

計畫編號： DOH99-DC-2031

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

新型流感疫苗相關種庫、產程與疫苗效價之開發與檢測

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：江正榮

研究人員： 李國銘、莊佩珊、陳健銘、張靜如、楊尚樺、陳怡靜

執行期間：99 年 1 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)
英文摘要	(4)
前言	(5)
材料與方法	(8)
結果	(12)
討論與建議	(28)
參考文獻	(30)
期中進度報告審查意見回覆	(31)
期末報告審查意見回覆	(33)

中文摘要

本計畫共建立四株不同 H1N1 疫苗株(X-179A、NIBRG-121、NIBRG-121xp、CBER-RG2)種毒庫，並完成原型疫苗各 3 批（每批約 400 顆蛋）的量產，X-179A 及 NIBRG-121xp 兩株具有較高的病毒力價，易培養且能有穩定且較高的病毒產量。10-0.1 HA ug/dose 免疫小鼠後，以 X-179A 及 NIBRG-121xp 能產生較好的抑制血球凝集和病毒中和效價，對於其餘病毒株皆能產生 200-800 的中和效價。另外利用反轉錄基因法製造之三株台灣本土疫苗種籽株，不僅完成種庫製備且病毒維持穩定力價。另亦完成 4055-RG(4055-1)、0083-RG(PR8-0083)各 2 批小量試產，證實自製台灣本土 H1N1 疫苗種籽株可有效量產並順利產生高抗體效價。

關鍵字：新型 H1N1 流感原型疫苗、病毒庫、交叉免疫反應、

台灣本土流感疫苗種籽株

英文摘要

Four new H1N1 influenza vaccine master seed banks were established in this project, include X-179A 、 NIBRG-121 、 NIBRG-121xp 、 CBER-RG2. We also complete 3 batches of 400 eggs scale production for each strain respectively. X-179A and NIBRG-121xp these two strains have high viral titer and were easily to be propagated and stable, therefore, the two strains were easy to be scale-up.

After the mice were immunized with 10-0.1 HA ug per dose of X-179A and NIBRG-121xp prototype vaccines , the serum of mice can produce better HI titer and neutralization response, the rest prototype vaccines also can produce 200-800 neutralization titer.

Finally we have already established 3 master seed banks of Taiwan local influenza vaccine strain which produced by reverse genetics method and all strains can remain high viral titer and stable., We also complete 2 batches of 4055-RG(4055-1) and 0083-RG(PR8-0083) respectively, the results of production yield and neutralization response imply that these three local vaccine strains can be used to scale-up production

Key words: new H1N1 influenza vaccine strain, master seed bank,
cross neutralization response,
Taiwan local influenza vaccine strain

前言

疫苗發展現況

2005 年 11 月世界衛生組織所舉辦疫苗研發專家會議指出，近年來 H5N1 禽流感病毒的快速擴散，極有可能造成全球性的大流行。因流感病毒基因的快速變異，未來出現可在人類間快速傳播，並具有高致病力的病毒是可以預見的。

2009 年，H1N1 新型流感病毒在全球造成大流行，在世界各國都造成不容忽視的疫情，但根據世界衛生組織 2008 的報告指出，全球流感疫苗的最大產能，在 2007 時約為 27 億劑，但在 2010 年可提升至 62 億劑，但仍與全球人口總數 67 億人所需，有 5 億劑的差距。

目前流感疫苗的生產方式，仍是以雞胚胎蛋為主，雖然已有許多新型流感疫苗製程問世，但其產能仍不足以應付全球性流感大流行，並且各種流感疫苗株，在雞胚胎蛋中的產率也有很大差異。故世界各國均試著研發新一代流感疫苗產程，期望能加快流感疫苗的生產速度，並提升產率。

國內外疫苗種株使用情況

世界衛生組織經由凝血抑制試驗(haemagglutination inhibition tests, HI test)與 HA、NA 的基因比對，於 2009 年 5 月建議新型流感疫苗株為『A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus』【1】。隨後，於 2009 年 10 月宣布 12 株候選疫苗株，如下表【2】：

Parent virus	Candidate vaccine virus	Type of virus or reassortant	Developing institute	Available from	Available since
A/California/7/2009(H1N1)	Wild type virus		CDC, USA	CDC, USA; NIBSC, UK	May 09
	X-179A	Classical	New York Medical College, USA	CDC, USA; NIBSC, UK	27 May 09
	IVR-153		CSL, Australia	CSL, Australia; NIBSC, UK	4 June 09
	X-181		New York Medical College, USA	New York Medical College, USA	14 Sept 09
	X-181A				
	NIBRG-121	Reverse Genetics	NIBSC, UK	NIBSC, UK	27 May 09
	NIBRG-121xp				6 Aug 09
A/California/4/2009(H1N1)	Wild type virus		CDC, USA	CDC, USA; NIBSC, UK	May 09
	CBER-RG2	Reverse Genetics	CBER/FDA, USA	CDC, USA;	19 June 09
A/Texas/5/2009(H1N1)	Wild type virus		CDC, USA	CDC, USA; NIBSC, UK	May 09
	IDCDC-RG15	Reverse Genetics	CDC, USA	CDC, USA	27 May 09
	IDCDC-RG20	Reverse Genetics	CDC, USA	CDC, USA	21 July 09
A/England/195/2009(H1N1)	Wild type virus		NIBSC, UK	NIBSC, UK	May 09
	NIBRG-122	Reverse Genetics	NIBSC, UK	NIBSC, UK	21 July 09
A/Texas/5/2009(H1N1) and A/New York/18/2009(H1N1)	IDCDC-RG18	Reverse Genetics	CDC, USA	CDC, USA	21 July 09
A/New York/18/2009(H1N1)	IDCDC-RG22	Reverse Genetics	CDC, USA	CDC, USA	21 July 09

已通過美國 FDA 核准上市的四項 H1N1 疫苗注射劑之國際大廠 CSL Limited、ID Biomedical Corporation of Quebec (GSK)、Novartis Vaccines and Diagnostics Limited(諾華)及 Sanofi Pasteur Inc. (賽諾菲巴斯德)與 MedImmune LLC 所生產之減毒鼻噴疫苗【3】，與歐盟核准之三項疫苗注射劑 Focetria®、Pandemrix®與 Celvapan®【4】和我國施打之諾華疫苗 Focetria®與國光疫苗安定伏裂解型流感疫苗(A/H1N1)【5】其所選用之疫苗株如下表：

產品或製造廠		選用之疫苗株
FDA 核准	CSL	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus
	GSK	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus
	Novartis	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus
	Sanofi Pasteur	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus
	MedImmune	A/California/7/2009 (H1N1)v
歐盟核准	Novartis Focetria®	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus (X-181)
	Novartis Celtura®	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus (X-179A)
	GSK Pandemrix®	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus (X-179A)
	Baxter Celvapan®	A/California/7/2009 (H1N1)v
我國	Focetria®	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus (X-181)
	安定伏	A/California/7/2009 (H1N1)v-like virus (X-179A)

新型流感病毒株種庫建立

2009 年因 H1N1 新流感病毒之崛起，導致人民恐慌，而發展並研究出相對應之疫苗並建立疫苗種庫無庸置疑是必須執行的項目，本局委託台大醫學院黃立民教授，於 95-97 年所進行科技發展研究計畫發現，世界衛生組織所建議的疫苗株，與台灣當年度所流行的病毒株並不吻合，有時流行於全世界的病毒株會早一步在台灣出現。98 年在台灣所流行的季節性流感病毒株為 A/Taiwan/1899/2009，而世界衛生組織所建議的標準疫苗株為 A/Brisbane/59/2007，在 98 年同樣由黃立民教授所進行的科技發展研究計畫發現，63 位幼兒在接種疫苗後，對於 98 年在台灣所流行的病毒株 A/Taiwan/1899/2009，只有 21% 的血清保護率，這個現象顯示，世界衛生組織所公佈的疫苗株，並不全然適合台灣。希望能建立我國流感疫苗株病毒庫相關技術平台與運作機制，一旦全球流感大流行，希望能從病毒庫中挑選適當的疫苗株，提供給我國緊急流感疫苗生產線製造所需之疫苗。

另本局委託長庚大學施信如教授建立以反轉錄基因法製造流感疫苗種籽株的技術平台，為使我國未來緊急流感疫苗生產線能進行更順暢，本中心將找出已建立了三株台灣本土疫苗種籽株，4055-RG(4055-1)、0083-RG(PR8-0083)、641-RG(PR8-641)之最適培養條件，並小量試產計算其產率，以評估以反轉錄基因法製作台灣本土疫苗株量產之可行性。

新流感疫苗株種庫的建立方式與一般 cGMP 級藥廠細胞病毒疫苗種庫的建立一樣，皆分成 master virus seed bank 及 working seed bank，操作則是在 P2+ 實驗室中，而使用的受精雞蛋以 SPF 為主。未來我們新流感防治目標是自己能生產台灣新流感病毒株之疫苗，因此疾病管制局背負疫苗株篩選與決定之重要任務，如果台灣未來的工廠無法像歐美大疫苗廠有能力篩選出「生產疫苗株」，我

們則無法向 WHO 一樣只宣布「類似疫苗株」的字眼，必須提供正確的疫苗株給予廠商。目前日本就是由厚生部宣佈當年生產疫苗株，然後由日本感染症研究所 (NIID) 統一提供給日本四家廠商。所以希望本中心初步建立之流感疫苗株種庫能為未來國家級的新流感疫苗株種庫鋪路並奠定基礎，並和世界衛生政策接軌，同時具備篩選最適於生產疫苗株的能力，及發展新型疫苗製程，以因應流感大流行。

流行於人類之 H1N1 病毒，由於抗原與基因不斷的演化，目前世界衛生組織之合作實驗室與參考實驗室積極篩選並發展出各種不同重組 H1N1 型疫苗株，俾利新型流感疫苗的研發，本局在已收到各種不同疫苗株之後，應盡速建立種毒庫，並期待找到各種疫苗株最適培養條件，及抗原性最佳之種毒。將來有機會提供給國內疫苗廠，用以快速生產有效對抗新型流感之疫苗。

細胞培養與病毒產程

細胞培養製程是未來疫苗發展的趨勢，具有製備耗時短、適用病毒廣泛、製備時程負有彈性等特性，為了因應全球流感大流行，並能於短期內達到供應大量之流感疫苗，細胞培養方式不失唯一有效的方式。目前 GSK, Novartis 以及 MedImmune 等國際大廠，均已有細胞培養製程疫苗產品在市面銷售，所使用的細胞株包括 MDCK 及 Vero 兩種，但其產能尚不足以提供全球流感疫苗之需求。全球流感疫苗主要產能，雖然仍然著落在受精雞蛋產程，但新一代流感疫苗製程的發展，朝向細胞培養已經是全球共同的趨勢。

目前由細胞培養製程所生產新流感疫苗，包括(1)諾華藥廠(NOVARTIS)所生產 Celtura®.H1N1 新型流感疫苗，利用 MDCK 細胞製造裂解病毒，次單位疫苗，已於 2009 年 11 月在德國及瑞士進行施打。(2) MedImmune 所生產的滅毒鼻噴疫苗，也已在美國上市，並進行施打。

目前 MDCK 細胞被考量應用於不活化流感疫苗生產之可行性，主要是基於 1. 流感病毒在細胞中之生長情況較佳，較容易應用於疫苗生產；2. 相較於雞胚胎蛋製程，細胞培養較易快速達到產能提升的目標；3. 可製作細胞種庫，並徹底進行細胞特性分析；4. 可馴化至無血清培養，降低血清來源之考量等特性【6】。不過「致癌性細胞介質所潛在的風險性」仍然使藥政法規單位與相關專家學者無法感到安心。

疫苗效價檢測

流行性感冒病毒的二個外套蛋白質 Hemagglutinin (HA) 及 Neuraminidase (NA) 是主要引起宿主免疫反應的抗原，因此也愈針對此兩病毒抗原蛋白發展一免疫分析平台能快速檢測不同病毒株的感染情形。目前流感疫苗檢驗的技術包括有血球凝集抑制法 (HI)、酵素免疫反應法 (enzyme immunoassay) 以及病毒中和反應 (virus neutralization) 測試法等。其中目前最廣泛使用的測定法為微量抗體中和反應 (microneutralization assay) 【7】 【8】，其方法與病毒中和反應大同小異，利用細胞培養系統來偵測尚未被抗體所不活化的抗原量，藉以得知受測血清中相對的抗體量，是惟一可定量的方法。另與病毒中和反應較不一樣的是以 96 孔細胞培養盤替代之前利用試管進行反應的方法，因此無論在所需之細胞數以及血清量都較往前的方法少很多，檢驗的速度也比較快。未進一步與國際接軌，目前本中心將初步建立該方式並與先前所建立之病毒中和反應相互比較。

材料與方法

I. Viral vaccine stains:

本計畫總共要使用 7 株不同之流感疫苗株，其中四株為向世界衛生組織合作實驗室取得之不同 H1N1 新型流感候選疫苗株(X-179A、NIBRG-121、NIBRG-121xp、CBER-RG2)，另外三株乃本局委託長庚大學施信如教授利用反轉錄基因法製造之台灣本土疫苗種籽株，4055-RG(4055-1)、0083-RG(PR8-0083)、641-RG(PR8-641)。

II. Preparation of virus seed banks:

購買農委會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所繁殖的 7 日齡胚胎蛋，放於恆溫恆濕的孵蛋器 4 日後才接種病毒。繁殖病毒的溫度 H5N1 約為 33-36°C 而季節性流感病毒則為 31-33°C，可於 48-72 小時收取尿囊液，經 0.2 μ m 無菌過濾後，分裝在冷凍小管，存放於零下 80°C 冰箱。另外製備凍結乾燥的病毒，作為長期保存的種源。所謂 Master Seed Bank 是指取得疫苗株之後，將病毒增殖放大至 100 vial 以上，然後再從 Master Seed Bank 取出 1vial 增殖放大當成 Working Seed Bank，量產所需之病毒皆取自 Working Seed Bank。

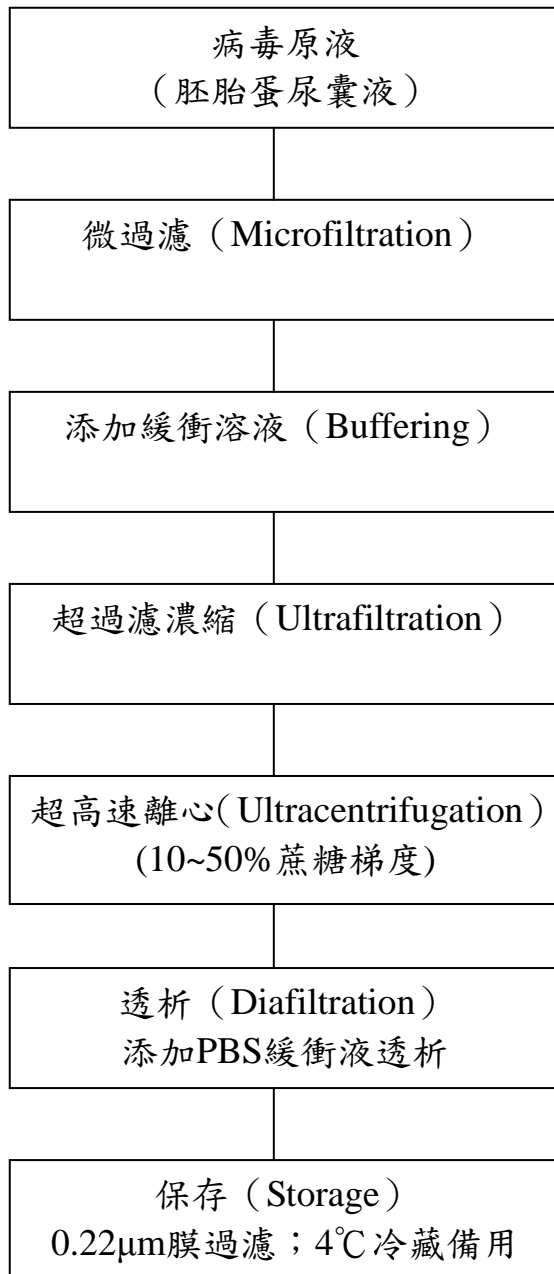
III. Harvest of allantoic fluid of embryonated eggs after virus amplification Purification of Viruses 【6,9】

購買一般蛋場繁殖的 8 日齡胚胎蛋，放於恆溫恆濕的孵蛋器 3 日後才接種病毒。取出病毒庫的冷凍小管溶化後，以含蛋白胨的 PBS (pH=7.2) 稀釋 1000 倍，用 1 mL 無菌針筒吸取適當稀釋之病毒液，並在每一顆雞胚胎蛋打入 0.1 mL 病毒液，每接種十顆蛋需更換針筒。用白膠將接種小孔封住，並記錄接種數量。接種後 24 小時及收穫前需以照蛋器觀察每顆雞胚胎蛋，將沒有血管的胚胎蛋淘汰，不予收穫。將等待收穫的胚胎蛋放入 4°C 至少 4 小時，讓血管收縮，避免收穫時紅血球混入尿囊液。每週接種及收穫胚胎蛋 200 顆，將兩週收穫的尿囊液混成 1 個批量，進行純化步驟。

IV. Purification of Viruses 【9,10】

將經胚胎蛋培養後含病毒之尿囊液，以 0.65+0.45 μ m cartridge filter 過濾後再用 0.22 μ m filter 過濾一次，接著將 1M Sodium Citrate/0.5 M NaCl buffer 與尿囊液以固定比例，將 buffer 加入尿囊液中混合。將此稀釋之尿囊液，以超過濾濃縮系統 (Labscale™ TFF System) 濃縮，減少體積以利後續超高速離心之進行。當 10~50% 蔗糖梯度注入完成後，將濃縮病毒液依 10 c.c./min 流速注入超高速離心轉子中，設定溫度為 4°C、離心時間 2.5hr 進行超高速離心。離心後，分割收集含有病毒的蔗糖溶液，並分別測其糖度及血球凝集試驗(Hemagglutinin test)。取 HA 效價高的分割管，以 4 倍 PBS 緩衝液稀釋後進行連續透析濃縮，最後的透析液即為最終純化產品。

圖一、利用雞胚胎蛋生產流感疫苗製程



V. Chemical inactivation of purified virus

1. 先以 0.9% NaCl 溶液將福馬林溶液稀釋成 5%，再以 0.22µm 的過濾膜過濾後，置於 4°C 中保存。以 5% 的福馬林滴定加入，使福馬林終濃度為 0.01%，置於 4°C 的震盪器 (orbital shaker) 中震盪 (100 rpm)，進行病毒不活化反應。每隔 7 天取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID₅₀) 以觀察病毒力價的變化，直至無病毒存活為止。

2. 先以 0.9% NaCl 溶液將福馬林溶液稀釋成 5%，再以 0.22 μ m 的過濾膜過濾後，置於 4°C 中保存。以 5% 的福馬林滴加入，使福馬林終濃度為 0.01%，置於 37°C 滾輪培養箱 2~3 天，進行病毒不活化反應。後隔 7 天取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID₅₀) 以觀察病毒力價的變化，直至無病毒存活為止。

VI. Animal Test

1. 將新流感疫苗株依序十倍稀釋成不同濃度 (20 μ g/ml、2 μ g/ml、0.2 μ g/ml)，放入 15 cc 的離心管置於 4°C 冰箱保存。
2. 實驗以 4~5 週齡之 BALB/c 小鼠進行免疫，每濃度各以 15 隻為一組共有 3 組實驗組，另以 NaCl 及 Blank 當作對照組。
3. 免疫前需先以 75% 酒精切棉擦拭小鼠腹部消毒，每隻小鼠以腹腔免疫 0.5 cc 之病毒液。
4. 第一次免疫後隔兩週重複步驟 3 進行第二次免疫。
5. 第二次免疫後隔兩週進行小鼠心臟採血，將所採得之血液集中於微量離心管內 (一隻小鼠/eppendorf)。
6. 將採得之小鼠血放入 4°C 冰箱中存放 30 分鐘後，以離心機離心 (3,000 rpm、15 分鐘)，取血清並將同一試驗組之血清混合，以 56°C 水浴進行血清去補體作用 (30 分鐘)。
7. 將血清分裝並置於 -20°C 中保存備用。

VII. Neutralization test

1. 血清稀釋：由 10 倍至 1280 倍做兩倍系列稀釋。
2. 病毒稀釋：取出待測病毒株，以 DMEM+tpck-trypsin (2 μ g/mL) 將病毒稀釋至 TCID₅₀/100 μ 為 200。
3. 病毒血清混合：將血清與病毒做 1:1 稀釋，混合均勻，在 34°C 反應 2 小時進行病毒與血清中和作用。
4. 將 96 孔 MDCK 細胞培養盤，倒去培養基，以每孔 100 μ L PBS 清洗兩次再加 DMEM+tpck-trypsin (2 μ g/mL) 100 μ L，34°C 備用，待反應兩小時後，將 96 孔 MDCK 細胞培養盤，倒去培養基，加入中和後的病毒與血清 100 μ L/well，六天後觀察 CPE。

VIII. Hemagglutination test(HA)

加入 0.5% 火雞血和 2 倍連續稀釋流感病毒液混合，室溫靜置 40min。判讀時先將 V 型盤立起約 80-90 度，約在 1.5 分鐘內完成判讀。等紅血球流動出現淚滴狀，並於盤底見一橫線(倒 T 字型)，即視為非凝集現象，並算出 HA titer。

IX. Hemagglutination inhibition test(HI) 【11】

免疫後經 RDE 處理之血清以 2 倍連續稀釋，與稀釋為 4 個血球凝集單位/25 μ L 之流感病毒液混合做 1:1 稀釋，加入 0.5% 火雞血混合後室溫靜置 40min。判讀時先將 V 型盤立起約 80-90 度，約在 1.5 分鐘內完

成判讀。等紅血球流動出現淚滴狀，並於盤底見一橫線(倒 T 字型)，即視為非凝集現象，並算出 HI titer。

X. TCID₅₀(50% Tissue Culture Infection Dose)

1. 以 100 μ L/per well 接種細胞液(2.5*10⁵ cells/ mL)至 96 孔盤中，放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱培養 overnight。
2. 將 96 孔盤裡的 median 倒掉，以 PBS 100 μ L 清洗 2 次後，加入 DMEM+tpck-trypsin(2 μ g/mL)100 μ L/per well，放入 34 $^{\circ}$ C 培養箱。
3. 在 48well 中加入 DMEM+tpck-trypsin(2 μ g/mL) 900 μ L/per well 及待測病毒液至第一個 well 進行 10 倍系列稀釋。
4. 從 34 $^{\circ}$ C 培養箱拿出 96well 培養盤，將 median 倒掉，每 well 加入 100 μ L 稀釋後之 sample，置入 34 $^{\circ}$ C 培養箱感染細胞。培養六天後觀察 CPE。

XI. SRD analytic method 【12,13】

1. 以 1 mL DW 將 standard antigen 回溶
2. 稍微搖晃，約 5 mins 使其完全溶解
3. 分別加 50 μ L 10 % w/v Zwittergent 3-14 於 450 μ L standard antigen 及待測 sample 中 (Zwittergent 3-14 終濃度為 1 % w/v)，於室溫中反應 30 mins，用以確保病毒不活化完全
4. 檢品與標準品分別做下列稀釋倍數 1X、0.75X、0.5X、0.25X
5. 依 random scheme 依序加入 standard antigen 及測試 sample 於 well 中 (20 μ L/well)，需垂直且緩慢加入
6. 於室溫中反應 10mins 後，置於 moist box 中
7. 約 620g 之重物壓住，需保持水平
8. 室溫中放置 30 mins 後，將 3 張長方形濾紙移走 (從角落快速拿走，圓形濾紙不能移開，否則形成的環會變形)，置於 36 $^{\circ}$ C 培養箱 (with fans) 中乾燥 2~3 hours
9. 以 0.3%commassie blue 染色 15~20 mins，用水將多餘之染劑洗掉，再退染 5~10 mins，再用水將多餘之退染劑洗掉
10. 移至 36 $^{\circ}$ C 培養箱中讓水乾掉 (約 30~60 mins)
11. 測量所形成環的直徑，以 BIOASSAY ASSIST 計算測試 sample 之 HA 含量

XII. Protein contain determination

利用蛋白質與銅離子反應，生成蛋白質與銅複合物，再與 Folin 試劑作用產生藍色反應而測定蛋白質含量。取 Sample 及蛋白質標準曲線 NO.0 ~NO.5 檢品各 1 mL，各加 10% TCA 1 mL，混和均勻，1500g 離心 20 min 後取上清液 1.5mL 丟棄，各加 5% TCA 2 mL，混和均勻，1500g 離心 20 min 後取上清液 2mL 丟棄，各加硫酸銅溶液稀釋液 2.5mL，混和均勻，各加蒸餾水 2.5mL，混和後靜置十分鐘，各加 Folin 試液稀釋液 0.5mL，混和均勻後置暗處室溫 30min。各取 1 mL 檢品以分光光度計波長 750nm 分別測定其吸光度，對照蛋白質標準曲線，定其濃度。

結果

一、建立 4 種新型 H1N1 流感疫苗株種庫：

本計畫上半年度，已建立 X179A，NIBRG-121，NIBRG-121xp 和 CBER-RG2 四株 H1N1 新型流感病毒種庫，其最佳培養條件如(表一)。X179A 的病毒力價最高易培養，誠如當初 WHO 建議各大藥廠使用於大量生產之疫苗株。CBER-RG2 及 NIBRG-121 這兩株病毒力價無法達到如 X179A 一樣的力價，尤其 CBER-RG2 必須在較低溫培養。NIBRG-121xp 是 NIBRG-121 的改良株，的確如預期病毒力價達到 4 倍上升。

表一 H1N1 新型流感疫苗株病毒種庫最佳培養條件

種株	X-179A	NIBRG-121	CBER-RG2	NIBRG-121xp
培養溫度(°C)	34	34	32	34
培養時間(hrs)	48	48	72	72
病毒濃度	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}
HA	1024	128	128	512
Master bank	第 1 代	第 1 代	第 2 代	第 1 代
Working bank	第 2 代	第 2 代	第 3 代	第 2 代

二、建立 3 種台灣本土季節流感疫苗株種庫

本計畫成功建立三株本土季節流感疫苗株病毒種庫。本局曾委託長庚大學施信如教授建立以反轉錄基因法製造流感疫苗種籽株之技術平台，且製備了三株台灣本土疫苗種籽株，4055-RG(4055-1)、0083-RG(PR8-0083)、641-RG(PR8-641)，經實驗取得三株本土疫苗株最佳培養條件如(表二)，相較於 H1N1 新型流感疫苗株，三株本土季節流感疫苗株病毒力價均能達到 512 以上，其中 0083-RG 在取得最佳培養條件實驗過程中，病毒力價可達到 2048。且三株本土季節流感疫苗株皆繼代超過 3 代，並能穩定維持病毒力價。

表二 本土季節流感疫苗株病毒種庫最佳培養條件

種株	4055-RG SPF1	0083-RG SPF2	641-RG SPF1
培養溫度(°C)	32	34	34
培養時間(hrs)	72	72	72
病毒濃度	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
HA	512	1024	512
Master bank	第 2 代	第 2 代	第 2 代
Working bank	第 3 代	第 3 代	第 3 代

三、新型 H1N1 原型疫苗相關特性

1. Harvest of allantoic fluid of embryonated eggs after virus amplification

本計畫小量試產 4 株不同 H1N1 疫苗株之原型疫苗各 3 批(每批約 400 顆蛋)，實驗結果顯示，X179A 和 NIBRG-121xp 兩株疫苗株，種蛋後收穫尿囊液的病毒力價，均可達到和種毒庫相同力價(表三、四)，但 CBER-RG2 和 NIBRG-121 兩株疫苗株，種蛋後收穫尿囊液的病毒力價，均有一或二批病毒力價僅有 32，但因其本身種毒庫病毒力價僅有 128 (表五、六)，綜合以上實驗結果，X179A 和 NIBRG-121xp 兩株疫苗株，有著較易培養出高病毒產量的特性，是較好的生產疫苗株。

表三、雞胚胎蛋接種 X-179A 疫苗株連續三批病毒力價與體積比較

批號	X-179A-09 Flu 01	X-179A-09 Flu 02	X-179A-09 Flu 03
收蛋顆數	365	352	377
HA	512	512	512
volume (ml)	4025	4200	4225
平均產量 (ml)	11.03	11.93	11.21
TCID ₅₀	6.6	6.6	6.5

表四、雞胚胎蛋接種 NIBRG-121 疫苗株連續三批病毒力價與體積比較

批號	RG121-09 Flu 01	RG121-09 Flu 02	RG121-09 Flu 03
收蛋顆數	361	364	379
HA	128	128	32
volume (ml)	4000	4150	4200
平均產量 (ml)	11.08	11.40	11.08
TCID ₅₀	5.36	5.14	4.25

表五、雞胚胎蛋接種 CBER-RG2 疫苗株連續三批病毒力價與體積比較

批號	CBER-RG2-10 Flu 01	CBER-RG2-10 Flu 02	CBER-RG2-10 Flu 03
收蛋顆數	356	363	371
HA	128	128	32
volume (ml)	3300	3300	3800
平均產量 (ml)	9.27	9.09	10.24
TCID ₅₀	5	4.75	5.25

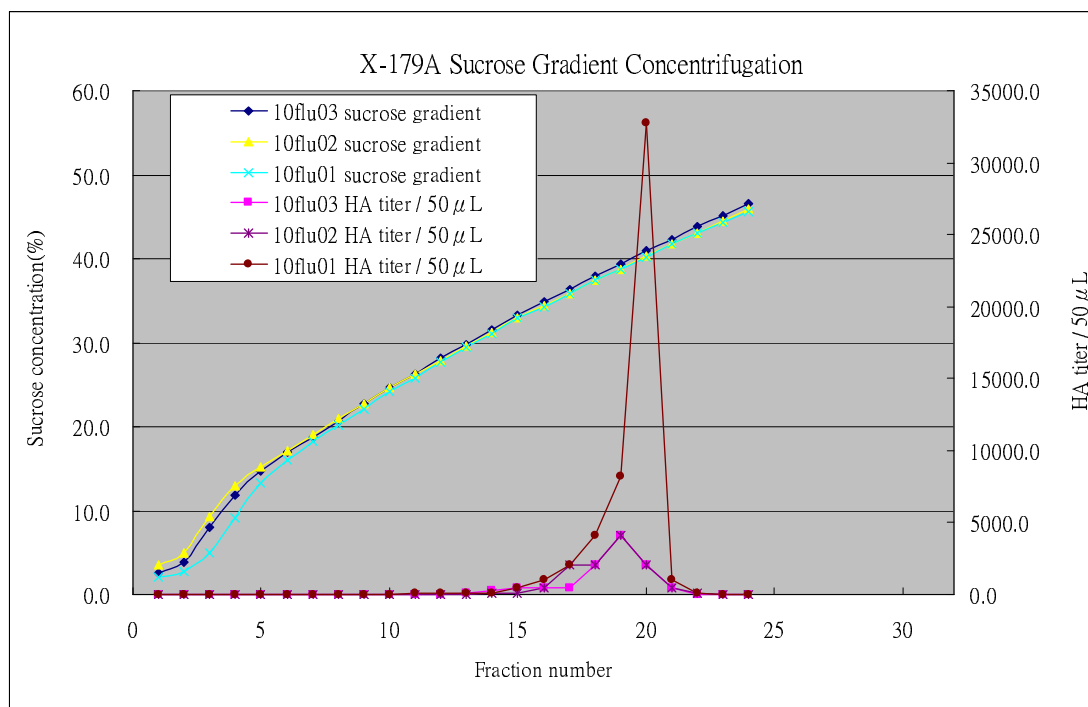
表六、雞胚胎蛋接種 NIBRG-121xp 疫苗株連續三批病毒力價與體積比較

批號	RG121xp-10 Flu 01	RG121xp-10 Flu 02	RG121xp-10 Flu 03
收蛋顆數	352	364	371
HA	512	256	256
volume (ml)	4400	4100	4150
平均產量 (ml)	12.50	11.26	11.19
TCID ₅₀	5.66	5.6	6.13

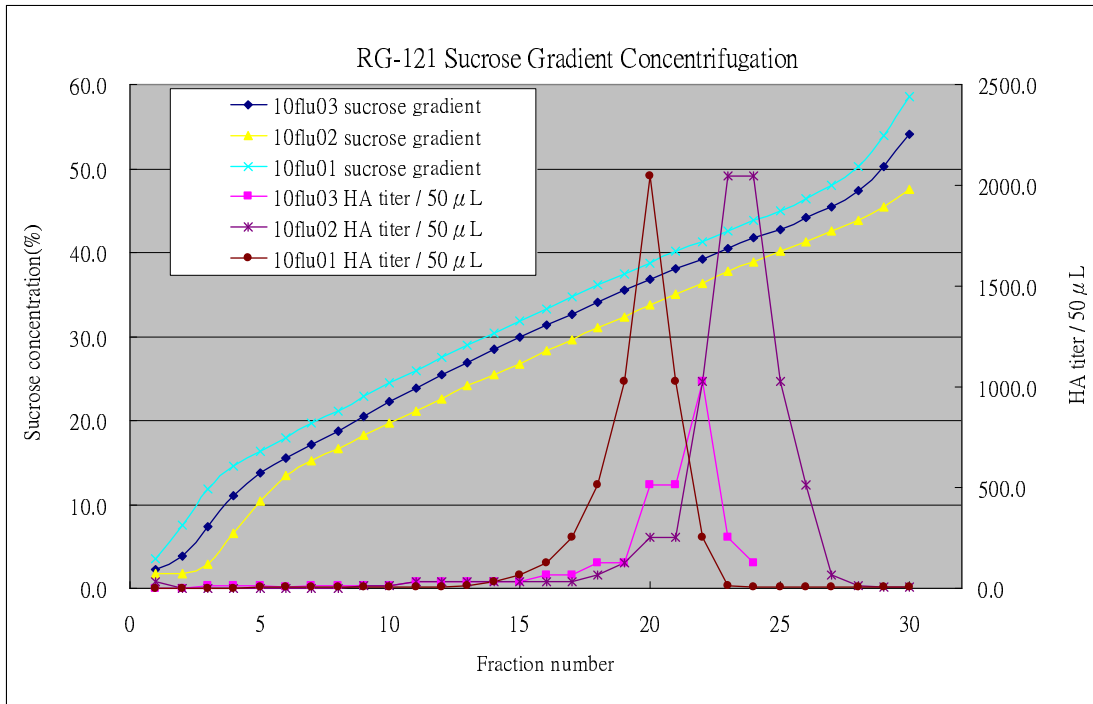
2. Viruses purification

疫苗株 X179A 三批量產是以 Beckman Coulter 超高速離心機搭配 Ti-15 離心轉子（轉子容量 1400ml），進行蔗糖梯度離心純化病毒（圖一），其餘 5 株疫苗株是以 Hitachi 超高速離心機搭配 P35ZT 離心轉子（轉子容量 1690ml）進行純化，故分割所收穫的樣品數及總體積有差異，但病毒均會在蔗糖濃度 38-41% 間被分離（圖二-七）。進行疫苗株 NIBRG-121 第一批病毒分離時，將 50% 蔗糖流速加快，故使得蔗糖梯度上升較快，第二批和第三批由數據得知，並不影響病毒分離的效果，病毒仍然會在蔗糖濃度 38-41% 間，有最高濃度（圖三）。進行疫苗株 0083RG 第二批病毒分離時，在蔗糖梯度即將建立完成階段，發生短暫供電問題，因超高速離心機有不斷電系統保護，並未停止運轉。但用於注入蔗糖的兩台蠕動幫浦，並未連接不斷電系統，故造成蔗糖梯度不穩定的情形，使得分割收集樣品收集範圍變廣且延後，但仍在容許範圍之內，且由檢驗數據得知，回收率並未受到影響（圖六）。

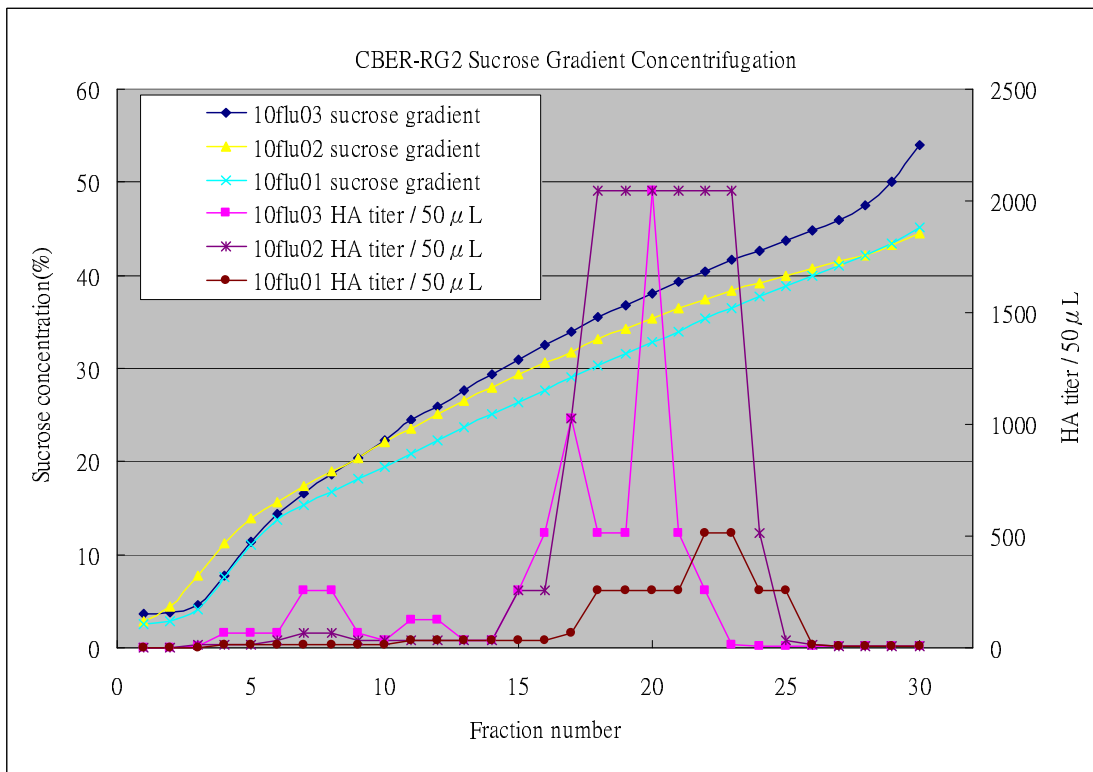
(1) X-179A 純化結果 (圖二)



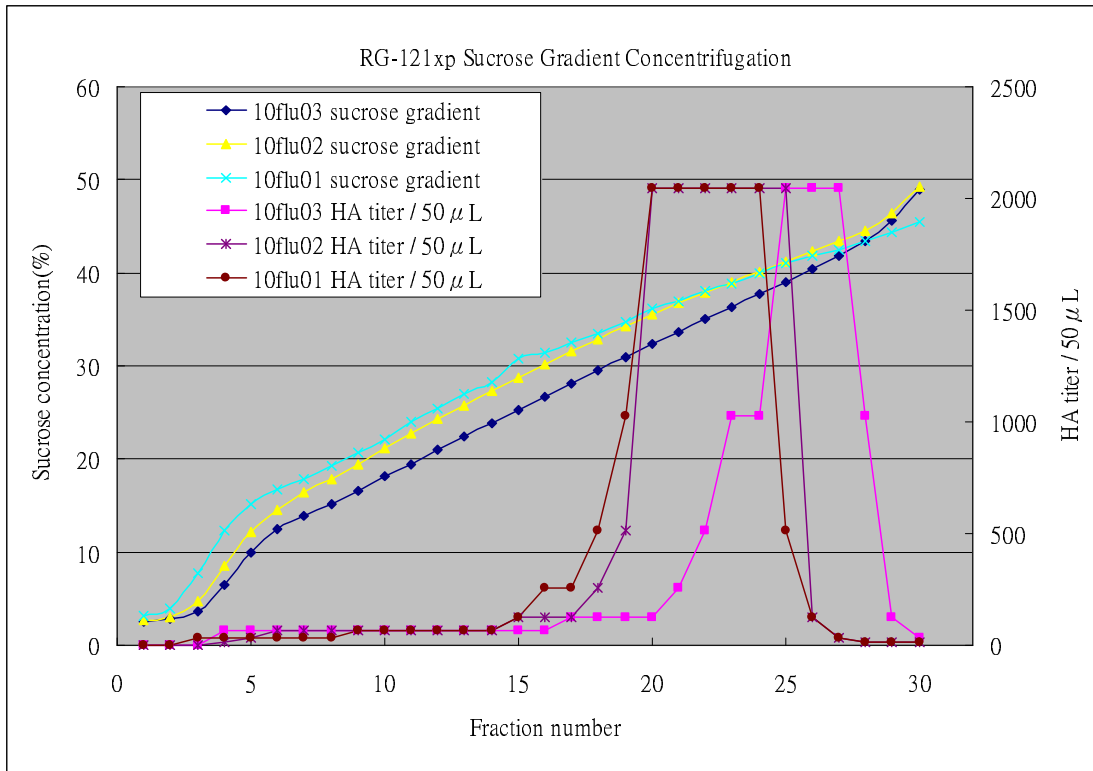
(2) NIBRG-121 純化結果 (圖三)



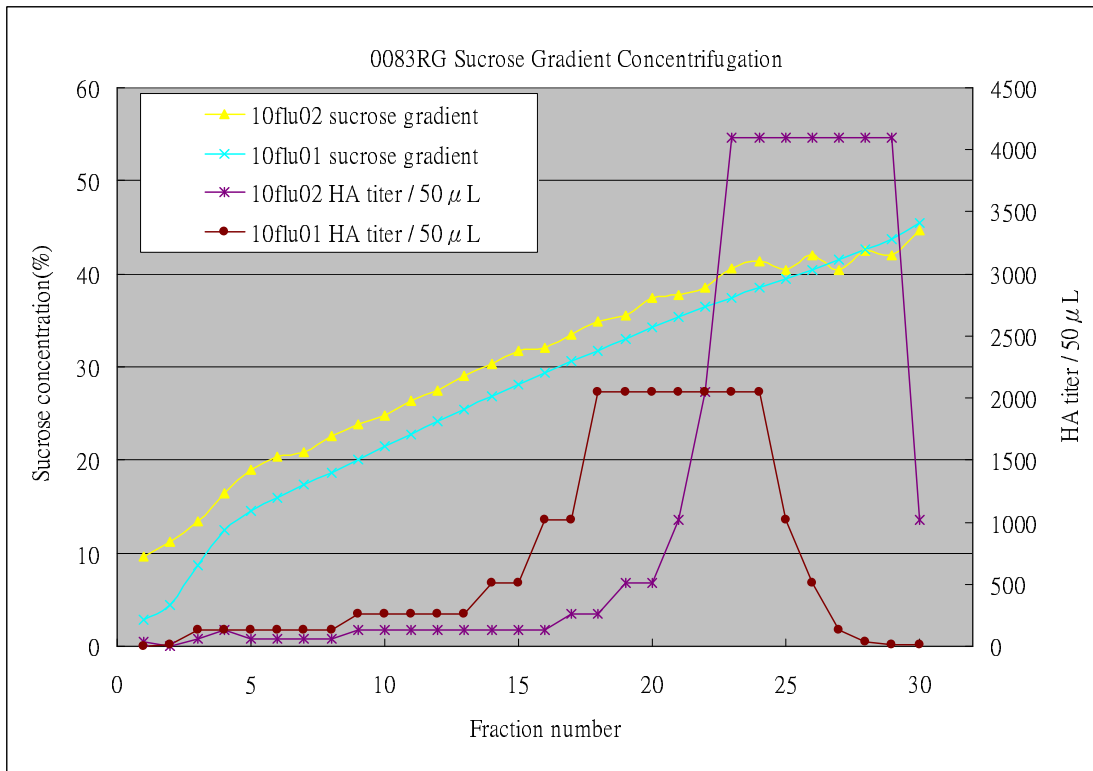
(3) CBER-RG2 純化結果 (圖四)



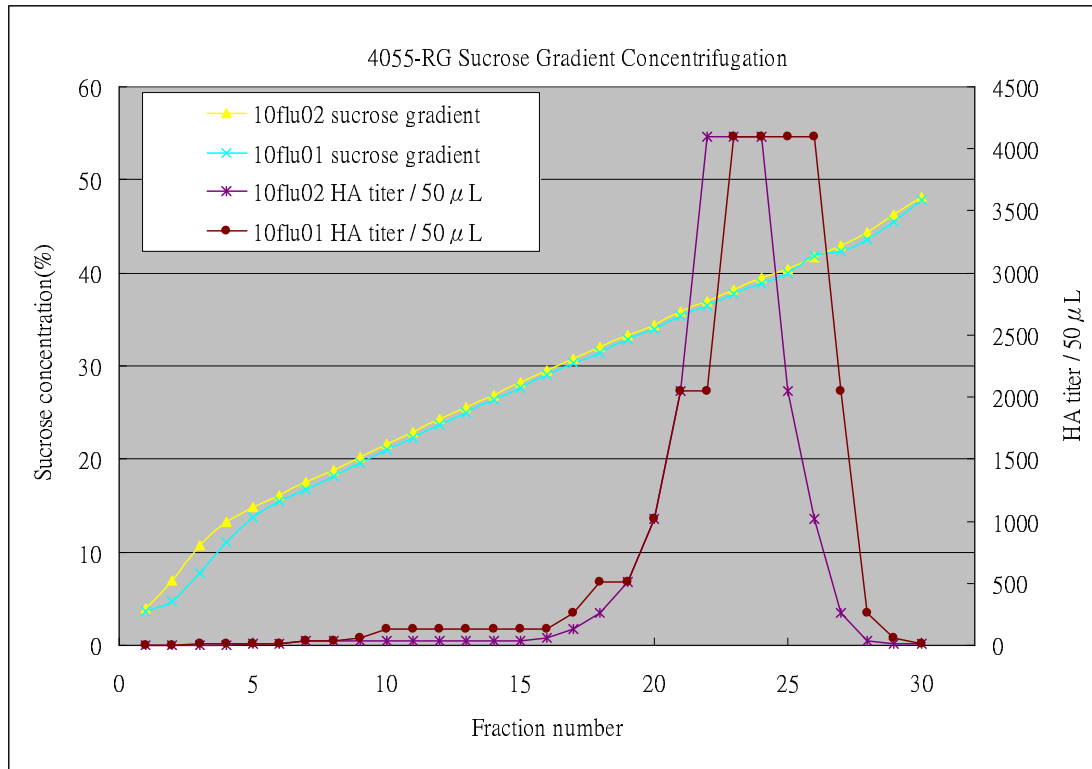
(4) NIBRG-121xp 純化結果 (圖五)



(5) 本土株 0083-RG 純化結果 (圖六)



(6) 本土株 4055-RG 純化結果 (圖七)



3. 比較分析 X179A、NIBRG-121、CBER-RG2、NIBRG-121xp 四株疫苗株小量產結果

疫苗株 X179A 三批均以先前建立之 400 顆蛋產程及設備生產製備，結果發現在最後透析階段，回收率皆低(表七)，產程有改善的空間與必要性，因此採用「自動化膜式超濾濃縮儀」進行透析。和舊式產程相較，此儀器為連續式透析，即是將 PBS buffer 直接連接透析儀的樣品槽，當樣品進行透析，體積減少，PBS 就會直接補進樣品槽，使樣品體積維持一定量，直到樣品中的蔗糖完全被置換成 PBS。自動化膜式超濾濃縮儀，和舊有 TFF 系統相較，可維持固定穿膜壓力，且更改進樣壓力至 10psi，使系統循環流速也相對提高，減少蛋白質及病毒顆粒沉積在濾膜表面。疫苗株 NIBRG-121 三批量產，NIBRG-121 01 採用舊有 TFF 系統而 NIBRG-121 02 和 03 則採自動化膜式超濾濃縮儀，結果發現最後透析步驟之回收率增高許多(表八)。CBER-RG2 三批量產的結果亦再度證實「自動化膜式超濾濃縮儀」的確能提升產程回收率，並增加其實用性(表九)。NIBRG-121xp 三批量產結果回收率在數據上似乎並不理想(表十)，因 HA TEST 實驗上主觀誤差較大，在以 SRD 定量 HA 蛋白後，並計算每顆蛋所能生產劑量，其結果顯示 NIBRG-121xp 三批小量試看均能達到 1-1.4 劑/蛋的產率(表十三)，符合目前所能認可的產率標準。但有關產程仍有改善的空間，另外如何找到計算回收率的指標也是我們努力的目標。

(1) X-179A 純化結果 (表七)

純化結果比較

Step	Batch number	Volumn (mL)	Protein conc. (µg/mL)	HA titer	Log TCID50/mL	Total Protein (mg)	Recovery rate (%)
Microfiltration	09 Flu01	3840	1245.683	512	6.6	4783.42	95.4
	09 Flu02	4200	868.919	512	6.6	3301.89	99.41
	09 Flu03	3800	2277.882	512	6.5	9567.1	90.48
Ultrafiltration	09 Flu01	175	2184.347	8192	8.36	327.65	59.63
	09 Flu02	155	2713.035	4096	8.14	420.52	29.53
	09 Flu03	150	3870.52	16384	8.25	677.34	132.54
Ultracentrifugation	09 Flu01	200	67.011	2048	7.14	13.4	19.88
	09 Flu02	200	45.345	2048	7.2	9.069	19.05
	09 Flu03	150	69.25	4096	7	10.39	28.4
Dialysis	09 Flu01	45	191.979	256	4.31	8.64	0.56
	09 Flu02	51	147.411	4096	<1.5	7.52	9.71
	09 Flu03	45	143.9	4096	7.75	6.48	8.521

(2) NIBRG-121 純化結果 (表八)

純化結果比較

Step	Batch number	Volumn (mL)	Protein conc. (µg/mL)	HA titer	Log TCID50/mL	Total Protein (mg)	Recovery rate (%)
Microfiltration	09 Flu01	3900	1409.536	256	5.36	5497.19	97.5
	09 Flu02	4050	560.544	128	5.14	2270.2	97.59
	09 Flu03	4000	2231.777	128	4.25	8927.11	95.24
Ultrafiltration	09 Flu01	150	3458.224	4096	6.7	518.73	60
	09 Flu02	175	857.128	4096	7.75	150	134.94
	09 Flu03	125	4972.359	4096	5	621.54	95.24
Ultracentrifugation	09 Flu01	200	13.438	256	3.6	2.69	20
	09 Flu02	250	34.751	2048	5.6	8.69	12.05
	09 Flu03	200	35.878	1024	5.6	7.18	38.1
Dialysis	09 Flu01	32	96.735	2048	4.5	3.1	6.4
	09 Flu02	25	393.172	16384	6.75	9.83	77.11
	09 Flu03	40	90.176	65536	4.6	3.61	487.62

(3) CBER-RG2 純化結果 (表九)

純化結果比較

Step	Batch number	Volumn (mL)	Protein conc. (µg/mL)	HA titer	Log TCID50/mL	Total Protein (mg)	Recovery rate (%)
Microfiltration	10 Flu 01	3150	1564.031	64	5	4926.7	47.73
	10 Flu02	3300	1585.417	128	4.75	5231.88	100
	10 Flu03	3800	1925.238	64	5.25	7315.9	100
Ultrafiltration	10 Flu 01	175	3420.194	1024	5.5	598.53	42.423
	10 Flu02	125	5252.264	4096	4	656.53	121.21
	10 Flu03	200	6070.466	2048	6.36	1214.09	168.42
Ultracentrifugation	10 Flu 01	400	-3.308	2048	6.84	-1.32	24.243
	10 Flu02	500	-5.384	4096	4.6	-2.69	30.3
	10 Flu03	300	3.48	4096	6.5	1.04	31.58
Dialysis	10 Flu 01	42	29.725	256	5.66	1.25	20.37
	10 Flu02	37.5	35.342	256	4.75	1.33	4.55
	10 Flu03	38	69.851	256	5.25	2.65	64

(4) NIBRG-121xp 純化結果 (表十)

純化結果比較

Step	Batch number	Volumn (mL)	Protein conc. (µg/mL)	HA titer	Log TCID50/mL	Total Protein (mg)	Recovery rate (%)
Microfiltration	10 Flu 01	4400	1562.92	256	5.66	6876.85	102.57
	10 Flu02	4200	1179.889	256	5.6	4955.53	103.64
	10 Flu03	4100	483.843	512	6.13	1983.76	102.56
Ultrafiltration	10 Flu 01	152	2704.015	2048	6.75	411.01	27.636
	10 Flu02	180	6609.951	512	6.6	1189.79	8.5714
	10 Flu03	180	2226.012	2048	6.6	400.68	17.561
Ultracentrifugation	10 Flu 01	400	30.935	2048	6	12.37	72.727
	10 Flu02	300	40.923	512	5.66	12.28	14.286
	10 Flu03	350	35.832	2048	6	12.54	34.146
Dialysis	10 Flu 01	42	269.208	2048	6.5	11.31	7.6364
	10 Flu02	37.5	358.442	512	4.75	13.44	1.7857
	10 Flu03	47.5	274.506	2048	3.84	13.04	4.6341

(5) 本土株 0083-RG 純化結果 (表十一)

純化結果比較

Step	Batch number	Volumn (mL)	Protein conc. (µg/mL)	HA titer	Log TCID50/mL	Total Protein (mg)	Recovery rate (%)
Microfiltration	10 Flu 01	1800	1059.118	2048	6.75	1906.41	189.47
	10 Flu02	1700	851.648	2048	6.5	1447.8	390.80
Ultrafiltration	10 Flu 01	120	3654.769	4096	7.6	438.57	25.26
	10 Flu02	125	2435.565	4096	7.84	304.45	57.47
Ultracentrifugation	10 Flu 01	400	24.972	4096	5.4	9.99	84.21
	10 Flu02	500	10.842	2048	4.5	5.42	114.94
Dialysis	10 Flu 01	37.5	191.181	4096	4	7.17	7.89
	10 Flu02	35	201.722	4096	3.66	7.06	16.09

(6) 本土株 4055-RG 純化結果 (表十二)

純化結果比較

Step	Batch number	Volumn (mL)	Protein conc. (µg/mL)	HA titer	Log TCID50/mL	Total Protein (mg)	Recovery rate (%)
Microfiltration	10 Flu 01	1600	3778.167	1024	7.75	6045.0672	188.24
	10 Flu02	1600	3025.576	1024	8	4840.9216	191.62
Ultrafiltration	10 Flu 01	150	9215.091	4096	9	1382.2637	70.59
	10 Flu02	125	10286.641	2048	9.5	1285.8301	29.94
Ultracentrifugation	10 Flu 01	400	16.827	2048	7.5	6.7308	94.12
	10 Flu02	350	12.352	2048	7.5	4.3232	83.83
Dialysis	10 Flu 01	50	51.919	4096	6.25	2.59595	23.53
	10 Flu02	50	71.437	2048	6	3.57185	11.98

4. 分析不同原型疫苗之產率

從疫苗株 X179A 三批量產過程中觀察 HA 與回收率等指標，X-179A 02 生產過程似乎沒問題，但測 HA 含量卻比 01 和 03 含量相對來的低，若以傳統 15 ug/dose 計算，X-179A 三批之產率分別為 2.68 dose/egg、0.72 dose/egg、1.10 dose/egg。我們曾檢視 02 此批其生產過程中之 TCID₅₀，的確比其他 2 批低很多。初步檢討其因素，可能是蛋的品質不是很好，影響病毒的培養，造成病毒力價降低，整體抗原量亦降低。而 NIBRG-121xp 三批之產率均維持在 1-1.5 劑/蛋之間，故以 X179A 和 NIBRG-121xp 疫苗株接種雞胚胎蛋，符合目前市面上製程所能接受的產率（表十三）。

表十三

Lot No.	Volume(ml)	HA Con.(ug/ml)	顆數	Dose/egg
X-179A 01	45	325.64	365	2.68
X-179A 02	51	74.19	352	0.72
X-179A 03	45	137.67	377	1.10
NIBRG-121xp 01	42	187.41	352	1.49
NIBRG-121xp 02	37.5	208.81	364	1.43
NIBRG-121xp 03	47.5	128.45	371	1.10

5. 病毒去活化

在 98 年計畫已證實利用 1:10000 比例福馬林加入病毒於 4°C 反應 7 天有去活化成效，但由於去活化時間冗長亦造成整個產程延後，因此參考國衛院之去活化條件，將原先去活化條件之 1:10000 比例福馬林加入病毒於 4°C 反應 7 天，更改條件以 1:4000 比例福馬林加入病毒於 37°C 反應 2 天。初步利用 TCID₅₀ 檢測毒力，然後再依蛋白質含量及 SRD 檢測方法比較抗原變化。由表十四數據可看到原本放在 4°C 以 1:10000 福馬林不活化之 CBER-RG2(03)病毒再加入 1:4000 比例福馬林 37°C 再次進行不活化，TCID₅₀ 毒力檢測則有明顯下降情形，惟蛋白質含量數據略下降，可能原因是福馬林含量增加，使蛋白質聚集造成此結果。另外再將 NIBRG121-xp(03)病毒以同比例福馬林，分別放於 4°C 及 37°C 反應，TCID₅₀ 毒力檢測在 4°C 樣品毒力並未下降但在 37°C 樣品則有明顯下降情形，另外蛋白質含量就沒太大差異。綜上，同比例福馬林於高溫下去活化效果好，低溫則緩慢較沒成效，且由 Protein 含量及 SRD 數據來看，兩者都沒有太大差異，往後進行動物實驗，免疫老鼠所產生之抗體效應（HI 檢測）也沒差異，故證實病毒抗原仍然完好存在，此條件亦可取代之。此外長庚本土株（0083RG）以 1:4000 比例福馬林、37°C 反應條件下，分別以不同時間點進行取樣，後 TCID₅₀ 毒力檢測，數據如下表結果可見毒力依不同時

間點依序遞降至 2.5 (反應 2 天), 此條件對流感病毒去活化是可行的 (表十五、圖八)。

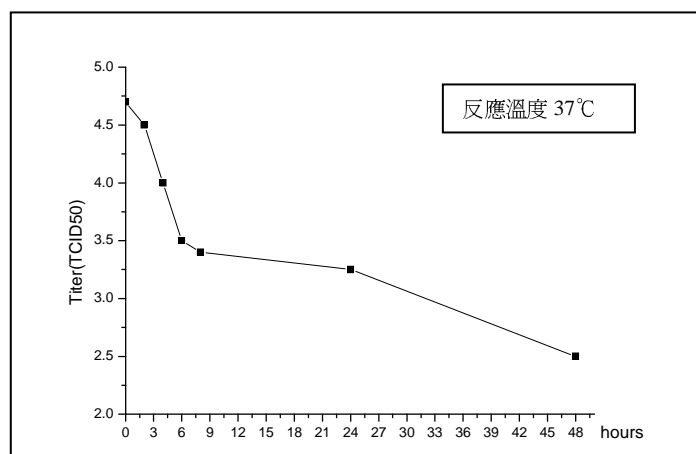
表十四

病毒	福馬林比例	溫度	TCID ₅₀	Protein(ug/ml)	SRD(ug/ml)	HI
CBER-RG2(03)-A	1:10000	4°C	4.25	52.024	-	223.81
	1:4000	4°C->37°C	2.6	39.047	-	266.07
RG121-xp(03)-A	1:4000	4°C	4.75	275.078	128.45	160
	1:4000	37°C	2.6	221.730	149.852	160

表十五

長庚本土株(0083RG)	
時間(hours)	TCID ₅₀
0	4.7
2	4.5
4	4
6	3.5
8	3.4
24	3.25
48	2.5

圖八



6. 原型疫苗 (X-179A/NIBRG-121/CBRE-RG2/NIBRG-121xp) HI 力價比較

將四株 H1N1 原型疫苗各三批, 以 10-0.1 HA ug/dose 免疫小鼠後所取得之血清, 進行交叉 HI test 之後發現 (表十六), 各株疫苗株均能產生對抗本身病毒株的抗體力價, 其中 X179A 及 CBRE-RG2 兩株即使以 0.1 HA ug/dose 免疫小鼠, 仍能產生 320 抗體力價, 但 X179A 交叉保護的能力並不如 CBRE-RG2 以及 NIBRG121xp, CBRE-RG2 以及 NIBRG121xp 抑制其餘三株病毒株血球凝集的能力, 差距皆小於 4 倍。另外以 1:4000 比例

福馬林、37°C反應條件，相較於 1：10000 比例福馬林反應 7 天進行去活化之原型疫苗，免疫小鼠後所能產生的抗體力價並無差異。

表十六

病毒 抗血清		RG-121	X179A	CBER-RG2	RG121xp
	免疫劑量 (HA ug/dose)	抗血清 HI 效價			
X179A-01	10	320	1280	640	320
	1	80	640	320	40
	0.1	40	320	160	20
X179A-03	10	160	1280	320	160
	1	80	640	160	40
	0.1	40	320	160	20
RG121-01	10	320	640	640	320
	1	80	320	320	160
	0.1	40	160	80	20
RG121-02	10	640	640	640	320
	1	160	320	320	80
	0.1	80	160	160	40
RG121-03	10	320	640	640	320
	1	160	320	320	80
	0.1	80	160	160	40
CBERRG2-01	10	640	320	640	320
	1	160	160	320	160
	0.1	40	80	160	40
CBERRG2-02	10	640	640	640	320
	1	160	320	320	160
	0.1	40	160	160	20
CBERRG2-03	10	640	640	640	640
	1	320	320	320	160
	0.1	160	160	320	80
CBERRG2-03 (37°C不活化)	10	640	640	640	320
	1	160	320	320	80
RG121xp-01	10	640	640	1280	640
	1	160	320	320	160
	0.1	80	160	160	80
RG121xp-02	10	640	640	640	320

	1	320	320	320	160
	0.1	160	160	160	80
RG121xp-03	10	640	640	640	640
	1	320	320	320	160
	0.1	80	160	160	80
RG121xp-03 (37°C 不活化)	10	640	640	640	640
	1	160	320	320	160

7. 本土疫苗株原型疫苗 (0083RG、4055RG) HI 力價比較

本土疫苗株原型疫苗，相較於 4 株 WHO 所認可 H1N1 疫苗株免疫小鼠後所產生抗體力價，並沒有差異，均能達到 640-1280，即使以 0.1 HA ug/dose 免疫小鼠，仍能產生抗體（表十七）。

表十七

病毒		0083RG	4055RG
抗血清			
	免疫劑量 (HA ug/dose)	抗血清 HI 效價	
0083RG	10	640	-
	1	320	-
	0.1	160	-
4055RG	10	-	1280
	1	-	640
	0.1	-	320

8. 原型疫苗 (X-179A/NIBRG-121/CBRE-RG2/NIBRG-121xp) 中和效價比較

將四株 H1N1 原型疫苗各三批，以 10-0.1 HA ug/dose 免疫小鼠後所取得之血清，進行交叉中和反應，發現仍以 X-179A 能產生最高抗體力價，CBRE-RG2 雖然也有很高的抗體力價，但無論以何種原型疫苗的血清，均能有效中和 CBRE-RG2 產生高抗體效價，故可能是因為 CBRE-RG2 本身感染能力較低的緣故。若以 0.1 HA ug/dose 免疫小鼠，X-179A 以及 NIBRG-121xp 無論對抗何株病毒，均能產生 200-800 抗體力價，但 X-179A 抗血清中和 RG-121 病毒株的能力似乎較差，最高僅能產生 223.87 中和效價（表十八）。

表十八

病毒		RG121	X179A	CBER-RG2
抗血清				
	免疫劑量 (HA ug/dose)	抗血清中和效價		
X179A-01	10	223.87	2985.31	1778.28
	1	94.4	749.89	831.76
	0.1	66.83	405.5	809.1
X179A-03	10	223.87	1778.28	1659.6
	1	112.2	891.25	1496.2
	0.1	56.23	203.23	446.68
X179A	10	112.2	891.25	891.25
	1	28.18	316.22	446.68
	0.1	26.3	223.87	208.9
RG121-01	10	891.25	891.25	1778.28
	1	223.87	416.86	1659.6
	0.1	104.7	223.81	891.25
RG121-02	10	891.25	891.25	1778.28
	1	446.68	266.07	1659.6
	0.1	223.87	223.81	891.25
RG121-03	10	891.25	1059.2	1778.28
	1	223.87	446.68	954.99
	0.1	112.2	188.36	630.96
CBERRG2-01	10	446.68	530.88	1778.28
	1	223.81	223.81	1059.2
	0.1	112.2	158.48	530.88
CBERRG2-02	10	478.63	630.96	1778.28
	1	223.81	266.07	1059.2
	0.1	66.83	208.9	446.68
CBERRG2-03	10	831.76	630.96	1258.9
	1	223.81	223.81	981.75
	0.1	133.35	223.81	749.89
CBERRG2-03 (37°C 不活化)	10	446.68	891.25	1496.2
	1	223.81	266.07	749.89
RG121xp-01	10	1059.2	891.25	1496.2

	1	446.68	446.68	749.89
	0.1	223.81	208.9	568.85
RG121xp-02	10	1059.2	891.25	954.99
	1	446.68	446.68	891.25
	0.1	223.81	223.81	831.76
RG121xp-03	10	1258.9	891.25	1496.2
	1	446.68	416.86	891.25
	0.1	223.81	223.81	891.25
RG121xp-03 (37°C 不活化)	10	1659.6	891.25	1258.9
	1	223.81	446.68	1059.2

9. 本土疫苗株原型疫苗 (0083RG、4055RG) 中和效價

本土疫苗株原型疫苗 (0083RG、4055RG)，免疫小鼠後所產生抗體力價，甚至優於 4 株 WHO 所認可 H1N1 疫苗株，即使以 0.1 HA ug/dose 免疫小鼠，仍能產生大於 200 的抗體力價 (表十九)。

表十九

病毒		0083RG	4055RG
抗血清			
	免疫劑量 (HA ug/dose)	抗血清中和效價	
0083RG	10	1778.28	-
	1	1659.6	-
	0.1	1258.9	-
4055RG	10	-	1659.6
	1	-	831.76
	0.1	-	266.07

10. H1N1 原型疫苗對抗 H5N1 病毒中和效價比較

將產率最佳之兩株 H1N1 之原型疫苗免疫小鼠後所產生之抗血清，分析檢測可否有效中和 H5N1 RG2 印尼株及 RG14 越南株，與本身病毒相比較，抗體反應達到 ≥ 4 倍以上差距，並且 HI 的結果與劑量無法成平行相關性，故推測新型 H1N1 之原型疫苗無法產生有效的中和抗體，中和 H5N1 病毒 (表二十、二十一)。

表二十

病毒 抗血清		RG2(H5N1)	RG14(H5N1)	X179A
	免疫劑量 (HA ug/dose)	抗血清 HI 效價		
X-179A 01	10	320	80	1280
	1	160	40	640
	0.1	80	20	320
X-179A 02	10	320	40	1280
	1	160	40	640
	0.1	160	20	320
X-179A 03	10	320	80	1280
	1	160	40	640
	0.1	80	20	320

表二十一

病毒 抗血清		RG2(H5N1)	RG14(H5N1)	RG-121xp
	免疫劑量 (HA ug/dose)	抗血清 HI 效價		
RG-121xp 01	10	80	80	640
	1	80	80	160
	0.1	80	40	80
RG-121xp 02	10	320	160	640
	1	320	80	160
	0.1	160	80	80
RG-121xp 03	10	160	160	640
	1	80	80	160
	0.1	40	40	80
	10 (37°C 不活化)	80	80	640
	1 (37°C 不活化)	80	40	160

討論與建議

本計畫已成功建立 4 株 H1N1 (X-179A/NIBRG-121/CBRE-RG2/NIBRG-121xp) 疫苗和 3 株台灣本土流感疫苗種籽株 (4055-RG(4055-1)、0083-RG(PR8-0083)、641-RG(PR8-641)) 種庫，小量產的結果也再度證實先前建立產程的可行性與可信度，並陸續修正中。實驗結果也正如預期，發現以 X-179A 及 NIBRG-121xp 兩株具有較高的病毒力價，在量產時也較易培養，能有穩定且較高的病毒產量。10-0.1 HA ug/dose 免疫小鼠後，以 X-179A 及 NIBRG-121xp 能產生較好的抑制血球凝集和病毒中合力價，在交叉中和試驗中，除了 X-179A 抗血清對於 NIBRG-121 的中和能力較差，X-179A 及 NIBRG-121xp 對於其餘病毒株皆能產生 200-800 的中和力價。故在 H1N1 流感爆發流行時，X-179A 及 NIBRG-121xp 因其易於培養及其可產生較好病毒中和力價的特性，在緊急生產疫苗時，可列為較優先的疫苗株選擇。

當出本局執行「流感疫苗研發計畫」時，業已建立我國流感疫苗株病毒庫相關技術平台與運作機制，希望未來一旦全球流感大流行，希望能從病毒庫中挑選適當的疫苗株，提供給我國緊急流感疫苗生產線製造所需之疫苗。但在實際運作仍有斷層，那就是由本局委託長庚大學施信如教授建立以反轉錄基因法製造流感疫苗種籽株之技術平台，其所製備的疫苗種子株是否可有效的量產，此計畫初步以 3 株試驗，病毒力價均能達到 512 以上，其中 0083-RG 在取得最佳培養條件實驗過程中，病毒力價可達到 2048，且三株本土季節流感疫苗株皆繼代超過 3 代，並能穩定維持病毒力價。另外 200 顆蛋小量試產也成功完成，並順利產生高抗體效價。未來本中心將會從長庚大學施信如教授實驗室收集更多種子株，並針對各個種子株進行量產分析比較，希望能建立台灣專屬的流感疫苗株種庫。

去活化步驟一直是生物製劑生產重要的關鍵步驟，在 98 年計畫已證實利用 1:10000 比例福馬林加入病毒於 4°C 反應 7 天有去活化成效，但由於去活化時間冗長亦造成整個產程時間拉長，以 1:4000 放於 37°C 反應(1~3 天)條件進行病毒去活化，經由 TCID₅₀、蛋白質含量、SRD 及 HI 檢測，證實病毒抗原仍然完整存在，故以後流感疫苗製備會以此條件進行病毒去活化，本中心未來仍會配合將原型疫苗接種至蛋的標準檢驗程序，更進一步證實去活化步驟的完全。

本中心自 96 年開始建立有關流感疫苗株種庫，從 H5N1 接著季節性流感疫苗株到目前的新型 H1N1，讓我們對流感疫苗株的特性有更深的認識與培養經驗，並且在最近兩次流感大流行中，針對建立我國緊急流感疫苗生產線也貢獻出一點心力，當然也培養出具備小量產的專業人才，希望未來這人才也能順利進入我國生技產業界，貢獻他們所學，協助生技產業的發展。

參考文獻

1. Characteristics of the emergent influenza A (H1N1) viruses and recommendations for vaccine development Publication date: 26 May 2009
http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/vaccine_recommendations/en/index.html
2. Candidate vaccine viruses
<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/guidance/vaccines/candidates/en/index.html>
3. FDA Influenza A (H1N1) 2009 Monovalent
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm181950.htm>
4. 歐盟 Vaccines <http://www.ema.europa.eu/influenza/vaccines/home.htm>
5. 安定伏裂解型流感疫苗(A/H1N1)仿單
<http://www.adimmune.com.tw/goods.php?act=view&no=3>
6. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee, November 16 - 17, 2005 Meeting
7. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. [Centers for Disease Control and Prevention \(CDC\) MMWR Morb Mortal Wkly Rep.](#) 2009 May 22;58(19):521-4
8. [Detection of antibody to avian influenza A \(H5N1\) virus in human serum by using a combination of serologic assays.](#) Rowe T et al. J Clin Microbiol. (1999)
9. Wickramasinghe SR, Kalbfub B, Zimmermann A, Thom V, Reichl U: Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. *Biotechnology and Bioengineering* 2005; 20; 92(2): 199-208.
10. Ruigrok RW, Krijgsman PC, de Ronde-Verloop FM, de Jong JC: Natural heterogeneity of shape, infectivity and protein composition in an influenza A (H3N2) virus preparation. *Virus Research.* 1985; 3(1): 69-76.
11. Lennette EH, Schmidt, NJ: Hemagglutination-inhibition test, *Diagnostic procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial infection*, 5th ed. Am Pub. Hlth. Assn. 1979; 603
12. Schild GC, Wood JM, Newman RW,: A single-radial-immunodiffusion technique for assay of influenza haemagglutinin antigen. *Bulletin of the World Health Organization* 1975; 52, 223-231.
13. Wood FM, Schild GC, Newman RW, Seagroatt V: An improved single-radial-immunodiffusion technique for assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determination of inactive whole virus and subunit vaccine. *Journal of Biological Standardization* 1977; 5, 237-247.

期中進度報告審查意見回覆

1. 有精進作為，如提高回收率；檢討產量時認為蛋品質會影響產量的意見是正確的，但可惜未提出解決方案。

回覆：如果正式生產時受精蛋會訂定許多規格，尤其是日齡與大小，但我們每次採購的數量不多且有時緊急需求的，故亦造成品質不好，但我們都會適時提醒廠商，故大部份都符合本中心的要求。

2. 動物免疫及攻毒試驗：(1) 建議以 7-8 周大（約 20g）小鼠進行；(2) 計畫中應說明免疫劑量。

回覆：本計畫所用之疫苗株皆屬季節性流感病毒，故老鼠實驗皆以 4-5 週齡之 BALB/c 為主，劑量方面則是以每劑所含 HA (ug) 為依據且不加佐劑，由於不是新開發之疫苗，為容易比較與分辨抗體效價高低，故免疫以兩次為主。

3. 建議分單次及二次免疫；疫苗劑量因存在之免疫佐劑而降低，是否考慮比較？

回覆：同上。

4. 以 8LD50 之 H5N1(A/Duck/China/E319-2/03:DKC-E319)病毒進行攻毒試驗的目的為何？此病毒為台閩地區之 endemic H5N1 virus？如果不是，是否考慮以台灣地區 local strain 進行攻毒。

回覆：本計畫所用之疫苗株皆屬季節性流感病毒，故不進行攻毒試驗，期末報告已進行修正。

5. 頁 4，二年半（其中）初步成果，表中所示病毒濃度係指 TCID₅₀？應註明。

回覆：謝謝委員的指正，期末報告會註明。

6. 頁 7，3 已不同劑量免疫小鼠，未說明小鼠樣本數；另外 HI 及中和效價應以平均值 +/- 標準差表示較適宜。

回覆：本計畫的老鼠動物實驗通常都是參照本中心生物製劑產品效價檢測的模式，免疫 15 隻老鼠，然後取每隻老鼠等量之血清後混合均勻，然後測定 HI 及中和效價 NT。

7. 進行 wild-type H5N1 病毒試驗，應於 BSL-3 實驗中進行；建議於完整計畫書提出

實記得補 (1) 動委會同意書 (2) 生物安全委員會同意書。

回覆：本計畫所用之疫苗株皆屬季節性流感病毒，故不進行攻毒試驗，期末報告已進行修正。

8. 實施方法及進行步驟之 II. Preparation of virus seed banks 建議未來於研究成果中明確定義 Master seed bank or Working seed bank 以及繼代數，以及檢附病毒株之檢驗報告。

回覆：Master seed bank or Working seed bank 定義已於報告中說明，而本計畫目的僅在初步建立疫苗株種庫，並評估其原型疫苗特性，並非要未上市準備，故病毒株並未進行檢驗認證。如果時機成熟將會進行所有相關安全性檢驗認證工作。繼代數已在期末報告中 (表一) 註明。

9. 實施方法及進行步驟之 V. Chemical inactivation of purified virus 每隔 7 天取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID₅₀) 之間格太寬，不易評估建立病毒不活化曲線。

回覆：本計畫在期末報告中已將採樣時間更改為，第 0、2、4、6、8、24、48 小時進行採樣監測，結果如 (圖八)，已可明確觀察到病毒不活化曲線。

期末進度報告審查意見回覆

1. 建議病毒液置 4°C 滅毒時間可考慮縮短，以免內毒素增加。

回覆：感謝委員之建議，實驗已證實 37°C 下進行不活化可大幅度縮短不活化時間，且不影響抗原活性，以後會進一步修正產程。