 8 至 12 週之平均效價(270U)較單獨免疫飯匙倩蛇毒的免疫計畫 A 的平均效價(110U)高, 但第 14 週至 32 週的平均效價相似, 免疫計畫 A 為 200U, 免疫計畫 E 為 210U。第 6 週同時免疫兩種蛇毒後, 雖然對雨傘節蛇毒也有保護效價, 但其平均效價(60U)卻是遠低於單獨免疫雨傘節蛇毒的免疫計畫 B(780U)。

#### 四、以 ELISA 檢測法建立抗體產程檢驗：

以 ELISA 測定法檢測免疫鴨隻血液中抗蛇毒 IgY 抗體效價, 發現五個免疫計畫(圖九)血液中的抗體效價皆在進行免疫後會持續升高, 於第 16 至 20 週達最高, 然後雖會略微下降, 但仍可維持一定的效價, 此外, 單獨免疫飯匙倩蛇毒的免疫計畫 A 及單獨免疫雨傘節蛇毒的免疫計畫 B 兩者之 ELISA 讀值相似, 第 20 週前皆呈現一穩定的讀值, 高峰期雖較動物中和測定法的高峰期提早 2 週, 但與動物中和測定之趨勢相似, 而此 2 組免疫計畫 ELISA 讀值在第 24 週後開始下降, 但動物中和結果則否, 仍可維持穩定的效價; 免疫計畫 C 與 D 之 ELISA 讀值雖於免疫後有上升的趨勢, 但其趨勢看不出與動物中和之結果有相似的地方; 而免疫計畫 E 與去年結果相同, ELISA 讀值皆於動物中和效價提前 2 週升高。

#### 五、檢測抗體效價之安定性：

將 94 年度計畫三組免疫計畫(第 20 週)之 IgY 抗體置於-20 冰箱存一年, 所測得之動物中和試驗結果顯示抗體效價並沒有降低, 與去年結果相同。

## 六、成本效益評估

### (一) 抗飯匙倩蛇毒：

1、IgY抗體分析：以免疫飯匙倩蛇毒6-32週，20 mg/ml達190U計算，目前抗飯匙倩蛇毒馬血清每年需求量為4500劑，每瓶需有1200U。

(1) 採蛋：一隻鴨約可收180顆蛋。

(2) 純化：1顆蛋純化後約有50mg，IgY抗體一劑需 $20 \text{ mg/ml} \div 190 \text{ u/ml} \times 1200 \text{ u} = 130 \text{ mg}$ ，需 $130 \text{ mg} \div 50 \text{ mg} = 3$ 顆蛋。

(3) 需求：4500劑抗血清，需13500顆蛋 (4500劑x 3顆蛋)

(4) 飼養鴨：75隻鴨 (13500顆蛋/180顆蛋)

(5) 蛇毒用量：3600mg (以基礎免疫2mg、4mg、6mg、8mg，每隔2週補強免疫2mg至第32週，共需 $48 \text{ mg} \times 75$ 隻鴨)

2、鴨飼養成本(以75隻估計)

(1) 動物一年價錢：1500元( $20 \text{ 元/隻} \times 75 \text{ 隻} = 1500 \text{ 元/年}$ )。

(2) 一年飼料：9萬。

(3) 一年人工水電：13.5萬。

(4) 動物免疫人力需求：本局人力。

(5) 採血或蛋：代養人員代工。

(6) 抗飯匙倩蛇毒IgY抗體共計：23萬。

### (二) 抗雨傘節蛇毒：

1、IgY抗體分析：以免疫雨傘節蛇毒6-32週，20 mg/ml達700U計算，目前抗雨傘節蛇毒馬血清每年需求量為1500劑，每瓶需有1200U。

(1) 採蛋：一隻鴨約可收180顆蛋。

(2) 純化：1顆蛋純化後約有50mg, IgY抗體一劑需20 mg/ml  $\div$  700u/ml  
 $\times$  1200u = 40mg, 需50mg  $\div$  40mg = 1顆蛋。

(3) 需求：1500劑抗血清, 需1500顆蛋 (1500劑 $\times$  1顆蛋)

(4) 飼養鴨：9隻鴨 (1500顆蛋/180顆蛋)

(5) 蛇毒用量：30mg (以基礎免疫0.2mg、0.4mg、0.6mg、0.8mg, 每  
隔4週補強免疫0.2mg至第32週, 共需3.2mg  $\times$  9隻鴨)

## 2、鴨飼養成本(以9隻估計)

(1) 動物一年價錢：180元(20元/隻  $\times$  9隻=180元/年)。

(2) 一年飼料：1萬。

(3) 一年人工水電：1.5萬。

(4) 動物免疫人力需求：本局人力。

(5) 採血或蛋：代養人員代工。

(6) 抗飯匙倩蛇毒IgY抗體共計：2.6萬。

(三) 總計：兩種蛇毒單獨免疫的IgY抗體一年成本約為25.6萬元。

## 討 論

利用馬匹製造抗蛇毒血清產品，其抗體效價標準需達到60田中單位(U)以上才具有保護效果，故本免疫計畫中篩選抗體效價的高低，也是以此為標準。

由雙向免疫擴散試驗所產生的沈澱線及西方墨點法的結果，證明所純化之IgY抗體對免疫之蛇毒具專一性與可辨識性，其中抗雨傘節IgY抗體之沈澱線較飯匙倩明顯，且抗飯匙倩抗體〔30mg/ml (1X)，相當於300U〕及抗蛇毒馬血清的〔20 mg/ml (2X)〕產生沈澱線所需的濃度遠高於抗雨傘節沈澱線所產生之濃度〔4 mg/ml (8X)〕，推測原因可能為抗飯匙倩IgY抗體效價較低不足以產生沈澱線，而抗蛇毒馬血清純度較IgY抗體低（圖三），干擾抗原抗體的反應作用。另外抗原抗體結合會受到配製膠片的緩衝液（目前使用PBS）影響，因為蛇毒蛋白與IgY抗體皆為蛋白質，在中性和弱鹼性的溶液中，多為親水性，且帶有一定量的負電荷，溶液pH值及其離子解離的程度會使抗原抗體失去一部分負電荷而相互凝聚，便出現明顯的凝聚或沈澱現象，若無電解質存在，則不會有沈澱線的產生。未來我們會將抗體效價、瓊脂膠片溶液（如NaCl、TBE buffer等）的配製、蛇毒蛋白的濃度等三種因素做最適化的調整，使沈澱線能更清楚的顯現。

### 一、抗飯匙倩 IgY 抗體效價：

#### （一）僅免疫飯匙倩蛇毒：

本年度飯匙倩蛇毒的免疫劑量與時程與去年度相同，皆為每隔兩週免疫2mg、4mg、6mg、8mg，每隔兩週2mg的劑量進行追加免疫，抗體效價約從第8週開始到達60U以上，與去年結果相同，追加免疫的抗體效價皆可維持於60U以上，而從第22週至32週，抗體效價更可達300U，且仍未發現有下降的趨勢。另今年平均效價190U與



去年類似 (170U), 顯示此一免疫時程與劑量所得到之抗體具有高度穩定性及可信賴性, 未來若進入量產階段時應可考慮使用此時程與劑量。

## (二) 免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒：

由於在 94 年試驗結果中發現免疫飯匙倩蛇毒時同時免疫雨傘節蛇毒, 抗飯匙倩 IgY 抗體之效價會比單獨免疫飯匙倩蛇毒高, 所以我們推測少量雨傘節蛇毒可能具有加乘飯匙倩蛇毒抗體的效果, 為驗證此推論, 今年便加入同時免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒的計畫。於第 6 週同時免疫飯匙倩蛇毒時與少量雨傘節蛇毒, 共免疫 6 次至第 16 週, 結果發現第 10 至 20 週所收取之平均抗體效價 (130U) 確較單獨免疫飯匙倩蛇毒高 (90U), 但第 22 及 24 週卻較低 (150U), 第 26 至 32 週則又升高 (410U)。由此上結果得知少量雨傘節蛇毒確實具有提高飯匙倩蛇毒抗體效價的效果, 不過一旦少了雨傘節蛇毒的加乘作用, 抗飯匙倩蛇毒抗體雖仍可維持一定的效價 (約 4 週), 然後便會先降低再升高, 造成此結果的原因可能是先佔據細胞抗原結合位之雨傘節蛇毒因缺少持續的抗原來維持細胞的記憶性, 在經過一段時間後, 飯匙倩蛇毒便可慢慢取代雨傘節蛇毒, 佔據細胞上的抗原結合位 (epitope), 使得抗飯匙倩蛇毒抗體效價就像基礎免疫的原理一樣, 在進行 2 至 3 次免疫後, 抗體效價會有明顯上升的現象。

## 二、抗雨傘節IgY抗體效價：

本中心於94年度計畫結果發現僅需免疫1/10飯匙倩蛇毒劑量之雨傘節蛇毒即可得到高效價之抗雨傘節蛇毒IgY抗體, 且效價可維持一段時間, 所以今年持續以此劑量進行雨傘節蛇毒免疫, 惟將追加免疫時

程由每隔2週更改為每隔4週進行，結果發現抗體效價與去年追加免疫之結果相似，可達約700U的效價，不過相對的蛇毒用量可節省約33%，抗體仍可維持穩定的高效價，推測原因可能是基礎免疫之蛇毒劑量以等差基數方式循序漸進升高，故於基礎免疫結束時鴨隻體內抗體已累積一定的濃度而已達到穩定狀態。另僅需免疫1/10飯匙倩蛇毒劑量的雨傘節蛇毒便可得到高效價抗體的原因可能為雨傘節蛇毒所含的抗原成分與禽類或哺乳類的抗原結合位親和力較高，進而快速攝入(uptake)，所以很容易便能引起免疫反應，而產生較高效價的抗體，並穩定的維持一段時間，若改用此免疫時程則追加免疫時間不需太頻繁，可減少鴨隻免疫時的壓力，即可達到量產所需的標準與目標，若抗體仍持續維持高效價，未來可再嘗試降低免疫劑量或追加免疫時間的間隔，藉此節省更多的蛇毒用量及人力。

### 三、抗飯匙倩及雨傘節IgY多價抗體效價：

#### (一) 先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒：

免疫計畫E為參考馬匹蛇毒免疫的時程及劑量後所設計的，依據去年之結果推測因為飯匙倩與雨傘節都屬於神經性蛇毒，抗原構造類似，彼此會對細胞上的抗原結合位產生競爭性，而雨傘節蛇毒的抗原競爭力遠強於飯匙倩蛇毒，會先佔據結合位，使後免疫的飯匙倩蛇毒抗原無法與細胞結合，故免疫記憶性較難被激起，所以需先免疫飯匙倩蛇毒，待免疫系統對飯匙倩蛇毒產生記憶性後，再免疫雨傘節蛇毒。由圖十發現不僅今年抗體效價與去年呈現不同的趨勢，平均抗體效價亦低於去年（今年抗飯匙倩為230U，雨傘節為60U，去年抗飯匙倩為300U，雨傘節為80U），且今年最高效價E-Q09為第6週的390U，E-Q10為第12週的410U，與去年在第18週的440U

完全不同。由於同時免疫兩種蛇毒，彼此會互相競爭抗原結合位，作用機轉變得更複雜，進而導致抗體效價呈現非常不穩定的趨勢，但此推論則需再進一步的探討，不過與去年結果同樣是抗飯匙倩抗體平均效價（230U）都高於單獨免疫飯匙倩的平均效價（190U），抗雨傘節抗體效價（60U）皆較單獨免疫雨傘節蛇毒低（平均700U），而由此一免疫計畫結果再次證明雨傘節蛇毒確實具有加乘飯匙倩蛇毒抗體的效果。

## （二）先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒：

由去年先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒的結果發現，雖然可提高抗飯匙倩抗體的效價，但抗雨傘節的效價卻很低，所以今年便有先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒的構想。結果發現此免疫計畫不論是抗飯匙倩抗體或抗雨傘節抗體效價均較單獨免疫效價低（表一），可能原因為雨傘節蛇毒雖然先佔據細胞的抗原結合位，後續免疫飯匙倩蛇毒的競爭力低於雨傘節蛇毒，無法取代之，但仍可能會對已經結合雨傘節蛇毒產生影響，干擾其免疫作用，導致兩者抗體效價皆下降，故此免疫計畫應可降低免疫飯匙倩蛇毒的劑量或時程。

由免疫計畫D與E發現不論先免疫哪一種蛇毒，後來免疫蛇毒的效價都會遠低於先免疫蛇毒的效價，雨傘節蛇毒雖會提高飯匙倩蛇毒的效價，但飯匙倩蛇毒卻會降低抗雨傘節蛇毒的效價，造成此結果的原因則需再進一步探討。

我們使用ELISA測定血清中抗體效價的目的是希望此方法能作為抗體篩選的工具，即時得知抗體效價上升趨勢，並作為收集鴨蛋的依據。Kowalczyk（1985）等人證實位於母雞卵細胞的IgY受體會先結合所有的IgY

抗體,然後從母雞的血液中運送至雞蛋中<sup>(12)</sup>,Lobbedey and Schlatterer( 2003 )使用ELISA檢測法發現鴨蛋蛋黃中具有專一性IgY抗體的存在,且在後代的血液中亦可被發現<sup>(14)</sup>,上述的報告皆證實在禽類血液中具有一定濃度的IgY抗體存在,所以使用ELISA檢測鴨隻血液中抗體濃度的方法是可行的。經比較ELISA與動物中和測定法後,發現兩者在免疫計畫A與B圖譜結果相符,且ELISA之高峰期皆較動物中和測定法的高峰期提早2週,可能是因為抗體是經由血液運送至卵黃中,所以血液中的抗體會比卵黃還要早被檢測到,但在第24週後ELISA結果卻持續下降,推測可能是因為免疫後期,鴨子血液中已有高效價的抗體存在,會與再免疫的蛇毒互相中和,導致有血液中抗體效價降低的現象發生;而免疫計畫C E在基礎免疫所得抗體效價的高峰期雖然同樣提早動物中和測定法2週,但追加免疫階段兩者的時間則變為同一週。由此確定ELISA檢測系統可在免疫單一蛇毒IgY抗體快速篩選抗體機制時使用,並可作為動物抗體中和測定法和產程監測的輔助工具,但若同時免疫兩種蛇毒則較不適合用此方法,可能需再尋求其他的檢測方法。

本中心為生物製劑製造廠,故成本效益為生產時所需考量的一個重要因素,根據以往製造多價抗蛇毒血清產品的經驗,產品中抗雨傘節的效價通常都比抗飯匙倩高2-3倍,而產品使用方面,被飯匙倩咬傷和被雨傘節咬傷的案例比是3:1,所以如果醫師能夠準確判斷病人被何種蛇咬傷,就能節省許多抗蛇毒血清產品和成本,避免造成無謂的浪費。所以以利用馬生產6000劑抗飯匙倩與雨傘節多價馬血清為基準,一匹馬每年飼養成本約180萬元,如果利用鴨子生產抗蛇毒IgY抗體,依目前實驗結果,每隻鴨子收取第6至32週的蛋,大約可收180顆蛋,分別單獨生產抗飯匙倩蛇毒及抗雨傘節蛇毒抗體初步可節省約85%的經費(表二及表三)。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,且目前世界動物保育的方

向都不建議使用馬匹來從事生物製劑的生產，所以基於成本、人員安全及動物保育三方面的考量，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。

## 參 考 文 獻

1. Akita, E. M. and S. Nakai, 1992 Isolation and purification of immunoglobulins from egg yolk. *J. Food Sci.* 57, 629
2. 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
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. Cama, V. A. and Sterling, C. R. 1991. Hyperimmune hens as a novel source of anti-Cryptosporidium antibodies suitable for passive immune transfer. *J Protozool.* Nov-Dec; 38(6):42S-43S
5. Devi, C. M., Bai, M. H., Krishnan, L.K. 2002 Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity *Toxicon* 40: 857-861
6. Devi, C. M., Bai, M. H., Lal A.V., Umashankar, P. R., Krishnan, L.K. 2002 An improved method for isolation of anti- viper venom antibodies from chicken egg yolk *J. Biochem. Biophys. Methods* 51: 129-138
7. Hassl, A. and H. Aspöck, 1988 Purification of yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods* 110, 225
8. Hatta, H., Kim, M. and T. Yamamoto, 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibodies "IgY". *Agric. Biol. Chem.* 54, 2531
9. 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

10. 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
11. 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
12. 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
13. Larsson, A., Wejaker, P.-E., Fosberg. P. -O., Lindahl, T. 1992 Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. Immunol. Methods* 156: 79-83
14. Lobbedey, L. and Schlatterer B. 2003. Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and in serum of their offspring. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 50(2):81-5
15. Parrisg, H. M. and Hayes, R. H. 1970. Hospital management of pit viper venenations. *Clinical Toxicology* 3 (3): 501-511
16. Polson, A. 1990. Isolation of IgY from the yolk of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.* 19, 253-258
17. Polson, A., Von Wechmar, M. B. and M. H. V. Van Regenmortel, 1985 Improvements in the isolation of IgY from the yolk of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Inves.* 14, 323
18. 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.*

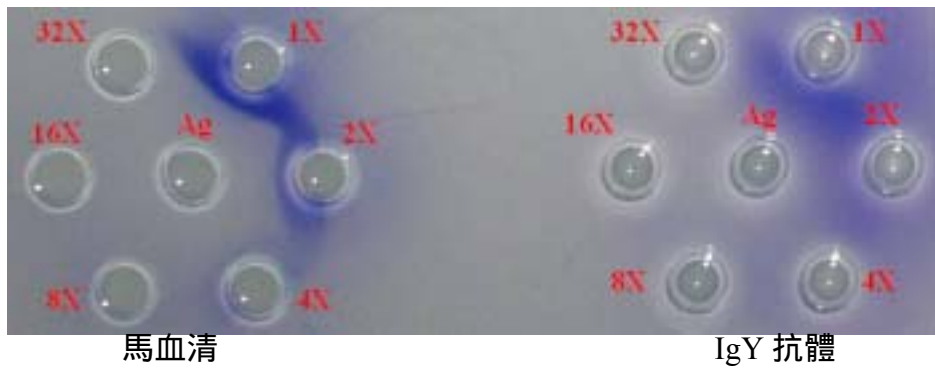
Diagn. Lab. Immunol. 9,5: 1061-1066

19. 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
20. 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
21. Yokoyama, H., Peralta, R.C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. 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

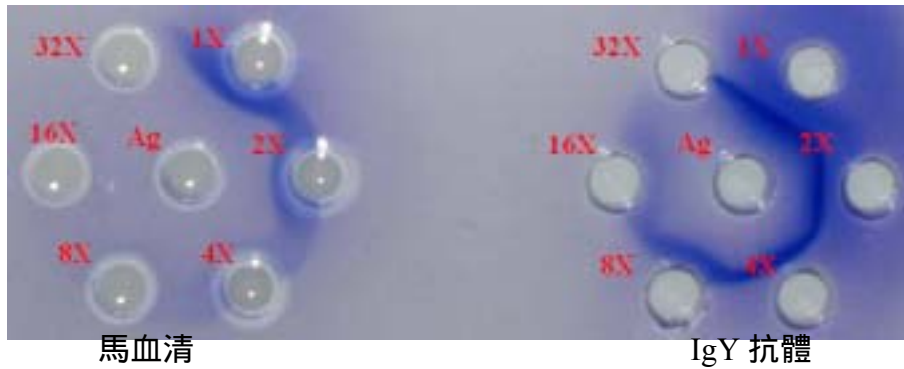


## 圖 表

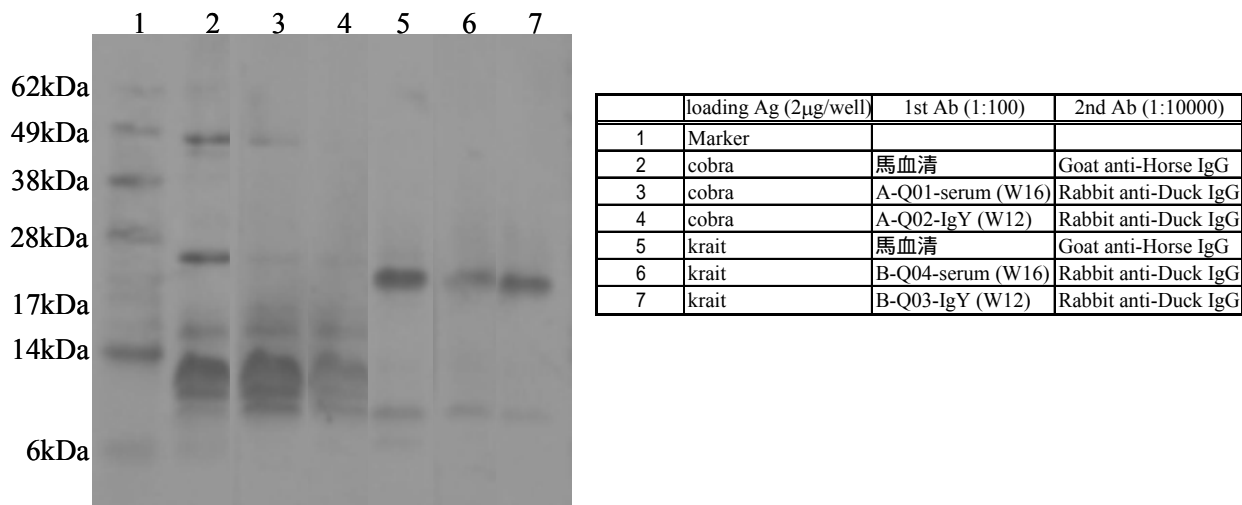
圖一、抗飯匙倩蛇毒 IgY 抗體與馬血清雙向免疫擴散試驗之比較。  
馬血清：1X 為 40 mg/ml，IgY 抗體：1X 為 30 mg/ml，  
飯匙倩 (Ag)：1 mg/ml。



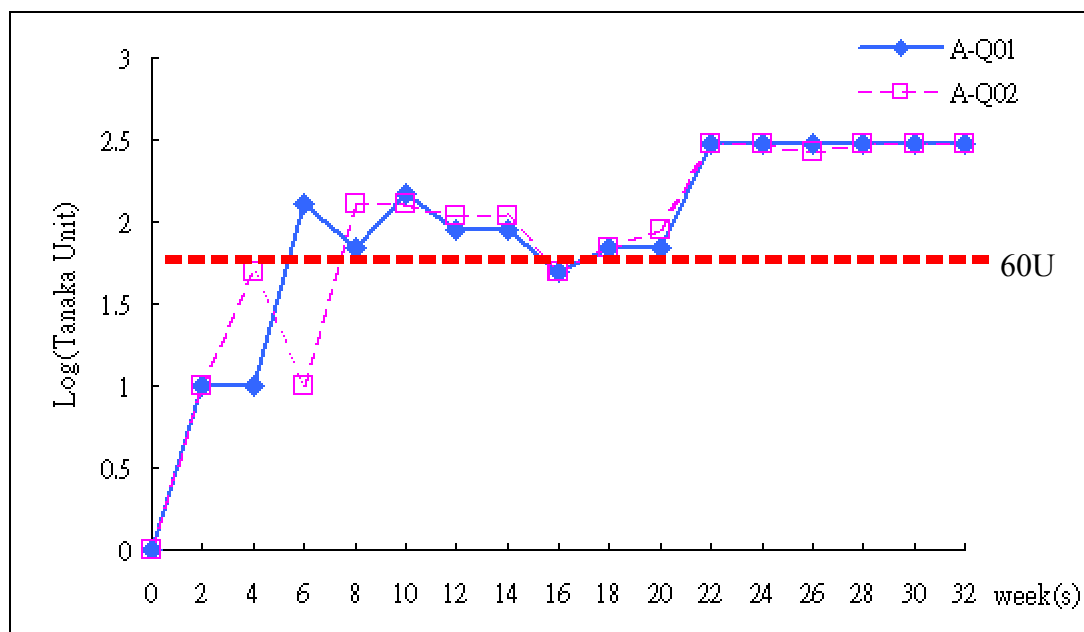
圖二、抗雨傘節蛇毒 IgY 抗體與馬血清雙向免疫擴散試驗之比較。  
馬血清：1X 為 40 mg/ml，IgY 抗體：1X 為 30 mg/ml，  
雨傘節 (Ag)：1 mg/ml。



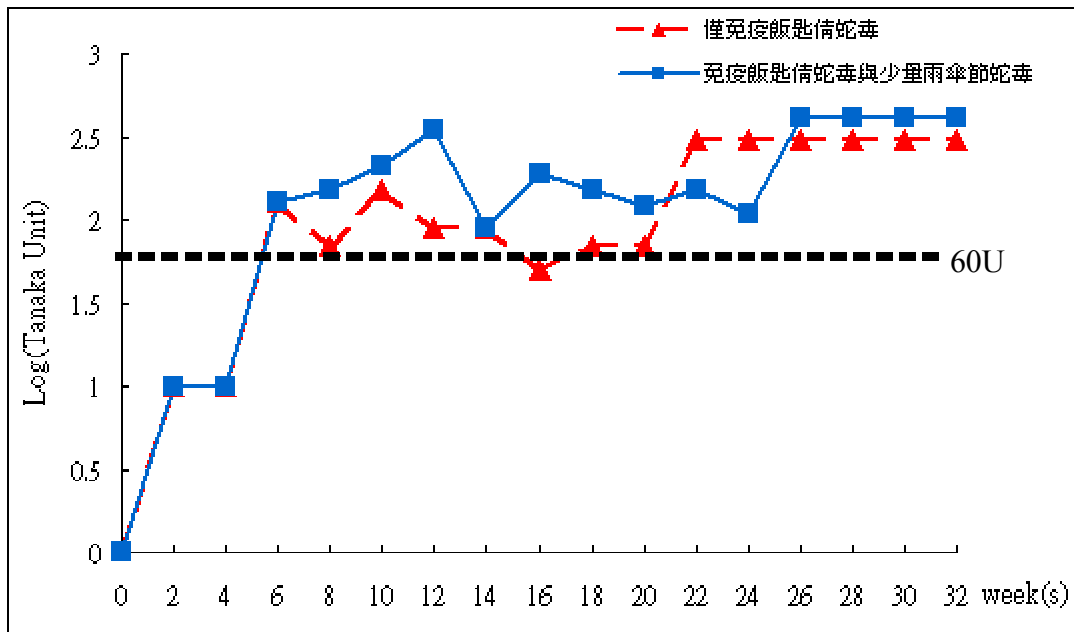
圖三、抗蛇毒 IgY 抗體與馬血清西方墨點法之比較。



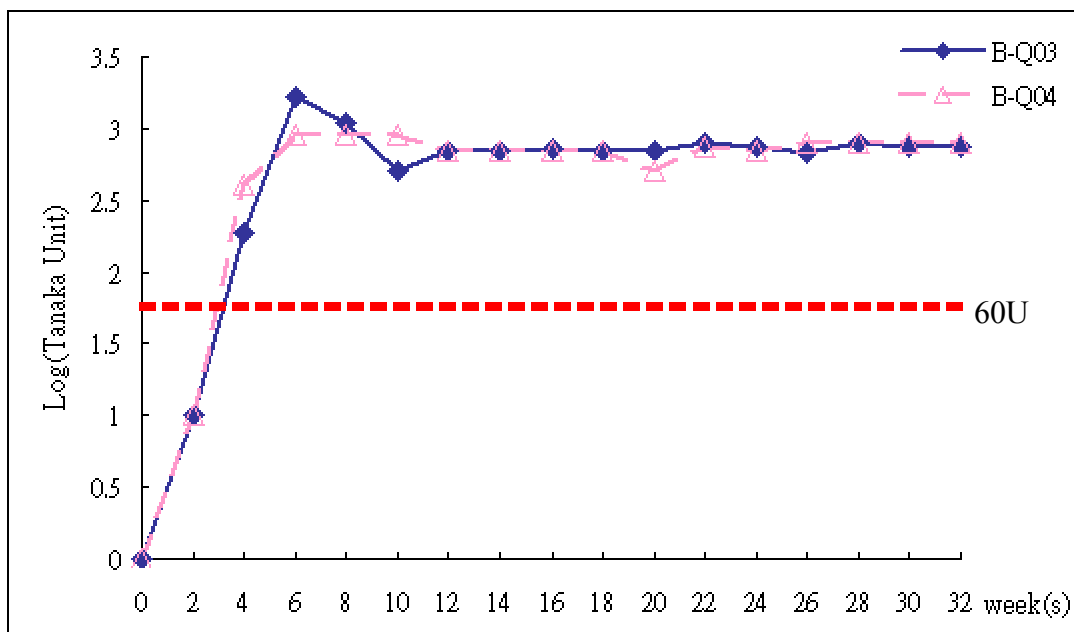
圖四、免疫計畫 A 抗飯匙倩 IgY 抗體之動物中和效價測定。



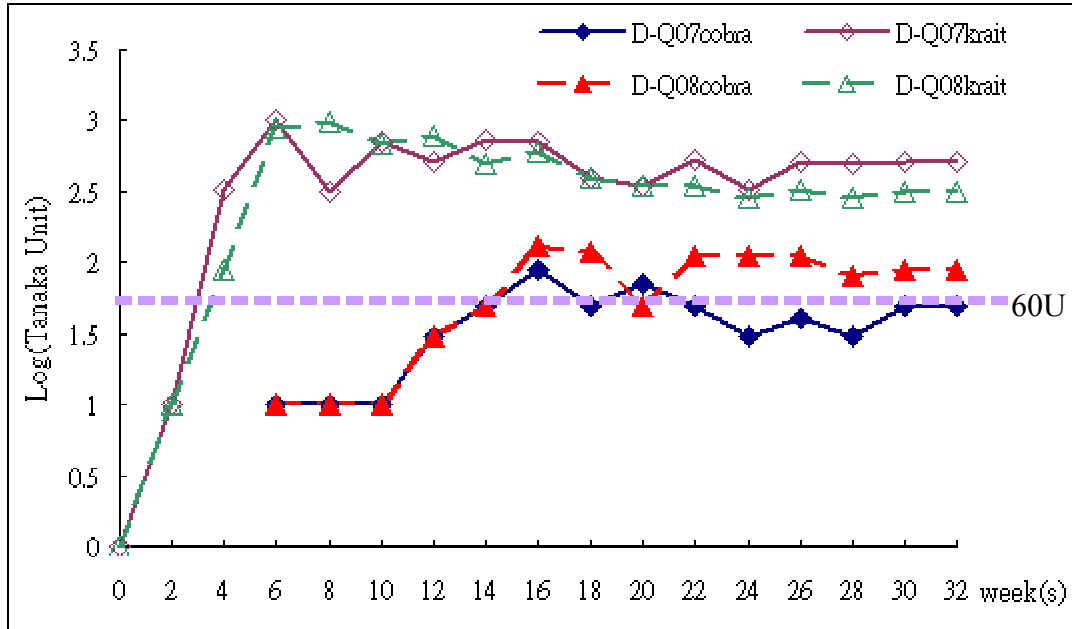
圖五、免疫計畫 A 與 C 抗飯匙倩 IgY 抗體之動物中和效價測定之比較。



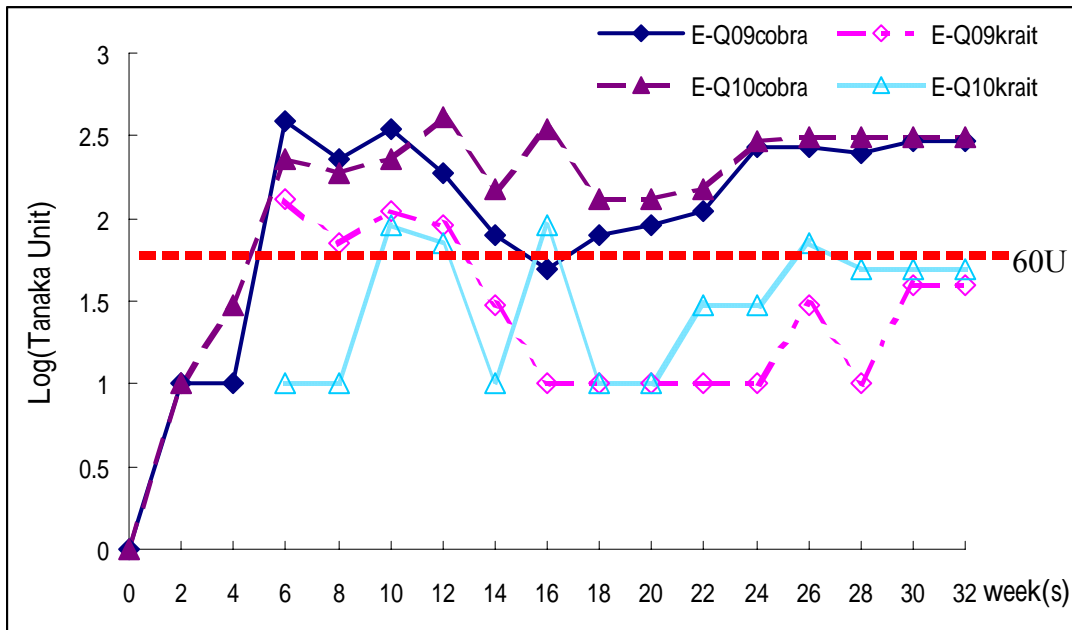
圖六、免疫計畫 B 抗飯匙倩 IgY 抗體之動物中和效價測定。



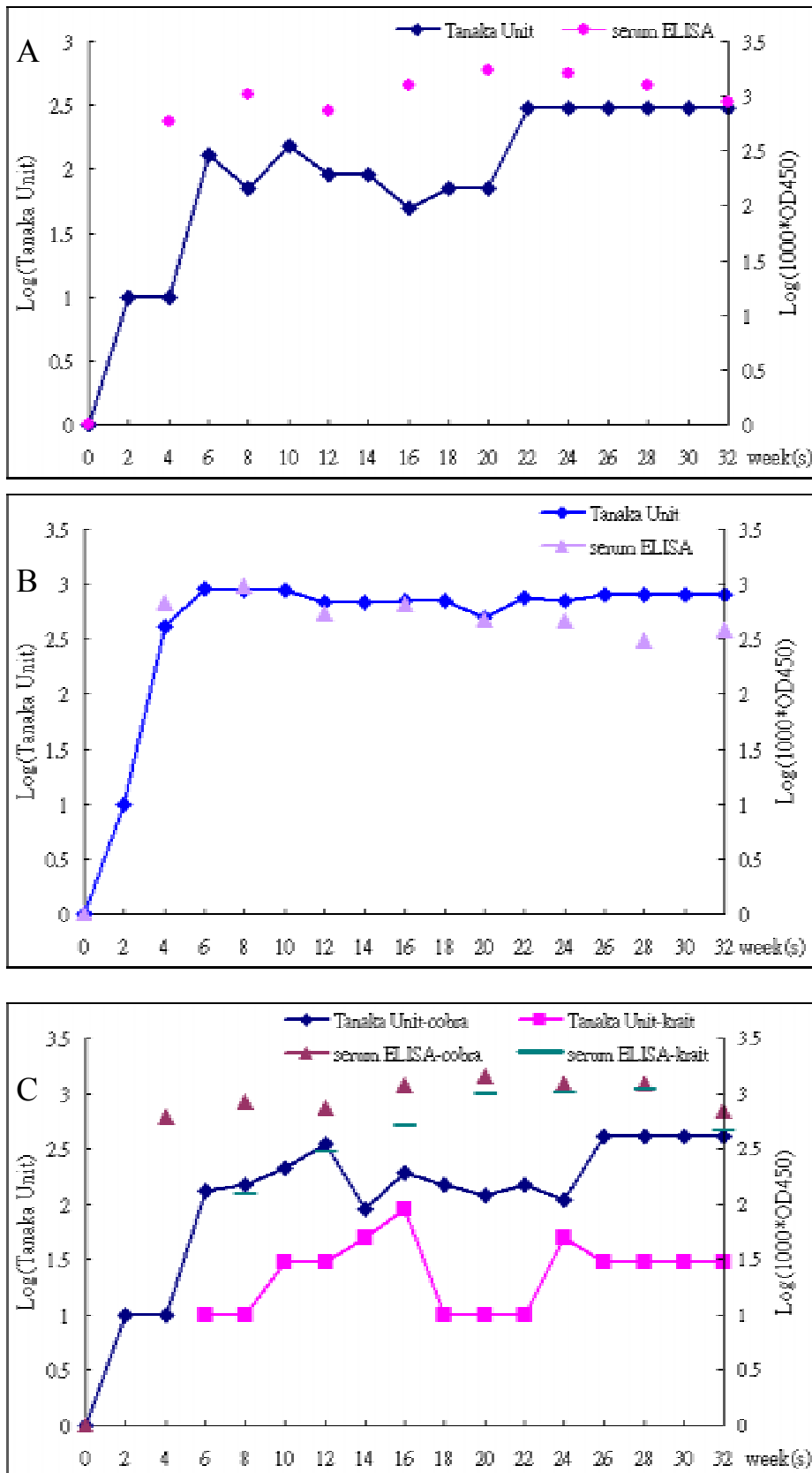
圖七、免疫計畫 D 抗飯匙倩與雨傘節 IgY 抗體之動物中和效價測定。

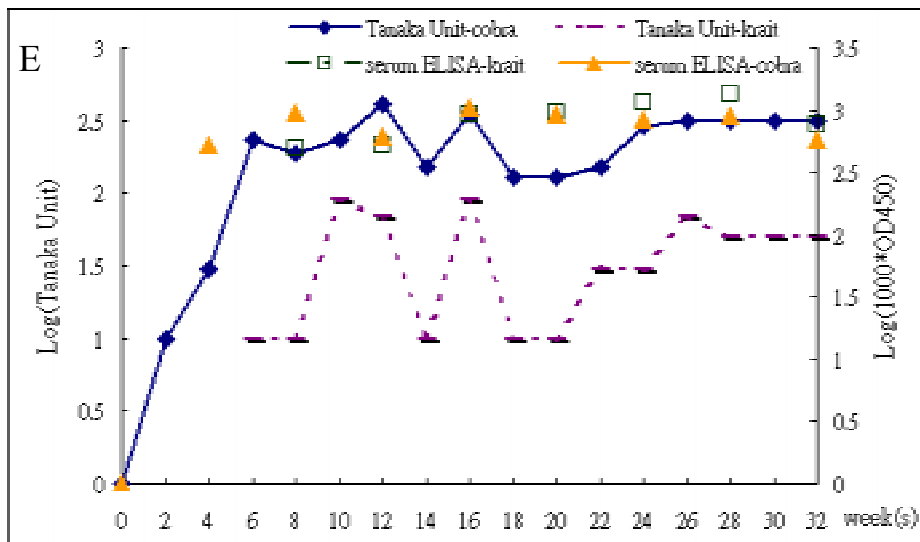
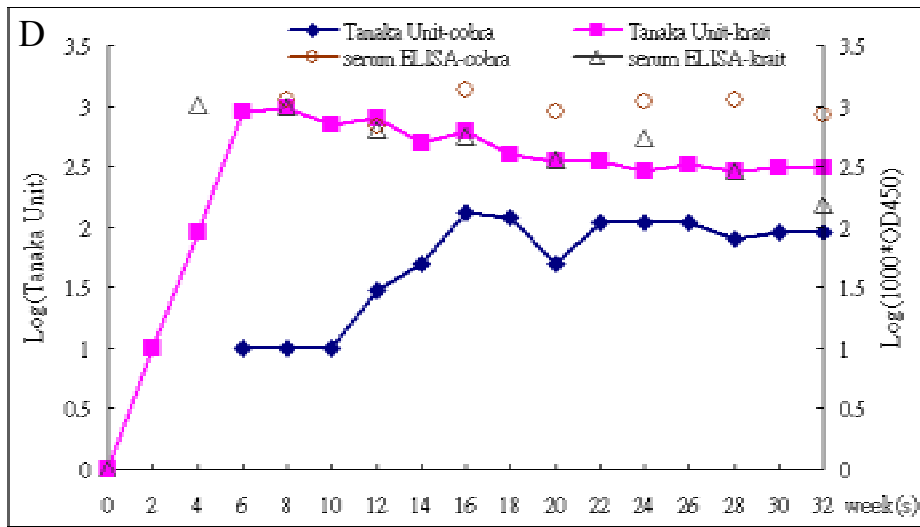


圖八、免疫計畫 E 抗飯匙倩與雨傘節 IgY 抗體之動物中和效價測定。

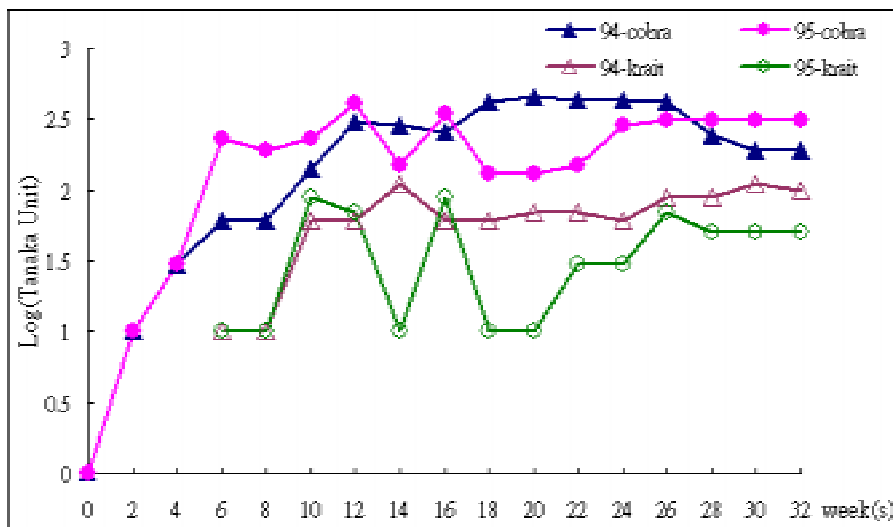


圖九、五組免疫計畫之抗蛇毒 IgY 抗體 ELISA 測定法與動物中和效價測定之比較。





圖十、比較 94 年與 95 年先免疫飯匙倩再免疫雨傘節之動物中和效價。



表一、五組免疫計畫第 6 週至 32 週 IgY 抗體平均效價之比較。

免疫計畫 \ 蛇毒	飯匙倩	雨傘節
A	190	—
B	—	700
C	220	60
D	60	520
E	230	60

A：僅免疫飯匙倩蛇毒。B：僅免疫雨傘節蛇毒。C：免疫飯匙倩蛇毒與少量雨傘節蛇毒。  
D：先免疫雨傘節蛇毒再免疫飯匙倩蛇毒。E：先免疫飯匙倩蛇毒再免疫雨傘節蛇毒。

表二、IgY 抗體與馬血清抗體需求量比較

	馬血清多價抗體	鴨蛋 IgY 抗體 ( 6-32 週估計 )	
		抗飯匙倩蛇毒	抗雨傘節蛇毒
每年需求量， 每劑 1200U	6000 劑	4500 劑	1500 劑
抽血或採蛋	1 匹馬每年可抽 3 次血， 每次 10L，共 30L ( 15L 粗血清 )	一隻鴨約可採 180 顆蛋	
		平均 190U	平均 700U
抗體純化量	3L 粗血清可精製 1L	抗體有 50mg/egg，1 劑 130mg ( 3 eggs )	抗體有 50mg/egg，1 劑 48mg ( 1 egg )
需求	60L 抗血清，需 180L 粗 血清，需採 360L 血	4500 瓶抗血清，需 13500 顆蛋	1500 瓶抗血清， 需 1500 顆蛋
飼養	360L 血/30L=12 匹馬	13500 顆蛋/180 顆 蛋= 75 隻鴨	1500 顆蛋/180 顆 蛋= 9 隻鴨
蛇毒用量	飯匙倩：375mg x 12 匹馬=4500mg 雨傘節：36mg x 12 匹馬=432mg	48mg x 75 隻鴨 =3600mg	3.2mg x 9 隻鴨 =30mg

表三、IgY 抗體與馬血清抗體飼養成本比較（不含產品精製之費用）

	馬	鴨(以 6-32 週估計)	
		抗飯匙倩蛇毒	抗雨傘節蛇毒
隻數	12 匹	75 隻	9 隻
動物一年價錢(元)	30 萬/隻 x 12 匹=360 萬 360 萬/3 年=120 萬元	20 元/隻 x 75 =1500	20 元/隻 x 9 =180
一年飼料(元)	4 萬/匹 x 12 匹=48 萬	9 萬	1 萬
一年人工水電(元)	1 萬/匹 x 12 匹=12 萬	13.5 萬	1.5 萬
動物免疫	本局人力		
採血或蛋	本局人力	由代養人員代工	
共計(元)	180 萬	23 萬	2.6 萬
		共計 25.6 萬	
較馬血清成本節省之經費	—	85 %	