

計畫編號：DOH94-DC-1053

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

流感疫苗研究發展先期計畫：流感疫苗先導生產整合計畫

研究報告

執行機構：財團法人國家衛生研究院 疫苗研發中心

計畫主持人：莊再成

研究人員：周文祥、陳豪勇、李敏西、冷治湘、黃元隆、胡勇誌、
張瑞原、趙欣如、黃鈴華、伍鳳碧、蕭佳欣、馮臺真、
吳佳翰、蕭安旅、王盈清、陳念慈、蔡浩鵬

執行期間：94年8月15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.....	2
※英文摘要.....	3
※前言.....	5
※材料與方法.....	8
※結果.....	13
※討論.....	17
※參考文獻.....	20
※圖表.....	22
附圖一：流感緊急應變生產線平面圖.....	22
附圖二：正壓實驗室（新型流感實驗室 1）.....	22
附圖三：負壓病毒產製區（新型流感實驗室 2）.....	23
附圖四：負壓病毒純化區（新型流感實驗室 3）.....	24
附圖五：H5N1 流感病毒不活化時程分析.....	24
附表一：GMP 及 EV71 Area 教育訓練課程表.....	25
附表二：H5N1 病毒庫儲存量.....	26
附表三(A)：各批次 H5N1 流感病毒超高速離心純化分.....	26
附表三(B)：H5N1 流感病毒超高速離心純化分析.....	27
附表四：無塵室管理、品保、廠務、品管、製程技術相關 SOP 文件列表.....	28
附表五：流感疫苗先導生產計畫 PERT Chart.....	29
附件一(A)：.....	30
附件一(B)：.....	31
附件一(C)：.....	32
附件二：.....	33

中 文 摘 要

有鑑於禽流感威脅的日益嚴重，同時我國並未具備相關疫苗生產能力，可預期一旦疫情爆發將對我國將造成極大的威脅。而本計畫執行之最終目的，在建立流感疫苗生產機制，同時執行新型流感疫苗先導生產儲備，以協助強化我國針對新型流感之防疫體系。本中心自民國 94 年 8 月 15 日開始執行此先期計畫至今，已經建置一具備 80 公升細胞培養原液產能之緊急應變生產線，並取得建築使用許可證；生產線之人員完成 GMP 與產程技術教育訓練，並接受流感疫苗接種；製程檢驗與品管人員分別自成功大學、疾病管制局流感病毒實驗室及日本感染症研究所學習並建立所需相關技術；包含了無塵室管理、品保、廠務、品管與製程相關技術之 SOP 文件正建置中；自疾病管制局取得之 H5N1 流感疫苗株 NIBRG-14 以 MDCK 細胞馴化後，利用 75T 之細胞培養皿小量生產，病毒 HA 力價可達 128 以上，同時安全性檢測顯示所使用之細胞與病毒均無黴漿菌污染；生產之流感病毒利用超高速離心純化，病毒顆粒多分佈於 30-33% 蔗糖梯度區域內；病毒以 5% 福馬林溶液 1:4000 比例處理，在 4°C 環境下作用 21 天後可達到完全不活化，惟不活化所需時間與病毒起始毒力有關。目前我們正進行小鼠動物免疫試驗與中和效價分析、疫苗佐劑配方之比較、病毒量產條件最適化、帶狀超高速離心純化最適操作條件之尋求，同時亦開始著手製備細胞種庫、病毒種庫及建立品管機制。目標自民國 95 年第二季起正式執行新型流感疫苗之先導生產，並達成未來每年最少 10 萬劑新型流感疫苗生產能力。

中文關鍵詞：新型流感疫苗，先導生產，儲備

英 文 摘 要

The epidemic of highly pathogenic avian influenza (HPAIV) caused by H5N1, which began in mid-December 2003 in the Republic of Korea and is now being seen in many Asian countries, is therefore of particular public health concern. The spread of infection in birds increases the opportunities for direct infection of humans. Indeed, there are now 135 Asian people infected by H5N1 HPAIV and 69 died already. Based on historical patterns, influenza pandemics can be expected to occur, on average, three to four times each century when new virus subtypes emerge and are readily transmitted from person to person. Therefore, experts around the world agree that another influenza pandemic is inevitable and possibly imminent. Currently Taiwan does not have any infra-structure to produce flu vaccines. If the pandemic flu does occur, then it will cause loss of human lives and economic breakdown in Taiwan. For such reasons, the goals of this project is to build up Taiwan Vaccine Manufacturing Infra-structure & Pandemic Flu Vaccine Emergency Production Capability. To this end, we started the project since August 15, 2005, and now have established a P2+ facility that could produce 80 liters of cell-culture based flu vaccine emergency production line. Staffs have been immunized with current flu vaccines and are well trained in cGMP operations. In addition, we have sent staff to be trained in National Cheng Kung University, Taiwan CDC and Japan NIID for establishing all necessary vaccine production technologies such as clean room management, QA, facility maintenance, SOPs for QC tests and viral vaccine manufacturing processes. From Taiwan CDC we obtained the current H5N1 vaccine strain NIBRG-14 and adapt it growing in MDCK cell lines. Using 75T-flask, we now can grow the virus to have HA titer of 128. We also tested the mycoplasma and found to be free of any contaminations. We now set up the down-stream purification processes, and find the virus particles are settled between 30 to 33%

sucrose-gradient under the ultra-centrifugation condition. Preliminary results indicated that we could inactivate the virus using the dilution ratio of 1:4000 of 5% formalin within 21 days at 4 °C. We are now performing mouse immunogenicity studies to evaluate the potency of the prototype H5N1 flu vaccine. Based on the new results, we will optimize the cell culture conditions, purification processes, adjuvant formulation and viral inactivation. We now also plan for the master cell bank and master virus seeds preparations, and product QC tests validation. When the pilot scale equipment arrive in the Q2/2006, we will start the pilot scale production, and hope to manufacture 100,000 doses of prototype H5N1 flu vaccine in bulk for the emergency immunization.

Keyword : Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (HPAIV), H5N1, Emergency production of prototype pandemic flu vaccine, MDCK cell lines, pilot scale.

前 言

在二十世紀期間，流感病毒曾於 1918、1957 與 1968 年造成人類三次大流行，其中 1918 年的流行甚至造成了估計約二千萬人的死亡。而自 1997 年香港爆發禽流感疫情，造成 18 人感染與 6 人死亡開始，禽類的流感病毒也正式跨過物種的界線，威脅到人類的健康，其嚴重程度已引起世界各國的關切，且至今包括香港、越南、泰國也都出現因禽流感造成之人類死亡病例。其餘出現禽類疫情但並未造成人類確定病例的國家，則包括美國、日本、南韓、印尼、柬埔寨、寮國、巴基斯坦與中國大陸等國。

根據過去三次大流行的研究顯示，流感病毒在 6 個月時間內即散播世界各大洲，並造成嚴重全球疫情，而在現今交通發達且往來頻繁的 21 世紀，若新型流感疫情真的發生，其傳播速度與所造成之損失，勢必將較過去更為嚴重。而就疾病之防疫而言，全球相當於一生命共同體，任何國家都無法置身事外。

民國 93 年 11 月 11、12 日世界衛生組織（WHO）、各國政府代表以及流感生產廠商於日內瓦針對流感大流行疫苗準備計畫召開會議，會議結論希望藉由國際合作方式募集更多基金，進而加速新型流感疫苗的研發，尤其是希望各國政府能全力支持有關新型流感疫苗相關試驗；同時 APEC 領袖會議期間，中央研究院李遠哲院長提出我國將投資兩千萬美金於流感疫苗研發之議，因此流感相關研究之推動已是刻不容緩。

目前國內尚未具備生產流感疫苗之產製技術，種種條件顯示，對於未來可能發生之新型流感疫情，可預期對我國將造成極大的威脅。而疫情一旦爆發且無法有效控制時，其所影響的範圍勢必廣及政治、

經濟與國防等各層面。有鑑於此，加速建構我國流感應變機制，包括建立疫苗生產基礎技術、建置緊急應變生產線、生產並儲備新型流感疫苗、加速推動流感相關基礎與應用性研究，確有其必要性與重要性。而本計畫的目標之一，就是建立我國流感疫苗種株製備、生產製造、製程檢驗技術，進一步執行新型流感疫苗先導生產，以建立新型流感疫苗儲備以供緊急應變使用。

目前世界衛生組織（WHO）針對禽流感病毒，已分別製備了 H5N1、H5N3、H7N1、H9N2 的疫苗候選株，其中疾病管制局 2005 年自英國 National Institute for Biological Standards and Control（NIBSC）取得了由 A/VietNam/1194/2004（H5N1）所製備出之 H5N1 流感疫苗種株 NIBRG-14，並已進行初步馴化至 MDCK 細胞培養。考量疾病管制局現有生物安全潔淨室（GMP 場所）除執行卡介苗、白喉、破傷風、蛇毒血清製劑產品生產外，另需進行細胞培養日本腦炎疫苗及細胞培養腸病毒 71 型疫苗的研發，已無適當空間將該病毒作更進一步馴化培養，或是執行先導試產建立戰備疫苗儲備，而國家衛生研究院疫苗中心除了同仁具備疫苗生產經驗、有足夠空間設置研究實驗室與緊急應變生產線、具有生物製劑工廠運作經驗之廠務部門同仁協助生產線設計規劃施工與維護，同時疾病管制局血清疫苗研製中心與國家衛生研究院疫苗研發中心在未來國家衛生研究院完成疫苗先導工廠興建與技術移轉之後，相關生物製劑之生產業務將全部移由國衛院執行；目前疾病管制局在建構流感生產線的任務中，儀器設備部分已開始陸續進行購置，包括安全操作臺、化學排煙櫃的採購已經完成，同時今年底前也將陸續進行顯微鏡、生物反應器、高速離心機、生物製劑量產級超高速離心機、快速蛋白液相層析系統、高壓滅菌

釜、量產級濃縮設備等之購置，並規劃於七月底開始陸續建置於國家衛生研究院竹南院區疫苗中心。無論是基於任務導向、防疫需求、業務移轉，甚至是疫苗發展產製資源之有效運用的理由，「流感疫苗研究發展計畫」之有效推動，對於國家衛生研究院疫苗研發中心都是責無旁貸的責任。

而本年度之計畫執行目標為「建立疫苗基礎技術」，預期執行之工作包含三大主題：一、建立流感疫苗生產機制：建置流感緊急應變生產線；二、執行新型流感疫苗先導生產：包括建立流感疫苗株病毒免疫特性與生長特性分析技術、病毒種庫馴化、疫苗種庫製備與安全性檢測、運用無血清或有血清培養基配合滾動瓶技術進行新型流感疫苗試產、建立病毒液純化精製技術、無毒化製備與檢驗、學習製程檢驗分析品管技術、撰寫初步標準操作程序書等；三、建立流感研究發展計畫專案管理機制。

材 料 與 方 法

一、新型流感疫苗緊急應變生產線建置

- 1.裝修工程：增設新隔間牆，天花板變更為暗架式矽酸鈣板天花板，室內區域採用彈性漆處理，地板增設 1 組設備基礎座，並整修復原地板、廠區新增設置皆須設置防火門。
- 2.實驗櫃檯工程：原廠區設置實驗桌拆除遷移修改，增設 PASS BOX 及洗手槽。
- 3.機電工程：修改為 GMP 專用燈具，增設用電迴路。
增設門禁管制系統，防止其他人員誤闖。
修改增設消防設備以符合法規需求。
增設洗手槽及給排水管路。
空調系統修改原廠區出回風口位置及型式，實驗室 2&3 出風口採用 HEPA 出風口，部分 BSC 及 HOOD 需接排氣風管，外排氣增設 BAG-IN 及 BAG-OUT 氣體過濾箱，並修改控制系統已達到室壓,溫度維持功能等。
- 4.實驗室工程:實驗室設備用電迴路插座工程,氣體統配管工程等.
- 5.資通訊網路佈線系統工程。

二、細胞和病毒的培養

1、細胞株的培養

Vero 細胞培養在含 4% 胎牛血清之 M199 培養基，溫度 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中。

MDCK 細胞培養在含 10% 胎牛血清之 DMEM 培養基，溫度 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中。

2、病毒的培養

培養完成之細胞中加入 TCID₅₀ 介於 10-100 之流感病毒液加以感染作病毒的繁殖，感染時培養液中添加 TPCK-treated Trypsin 酵素（最終濃度為 2μg/mL），置於 34°C 作用，出現細胞病變後收穫。

3、病毒的收取

收集培養基中之培養液，在 4°C 以 3000rpm 的離心速度去除細胞碎屑。

4、病毒的定量—TCID₅₀

將病毒以系列稀釋的方法，接種於 96 well 細胞培養盤中的 Vero 細胞與 MDCK 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE(細胞病理現象)，並經由結晶紫染色或免疫螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形，以其具 50% CPE 的最高稀釋濃度決定 TCID₅₀ 的效價。

5、病毒保存

將收穫之病毒原液添加 glycerol 至 1% 後，分裝至冷凍管內保存於 -80°C 冰箱。

6、病毒胚胎蛋接種與收穫

在雞胚蛋標明氣室及雞胚的大概位置，將雞胚蛋之氣室處的蛋殼鑿一小洞，以針筒取適當稀釋病毒液，將病毒注入尿囊腔，之後將小洞封住，於 34°C 培養二至三天後，再將蛋冷藏於 4°C over night。將氣室處的蛋殼稍微播開，以 dropper 吸取尿囊腔液體。

三、流感病毒檢驗

1、對照抗原和分離株 HA 力價測定：

以 96 孔微量測定盤進行試驗，分裝 25μL PBS 至第 2~第 12 孔 (A~H 列)，第 1 孔 (A1~F1) 分別加 50μL 分離株病毒液或對照抗原，G 及 H 列的第 1 孔不加抗原液，H 列做為血球對照用，所以 H 列第 1

孔加 50 μ L PBS。由第 1 孔開始進行 25 μ L 兩倍連續序列稀釋，稀釋之最後一孔丟棄 25 μ L，再加 25 μ L PBS 至每一孔。全盤每孔加 25 μ L 天竺鼠或火雞紅血球懸浮液，輕拍盤子使混合均勻，在室溫中放置約 40 分鐘，見血球對照孔之血球完全沉降下來即可判讀及記錄，血球與病毒（或抗原）完全凝集記為”+”，不完全凝集記為”+”，血球完全沉降者記為”-”。將盤子傾斜，觀察血球淚滴狀流下，流下之速度與血球對照相同者表示血球完全沉降。完全凝集之病毒（或抗原）最高稀釋倍數，即代表病毒（或抗原）之 HA 力價。

四、病毒之純化

1. 微過濾法（microfiltration）

利用拋棄式過濾膜（膜孔徑分別為 1.2 μ m 與 0.45 μ m），幫浦（WATSON MARLOW 505S）以 90 rpm 運轉，初步分離細胞及病毒。

2. 限外超過濾純化法（ultrafiltration）

利用切向流過濾系統，採用反覆循環過濾方式（recirculation filtration），配合分子量 30 萬（MW cutoff 300,000 regenerated cellulose）或 100 萬之過濾卡匣（cassette），以每分鐘 0.2 公升之流速，濃縮病毒及清除病毒雜質液。

3. 超高速離心法

以 Beckman L8-60M 超高速離心機（rotor:SW40Ti）操作。配置 20、30、40、50% 等四種濃度之蔗糖溶液，充填至離心管內（每種梯度約 3.1mL），放置 37 $^{\circ}$ C 靜置 1 小時，之後抽取流感病毒濃縮液 0.5mL 加至離心管內，在 4 $^{\circ}$ C 下，30000rpm 離心 90 分鐘。選取病毒存在區域，將蔗糖溶液以透析方式置換為磷酸緩衝液，測定 HA 或

TCID₅₀。

五、病毒不活化

以 0.9% NaCl 溶液將甲醛溶液稀釋至濃度 5%，再以 1:4000 的比例分別滴入以雞胚胎蛋培養出之 H5N1 病毒 (HA titer=64/50 μ l) 及細胞培養出之 H5N1 病毒 (HA titer=16/50 μ l) 病毒液中，於 4°C 下震盪，進行病毒之不活化反應。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。

六、動物免疫與血清收集

將不活化完成之 H5N1 病毒 (以 0.9% NaCl 溶液將 HA titer 調整為 16/50 μ l)，第一週先以與病毒同體積之 Freund's complete adjuvant 當作佐劑，混合均勻後，分別以皮下注射方式免疫 10 隻 12-14 克重之 ICR 小鼠，第三週再以與病毒液同體積之 Freund's incomplete adjuvant 當作佐劑，混合均勻後，以皮下注射方式免疫小鼠，第四週再以心臟抽血的方式採血。將所取得之小鼠血以 3,000 rpm、10 分鐘離心收集血清，將其混合，以 30 分鐘、56°C 水浴不活化血清，保存於 -20°C。

七、黴漿菌污染檢測

使用 PCR Mycoplasma Detection Set 檢驗套組：PCR Mycoplasma Detection Set cat.# 6601 (from TaKaRa Bio Inc.)

第一次 PCR 在微量離心管中將試劑混合至總體積 100 μ L，包含反應液 (含 H₂O 69.5 – 79 μ L、10x PCR Buffer 10 μ L、dNTP Mixture 8 μ L、MCGp F1 Primer 1 μ L、MCGp 1 μ L、R1 PrimerTaq polymerase 0.5 μ L) 及 0.5-10 μ L 樣品，並將所有微量離心管進行 PCR 熱循環；第二次

PCR 在微量離心管中將反應液（含 H₂O 78.5μL、10x PCR Buffer 10μL、dNTP Mixture 8μL、MCGp F1 Primer 1μL、MCGp 1μL、R1 PrimerTaq polymerase 0.5μL）及 1μL 的 1st PCR 樣品混合至總體積 100μL，並將所有微量離心管進行 PCR 熱循環。之後以電泳分析擴增後的產物，取 10μL 的 1st 和 2nd 產物進行膠電泳分析以洋菜膠電泳核對 PCR 的產物及片段大小。1%洋菜電泳膠分析 1st 的 PCR 產物，2-4%洋菜電泳膠分析 2nd 的 PCR 產物。此套組可偵測 11 種 *Mycoplasma* (*M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum*) 和 1 種 *Ureaplasma* (*U. urealyticum*)。

結 果

一、流感緊急應變生產線建置與管理

流感緊急應變生產線係建置於本中心 7 樓實驗區，包含一間正壓實驗室與二間負壓實驗室（附圖一）。正壓實驗室（新型流感實驗室 1）主要規劃為流感病毒接種前之細胞培養操作用，設置了包括滾動瓶恆溫培養箱、二氧化碳培養箱、無菌操作臺、顯微鏡、離心機、冰箱等設備（附圖二）；負壓病毒產製區（新型流感實驗室 2）主要規劃為流感病毒之接種與量產用，設置了包括滾動瓶恆溫培養箱、無菌操作臺、顯微鏡、離心機等設備，本產製區域之批次病毒最大產能可達 80 公升以上（附圖三）；負壓病毒純化區（新型流感實驗室 3）主要規劃為流感病毒之純化精製用，設置了包括無菌操作臺、全排氣化學層流台、量產級超高速離心機等設備（附圖四），其中由於量產級超高速離心機為廠商接單後製造，預計明年第二季初可完成安裝測試，因此現階段已規劃利用實驗室級離心機搭配 zonal rotor 暫時替代使用。

目前該生產線已取得使用許可證（附件一），針對 H5N1 病毒株之使用安全亦通過本院生物安全委員會審議通過（附件二）；所有生產線相關人員已完成 GMP 教育訓練、產程技術教育訓練（附表一），並接受流感疫苗接種；無塵室環境管理與製程操作 SOP 亦陸續建立完成。

二、病毒種庫馴化、疫苗種庫製備與安全性檢測

在病毒馴化上，我們使用了包括 Vero 細胞與 MDCK 細胞，兩種細胞均通過黴漿菌污染測試，同時 MDCK 細胞來源包含由疾病管制局以及食品工業研究所取得。實驗結果顯示，利用 Vero 細胞小量生產 H5N1 疫苗株 NIBRG-14，經過 2 次馴化操作，病毒力價 HA 小於 2；利用 MDCK 細胞小量生產 H5N1 疫苗株 NIBRG-14，經過 3 次馴化操

作，病毒力價 HA 可達 256。目前所有收穫之病毒液均添加 glycerol 後冷凍儲存，同時均已利用 PCR 方法確立並無黴漿菌污染（附表二）。

我們將於明年第一季前製備細胞母種庫 Master Cell Bank（ $5-10 \times 10^5$ cell / vial）至少 100 支，以及病毒母種庫 Master Virus Bank（HA $\geq 128 / 0.05\text{mL}$ ）至少 100 支，以利於後續產程規劃，以及疫苗量產之使用。

三、流感疫苗株病毒免疫特性與生長特性分析技術

有關病毒免疫特性分析方面，我們規劃將小鼠以不活化之病毒免疫採血後，利用中和試驗或 HI test 分析。目前免疫之抗原已經利用油質佐劑配方後，由皮下注射 ICR 小鼠，初步規劃以間隔 2 週免疫補強再隔週採血之時程進行，中和試驗結果預計於明年一月第一週完成。同時有關鋁鹽佐劑與 CpG 佐劑配方之免疫特性分析試驗預計於明年第一季完成。

生長特性分析攸關於病毒量產時之接種劑量與收穫時程，目前我們正進行不同病毒接種力價之比較，並以生產病毒之 TCID₅₀ 力價與 HA 力價作為評估指標。連續試驗結果顯示，在 T75 之培養皿中以病毒力價（TCID₅₀）約 10-100 進行接種，4 天時間收穫病毒之 HA 力價可達 128 以上。目前以細胞培養小量產製之結果，病毒力價（HA）最高為 256（附表二）。

四、運用無血清或有血清培養基配合滾動瓶培養技術進行新型流感疫苗試產

由於 MDCK 細胞以胰蛋白酶處理不易，因此如何有效增量以利於繼代培養，是進入量產之重要關鍵。現階段我們仍嘗試以含有 FBS 之血清培養基建立滾動瓶細胞生長條件與進行繼代培養。初步結果發

現在 850cm² 的滾動培養瓶以 2x10⁶cells/400ml 的接種量培養 4 天後，細胞分佈約達 8 分滿，為繼代培養之最適條件。

五、建立病毒液純化精製技術

有關 H5N1 流感病毒之純化，目前是利用胚胎蛋生產之病毒液加以濃縮後，以實驗室級超高速離心機，配合 swinging bucket rotor，以 20-50% 蔗糖梯度 120000g 的重力條件來尋求最適操作條件。利用糖度計與 HA test 的分析結果顯示，連續五次純化操作，H5N1 流感病毒顆粒多分佈於 30-33% 蔗糖梯度區域內（附表三）。

六、無毒化製備與檢驗

目前有關 H5N1 流感病毒之不活化，我們採用 5% 福馬林處理，添加濃度為 1：4000，經稍加混合後便靜置於 4°C 冰箱內。病毒來源分別包括胚胎蛋與細胞培養產製之病毒液。初步結果顯示，在經過至少 21 天處理之後，病毒力價均降至 0，惟不活化所需時間與病毒起始毒力有關（附圖四）。

七、學習製程檢驗分析品管技術

為配合流感疫苗先導生產計畫之執行，本中心除派遣相關同仁至成功大學與疾病管制局研究檢驗中心病毒實驗室學習與建立 HA、HI、IFA、real-time PCR、TCID₅₀ 等檢驗分析技術外，並於 11 月中旬派遣同仁至日本國立感染症研究所研習安全性試驗 (leukocyte-decreasing test) 與效價試驗 (SRI test) 技術。目前初步 SOP 已陸續建置完成，相關之儀器設備材料預計於明年第一季建置完成。

八、撰寫初步標準操作程序書

有關製程相關 SOP 文件，目前已陸續建立完成。主要包含了無塵室管理（包含服裝、環境、儀器）、品保、廠務、品管、製程相關技術

等部分。內容詳見表四。

九、流感研究發展計畫專案管理

原專案管理之規劃，是協助疾病管制局辦理流感疫苗研究發展計畫相關行政管控事宜，惟基於業務之區隔與權責之劃分，專案管理之標的改為主要針對本新型流感疫苗先導生產計畫。其主要功能除辦理一般行政事物、召開定期會議、目標追蹤外，並訂立工作時程表。有關本計畫之執行時程規劃 Program Evaluation and Review Technique Chart (PERT Chart)如附表五。

討 論

1997 年以來陸續爆發之禽流感疫情，已經對全世界造成生命安全的威脅。由於我國目前之研發能量並未有效投入流感相關研究，國內亦未具備生產流感疫苗之產製技術，因此對於未來可能發生之新型流感疫情，預期將對我國將造成極大的威脅。而「流感疫苗研究發展先期計畫：流感疫苗先導生產整合計畫」之執行目標，主要目標就是希望建構我國對於新型流感疫情之應變機制。儘管本計畫屬於先期計畫性質，執行期間自民國 94 年 8 月 15 日至 12 月 31 日止，然而延續之最終執行目標有二：(一) 建立流感疫苗生產機制：包含建置流感緊急應變生產線，製備疫苗生產用細胞與病毒種株庫，建立生產製造、製程檢驗之技術與人力；(二) 執行新型流感疫苗先導生產：針對 H5N1 新型流感執行疫苗先導試產，以達成每年至少生產 10 萬劑之疫苗儲備(每劑含 HA 15 μ g)。在時程規劃上，我們計畫在民國 95 年第二季時完成所有產程之開發，同時建立初步疫苗安全性與動物試驗報告，自民國 95 年第三季起開始進行疫苗原液之先導生產儲備。

有關緊急應變生產線之建置，原則是依據細胞培養製程來設計，同時目前該生產線已經具備生產純化 1 公升量產原液之規模。而配合產程開發期程自小量試產(95 年 4 月前)至大量生產(95 年 5 月起)之階段規劃，所需之量產級設備將於明年 4 月底前完全設置完成。此外，由於目前世界各大藥廠多仍以成熟、已長期使用之胚胎蛋製程技術生產新型流感疫苗及季節性三價流感疫苗，考量目標之達成與風險管理，本中心已與疾病管制局血清疫苗研製中心合作進行胚胎蛋製程之產製規劃，同時亦安排相關同仁學習胚胎蛋孵化、病毒接種、採收、處理等相關技術，不過現階段受限於場所尚未裝修與所需相關儀器設備尚未建置，因此最快於明年第一季才能夠正式試產。

有關產程開發上，原規劃使用已完成確效且廣泛使用於小兒麻痺疫苗與狂犬病疫苗產製用的 Vero 細胞株，惟依據病毒馴化結果顯示，該細胞並無法有效生產出高 HA 力價之 H5N1 流感病毒疫苗株 (HA 力價 <2)，同時利用 MDCK 細胞作為宿主時，產生之 H5N1 流感疫苗株力價可達 128 以上，因此我們選擇 MDCK 細胞作為疫苗生產用細胞株，同時我們將於明年第一季完成細胞與病毒種庫之製備與病毒種庫抗原安定性分析；量產技術方面，由於本中心具有細胞培養腸病毒 71 型與細胞培養日本腦炎疫苗開發與產製之經驗，因此我們規劃沿用相同之滾動瓶產製技術進行量產。不過同時我們也已開始進行生物反應器技術之開發，期待藉由提升單位體積之細胞密度，提升單位體積之病毒產率；培養基選擇上，我們現階段仍沿用含有 FBS 血清之 DMEM 培養基，不過我們亦已篩選出兩種具有發展潛力之無血清培養基，因此有關未來量產用培養基之選擇，我們將利用 3 個月的時間作確認，分析評估指標包含細胞生長、生產病毒效價、經濟成本效應等；病毒純化上沿襲已廣泛使用之超高速離心技術，目前由小量純化結果已確立最適之蔗糖梯度，進一步我們將嘗試應用樣品操作體積較大之帶狀超高速離心(zonal centrifugation)方式進行，同時帶狀超高速離心也是我們規劃未來正式量產時使用之純化技術；有關疫苗劑型方面，我們計畫將病毒加以不活化後，利用 ICR 小鼠免疫採血分析，由鋁鹽佐劑與 CpG 佐劑中挑選較佳之配方，所需之不活化病毒原液將於 2005 年底製備完成，動物試驗初步結果預計於 2006 年第一季完成；另有關疫苗品管方面，主要包括品管技術建立與標準品試劑之取得。針對技術而言，目前已建立包含製程相關之 real-time PCR、HA、IFA、TCID₅₀，與效價分析相關之 SRI test、HI test，以及與安全性相關之 leukocyte-decreasing test 等等，而由於我們所使用之 H5N1 病毒疫苗株 NIBRG-14 是由英國 NIBSC 製備，因此檢驗用標準抗原

以及抗血清試劑部分，我們已向英國 NIBSC 進行採購。

有關疫苗儲備部分，我們規劃自民國 95 年第三季起正式先導生產，目標為達成每年至少 10 萬劑疫苗產能(每劑含 HA 15 μ g)。產製技術之使用包括細胞培養與胚胎蛋製程，其中細胞培養以批次產能 80 公升以上為目標，胚胎蛋製程之批次產能則規劃至少 300 顆蛋以上。儲備型式為經純化之不活化全病毒疫苗原液，所有量產批次均必須通過相關安全性與效價之品管測試。

最後，為達成協助建立我國對於新型流感應變機制之目標，本中心除將盡力完成相關製程開發與先導生產儲備之任務之外，同時已規劃與長庚大學施信如教授與疾病管制局流感病毒實驗室合作，建立反基因流感疫苗種株製備技術 (reverse genetic technology)，使我國對於未來隨時可能爆發之新型流感疫情，能夠真正具備完整之自我應變能力。

參 考 文 獻

1. Nicolson C, Major D, Wood JM, Robertson JS. (2005). Generation of influenza vaccine viruses on Vero cells by reverse genetics: an H5N1 candidate vaccine strain produced under a quality system. *Vaccine*. Apr 22;23(22):2943-52
2. Avian influenza: assessing the pandemic threat. World Health Organization. 2005
3. Bruhl P, Kerschbaum A, Kistner O, Barrett N, Dorner F, Gerencer M. (2000). Humoral and cell-mediated immunity to vero cell-derived influenza vaccine. *Vaccine*. Dec 8;19(9-10):1149-58.
4. Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. (1999). Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. *Dev Biol Stand*. 98:101-10. discussion 111.
5. Kistner O, Barrett PN, Mundt W, Reiter M, Schober-Bendixen S, Dorner F. (1998). Development of a mammalian cell (Vero) derived candidate influenza virus vaccine. *Vaccine*. May-Jun;16(9-10):960-8.
6. Presentations for the Informal meeting of WHO on Influenza Pandemic Vaccines. Nov 2004
7. WHO guidance on development of influenza vaccine reference viruses by reverse genetics. Global Influenza Programme, World Health Organization, Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. 2005
8. Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases. Standing Committee on Agriculture and Resource Management. Victoria, Australia. 1993.
9. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health. 1997.
10. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Global

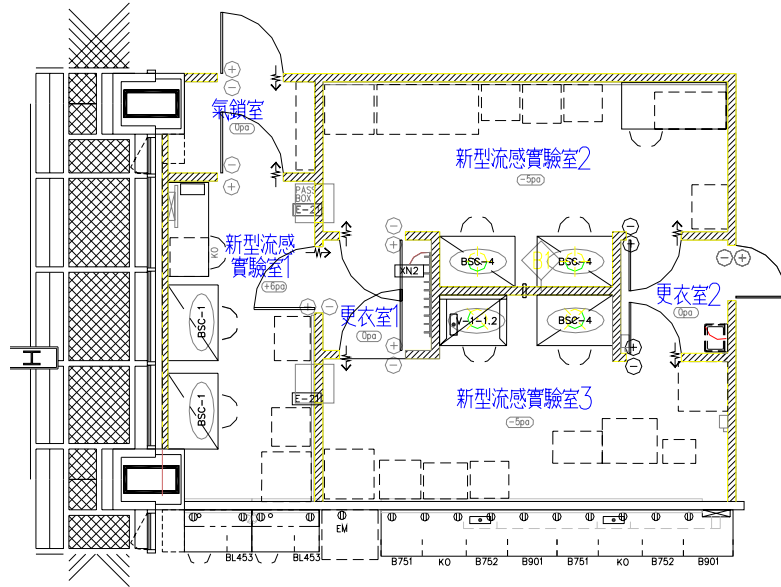
Influenza Programme, World Health Organization, Department of Communicable Diseases Surveillance and Control, Switzerland. 2002.

11.NOTE FOR GUIDANCE ON HARMONISATION OF REQUIREMENT FOR INFLUENZA VACCINE. Human Medicines Evaluation Unit. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 12 March 1997

12.M.C. GUTIERREZ, D.M. DIAZ-PONTONES, M.R. LOPEZ VANCELL and G. BEATY (1988). Culture of an epithelial cell line (MDCK) with a serum substitute. *Biology of the Cell*, 62 : 241-245.

圖 表

附圖一：流感緊急應變生產線平面圖



附圖二：正壓實驗室（新型流感實驗室1）



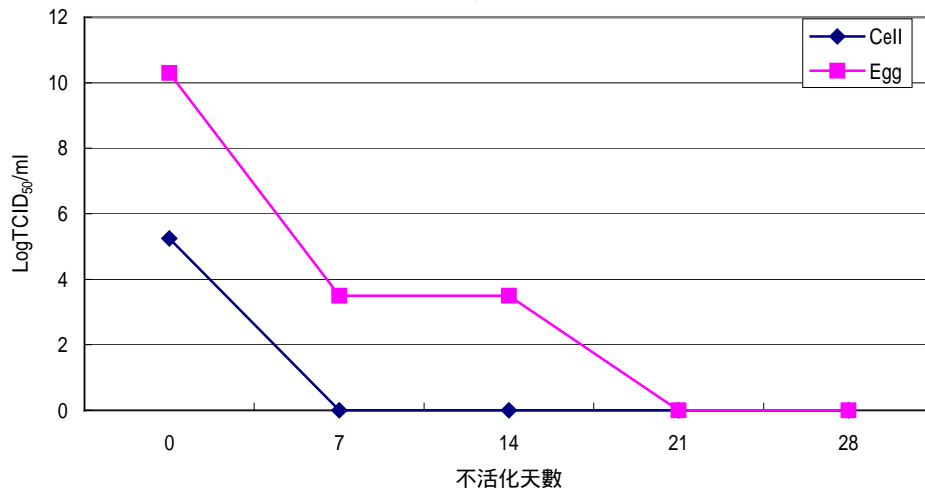
附圖三：負壓病毒產製區（新型流感實驗室 2）



附圖四：負壓病毒純化區（新型流感實驗室3）



附圖五：H5N1 流感病毒不活化時程分析



1. 利用細胞培養與胚胎蛋培養方式所產製之病毒，粗收穫病毒之 HA 力價分別為 16、64，TCID₅₀ 感染力價則分別為為 $10^{5.25}$ 與 $10^{10.3}$ 。
2. 細胞培養與胚胎蛋培養之 H5N1 流感病毒在 4°C 條件下添加 1/4000 體積之 formalin 加以作用，病毒活性分別於第 7、21 天達到完全不活化（TCID₅₀ 感染力價降為 10^0 以下）。

附表一：GMP 及 EV71 Area 教育訓練課程表

日期	時間	講課內容	主講人	地點	備註
10/19 (三)	10:00	CDC 疫苗中心簡介及環境介紹 (EV71 工作簡介)	蔡浩鵬	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
10/20 (四)	10:00	GMP 作業簡介	張瑞原	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
10/20 (四)	14:00	潔淨室服裝管理	羅宜雯	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
10/25 (二)	14:00	製造前準備及無菌操作說明	鄭佳瑋	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
10/28 (五)	10:00	環境管理及清潔	陳沛玲 郭孟欣	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
11/2 (三)	10:00	環境監測(落塵及微生物)	陳京瑤	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
11/2 (三)	10:00	滅菌釜及廢棄物處理	張正鵬	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
11/2 (三)	10:00	病毒純化系統簡介	張瑞原	CDC 疫苗中心 3樓會議室	
11/3 (四)	14:00	動物管理與實驗說明	胡門興 張正鵬	CDC 動物房	
		實作課程			
10/31(一) 11/1 (二)	9:00	細胞及病毒培養簡介與實作	鄭佳瑋	CDC 疫苗中心 四樓潔淨室	
10/31(一)	9:00~17:00	病毒濃縮系統簡介及實作	郭孟欣	CDC 疫苗中心 四樓潔淨室	
11/2 (三)	14:00	病毒純化系統實作	張瑞原	CDC 疫苗中心 四樓潔淨室	
10/31(一) 11/1(二)	14:00	檢測系統實作-TCID50	陳京瑤	CDC 疫苗中心 四樓潔淨室	
11/1(二) 11/2(三)	15:00 14:00	檢測系統實作-中和試驗	陳沛玲	CDC 疫苗中心 四樓潔淨室	
11/1(二)	10:30	產品檢測實作-ELISA	呂亞蓉	CDC 疫苗中心 2樓實驗室	
11/3 (四)	14:00	小鼠實驗實作	張正鵬	CDC 動物室	

附表二：H5N1 病毒庫儲存量

細胞	來源	病毒種類	病毒代數	使用 細胞代數	HA 力價	LogTCID ₅₀ /ml	mycoplasma	存量 (0.5mL/vial)
MDCK	NHRI	NIBRG14	1 (CDC 研檢中心)	N+ ?	16	5.25	No	—
			2	60	2	5.75	No	6
			3	64	256	待測	No	30
	CDC	NIBRG14	1 (CDC 研檢中心)	N+ ?	16	5.25	No	—
			2	N+2	128	7.25	No	6
			3	N+5	64	待測	No	30
Vero	CDC	NIBRG14	2	134	<2	待測	No	6

來源為 NHRI 之 MDCK 細胞是自食品工業研究所購得(原始為 155 代);來源為 CDC 之 MDCK 細胞尚未查證繼代數，因此其來源代數與繼代數暫以 N 與 ? 表示。

附表三(A)：胚胎蛋培養各批次 H5N1 流感病毒超高速離心純化分析

Sample name Fraction name	11/9	11/9	11/16	11/30	12/7
	HA titer / 50 μ L				
尿黃囊原液	128	32	32	16	64
尿黃囊原液濃縮	>4096	>4096	1024	1024	2048
Sample zone	256	256	128	64	32
20% sucrose fraction					256
30% sucrose fraction	1024	1024	>4096	512	2048
40% sucrose fraction	512	256	256	32	1024
50% sucrose fraction	16	32	32	2	64
60% sucrose fraction	<2	64	64	<2	

Sample Zone 以及各 sucrose fraction 表示依執行超高速離心前各樣品之分佈區域進行採樣。

附表三(B)：H5N1 流感病毒超高速離心純化分析

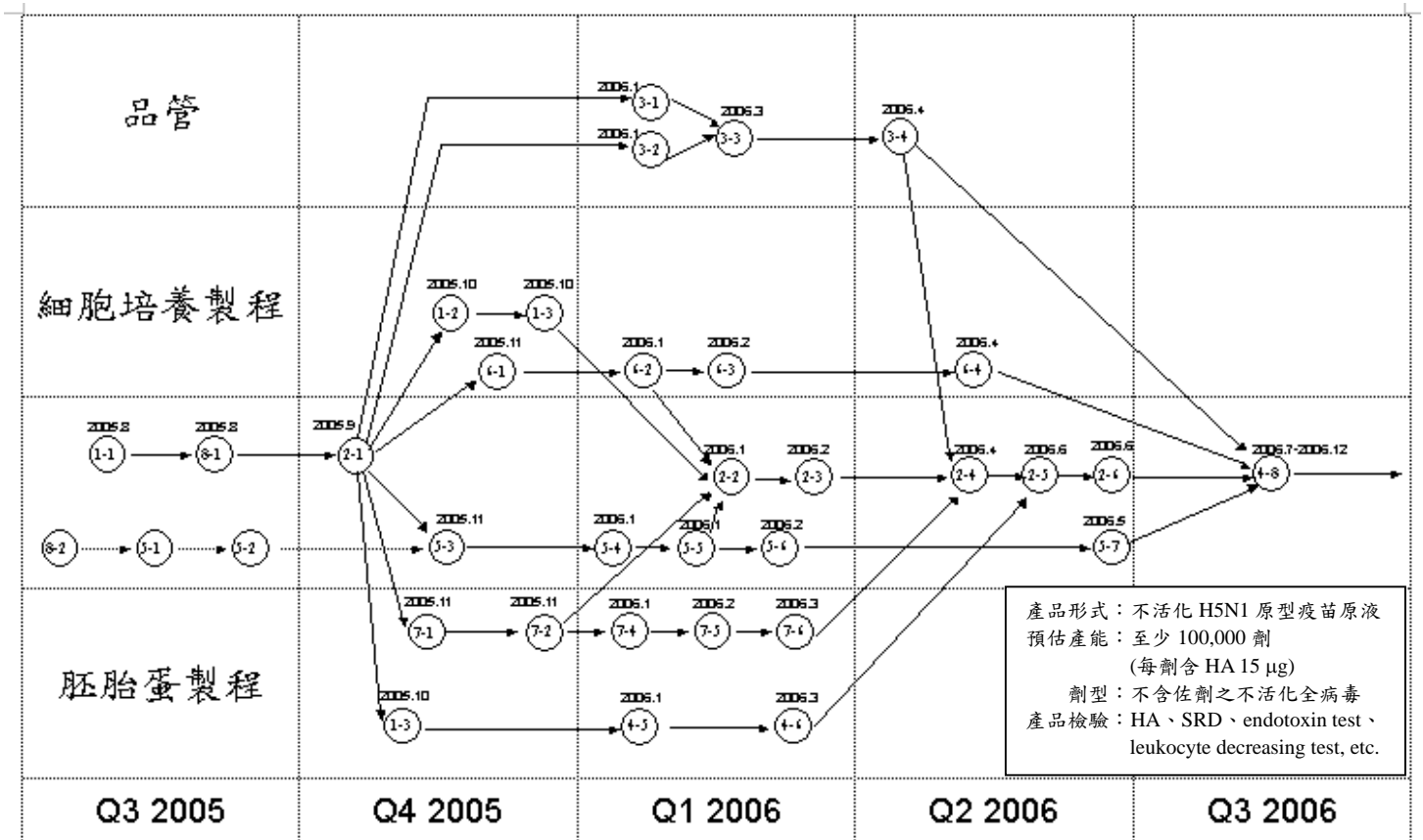
檢驗批次	Sample	HA titer/50 μ L	Sucrose%(w/w)	Volumn(mL)
11/30	雞胚原液	16		25
	原液濃縮	1024		0.36
	Sample zone	64		0.3
	Fraction 1	512	32.20%	3
	Fraction 2	32	40.90%	3
	Fraction 3	2	51.50%	3
	Fraction 4	<2	58.90%	3
12/7	雞胚原液	64		25
	原液濃縮	2048		0.4
	sample zone	32		0.34
	Fraction 1	256	20.80%	3
	Fraction 2	2048	31.50%	3
	Fraction 3	1024	40.70%	3
	Fraction4	64	49.80%	3

自 Sample Zone 至 fraction 1-4 表示自超高速離心管上方至下方之採樣區域。

附表四：無塵室管理、品保、廠務、品管、製程技術相關 SOP 文件列表

服裝	儀器
P2+實驗室服裝管理	80 度冰箱清潔紀錄表
進入一萬級更衣室須知	4 度冰箱
離開緩衝是須知	4 度冰箱使用紀錄表
進入十萬級更衣室須知	4 度冰箱清潔紀錄表
離開十萬級更衣室須知	Roller bottle incubator
一萬級實驗室服裝基準	Roller bottle incubator 使用紀錄表
十萬級實驗室服裝基準	Roller bottle incubator 清潔紀錄表
人員進出路線圖	Chemical hood
環境	Chemical hood 使用紀錄表
P2+實驗室管理作業程序	Chemical hood 清潔紀錄表
清潔作業	(QA)
十萬級區清掃紀錄表	員工作業衛生規範
一萬級區清掃紀錄表	(廠務)
75%酒精	環境之溫濕度及壓差管理範圍
1.5%衛康	(QC)
0.6%萊舒	微塵測量計數器
儀器	空氣微生物採樣器
高壓滅菌器	人員表面微生物測試
高壓滅菌器使用紀錄表	人員表面微生物測試紀錄表
高壓滅菌器清潔紀錄表	P2+實驗室環境測定
層流工作檯	P2+實驗室落下菌測試
層流工作檯使用紀錄表	落下菌測定紀錄表
層流工作檯清潔紀錄表	工作台表面微生物測試
離心機	工作台表面微生物測試紀錄表
離心機使用紀錄表	空中浮游菌測試
離心機清潔紀錄表	空中浮游菌測試紀錄表
恆溫培養箱	製程相關
恆溫培養箱使用紀錄表	MDCK 細胞種庫之建立
恆溫培養箱清潔紀錄表	MDCK 細胞繼代培養(小量培養)
恆溫水槽	MDCK 細胞繼代培養(細胞滾動培養瓶)
恆溫水槽使用紀錄表	H5N1 流感病毒之接種與收穫(小量培養)
恆溫水槽清潔紀錄表	蔗糖密度梯度超高速離心
顯微鏡	HA assay
顯微鏡使用紀錄表	TCID ₅₀
顯微鏡清潔紀錄表	效力試驗 (SRI test)
80 度冰箱	安全試驗 (Leukocyte-decreasing test)
80 度冰箱使用紀錄表	

附表五：流感疫苗先導生產計畫 PERT Chart 與各工作編號之說明



1. 人員訓練	2. 產製技術建立	3. 品管技術建立	4. 生產線建立	5. 病毒種株建立	6. 細胞株建立	7. 胚胎蛋來源	8. 預算支應
1-1 需求人力評估	2-1 製造技術開發	3-1 品管技術移轉訓練	4-1 產程規劃	5-1 P3 實驗室建立	6-1 確立細胞株	7-1 確立胚胎蛋規格	8-1 先導生產計畫
1-2 cGMP 訓練	2-2 實驗室試製	3-2 儀器設備建置	4-2 設備需求確認	5-2 疫苗株製備技術建立	6-2 建立細胞種庫工作庫	7-2 尋找供應商	8-2 其他預算
1-3 細胞培養產程訓練	2-3 儀器設備建置	3-3 SOP 建立	4-3 圖面設計	5-3 疫苗株篩選與製備	6-3 細胞生長特性分析	7-3 設立專責廠房	8-3 建廠經費補助
1-4 胚胎蛋產程訓練	2-4 小量試製	3-4 試劑與標準品建立	4-4 建築執照申請	5-4 生長與抗原特性分析	6-4 執行細胞庫確效作業	7-4 確立運送供應機制	
	2-5 大量試製		4-5 施工建造	5-5 建立病毒疫苗株種庫		7-5 建立廢棄物處理機制	
	2-6 SOP 建立		4-6 儀器設備建置	5-6 建立疫苗株保存機制		7-6 簽定長期供應契約	
			4-7 生產線試車確效	5-7 執行病毒庫確效作業			
			4-8 正式先導量產				
			4-9 疫苗量產				

附件一(A)：

副本

科學工業園區管理局 函

300 新竹科學工業區新安路3號
受文者：本局建管組(含合格證明本)

發文日期：中華民國94年11月16日

發文字號：國建字第0940031411號

送別：

管等及解密條件或保密期限：

附件：如說明


主旨：貴院申請(94)科工(竹)用字第037號建築使用執照室內裝修竣工查驗案，業經專業技術人員簽證負責符合建築法等有關規定，准予發給室內裝修合格證明，請查照。

說明：

一、復 貴公司94年11月11日申請書。

二、申請地址(位置)如下：苗栗縣竹南鎮科研路35號B棟7樓(面積：174.62平方公尺)。

三、本案所附資料若有不實，將由 貴院自行承擔法律責任，若違反相關法令規定或事後變更者，依行政程序相關規定，本局保留本案行政處分之廢止權。

四、隨函檢送建築物室內裝修合格證明乙份。(合格證明字號：(94)科工(竹)裝修字第050號)。

正本：財團法人國家衛生研究院

副本：許芳吉建築師事務所、昇合營造有限公司、本局建管組(含合格證明本)

局長 李 昇 木

本局核發負責處定
建築專業主管決行

附件一(B)：

Flom: 五福 / 利國下 建築物室內裝修合格證明 E1 - 8

申請人：財團法人國家衛生研究院

建築物室內裝修位置：苗栗縣竹南鎮科研路 35 號(研究大樓 7 樓疫苗中心)

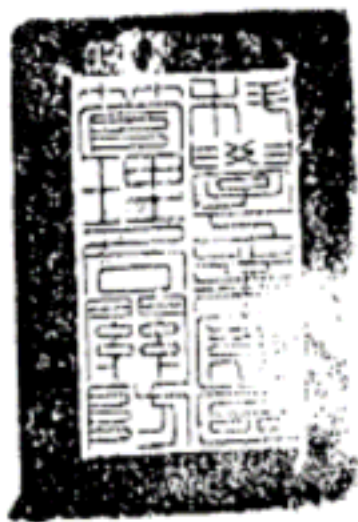
建築物室內裝修設計廠商：許常吉建築師事務所

建築物室內裝修施工廠商：昇合營造有限公司

審查機關：科學工業園區管理局、苗栗縣消防局

查驗人員：徐仁璋、謝文治

發證機關：科學工業園區管理局



中華民國 91 年 11 月 8 日

註：本合格證明依內政部訂頒建築物室內裝修管理辦法核發。

附件一(C)：

建築物室內裝修要表				
樓 地 板 面 積 備	第 等	天花板、分間牆 防火門	111.62	實驗室
	層			
	層			
	層			
	層			
	層			
	層			
	層			
	層			
	總 計		174.62	
	1. 建築物使用執照號碼：(84)科五(特)用字第 037 號 2. 收文日期及文號：84.11.11. 0940031411。			

附件二：

國家衛生研究院環境安全委員會生物安全小組
生物材料使用申請同意書

申請單位：疫苗研究發展中心

計畫主持人：莊再成

職稱：中心主任

聯絡地址：國家衛生研究院竹南院區研究大樓七樓

聯絡電話：037-246166 分機：37701

研究計畫名稱：新型流感疫苗開發

申請品名：流感病毒 H5N1 (低致病性)

申請用途：檢測藥物對不同病毒典型之藥性反應

其生物安全等級： P1 P2 P3 P4

進行本研究所需之安全等級： P1 P2+ P3 P4

進行本研究之實驗室：研究大樓(一)七樓流行病毒實驗室 (Lab 71110、71111、71112、71113、71114、71115)

業已向疾管局索取 100 顆克流感，以備不時之需

國家衛生研究院環境安全委員會生物安全小組查覈欄

本項生物材料申請暨實驗查覈結果： 同意進行 不同意進行

附意見(無者免填)

環境安全委員會生物安全小組負責人(或查覈人)簽名：吳素全

中華民國 94 年 11 月 3 日