計畫編號： DOH99-DC-2039

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

吸著破傷風類毒素原液持續性安定試驗

研 究 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局血清疫苗研製中心

計畫主持人：吳炳輝

研究人員：李政道、劉健良、陳蓓諭、吳慧娟、張靜芳、黃秀懿

執行期間：99 年 4 月 1 日至 99 年 12 月 31 日

目　　錄

頁　碼

封面 **(1)**

目錄 **(2)**

中文摘要 **(3)**

前言 **(4)**

材料與方法 **(8)**

結果 **(11)**

討論 **(16)**

參考文獻 **(19)**

中文摘要

目前由本局疫苗中心所產製上市販售的破傷風疫苗共有三種：1.明礬沉澱破傷風類毒素（Tetanus ToxoidAlum Precipitated）；2.吸著白喉破傷風混合類毒素（Diphtheria &Tetanus Toxoids Adsorbed）；3.吸著破傷風白喉混合類毒素(成人用)（Tetanus & Diphtheria Toxoids Adsorbed ； Adult Use）。以上三項產品都是以吸著破傷風類毒素為原液再經過後續處理而成；且必須通過包括pH值、無菌、安全、力價等品管檢驗相關測試項目，因此吸著破傷風類毒素原液的安定性與成品的品質有相當重要的關係。本計劃是將目前吸著破傷風類毒素原液分別儲放於不同時間、溫度。經過這些預置條件後是否會影響到疫苗原液的品質的改變，並利用加速試驗評估於標示儲存條件之外(如：運銷時可能遭到短暫脫離標示之儲存條件)對原液安定性之影響。為監控疫苗及維護良好之疫苗品質，達到最好接種預防的效果，監控疫苗存放的安定性與其力價的關聯實為必要，使期，充分運用並發揮所產製製品的經濟價值，最終能達到品質最佳與保證的效益。

關鍵字：破傷風疫苗, pH 值,力價,加速試驗

前言

破傷風（**Tetanus**）此疾病係由破傷風桿菌之外毒素（exotoxin）所引起，其特徵為痛性之肌肉收縮（最初在咬肌及頸部肌肉，而後為軀幹肌肉）。而最常見之初症狀為腹部僵硬（abdominal rigidity）及肌肉痙攣（spasm），典型的破傷風痙攣現象為「角弓反張」（opisthotonus）及臉部表情出現「痙笑」（risus sardonicus）之特徵。此疾病之致死率約在 10％～90％之間，且以老人及小孩為最，在無疫苗的時代，感染破傷風致死率很高尤其在新生兒及五十歲以上的老年人，自從開打疫苗之後，致死率就快速下降[1]。破傷風桿菌芽胞（spore）進入人體之方式，通常是經由受土壤、塵土或動物及人類糞便污染之穿刺傷口而入。另外，也有可能透過撕裂傷、燒傷及一般傷口甚或由注射受污染之藥物而引起。壞死組織有利此種厭氣性的破傷風桿菌增殖。

破傷風疫苗的發現可推至1889年，Kitasato由破傷風病患的傷口，分離出破傷風的病原菌，不但証明此菌在動物身上可造成相同的破傷風，也發現此種細菌的毒素可被人體內的抗體中和。1897年Edmond Nocard發現利用破傷風毒素經由被動免疫產生的抗體可用來預防或治療破傷風。1924年P. Descombey發展出破傷風類毒素疫苗技術並在第二次世界大戰中被使用。此後由接種經驗得知破傷風類毒素之接種相當有效，因此全世界大量推廣使用。破傷風類毒素

係由破傷風桿菌（C. tetani，Harvard strain AT－47）的破傷風毒素，經甲醛減毒處理及精製後，以磷酸鋁吸附所得的無菌懸浮液。在現今已開發國家破傷風致死率已趨近為零，但在未開發國家仍然是一個高致死率的疾病，在六十歲以上老人的致死率甚至超過50％[2-3]。台灣地區的破傷風以民國45年的1,004例最高，民國53年開始供應白喉、破傷風、百日咳混合疫苗（DTP）接種，於民國61年以後病例減至100例以下；自民國70年起，每年破傷風之報告病例皆在20例以下，臺灣於2002、2003、2004、2005、2006年分別通報15、13、16、16及14例病例（共74例），確定病例均為0例。近年來市面上陸續推出新一代的含白喉、破傷風、百日咳成份混合疫苗，如非全細胞型三合一疫苗(Tdap)[4]、五合一疫苗、六合一疫苗，五合一疫苗為非全細胞型三合一疫苗加上小兒麻痺、b 型嗜血桿疫苗的成分合為一針，使用於人體身上疫苗注射後產生免疫的效果不亞於傳統型的三合一疫苗、b 型嗜血桿菌疫苗單獨使用所產生的免疫力[4-6]。

近來衛生署為提昇國內藥廠品質與國際間對於GMP的要求與日俱增，對GMP之推行由原有GMP到cGMP藥品優良製造確效作業（current Good Manufacturing Practice，簡稱cGMP），再發展至最近之 PIC/S GMP，國際醫藥品稽查協約組織（The Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical

Inspection Co-operation Scheme, PIC/S ）是由世界各國衛生機關所組成的跨國性國際組織，PIC/S GMP Guide勢必為未來GMP國際標準。依衛生署規定，104年1月1日起，所有西藥製劑製造工廠必須全面完成實施國際GMP標準(PIC/S GMP)。

疫苗的安定性（Stability）對疫苗免疫計畫成功有重要之影響，也是保證疫苗品質之一部分。依據PIC/S GMP的規範，藥品上市後，其安定性應依照一個持續性的適當計畫進行監測。批次的數目與測試頻率應能提供足夠的資訊/數據量，以容許趨勢分析。所有影響安定性之環境因子中，對疫苗均有影響的是溫度，濕度則因包裝方式，故對大多數疫苗並無影響。

目前由本局疫苗中心所產製上市販售的破傷風疫苗，上市前均依照中華藥典規範必須通過包括pH值、無菌、安全、力價等品管檢驗相關測試項目，品質有一定保障。評估疫苗安定性最大的問題為許多疫苗具有特殊之之生物活性，生物分析對疫苗之品管扮演很重要的角色，而活體攻擊（i.v. Challenge）之力價試驗通常用來作為疫苗安定性試驗之指標變數。由於生物分析之變異性較大，標準品之使用對安定性資料分析及解釋影響很大，因此標準品必須以國際生物標準品（International biological standard）來校正，國際標準品之目的是為了全世界疫苗力價可具比較性。

生物製劑生產本就不易，為使所生產的原液均能達到最大利用

效能，因此必須清楚知道原液的安定性試驗，藉以推估其最大保存期限，因此藉由本次吸著破傷風類毒素原液的安定性試驗瞭解原液品質的穩定性。

.

材料與方法

(一) 吸著破傷風類毒素分別儲放不同年限於 4℃力價有無改變

將送驗的吸著破傷風類毒素儲放於冰箱 4℃各 1 個月、3 年、4 年及 7 年。本計劃將抽樣留存的吸著破傷風類毒素原液作為本研究之疫苗樣本。安定試驗為產品以外觀性狀及力價試驗二項試驗來進行。持續性安定試驗係依據計畫書 P8.9.4，試驗結果顯示外觀性狀仍為混濁白色懸浮液，微帶保藏劑之特臭；力價測定符合每 mL 血清所含破傷風抗毒素不得少於 2 抗毒單位，證明在儲存期間原液品質仍能保持有效性及安全性。免疫試驗係取體重 450 g～550 g 之健康天竺鼠四隻(公母不居)以上，每隻施打特定濃度破傷風類毒原液於大腿內側皮下，每隻天竺鼠免疫各 0.5mL。試驗動物每周測量其體重觀察其免疫情形，於 30 天後進行心臟內採血，取得血液後分離血清，每隻天竺鼠血清各取等量混合之。血清於 56℃水浴 30 min 後，儲存於 4℃待測。力價測定需準備：(1)標準破傷風抗毒素溶液(2) 標準破傷風毒素溶液(3)檢體試驗血清。標準破傷風抗毒素溶液：標準破傷風抗毒素選用 NIBSC 國際標準抗破傷風人類免疫球蛋白 (TE-3)，此標準品為凍結乾燥品，稀釋以生理氯化鈉溶液，使每 ml 含 120 抗毒單位。用時以生理氯化鈉溶液稀釋成三種稀釋液，使每 0.2ml 各含 0.09、0.10 及 0.11 抗毒單位。試驗法試驗

動物為 15－17ｇ小白鼠。

(1)對照試驗──將稀釋的破傷風毒素溶液與標準品三種稀釋液分別等量混合，於室溫中靜 置一小時後，取 0.4ml 皮下注入小白鼠腿部內側；每一種混合液至少注射二隻，注射後至少觀察五天。注射 L +/10 破傷風毒素與零點一單位抗毒素混合液之試驗動物應於注射後九十六小時左右死亡，而混以零點零九抗毒單位者之死亡應稍早，混以零點一一抗毒單位者應稍遲。

(2)檢體試驗──將稀釋的破傷風毒素與檢體的三種稀釋液分別等量混合，於室溫中靜置一小時後，取 0.4ml 皮下注入小白鼠腿部內側；每一種混合液至少注射兩隻，同樣觀察五天，檢體試驗應與對照試驗同時施行。試驗動物之死亡情形應與對照試驗動物相似且試驗動物活的時間稍久，方始合格。

(二) 吸著破傷風類毒素分別儲放不同年限於 4℃其 pH 值有無改變

將目前吸著破傷風類毒素儲放於 4℃在這些時間點分別進行檢測 pH 值變化。操作時打開電極填充孔並以 RO 水沖洗電極，將拭淨紙吸乾之電極放進待測液中，並給予攪拌，數值穩定後得到該樣品 pH 值。

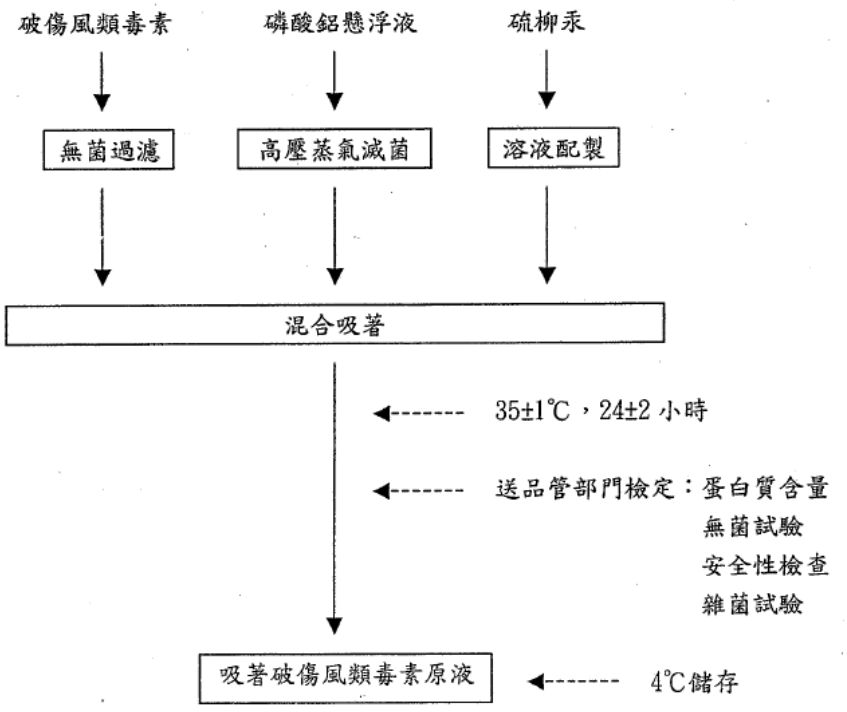
(三) 吸著破傷風類毒素加速試驗

將 99 年度新製吸著破傷風類毒素放置於 25℃各零、一、二、三及六個月。在這些時間點分別進行力價試驗是否會影響到疫苗的力價的改變。依據國際協調會議(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, ICH)之指引，由於本研究之疫苗樣本儲存於 4℃，故加速試驗採取 25℃±2℃。樣品存放一定時間後，測其力價是否發生改變。

結果

(一) 吸著破傷風類毒素原液樣本的收集

已收集五批吸著破傷風類毒素原液，分別為 Ta92-07、Ta92-08、Ta95-26、Ta96-27、Ta99-28。五批原液都是由本局血清疫苗研製中心製作，製造流程詳見圖一。五批原液均有製做成品的紀錄，所製成的產品皆符合中華藥典所規範：成品力價實驗每 mL 血清所含的破傷風抗毒素不得少於 2 抗毒單位。本計劃所收集吸著破傷風類毒素原液資料，最長存放的原液批號為 Ta92-07，迄今已經存放 82 個月(約 7 年)，最短存放的原液批號為 Ta99-28，迄今約半年。詳細五批吸著破傷風類毒素原液資料詳見表一。



圖一、破傷風類毒素原液製造流程

表一、本計劃所收集吸著破傷風類毒素原液資料

	製造年份	力價	存放月數(月)
Ta92-07	92 年 8 月	大於 2 抗毒單位	82
Ta92-08	93 年 3 月	大於 2 抗毒單位	75
Ta95-26	95 年 5 月	大於 2 抗毒單位	49
Ta96-27	96 年 4 月	大於 2 抗毒單位	38
Ta99-28	99 年 2 月	大於 2 抗毒單位	4

●存放月數=從本計劃實驗起始月份回推至製造月份吸著破傷風類毒素原液存放於 4℃的時間

(二) 吸著破傷風類毒素分別儲放不同年限於 4℃力價改變情形

安定性試驗乃在研究樣品受到環境因素如溫度、濕度及光線等之影響隨時間變化之關係，研究出樣品降解曲線，據以推定有效期間，確保樣品使用時的有效性及安全性。將不同時間儲放於 4℃不同批次的吸著破傷風類毒素原液進行力價試驗，觀察時間對疫苗的力價的影響。五批吸著破傷風類毒素原液，發現雖然經過長達 7 年左右時間於溫度 4℃儲存條件下存放，所測得的力價仍大於 2 抗毒單位。詳細五批吸著破傷風類毒素原液力價變化詳見表二。

表二、吸著破傷風類毒素分別儲放不同年限於 4℃力價改變

批號	原始力價	本計劃測得力價
Ta92-07	大於 2 抗毒單位	大於 2 抗毒單位
Ta92-08	大於 2 抗毒單位	大於 2 抗毒單位
Ta95-26	大於 2 抗毒單位	大於 2 抗毒單位
Ta96-27	大於 2 抗毒單位	大於 2 抗毒單位
Ta99-28	大於 2 抗毒單位	大於 2 抗毒單位

(三) 吸著破傷風類毒素分別儲放不同年限於 4℃其 pH 值

pH 值對結合疫苗的穩定性、安全性及免疫保護效果影響甚鉅，應根據臨床研究和穩定性試驗的結果確定最適 pH 值範圍。所以儲存環境對於原液的 pH 值是否影響，對於成品品質的好壞有很大的關連性。目前測得的四批吸著破傷風類毒素原液的 pH 值落在 5.47~5.66 之間。但由於破傷風原液品管檢驗項目並不包含 pH 值的檢測，所以無法得知原液新製成時其 pH 值。但根據中華藥典第六版規定明礬沉澱破傷風類毒素的成品其 pH 值合格範圍為 5.4~7.4，所以本計劃測得的吸著破傷風類毒素 pH 值處於合格範圍之內，故推定經過長時間的保存，原液 pH 值仍維持在適當條件之中。四批吸著破傷風類毒素原液 pH 值詳見表三。

表三、吸著破傷風類毒素分別儲放不同年限於 4℃其 pH 值。

批號	pH 值
Ta92-07	5.51
Ta92-08	5.47
Ta95-26	5.66
Ta96-27	5.58

(四) 吸著破傷風類毒素原液加速試驗

加速試驗是藉著使用較嚴苛的儲存條件當作正式安定性試驗的一部份，以加速藥品化學性之降解和物理性之變化的一種試驗設計。加速試驗的資料，亦可用於評估長期試驗之化學變化。且可評估於標示儲存條件之外(如：運銷時可能遭到短暫脫離標示之儲存條件)對安定性之影響。加速試驗的物理變化之研究結果，或僅作為安定性之參考。本試驗將 99 年度新製吸著破傷風類毒素放置於 25℃±2℃各 0、1、2、3 及 6 個月，在這些時間點分別進行力價試驗以測試儲放溫度是否會影響到疫苗的力價的改變。根據行政院衛生署細菌學免疫學製品許可證中規定吸著破傷風類毒素成品劑量為小於 20LF/mL，故實驗採取兩種劑量的破傷風類毒素原液進行免疫，分別為 5LF/mL、15LF/mL。

表四、吸著破傷風類毒素原液(Ta99-28)放置於 25℃±2℃第 0~6 月力價變化。

放置月數	本計劃測得力價 (5LF/mL)	本計劃測得力價 (15LF/mL)
0 month	大於 5 抗毒單位	大於 7 抗毒單位
1 month	大於 5 抗毒單位	大於 8 抗毒單位
2 month	大於 6 抗毒單位	大於 8 抗毒單位
3 month	大於 6 抗毒單位	大於 8 抗毒單位
6 month	大於 6 抗毒單位	大於 8 抗毒單位

註: limit of flocculation(LF)為絮狀沉澱反應測定破傷風類毒素的劑量單位，1LF 相當 1 個標準單位的破傷風抗毒素與某劑量類毒素混合後在試管內反應時最先觀察到絮狀反應的現象，該管類毒素劑量定義為 1LF。

討　論

目前破傷風疫苗經由品管檢驗相關測試，因監控疫苗及接種品質以維護良好之疫苗品質，以期能達到最好預防的效果。而製造疫苗原液之穩定性與製成疫苗成品的品質的優劣有直接的關係。故本研究藉由吸著破傷風類毒素原液存放時間與力價關係分析、原液存放時間與其 pH 值變化以及 99 年度新製吸著破傷風類毒素原液進行 25℃加速試驗這三方面來探討破傷風類毒素原液安定性。

將吸著破傷風類毒素原液儲放於 4℃的環境下，經過長時間的保存(最長至今約 7 年)，外觀並無重大變化，搖晃後仍然保持乳白色液狀且無凝結現象。力價試驗所測得的力價為每 mL 血清大於 2 個抗毒單位，由此得知原液仍具有足夠保護效用，藉此推斷破傷風類毒素原液經過長時間的保存，在外觀及力價方面並無明顯變質的現象。

原液 pH 值是否會隨存放時間而有顯著改變的試驗，藉由偵測原液 pH 值來推斷破傷風類毒素蛋白有無產生變性的情況，因大部份的蛋白質只能在其適當的環境中才能正常發揮其生物功能。當處在不適當的 pH 值條件下時，蛋白質會因其結構不穩定產生變性的情況。而疫苗能發揮功能，主要重點是在於其抗原特殊 3D 結構可

供辨認產生特定抗體。疫苗一旦遭遇變性現象時就會失去其特有的生物活性。本計劃測量五批原液的 pH 值，所測得數值為 5.4~5.7 之間，屬於中性偏酸的範圍。分析 pH 值數據並未隨著存放時間明顯上升或下降，故此得知原液的 pH 值不會因存放時間而有顯著變化，且中華藥典第六版規定明礬沉澱破傷風類毒素的成品合格範圍為 5.4~7.4，藉此推斷經過適當儲存條件下，雖然經過 7 年長時間保存，原液內的類毒素仍處於適合的 pH 值環境中。

99 年度新製吸著破傷風類毒素原液放置於 25℃進行加速試驗：破傷風原液儲存於非正常環境條件下，探討原液在環境變化下是否影響其力價，藉此來瞭解類毒素降解情形，以提供未來如製造過程中出現原液處在非正常環境條件下是否會影響破傷風類毒素原液力價參考資料。在完成 0、1、2、3、6 個月加速試驗後，根據藥品安定性試驗基準定義的明顯變化：效價比初期值減少 5%；或用生物或免疫試驗方法，效價不符合其規格。本計劃破傷風類毒素經過 0、1、2、3、6 個月放置於 25℃且濃度為 5LF 及 15LF 情況下，所測的的力價分別落於 5~6 抗毒單位及 7~8 抗毒單位，相對於標準 2 個抗毒單位超出許多，顯示本廠的產製破傷風原液具有一定效用及穩定性，即使長時間(6 個月)處在不適當的儲存條件下，破傷風類毒素原液依然具有一定的力價。

生物製劑的品質與製成該製劑的原液品質有絕對的關係，綜合本計劃試驗結果發現：破傷風類毒素原液品質極穩定，經過長達 7 年時間於 4℃環境保存仍保持有效的力價、原液 pH 值依然維持於穩定的範圍之內及 6 個月加速試驗得知原液放置於非正常環境條件下依然具有效力，因此推斷本廠所產製破傷風類毒素原液具有一定品質，有利於後續生物製劑產品製造品質並能符合 WHO 的相關規範。

參考文獻

1. Macrae, J., *Tetanus.* Br Med J, 1973. **1**(5855): p. 730-2.
2. Cook, T.M., R.T. Protheroe, and J.M. Handel, *Tetanus: a review of the literature.* Br J Anaesth, 2001. **87**(3): p. 477-87.
3. Lee, H.C., W.C. Ko, and Y.C. Chuang, *Tetanus of the elderly.* J Microbiol Immunol Infect, 2000. **33**(3): p. 191-6.
4. Yih, W.K., et al., *An assessment of the safety of adolescent and adult tetanus-diphtheria-acellular pertussis (Tdap) vaccine, using active surveillance for adverse events in the Vaccine Safety Datalink.* Vaccine, 2009. **27**(32): p. 4257-62.
5. Aristegui, J., et al., *Comparison of the reactogenicity and immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated polio (DTPa-HBV-IPV) vaccine, mixed with the Haemophilus influenzae type b (Hib) conjugate vaccine and administered as a single injection, with the DTPa-IPV/Hib and hepatitis B vaccines administered in two simultaneous injections to infants at 2, 4 and 6 months of age.* Vaccine, 2003. **21**(25-26): p. 3593-600.
6. Marshall, H., et al., *Primary and booster immunization with a diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B (DTPa-HBV) and Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine administered separately or together is safe and immunogenic.* Int J Infect Dis, 2010. **14**(1): p. e41-9.
7. Bohnert, S. and G. Schiavo, *Tetanus toxin is transported in a novel neuronal compartment characterized by a specialized pH regulation.* J Biol Chem, 2005. **280**(51): p. 42336-44.
8. Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products（Part I）PE 009-8
(Part I)6.23~6.33
9. WHO guideline on stability evaluation of vaccines
10. 藥品安定性試驗基準：生物技術/生物性藥品之安定性試驗
11. 中華藥典第六版
12. 美國藥典(USP)第三十三版