

計畫編號：DOH94-DC-2017

行政院衛生署疾病管制局九十四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

Development of cobra and krait bivalent antivenin from the egg yolk of immunized ducks

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、陳沛玲

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 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	3
英文摘要	4
前言	5
材料與方法	9
一、蛇毒毒力測定	9
二、蛇毒抗原之製備	9
三、實驗鴨	9
四、動物免疫方式	9
五、建立抗飯匙倩IgY抗體鴨子免疫模式	9
六、建立抗雨傘節IgY抗體鴨子免疫模式	10
(一) 低劑量蛇毒免疫	10
(二) 高劑量蛇毒免疫	11
七、建立抗飯匙倩與雨傘節多價IgY抗體鴨子免疫模式	11
八、鴨蛋收取時程	11
九、尋找多價IgY抗體純化最適條件	12
十、IgY抗體蛋白質濃度調整與測定	12
十一、建立抗體產程檢驗系統	12
十二、測定IgY中和蛇毒之效價	13
十三、檢測被免疫鴨抗體效價之持續性	13
十四、個別免疫蛇毒之抗體混和後與多價抗體的中和效價比較	13
結果	14
一、蛇毒毒力測定	14
二、IgY之萃取與純化	14
三、免疫計畫之確認	15
(一) 動物中和效價測定法	16

1、抗飯匙倩IgY抗體效價 (20mg/ml)	16
2、抗雨傘節IgY抗體效價 (20mg/ml)	16
3、抗飯匙倩及雨傘節IgY抗體效價 (20mg/ml)	17
四、以ELISA檢測法建立抗體產程檢驗.....	16
五、個別免疫蛇毒之抗體混和後與多價抗體的中和效價比較.....	16
六、成本效益評估.....	16
(一) IgY抗體分析.....	16
(二) 鴨隻飼養成本.....	17
討論.....	18
參考文獻.....	22
圖表.....	22
圖一、以硫酸銨沉澱法純化免疫計畫 A 抗飯匙倩所得之 IgY 抗體蛋白質濃度.....	25
圖二、以硫酸銨沉澱法純化免疫計畫 B 抗雨傘節之 IgY 抗體蛋白質濃度.....	25
圖三、以硫酸銨沉澱法純化免疫計畫 C 抗飯匙倩與雨傘節之 IgY 抗體蛋白質濃度.....	26
圖四、免疫計畫 A 抗飯匙倩之動物中和效價測定.....	26
圖五、免疫計畫 C 之動物中和效價測定.....	27
圖六、三個免疫計畫鴨隻血液中的抗體效價.....	28
表一、免疫計畫 B 抗雨傘節之動物中和效價測定.....	29
表二、抗體混合與多價抗體之動物中和測定.....	30
表三、IgY 抗體與馬血清抗體需求量比較.....	30
表四、IgY 抗體與馬血清抗體飼養成本比較 (不含產品精製之費用)	31

中文摘要

比較 93 年的研究成果，本年度藉由飯匙倩蛇毒免疫時程之改變及純化步驟之修正，結果顯示 20mg/ml 抗飯匙倩蛇毒抗體平均效價為 170U，較去年 40mg/ml 抗體平均效價 250U 為佳，且收蛋的截止日可由第 21 週延至第 32 週。另外單獨免疫雨傘節蛇毒，純化抗體之效價於第 8 週到第 32 週間都可維持在 600U 以上；飯匙倩與雨傘節匙毒混合免疫所純化之抗體，對雨傘節蛇毒的抗體效價於第 10 週至第 32 週時皆可達 60U 以上，其中對飯匙倩蛇毒的效價於第 12-16 週時可達到 240U 以上，第 18 週達到最高 440U，較單獨免疫飯匙倩蛇毒的效價（第 12-16 週時為 120U，第 18 週為 220U）為高。以 ELISA 檢驗系統來檢測血清中 IgY 抗體效價，發現整個檢驗系統的專一性及靈敏度皆增高，且與動物抗體中和效價測定法相比較，兩者結果相符合，所以確定 ELISA 檢測系統可做為快速篩選抗體機制及收蛋時程的一項重要指標，並可當作動物中和抗體測定法的輔助工具。將個別免疫飯匙倩和雨傘節蛇毒所得 IgY 抗體混合之後，抗飯匙倩蛇毒的效果較兩種蛇毒同時免疫之多價抗體差，但抗雨傘節蛇毒卻較佳。綜合以上的結論，若改以鴨蛋生產抗飯匙倩蛇毒初步可節省約 15 % 的經費，抗雨傘節蛇毒更可節省約 75 % 的經費。

關鍵字：IgY 抗體、硫酸銨沉澱法、酵素連結免疫試驗法、動物中和測定法、田中單位

英文摘要

In comparison with the previous study, the average neutralization titer (170U for 20mg/ml) of cobra IgY antibody in this year was higher than that (250U for 40mg/ml) of last year and the period of collecting egg can be extended 11 more weeks by modifying immunization dosage, schedule and purification procedures. The neutralization titer for purified IgY antibody from krait venom immunization alone was maintained above 600U from week 8 to week 32; whereas for cobra and krait mixed venom immunization, the neutralization titer can reach above 60U from week 10 to week 32. The titer for purified antivenin from cobra antivenom immunization was able to reach above 240U from week 12 to 16, and to 360U from week 18 to 20. The purified IgY antibody titer for cobra and krait mixed venom immunization was higher than the titer for cobra venom immunization only (120U for week 12 to 16 and 200U for week 18 to 20).

Because the specificity and sensitivity of ELISA assay increased, the results showed that the neutralization titer profile between the animal neutralization test and the ELISA assay respectively will be parallel. Therefore, we can conclude that ELISA assay can be used for quick IgY antibody selection and be a supporting tool for the neutralization test from the animal study.

The titer of the pooled IgY antibody from cobra and krait mixed venom immunization against cobra venom is lower than the bivalent antivenin from cobra and krait mixed venom immunization, but higher against krait venom.

The use of duck egg for cobra and krait IgY antibody production can save up to 15% and 75% of the budget respectively.

**Keyword : IgY antibody, Ammonium sulfate precipitation, ELISA,
Neutralization test, Tanaka Unit,**

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。目前本局將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)抗鎖鍊蛇毒血清，其中抗鎖鍊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 %。

在急救過程中，一旦馬血清蛋白(horse serum proteins)進入人體，常使傷者引發三種副作用，即(1)抗補體反應：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：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；(3)過敏性休克：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^(1,19)。另外，目前本局生產抗蛇毒血清之馬匹需由國外進口，單價較高，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，而製造一劑抗蛇毒血清之成本高達新台幣 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，且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抗蛇毒抗體確有其必要性。

禽類屬於較低等之脊椎動物，以鴨為例，在免疫抗原後，母鴨除了血清含有抗體，這些抗體也會傳送到鴨蛋的蛋黃部份，稱之為蛋黃免疫球蛋白

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^(20,21)。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 : 鴨蛋之 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) ⁽¹¹⁾。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^(10,21)。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^(6,7)。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：IgY 以液態形式儲存於 4℃ 中，其安定性可達十年。

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⁽⁹⁾、Enterotoxigenic E. coli⁽⁸⁾、Helicobacter pylori^(14,16,17)、Dental caries⁽¹⁰⁾、Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus⁽²⁰⁾、Streptococcus mutans⁽³⁾ 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⁽¹²⁾，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⁽¹⁸⁾，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^(4,5)，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 A2 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⁽²⁾。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 93 年自行研究計畫評估，國內一年約需 5000~6000 劑抗飯匙倩抗血清，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)，IgY 抗體一劑需 $20 \text{ mg/ml} \div 180 \text{ u/ml} \times 1200 \text{ u} = 140 \text{ mg}$ ，而一隻鴨子一年最少可提供 $(200 \text{ eggs} \times 60 \text{ mg/egg} \times 20\% \text{ 為專一性抗體}) \div 140 \text{ mg} = 17 \text{ 劑}$ ，故最少只需飼養 350 隻鴨子，從飼養成本來比較，鴨 IgY 抗體較傳統馬血清的成本低。

材 料 與 方 法

一、蛇毒毒力測定：

以 0.9 % NaCl 溶液溶解凍結乾燥之蛇毒，再稀釋至適當濃度後，以二倍濃度連續序列稀釋。以體重 12-14 克之 3 隻 ICR 小白鼠進行皮下注射，每隻小鼠注射劑量為 0.2 ml，注射後觀察 48 小時，並紀錄動物死亡數目，計算蛇毒對小白鼠之最低致死劑量(minimum lethal dose ; MLD)。

二、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 ℃ 中過夜。

三、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。

四、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，以肌肉注射方式免疫，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。

五、建立抗飯匙倩 IgY 抗體鴨子免疫模式：

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，共免疫三隻鴨子，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。於第 28 週時停止免疫 A-sv3，但仍繼續純化 IgY 抗體與採血，用以檢測停止免疫後，抗體效價之持續性。免疫時程及劑量如下表(鴨隻編號為 A-sv1、A-sv2、A-sv3)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
蛇毒(mg)	2	4	6	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
IgY 純化 (20mg/ml)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
血清收集	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓

六、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，之後每隔兩週進行一次補強免疫，分為高劑量蛇毒免疫與低劑量蛇毒免疫(免疫時程及劑量如下表)，每個計畫兩隻鴨子，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。

(一) 低劑量蛇毒免疫(鴨隻編號為 B-1sv6、B-1sv7)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
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	0.2	0.2
IgY 純化 (20mg/ml)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
血清收集	✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓		✓	✓

(二) 高劑量蛇毒免疫(鴨隻編號為 B-2sv8、 B-2sv9)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
蛇毒(mg)	0.4	0.8	1.2	1.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	—	—
IgY 純化(20mg/ml)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
血清收集	√		√		√		√		√		√		√		

七、 建立抗飯匙倩與雨傘節多價 IgY 抗體鴨子免疫模式：

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 C-sv4、 C-sv5)：

週數	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34
飯匙倩蛇毒(mg)	2	4	6	8	2	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	0.2	—
IgY 純化 (20mg/ml)	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
血清收集	√		√		√		√		√		√		√		√		√	√

註一：三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，共取 7 天的蛋混在一起，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。

註二：三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。

八、 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。

九、尋找多價 IgY 抗體純化最適條件：

近年來以 polyethylene glycol (PEG) ⁽⁸⁾及沉澱法水稀釋法(water dilution method ; WD) ^(9,10)萃取 IgY 的成本最低、回收率最佳。依據本中心 92 年及 93 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。

十、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 μl , 置入96孔微量盤中, 至少3重複。分別加入 Bradford reagent 150 μl , 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。

十一、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。

十二、測定 IgY 中和蛇毒之效價：

將 IgY (20 mg/ml) 分別與不同濃度的蛇毒液混和均勻後，置於 37 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、個別免疫蛇毒之 IgY 抗體混合後與多價抗體的中和效價比較：

分別將以飯匙倩和雨傘節蛇毒免疫鴨子所得 IgY 抗體混合後，與混合飯匙倩和雨傘節蛇毒同時免疫同一隻鴨子所得之多價抗體做比較。

結 果

一、蛇毒毒力測定：

使用 ICR 小鼠做蛇毒毒力測定，1MLD 的飯匙倩蛇毒劑量為 0.075 mg/ml，雨傘節蛇毒為 0.015 mg/ml。

二、IgY 之萃取與純化：

去年計畫中利用硫酸銨沉澱法純化抗蛇毒 IgY 抗體，純度已可達 90 % 以上，並且未來大量製造時，考量成本與步驟簡便性，所以今年實驗仍只使用硫酸銨沉澱法。

免疫計畫 A 抗飯匙倩結果顯示第一次免疫後所得之 IgY 抗體蛋白質濃度皆略微下降，持續進行免疫，蛋白質濃度有上升的趨勢，第 10 週所得到之蛋白質濃度達最高，再緩慢降低，第 14 週為最低，然後每隔 4 至 6 週，濃度呈現高低起伏的趨勢；第 28 週停止免疫 Asv3 鴨隻後，所純化出的抗體蛋白濃度較持續免疫的鴨隻低（圖一）。有關免疫後每顆蛋萃取之 IgY 抗體總含量，初步估算免疫計畫 A 抗飯匙倩 IgY 約為 50 mg/egg。

免疫計畫 B 抗雨傘節結果顯示同樣於第一次免疫後所得之 IgY 抗體蛋白質濃度較微下降，持續進行免疫，蛋白質濃度有上升的趨勢，第 6 週基礎免疫結束後所得到之蛋白質濃度達最高，再緩慢降低，高劑量蛇毒（B-2-sv8 及 B-2-sv9）的蛋白質濃度較低劑量蛇毒（B-1-sv6 及 B-1-sv7）穩定，沒有太大的變動；第 26 週停止免疫高劑量蛇毒鴨隻後，其所純化出的抗體蛋白濃度較持續免疫的鴨隻低（圖二）。有關免疫後每顆蛋萃取之 IgY 抗體總含量，初步估算免疫計畫 B 抗雨傘節 IgY 為 70-80 mg/egg（高劑量與低劑量免疫的結果相同）。

免疫計畫 C 抗飯匙倩與雨傘節結果顯示在飯匙倩蛇毒最後一次基礎免疫時（第 6 週）同時免疫雨傘節蛇毒後，所得到之抗體濃度仍持續增加，至第 12 週後才降低，14 週達最低，然後與免疫計畫 A 一樣，每隔 4 至 6 週，濃度呈現高低起伏的趨勢（圖三）。有關免疫後每顆蛋萃取之 IgY 抗體總含量，初步估算免疫計畫 C 抗飯匙倩與雨傘節則為 60-70 mg/egg。

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）：

經基礎免疫後，抗飯匙倩 IgY 抗體已達 80U 的保護效價，持續進行追加免疫，抗體效價會繼續維持，平均效價 $Asv1$ 為 180U， $Asv2$ 則為 160U， $Asv3$ 於第 26 週停止免疫後，抗體效價雖會持續下降，但至實驗結束的第 34 週時平均效價仍有 130U（圖四）。

2、抗雨傘節 IgY 抗體效價（20mg/ml）：

免疫高劑量蛇毒或低劑量蛇毒之得之抗雨傘節 IgY 抗體效價，並無顯著的差別，兩者皆於第 6 週時都可達到 400U 以上的效價，且至實驗結束的 32 週時，都可維持 600U 以上的效價。雖然第 26 週停止免疫高劑量蛇毒後，28 週的抗體效價略微降低，但 30 週卻又再上升（表一）。

3、抗飯匙倩及雨傘節 IgY 抗體效價（20mg/ml）：

飯匙倩抗體效價於第 6 週時已達 60U，然後持續上升，於第 12-16 週時可達到 240U 以上，第 18 週 440U 達最高，較單獨免疫飯匙倩蛇毒的免疫計畫 A 效價（第 12-16 週時為 120U，第 18 週為 220U）為高。第 6 週同時免疫兩種蛇毒後，對雨傘節抗體效價亦隨之升高，

第 14 16 週達最高 (120U), 且第 10 週至第 32 週時皆可達 60U 以上 (圖五)。

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，三個免疫計畫 (圖六) 血液中的抗體效價皆在免疫進行免疫後，持續升高，於第 16 週達最高，然後雖略有降低，除免疫計畫 C 抗雨傘節蛇毒的效價持續降低外，其餘兩個免疫計畫效價仍很穩定的，沒有明顯的變化。

五、個別免疫蛇毒之 IgY 抗體混合後與多價抗體的中和效價比較：

分別將第 16、18、20 週 Asv1 與 B-1sv6 的 IgY 抗體混和後 (濃度仍為 20mg/ml), 進行抗飯匙倩與雨傘節蛇毒動物中和測定，並與 Csv4 的抗蛇毒 IgY 多價抗體效價比較，結果 (表二) 發現前者抗飯匙倩蛇毒的效果雖較後者差，但抗雨傘節蛇毒卻較後者佳。

六、成本效益評估

(一) IgY 抗體分析：以免疫低劑量雨傘節蛇毒 6-32 週，20 mg/ml 達 400U 計算，目前馬蛇毒血清每年需求量為 6000 劑，每瓶需有 1200U。

1、採蛋：約可收蛋 180 顆。

2、純化：1 顆蛋純化後約有 70mg，其中約 20 % (即 15mg) 為專一性抗體，IgY 抗體一劑需 $20 \text{ mg/ml} \div 400 \text{ u/ml} \times 1200 \text{ u} = 60 \text{ mg}$ ，需 $60 \text{ mg} \div 15 \text{ mg} = 4$ 顆蛋。

3、需求：6000 瓶抗血清，需 24000 顆蛋 (6000 瓶 x 4 顆蛋)

4、飼養鴨：140 隻鴨 (24000 顆蛋 / 180 顆蛋)

5、蛇毒用量：672mg (以基礎免疫 0.2mg、0.4mg、0.6mg、0.8mg，每隔 2 週補強免疫 0.2mg 至第 32 週，共需 $4.8 \text{ mg} \times 140$ 隻鴨)

(二) 鴨飼養成本(以140隻估計)

- 1、動物一年價錢：3000元(20元/隻 x 140隻=3000元/年)。
- 2、一年飼料：16萬。
- 3、一年人工水電：24萬。
- 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、抗雨傘節蛇毒抗體共計：40.3萬。

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，所以鴨子免疫計畫中篩選抗體效價的高低，也是以此為標準。經純化之 IgY 抗體隨著免疫次數的增加，蛋白質濃度會持續升高，雖然在基礎免疫後便開始下降，但抗體效價卻持續升高，顯示經持續免疫抗原後，鴨子體內單位抗體蛋白質中的專一性 IgY 抗體量增加，故蛋白質濃度雖然下降但仍可維持較高的中和效價。

本年度飯匙倩蛇毒的基礎免疫劑量與時程為每隔兩週免疫 2mg、4mg、6mg、8mg，抗體效價約從第 6 週開始到達 60U 以上，與去年結果類似（隔兩週免疫 2mg、4mg、6mg、8mg、10mg），追加免疫則是每隔兩週 2mg 的劑量進行免疫（去年為 10mg 隔四週追加免疫兩次，每隔四週以 5mg 免疫），所以本年度相對的蛇毒用量可節省約 43%，且抗體效價圖譜與去年比較呈現較穩定的升高且持續更久，推測原因可能為免疫蛇毒劑量是以等差基數方式循序漸進升高，使鴨隻體內抗體濃度達到穩定狀態，每隔兩週只要進行低劑量的追加免疫，就能使免疫系統馬上引起較高的免疫反應，使鴨隻體內的抗體濃度保持持續穩定的狀態。在免疫第 28 週至 34 週，雖然進行持續補強免疫，抗體效價沒有顯著上升，甚至有略微下降的狀況，推測可能原因如下：一、免疫耐受性產生：因重複大量的抗原刺激，造成細胞凋亡(apoptosis)；二、免疫抗原被體內抗體中和；三、免疫的鴨隻衰老。另在第 28 週時停止免疫 Asv3 鴨隻後，其抗體效價有顯著的下降，顯示鳥禽類與哺乳類不同，在經過固定且長期的免疫後，其免疫系統對免疫抗原雖具有記憶性，一但停止免疫後，其抗體濃度及效價也隨之快速降低。

免疫計畫 B 中雨傘節蛇毒不管免疫高劑量與低劑量所產抗體效價皆沒顯著的差別，在高劑量實驗計畫中一但停止免疫蛇毒後，抗體效價仍可維

持一段時間，與飯匙倩略不同。以上結果和馬匹免疫的情形相符合，另利用低劑量（和飯匙倩比較只要十分之一的量）即可產生高抗體效價，其可能原因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。綜合以上，雨傘節只要免疫低劑量蛇毒，即隔兩週基礎免疫 0.2mg 0.4mg 0.6mg 0.8mg，每隔兩週以 0.2mg 進行追加免疫，即可達到量產所需的標準與目標，或許明年計畫可延長追加免疫的間隔時程，一面可節省蛇毒需求量，另依方面可節省人力。

免疫計畫C為參考馬匹蛇毒免疫的時程及劑量後所設計的，因飯匙倩與雨傘節皆為神經性蛇毒，抗原構造相類似，彼此間會對細胞上的抗原結合位（epitope）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，故需先免疫飯匙倩蛇毒，使免疫系統對飯匙倩蛇毒產生記憶性後，再免疫雨傘節蛇毒，而馬匹在免疫一段時間後會有抗雨傘節蛇毒的效價升高，抗飯匙倩蛇毒的效價卻降低的情形發生，尤其是最終該產品原料常常發現馬血清中雨傘節的抗體效價高於飯匙倩3-4倍以上。在免疫計畫C中也發現，在第28週至32週抗雨傘節蛇毒的IgY抗體效價升高，但抗飯匙倩蛇毒效價逐漸降低的現象，可能原因為飯匙倩蛇毒先佔據抗原結合位，雖然雨傘節蛇毒的抗原競爭力遠強於飯匙倩蛇毒，但低劑量雨傘節蛇毒必須持續累積的至某個劑量後，才會取代原先與決定位結合的飯匙倩蛇毒，而使得雨傘節抗體效價升高，飯匙倩抗體效價降低的現象。

由於馬匹抗蛇毒血清中兩種抗體效價差距甚大，所以在抗蛇毒血清產品分裝時往往為了使飯匙倩的抗體效價達到標準，而造成高效價雨傘節抗體的浪費。我們考慮如何將得來不易之抗體做最有效的應用分配，所以有分別製造飯匙倩和雨傘節兩種抗蛇毒IgY抗體的想法，然後將兩種IgY抗體

混合 (Asv1 + B-1sv6), 目前結果顯示混合前後抗體效價並無相互影響的現象。由於兩種蛇毒抗原構造相似, 產生之抗體是否容易導致彼此互相競爭作用, 進而影響兩種抗體效價, 所以明年我們將會測試兩種抗體混合後之安定性, 以確定混合抗體效價的效期。

免疫計畫C抗飯匙倩的抗體效價(平均300U)較單獨免疫飯匙倩蛇毒的免疫計畫A高(平均170U), 但抗雨傘節蛇毒抗體效價(平均80U)卻較單獨免疫雨傘節蛇毒的免疫計畫B低(平均600U), 可能少量雨傘節蛇毒可加乘飯匙倩蛇毒抗體的效果, 所以明年可在單獨製造飯匙倩抗體的時候, 可在免疫鴨子的同時追加低劑量之雨傘節蛇毒, 或許這樣可增加產率降低成本。另外飯匙倩蛇毒反而會降低雨傘節蛇毒的作用, 或許是雨傘節蛇毒劑量太低, 整個免疫抗體起始作用被飯匙倩蛇毒壓抑, 其詳細原因須待進一步探討。

在建立產程檢驗系統方面, 使用ELISA測定血清中抗體效價的目的是希望以該方法當作篩選工具, 可快速得知抗體效價上升趨勢, 並作為收集鴨蛋的依據。Kowalczyk (1985) 等人證實位於卵細胞的IgY受體會結合所有的IgY抗體, 然後從母雞的血液中運送至雞蛋中⁽¹³⁾, 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⁽¹⁵⁾, 上述報告證實血清中具有一定濃度的IgY抗體存在。經改良先前建立之ELISA檢測法後, 顯示整個檢驗系統的專一性及靈敏度皆增高, 與動物中和測定法相較後, 發現兩者抗體效價圖譜結果相符合; 而免疫計畫A與C的抗飯匙倩蛇毒之高峰期(第16週)較動物中和測定法的高峰期(第18週)提早, 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, 由此更能確定ELISA檢測系統可為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成監測

的一項重要輔助工具。

由於本中心為生物製劑製造廠，最重要的考量因素為成本效益，因此我們比較以鴨蛋或馬血清生產抗蛇毒血清所需之經費。以雨傘節蛇毒為例，利用馬生產 6000 劑產品，成本約為 156.8 萬元，而利用鴨子生產，依目前實驗結果，每隻鴨子收取第 6 至 32 週的蛋，大約 180 顆，生產抗飯匙倩蛇毒初步可節省約 15 % 的經費，抗雨傘節蛇毒更可節省約 75 % 的經費(表三和表四)。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產生物製劑，所以基於成本、人員安全及動物保育三方面，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

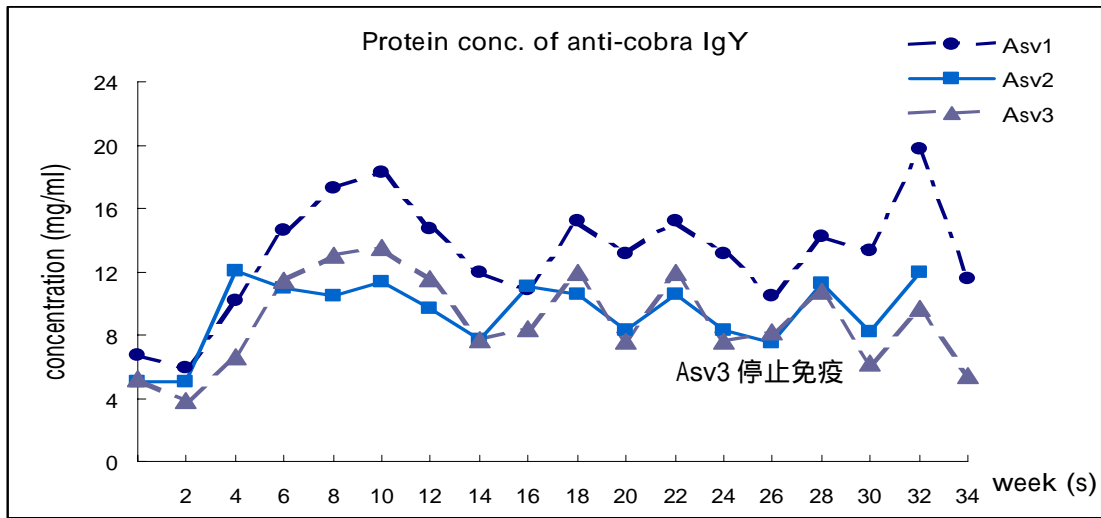
1. Akita, E. M. and S. Nakai, 1992 Isolation and purification of immunoglobulins from egg yolk. *J. Food Sci.* 57, 629
2. Almeida, C. M., Kanashiro, M. M., Rangel, F. B., Mata, M. F., Kipnis, T. L. and Silva W. D. 1998. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from 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., Ahschi, 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.Hideaki Yokoyama. , Robert C., et al (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
- 12.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
- 13.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
- 14.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
- 15.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

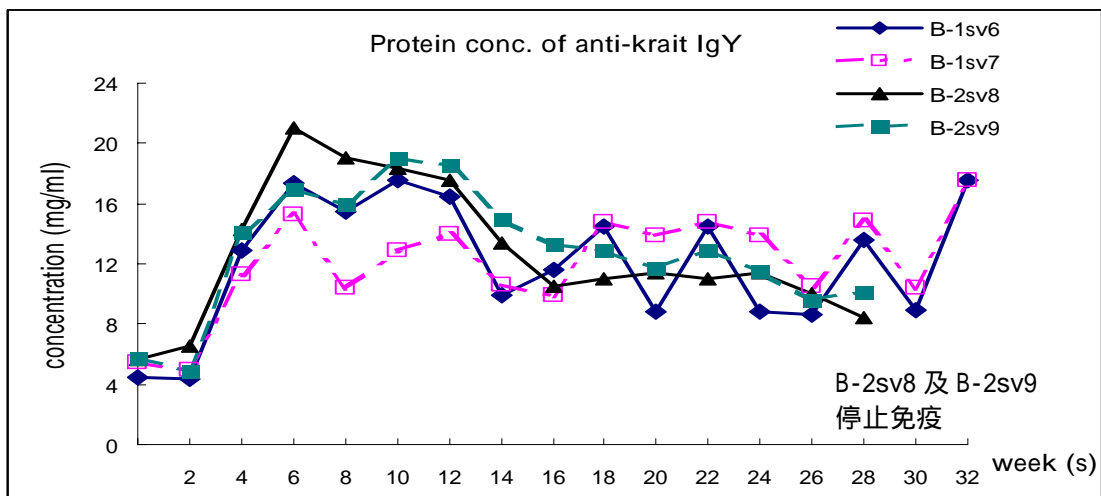
16. Parriss, H. M. and Hayes, R. H. 1970. Hospital management of pit viper venenations. *Clinical Toxicology* 3 (3): 501-511
17. Polson, A. 1990. Isolation of IgY from the yolk of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.* 19, 253-258
18. Polson, A., Von Wechmar, M. B. and 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
19. 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
20. 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
21. 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

圖 表

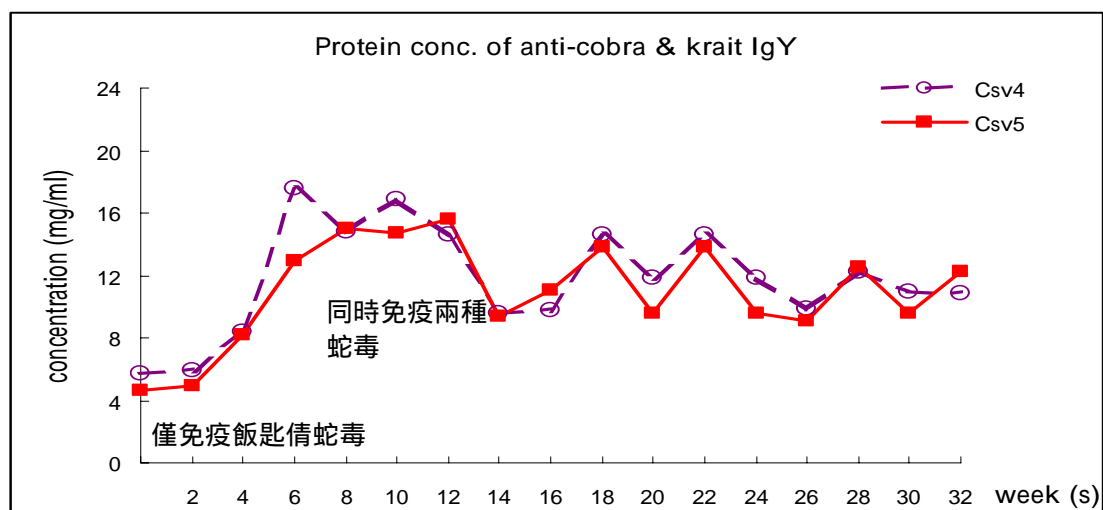
圖一、以硫酸銨沉澱法純化免疫計畫 A 抗飯匙情所得之 IgY 抗體蛋白質濃度。



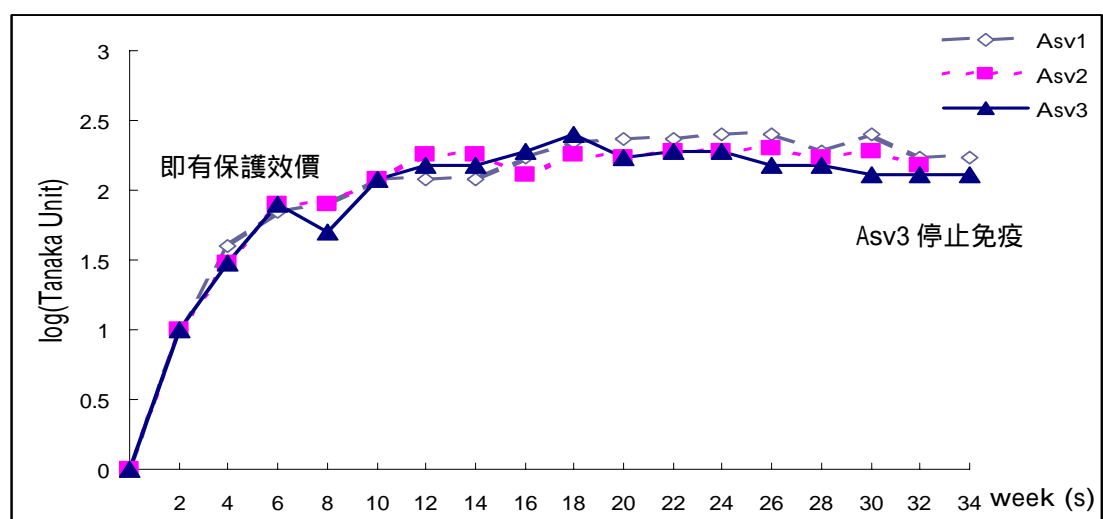
圖二、以硫酸銨沉澱法純化免疫計畫 B 抗雨傘節之 IgY 抗體蛋白質濃度。



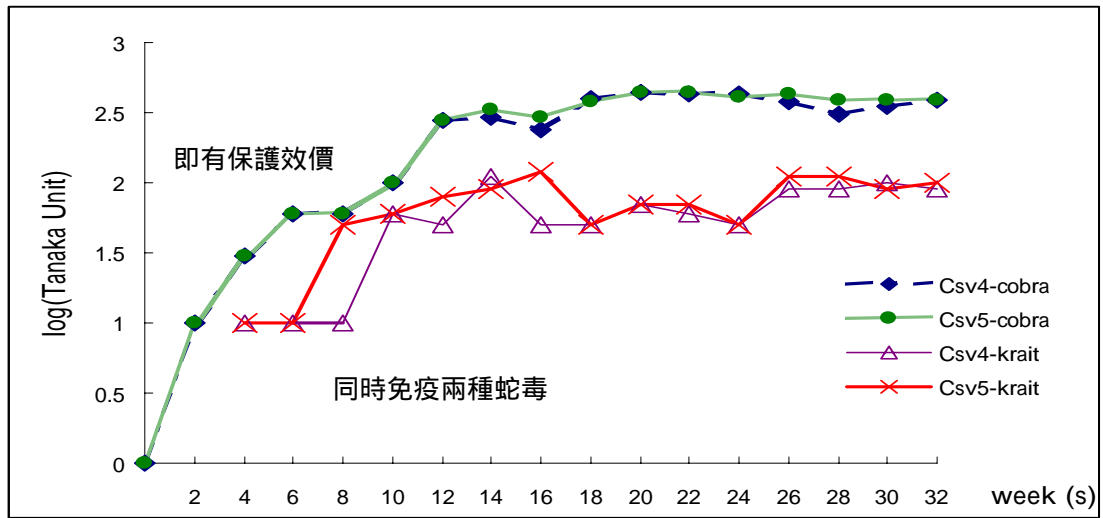
圖三、以硫酸銨沉澱法純化免疫計畫 C 抗飯匙倩與雨傘節之 IgY 抗體蛋白質濃度。



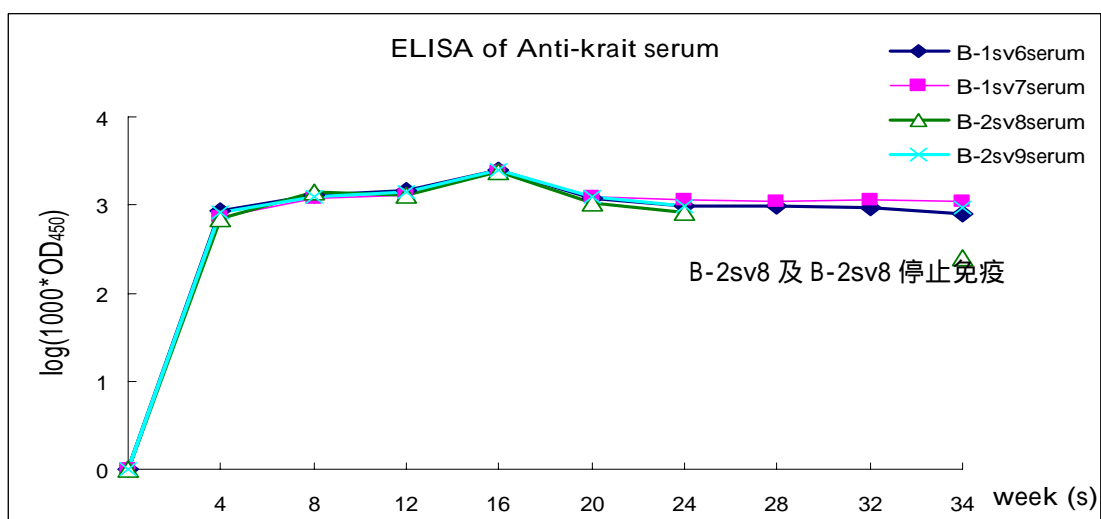
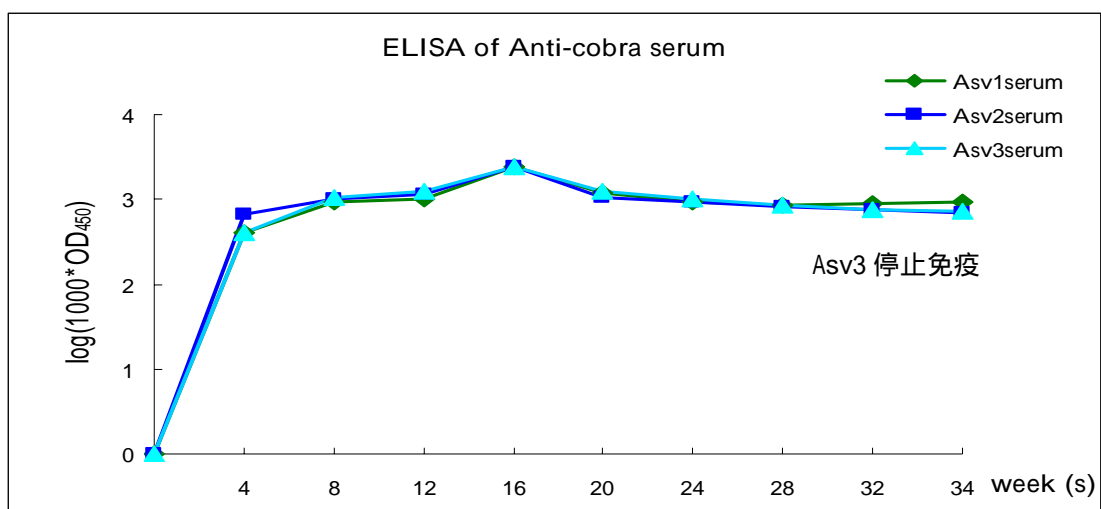
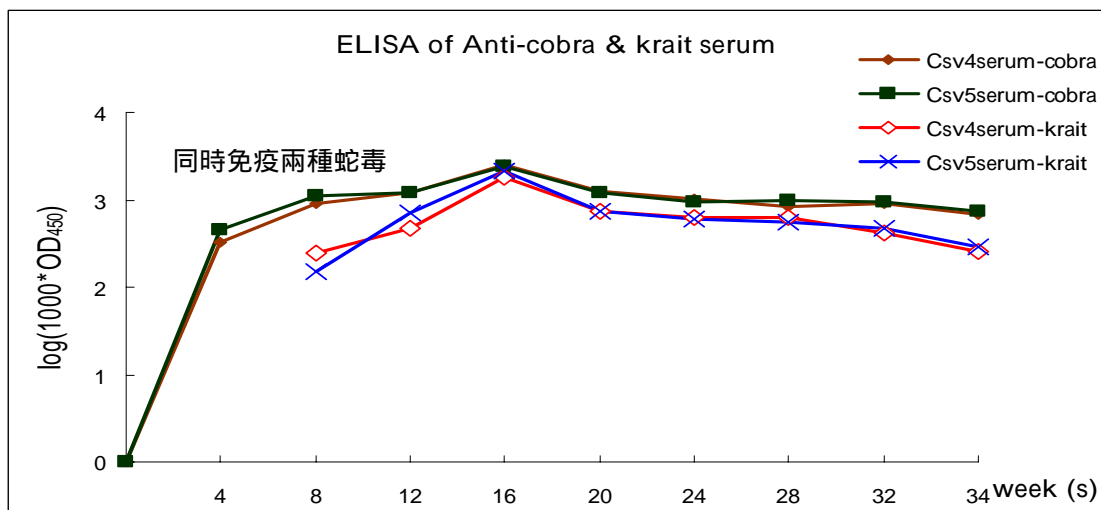
圖四、免疫計畫 A 抗飯匙倩之動物中和效價測定。



圖五、免疫計畫 C 之動物中和效價測定。



圖六、三個免疫計畫鴨隻血液中的抗體效價。



表一、免疫計畫 B 抗雨傘節之動物中和效價測定

		Week (s)									
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
Tanaka Unit (U/ml)	B-1sv6	—	< 20	80	400	600	600	600	600	600	600
	B-1sv7	—	< 20	20	400	600	600	600	580	600	600
				40					600		
	B-2sv8	—	< 20	20	400	600	600	600	600	580	600
				40					600		
	B-2sv9	—	< 20	20	400	600	600	600	580	600	600
				40					600		

		Week (s)							
		20	22	24	26	28	30	32	
Tanaka Unit (U/ml)	B-1sv6	600	600	600	600	600	600	600	
	B-1sv7	600	600	600	600	600	600	600	
	B-2sv8	600	600	600	600*	580	600	600	
	B-2sv9	600	600	< 580	600*	< 580	600	—	

*停止免疫 B-2sv8 及 B-2sv8

表二、抗體混合與多價抗體之動物中和測定

			Week (s)		
			16	18	20
Tanaka Unit (U/ml)	cobra	Asv1 + B-1sv6	< 360	< 360	< 360
		Csv4	280~300	380~400	440
	krait	Asv1 + B-1sv6	100	100	100
		Csv4	40~60	40~60	60~80

表三、IgY 抗體與馬血清抗體需求量比較

	馬血清抗體	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	6000 劑，每劑 1200U		
抽血或採蛋	1 匹馬每年可抽 3 次血， 每次 10L，共 30L (15L 粗血清)	各可採 180 顆蛋	
抗體純化量	3L 粗血清可精製 1L	專一性抗體有 10mg/egg，1 劑 140mg (14 eggs)	專一性抗體有 15mg/egg，1 劑 60mg (4 eggs)
需求	60L 抗血清，需 180L 粗 血清，需採 360L 血	6000 瓶抗血清， 需 84000 顆蛋	6000 瓶抗血清， 需 24000 顆蛋
飼養	360L 血/30L=12 匹馬	8.4 萬顆蛋/180 顆 蛋= 470 隻鴨	2.4 萬顆蛋/180 顆 蛋= 140 隻鴨
蛇毒用量	430mg x 12 匹馬 =5160mg	48mg x 470 隻鴨 =22560mg	4.8mg x 140 隻鴨 =672mg

表四、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 隻	470 隻	140 隻
動物一年價錢(元)	35 萬/隻 x 12 隻=420 萬 420 萬/3 年=140 萬元	20 元/隻 x 470 =1 萬	20 元/隻 x 140 =3 千
一年飼料(元)	4 萬/隻 x 12 隻=48 萬	54 萬	16 萬
一年人工水電(元)	1 萬/隻 x 12 隻=12 萬	81 萬	24 萬
動物免疫(元)	本局人力	本局人力	
採血或蛋	本局人力	由代養人員代工	
共計(元)	156.8 萬	136 萬	40.3 萬
較馬血清成本節省 之經費	—	15 %	75 %