

行政院衛生署科技研究發展計畫報告

年 度：八十六

計畫名稱：疫苗副作用及製作技術之研究改進—日本腦炎疫苗製程之改進

Improvement of the Production Process for
Japanese Encephalitis Vaccine

計畫編號：DOH86-TD-047

執行機構：行政院衛生署預防醫學研究所

主 持 人：周如文 簽 名：

填報日期：民國八十六年八月十五日

摘要

綜觀國內外日本腦炎疫苗的製造，歷來是以病毒感染鼠腦後，採集發病的鼠腦，經純化後，再以福馬林祛除病毒感染力，最後添加防腐劑及保存劑，製成疫苗原液。唯以此流程產製之疫苗，殘存蛋白質量偏高，且抗原性流失率高，易造成接種副作用與疫苗品管問題，經濟效益差。因此，本研究積極研發日本腦炎病毒純化技術，進一步精製病毒。目前，已完成限外超過濾法(ultrafiltration)運用於病毒純化並供量產的可行性評估。將以Pellicon限外超過濾系統配合300kDa濾膜，使用15psi壓力差進行病毒純化。新製程所獲得之原液，其蛋白質殘存量僅為舊製程之11.2%，單位抗原純度增加5倍，效率增進顯著。

關鍵詞：日本腦炎疫苗，限外超過濾法，病毒純化

Abstract

Infected mouse-brain is the main source of Japanese encephalitis (JE) vaccine with the advantage of high virus titer. Even though the homogenized mouse-brain viral suspension was purified by a sequence of centrifugation alcohol/ protamine sulfate precipitation and formalin inactivation at 4°C, the residual proteins from tissue remain high. It not only create quality control problems but also cause side-effect after vaccination. The minimum requirement of WHO specify minimum immunogenicity and potency in mice and maximum total protein (80mcg/ml). Bulk vaccine has to be diluted by PBS to meet a protein limit that will have the probability of poor potency. In order to tackle above limitations, a new method has to be innovated and incorporated into conventional JE production process to further refine the purification process, for decreasing the protein content, eliminating side-effect and for increasing the immunogenicity of the vaccine. In the first year period, a proper Pellicon ultrafiltration system with 3000Kda cut-off membrane has been chosen and standard operation procedures have been established. The production efficiency and yield are comparable to original production processes with 5-fold increased in antigen purity.

傳染病的防治為世界各國共同的課題，民國63年世界衛生組織推動「擴大預防接種計畫」，使得全球有80%兒童接受EPI的接種保護。但因傳統疫苗使用上的限制，如疫苗本身的安定性、接種的效果等，促使民國63年完成「兒童疫苗振興計畫」以改善此等問題。其中強調新一代疫苗除了應以新穎的生物科技開發新的疫苗外，更需提昇現有疫苗的品質、疫苗的供應及疫苗使用後效益的監測。同年十二月，世界衛生組織更在日內瓦召開「疫苗研發的前提與兒童疫苗振興計畫」會議，提出理想疫苗的藍本：接種方式簡便化，保護效果良好，熱安定性高，冷藏運送過程減少且副作用小。

日本腦炎(Japanese encephalitis, JE)是西太平洋地區夏季(5-9月)重要之傳染性病毒流行病之一。其為人畜共通疾病(1)，豬是主要之增幅動物(2)，藉由病媒蚊傳播病毒(3)。引致發熱、腦膜及腦神經等病變。台灣的首個病例發現於1935年(4)，1938年由「流行性腦炎」病患中分離出病毒。1955年，開始公共衛生上病例之統計。1967年由台灣血清疫苗研究製造所(即現今行政院衛生署預防醫學研究所之前身)，自製生產由鼠腦感染病毒後純化之不活化疫苗。1968年始，兩歲幼童開始全面性JE疫苗接種。自從JE疫苗納入台灣地區常規接種時程後，疾病盛行率在1975年後驟減，奠定日後JE防治之基石。日本腦炎疫苗接種至今仍是最有效的防疫方式，質優且價廉的疫苗是為此疾病防治之利器。本計畫的宗旨即在改善傳統疫苗的製法，提高疫苗效價減少副作用，以達理想疫苗的目標。

緣於鼠腦可取得力價高之病毒，現今日本腦炎疫苗之製造以感染病毒之鼠腦為主要原料。但由於精製後之疫苗原液，蛋白質殘存量多且成份相當複雜，副作用問題頗為棘手。多年來已發展出多種方法以改良病毒純化製程，如：魚精蛋白沉澱法(5,6)，鹵化碳處理(7)，酒精沉澱法(8)，polyethylene glycol沉澱法(9)，磷酸

鋁管柱分析法（10）及蔗糖梯度離心法（11）等，其中部分方法運用於純化病毒時鼠腦成份之祛除。此等方法，或是蛋白質殘存量仍多或是處理步驟繁複，效果普遍差強人意。至於我國日本腦炎疫苗之製造，歷來是以病毒感染鼠腦後，採集發病的鼠腦，經均質化、離心、添加酒精/魚精蛋白使大部分蛋白質沉澱後，以福馬林除去病毒感染力，最後添加防腐劑（硫柳汞）及保存劑，成為疫苗原液。雖經稀釋以符合世界衛生組織（WHO）之規定：每劑日本腦炎日本腦炎疫苗所含蛋白質量須少於80毫克/毫升，但此種疫苗仍然殘餘鼠腦蛋白質，可能引致接種者的過敏反應；又疫苗本身更因稀釋之故，力價極可能低於檢驗標準，造成資源之浪費。本計畫的目的即在研發大規模日本腦炎病毒純化技術，如：限外超過濾法（Ultrafiltration, UF），進一步精製病毒，生產質、量、價均宜之疫苗。

限外超過濾法的功能在清除（clarification）、濃縮（concentration）、脫鹽（desalting）、交換緩衝液（buffer exchange）及分離（fractionation），其適用範圍包括細胞、病毒、蛋白質及多醣類等之處理。選擇的正確UF系統型式及過濾膜，可有效提高病毒精製效率。過濾膜的性質是anisotropic（12），利用分子量選擇過濾的原理，進行目標物之分離純化。其分離效果介於逆滲透（reverse osmosis: salt retention）及微過濾間（microfiltration: particulate retention）。Wong（13）報導Centricon-100 UF系統，可有效的分離病毒，而不影響其感染力。Pana則（14）利用Millipore之Minitan及Pellicon UF系統純化小兒麻痺及HAV，確認UF可取代傳統調整pH或添加多價陽離子鹽等濃縮病毒方法。因此本計畫擬評估以UF方法，改進我國現有日本腦炎疫苗製程之可行性。以期改善疫苗品質，提高疫苗產能，穩定疫苗供應，並降低成本以提高經濟效益。

實施方法與進行步驟

一、限外超過濾法的確立

1. 限外超過濾系統之選擇

收集各種限外超過濾系統之應用資料，評估並試用符合下列特點之系統：（1）密閉系統利於無菌操作；（2）處理速度快；（3）製程放大（scale-up）易；（4）切向流動式，以降低濃縮極化現象；（5）病毒顆粒及力價保持良好。

2. 限外超過濾方式之選擇

常用限外超過濾方式如：（1）單一通過過濾方式（single-pass filtration）、（2）返復循環過濾方式（recirculation filtration）、（3）容量恆定過濾方式（constant volume washing/dialfiltration）、（4）階梯式過濾方式（cascade filtration）。其中（2）可運用於病毒之濃縮，（3）可運用於病毒液雜質之清除，較符合計畫主旨。因此擬評估此二過濾方式在日本腦炎病毒純化效率及力價分析。

3. 限外超過濾膜之選擇

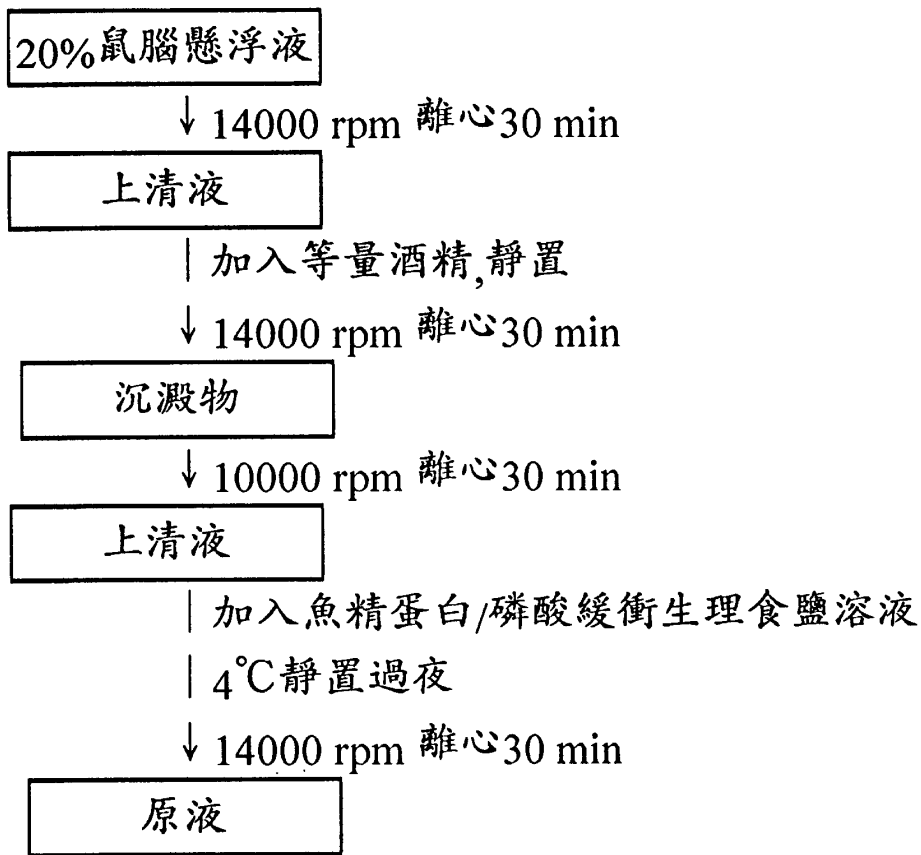
依據下列因素選擇最適當之過濾膜：（1）分子量cut-off：日本腦炎病毒之分子量為 3×10^6 ；（2）樣品滯留量小；（3）蛋白質吸附量低；（4）承受壓力範圍；（5）產品回收率高；（6）製程易放大；（7）可確效。

4. 限外超過濾系統操作條件之選擇（15）

系統操作條件中最主要的變數有：流速、壓力、濃度及清除小分子所需溶液體積，詳細評量變數間相互的關係有助於產品回收效率的提昇。

二、日本腦炎疫苗原液之製造

現有日本腦炎疫苗精製之過程（16），採酒精/魚精蛋白沉澱法配合離心步驟（如下表）。



將依此程序改良後評量限外超過濾法之可行性。

三、分析方法

1. 蛋白質濃度之測定

採用 Bradford（17）及Lowry（18）的方法，以BSA為標準品做蛋白質濃度之定量分析。

2. 紅血球凝集試驗（HA）（19）

於九十六孔微量滴定盤上，加入病毒樣品，做兩倍連續稀釋至適當倍數，再添加 pH6.3之0.33% 鵝紅血球於各孔中，振盪混勻後，靜置於37°C下 1 小時，觀察是否有血球凝集現象，並記錄其紅血球凝集力價。

3. 反轉間接紅血球凝集試驗（RIHA）（20）

於九十六孔微量滴定盤上，加入病毒樣品，做兩倍連續稀釋至適當倍數，再添加 0.5% 已黏覆日本腦炎病毒抗體的綿羊紅血球於各孔中，振盪混勻後，靜置於室溫下 2 小時，觀察是否有血球凝集現象，並記錄其紅血球凝集力價。

4. 酵素連結免疫反應法 (ELISA) (21)

黏覆白兔抗日本腦炎病毒抗體於九十六孔微量滴定盤上，使用 ELISA 清洗儀 (BIO-TEK EL403)，清除未黏覆之抗體。之後，添加待測日本腦炎疫苗或病毒樣品，放置於 37°C 保溫箱中 2 小時。於清洗後添加豬抗日本腦炎病毒抗體，再置於 37°C 保溫箱中 1 小時。再添加 Avidin-馬山葵過氧化酵素複合體，放置於 37°C 保溫箱中作用 30 分鐘。清洗後，在每孔中添加 100 μ l 酵素受質體，放置於室溫暗處，呈色反應 30 分鐘。以 ELISA 吸光儀 (Molecular Device, Emax) 讀取 OD₄₉₀ 及 OD₆₅₀ 之差值。

四、比較新舊製造流程之效率與產率

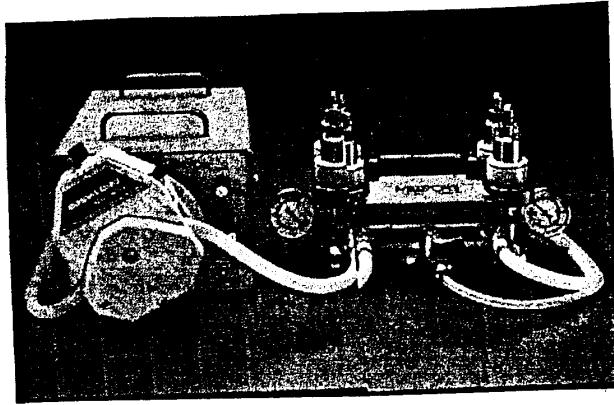
依上述確立之 UF 方法，處理同批樣品後，利用三、1-4 方法分析後進行比較評估。

結果

一、限外超過濾法之確立

1. 選擇最適當的限外超過濾系統

依照樣品處理量、效率與系統確效之難易，評估 stir-cell, hollow fiber, ceramics 及 tangential flow 等不同限外超過濾系統，最後選定密理博 Pellicon-2 tangential flow 系統。此系統可由實驗室階段輕易地線性放大至先導級及製備級。



2. 選擇最適當限外超過濾膜

於選定系統後，以阻塞研究(fouling study)評比分子量cut-off值各為100K及300kDa之Pellicon XL PBMK濾膜之適用性。進料與出料壓力分別為15及0 psi，以返復循環過濾方式進行。依據HA、ELISA及蛋白質祛除程度，選擇分子量 cut-off 為 300 kDa 之濾膜(圖一、表一)。

3. 選擇最適當系統壓力差(ΔP)

以三倍樣品量之磷酸鹽緩衝液以容量恆定過濾方式進行評估，並依據HA測定結果判定最適當系統壓力差(ΔP)結果為15psi(表二)。

4. 選擇最適當透膜壓力(TMP)

當系統壓力差為15psi時，以返復循環過濾方式進行研究，結果發現當透膜壓力(TMP)為12.5psi時，白質祛除效率較高(圖二)。

5. 選擇容量恆定過濾所需緩衝液體積

雖然緩衝液所用體積愈多，對蛋白質祛除效率愈高，但病毒抗原回收率將降低，則當所用體積達5倍時，回收率將降至50%以下。因此，容量恆定過濾時所需緩衝液體積，以3或4倍最適當(表三)。

6. 樣品蛋白質含量對限外超過濾效率之影響

由圖三得知，蛋白質祛除效率與樣品蛋白質含量有絕對之關聯性。目前，已知UF前樣品蛋白質含量少於若350 $\mu\text{g/ml}$ 者，UF 對蛋白質祛除效率為 75% 以上；多於 400 $\mu\text{g/ml}$ 者則效率僅達 50%。因此，UF 前之樣品前處理情形為病毒純化效率之決定性因子。

7. 添加明膠對病毒回收率及蛋白質祛除效率之影響

由圖四、五顯示，添加0.04%明膠之樣品經限外超過濾後之殘餘蛋白質較未添加明膠之樣品高約10%。根據HA，病毒回收率可維持100%。

8. 選擇最適當的限外超過濾方式

嘗試以返復循環過濾方式、容量恆定過濾方式及兩者合併使用方式，進行病毒純化，並以病毒力價為評估標準。實驗後，決定採用先以返復循環過濾方式濃縮病毒後，再進行容量恆定過濾，以期達到最大蛋白質量之祛除。目前，經 UF 後之病毒原液之蛋白質量約介於 30-80 $\mu\text{g/ml}$ 之間。

二、日本腦炎疫苗原液製造流程之確立

1. 魚精蛋白沉澱

由表四得知，若將魚精蛋白直接添加於鼠腦懸浮液中，靜置後離心分離上清液中之病毒，比分別離心鼠腦組織再進行魚精蛋白沉澱者，每單位病毒回收率僅餘四分之一，殘餘蛋白質量亦較高。製程中若於酒精沉澱後再經低濃度魚精蛋

白沉澱，雖然蛋白質祛除量較多，但病毒回收率僅為未再經處理者之半(表五)。因此，限外超過濾前不經魚精蛋白沉澱處理。

2. 酒精沉澱

如圖六所示，最適當之酒精濃度為17%，添加速度為50ml/min，酒精沉澱程序於15°C下進行。

三、比較更新後及現行製造流程之效率與產率

更新後之製造流程(表六)，祛除鼠腦蛋白質之效率比較列於表七。經新製程精製後，原液之蛋白質殘餘量為81.8 μ g/ml，ELISA抗原值為2.47；而舊製程則為730 μ g/ml，ELISA抗原值僅為0.51(表七)。

討論

本研究積極研發限外超過濾病毒純化技術，以進一步精製鼠腦產製之日本腦炎疫苗。以達成下列之總目標：減少疫苗製品外來(contaminated)蛋白質量，降低疫苗副作用，避免醫療糾紛。提高疫苗製品之製造效率及檢驗合格率，以降低成本及節省資源。提高疫苗製品之力價，提高其品質及經濟效益。提高疫苗製品之安全性，提高與其它疫苗複合為多合一疫苗的可能性。目前，已完成最適當之限外過濾系統及條件之選擇及更新後及現行製造流程效率與產率之比較，並建立製程之標準操作程序(表八)。

製程操作效率及病毒回收率與純度，取決於沉澱步驟使用之時程及限外超過濾條件之最適化。因此，首先評估魚精蛋白直接添加於鼠腦懸浮液之可行性，結果因鼠腦懸浮液中組織等成份複雜，致

使病毒與其它蛋白等物質共同沉澱而回收率差，比先離心後再添加者抗原回收少75%。因此，建議先離心鼠腦懸浮液後再添加魚精蛋白並靜置2小時使沉澱完全，不但可有效率的祛除雜蛋白、醣類及脂質，更提高後續酒精沉澱步驟成效。17%酒精濃度，以50 ml/min速度添加有利於沉澱形成，並宜於15°C下控溫進行，以免病毒遭升溫破壞。初步建立整體純化流程：以均質機製備 20% 鼠腦懸浮液後，離心後再加入魚精蛋白，靜置後離心。於上清液施行酒精沉澱，並於冷房隔夜靜置。離心後之沉澱復原液，再加入魚精蛋白進行沉澱。離心後之上清液，以 0.45 μ m 濾膜過濾，再進行限外超過濾。

限外超過濾之原理，在於施與物質適當之推動力，利用壓差或濃度差進行物質傳送，依照物質分子量、分子形狀或進行過濾。因此，溫度、壓力、流速、樣品性質及系統清洗條件與清水通透率等，不但是限外超過濾法成效關鍵，更是維持批與批間恆定之決定性因子。限外超過濾系統與方法，是經由濾膜選擇至過濾方式與最適條件測試後以建立。目前，已完成限外超過濾法(ultrafiltration)運用於病毒純化並供量產的可行性評估。將以Pellicon限外超過濾系統配合300kDa濾膜，使用15psi壓力差進行病毒純化。採用先以返復循環過濾方式濃縮病毒後，再進行容量恆定過濾，以期達到最大蛋白質質量之祛除。新製程所獲得之原液，其蛋白質殘存量僅為舊製程之11.2%，單位抗原純度增加5倍，效率增進顯著，建議供現有日本腦炎疫苗參酌修正使用。

參考文獻

1. A.P. Wang, J.T. Grayston, I.H. Chu, Encephalitis on Taiwan V. Animal and bird serology, Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 155-158, 1962.
2. S.P. wang, J.T. Grayston, S.M.K. Hu, Encephalitis on Taiwan III. Virus isolation from mosquitoes, Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 141-148, 1962.
3. C.L. Chen, Criteria for the diagnosis of Japanese encephalitis, 日本腦炎防治研討會報告, 59, 1971。
4. K. Sakai, Summer encephalitis among children in northern Formosa Taiwan, Igakkai Zasshi, 34, 87-88, 1935.
5. G.L. Ada, S.G. Anderson, A.J. Abbot, Purification of Murray Valley encephalitis virus, Gen. Microbiol., 24, 177-186, 1961.
6. P.-Y. Cheng, Purification, size and morphology of mosquito borne animal virus Semliki Forest encephalitis viruses, Virology, 14, 124-131, 1961.
7. T.M. Steven, R.W. Schlesinger, Studies on the nature of Dangué viruses. 1. Correlation of particle density, infectivity and RNA content of type 2 virus., Virology, 27, 103-112, 1965.
8. J. Nakamura, Studies on the purified Japanese encephalitis vaccines, NIBS Bull. Biol. Res., 8, 78-99, 1969.
9. C. Aizawa, S. Hasegawa, C.-Y. Cheng, I. Yoshioka, Large-scale purification of Japanese encephalitis virus from infected mouse brain for preparation of vaccine, Appl. Env. Microbiol., 39, 54-57, 1980.
10. E.R. Pfefferkorn, H.S. Hunter, Purification and partial chemical analysis of Sindbis virus, Virology, 20, 433-445, 1963.
11. K. Okuda, K. Ito, K. Miyake, M. Morita, M. Ogonuki, S. Matsui, Purification of Japanese encephalitis vaccine by zonal centrifugation, J.

Clin. Microbiol., 1, 96-101, 1975.

12. A.S. Michaels, In *Progress in separation and purification* (E.S. Perry, ed.) 1, 297-334, New York, John Wiley, 1968.

13. K. Kunal Saha, Y.-C. Lin, P.K.Y. Wong, A simple method for obtaining highly viable virus from culture supernatant, J. Virol. Meth., 46, 349-352, 1994.

14. M. Divizia, A.L. Santi, A. Pana, Ultrafiltration: as efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration, J. Virol. Meth., 23, 55-62, 1989.

15. P. Ng, J. Lundblad, G. Mitra, Optimization of solute separation by diafiltration, Separation Science, II(5), 499-502, 1976.

16. W.H. Hammon, M. Kitaoka, eds., In " Immunization for Japanese encephalitis", 147-158, Igaku Shoin Ltd, Tokyo, 1971.

17. M. Bradford, Anal. Biochem., 72, 248, 1976.

18. O.H. Lowry, et al. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.

19. G.C.Y. Lee, J.T. Grayston, S.P. Wang, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 863, 1976

20. R.K. Gupta, V.K. Mehta, V.K. Gupta, C.N. Misra, S.N. Saxena, The standardization of the reverse indirect haemagglutination test for the assay of the viral antigen of Japanese encephalitis vaccine, J. of Biological Standardization, 15, 271-279, 1987.

21. R. Jou, S.Y. Yen, C. Huang, S. Kang, M.Y. Liao, A new ELISA method for Japanese encephalitis vaccine antigen content determination, submitted to J. of immunology.

表一 選擇最適當的限外超過濾膜

過濾膜 (MWCO)	HA		ELISA (sample/NK189)		蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	過濾前	過濾後	過濾前	過濾後	過濾前	過濾後
100,000	1024	512	0.81	0.71	573.91	555.40
300,000	1024	1024	0.81	0.81	573.91	505.62

表二 選擇最適當系統壓力差(Δp)

壓力差 $\Delta p(\text{psi})$	HA		蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
	過濾前	過濾後	過濾前	過濾後
10 (Pin=20,Pout=10)	1024	512	573.91	397.74
15 (Pin=20,Pout=5)	1024	1024	573.91	393.98
20 (Pin=20,Pout=0)	1024	512	573.91	355.09

表三 選擇容量恆定過濾所需緩衝液體積

緩衝液體積	RIHA	蛋白質濃度		ELISA	
		$\mu\text{g/ml}$	%祛除率	樣品/NK189	%抗原回收率
UF前	2048	720.60	0.00	0.58	100
1xV	2048	423.59	41.40	0.55	55.74
2xV	2048	386.64	46.30	0.66	61.06
3xV	2048	356.20	50.60	0.69	58.81
4xV	2048	315.51	56.20	0.72	54.35
5xV	1024	260.06	63.90	0.74	46.05

表四 魚精蛋白添加步驟與病毒回收及蛋白質祛除率之比較

	RIHA	蛋白質濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
20%鼠腦懸浮液(S1)	2048	14192
第一次離心之上清液(S2)	2048	6567
S2加魚精蛋白後離心之上清液	2048	4342
S1直接加魚精蛋白後離心之上清液	256	4833

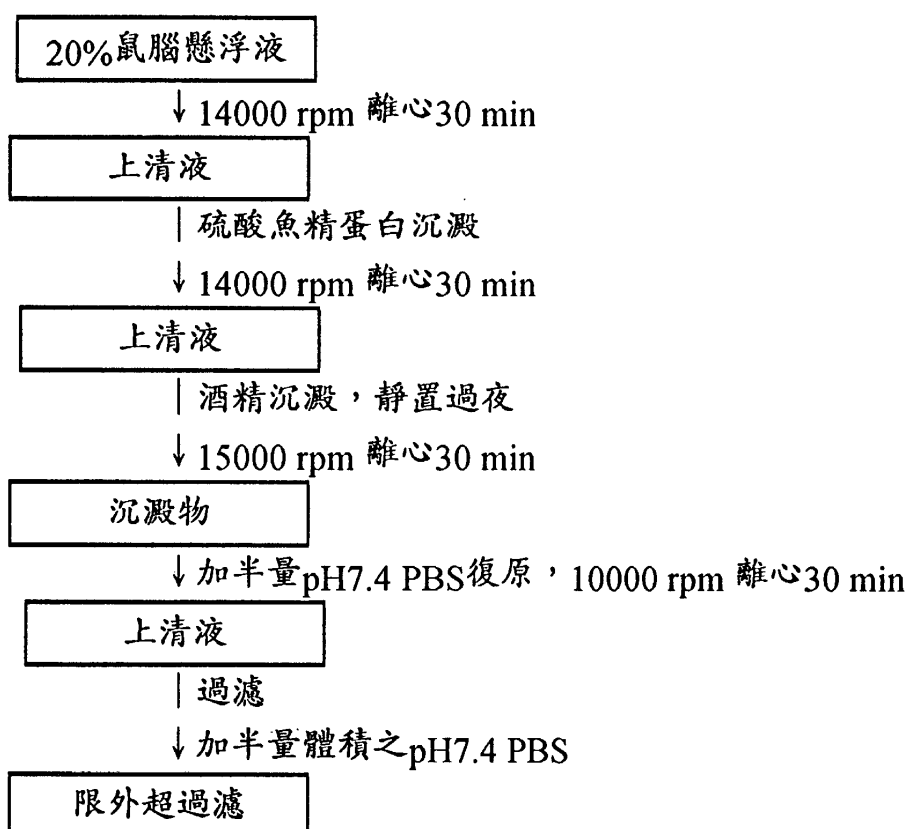
表五 酒精沉澱後添加魚精蛋白對蛋白質祛除率的影響

樣品	蛋白質濃度($\mu\text{g/ml}$)		% HA回收率
	過濾前	過濾後	
PK33-3*	4927.8	234	62
PK20**	4611.7	102	25.4

*酒精沉澱物以磷酸緩衝液復原後，經離心取上清液

**酒精沉澱物以磷酸緩衝液復原後，加魚精蛋白沉澱後離心取上清液

表六 改良後之日本腦炎疫苗製程



表七 鼠腦精製之新舊製程效率比較

	舊製程(NK1277)		新製程(NK1297)	
	20% 鼠腦懸浮液	精製後	20% 鼠腦懸浮液	精製後
PFU/ml	1.8×10^9	3×10^5	2.1×10^9	4.8×10^5
ELISA(sample/ref.)	0.52	0.51	0.70	2.47
蛋白質濃度($\mu\text{g/ml}$)	12264.0	730.0	12183.0	81.8

表八 日本腦炎疫苗標準製造程序表

Process and Record of Mouse-Brain JE Virus Purification

Date: _____ Strain: _____ Batch no: _____ Operator: _____ *

Fresh Mouse Brain _____ g - _____ g = _____ g

- add 1/50M PBS, pH8.0 _____ ml
- Homogenize on ice 3min, rest for 2min then homogenize for another 2min
- add 4X 1/50M PBS, pH8.0 _____ ml
- centrifuge at 14,000rpm for 30min

_____ ml

sup. _____ ml ppt. _____ ml

- stir and add 11mg/ml Protamine sulfate/PBS pH8.0 _____ ml to final concentration of 1.0mg/ml
- stir for 1-2hr at 4 °C
- centrifuge at 14,000rpm for 30min

_____ ml

sup. _____ ml ppt. _____ ml

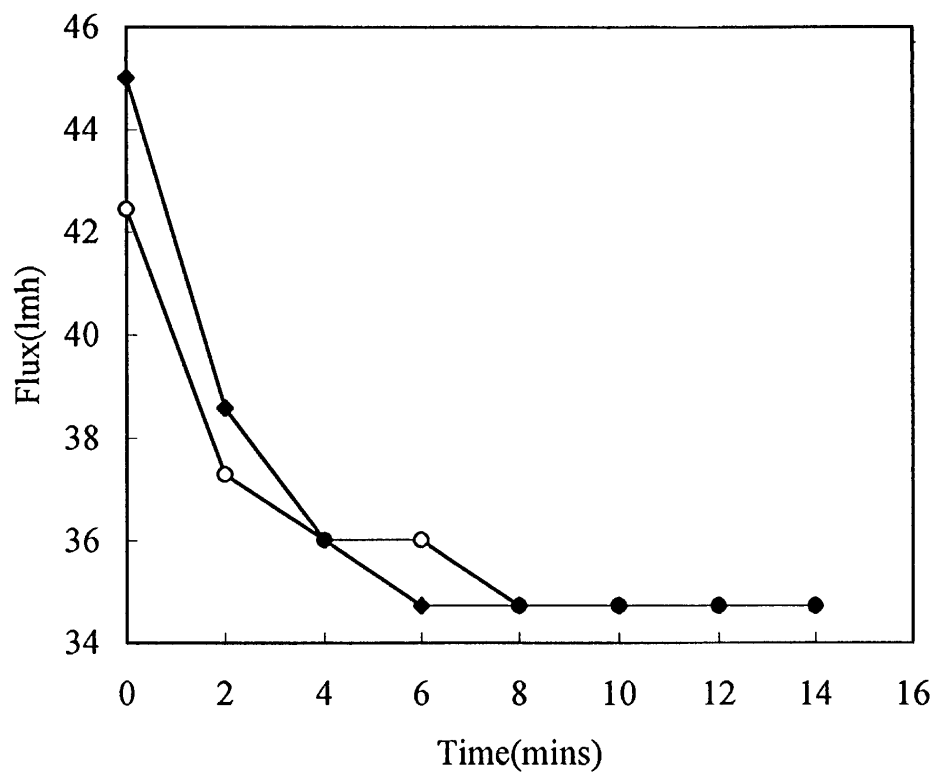
- incubate at 13-15 °C and add 0.74X 40% cold alcohol _____ ml (to final conc. of 17% at 40-50ml/min flow rate)
- rest at 4 °C overnight
- centrifuge at 15,000rpm, 30min

sup. _____ ml ppt. _____ ml

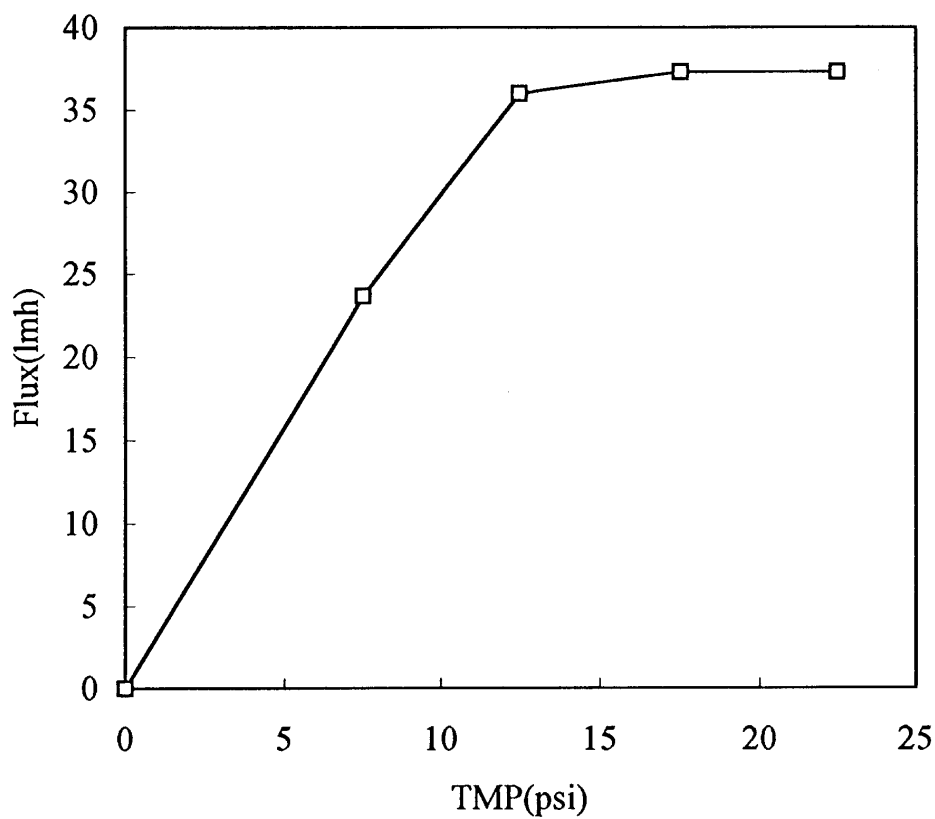
- resuspend with half total volume of 1/75M PBS, pH7.4 _____ ml
- homogenize on ice
- centrifuge at 10,000rpm for 30min

sup. _____ ml ppt. _____ ml

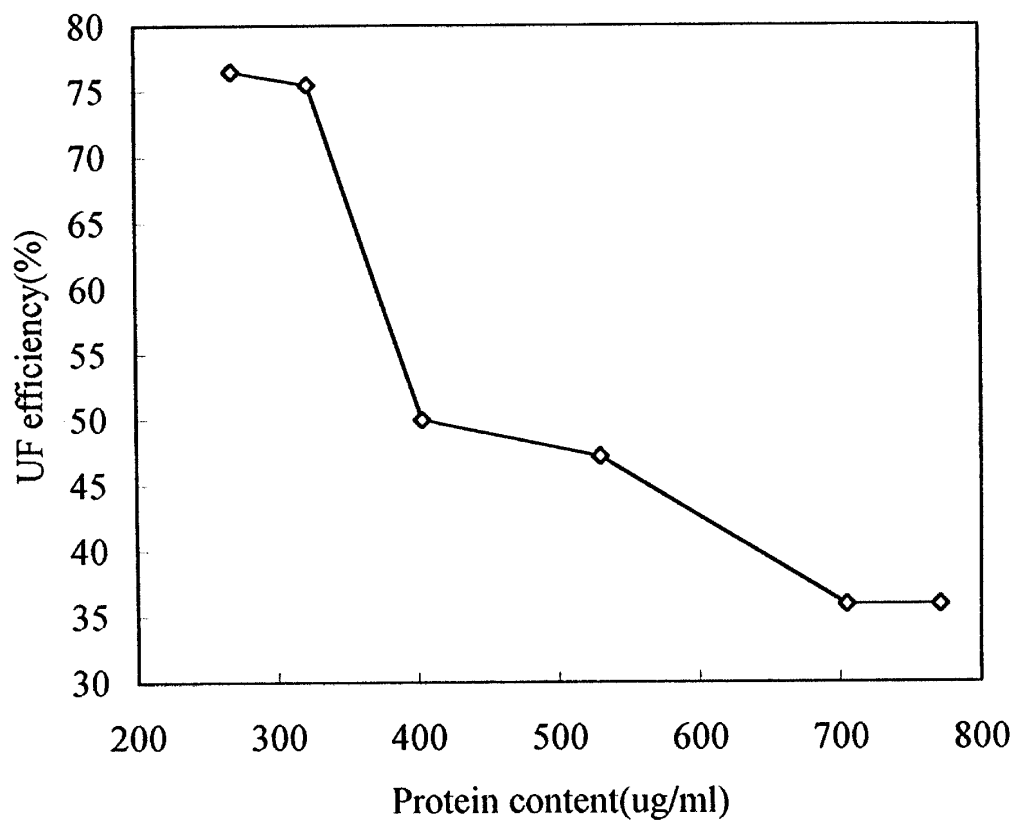
- 0.45 µm membrane filtration, final volume _____ ml
- UF with 300,000 MWCO membrane and dilfiltrate with 3X 1/75M PBS pH7.4, final volume _____ ml
- add 2.5% formalin in 1/75M PBS pH7.4 to final conc. of 0.05% formalin _____ ml
- add 1% thimersol in 1/75M PBS pH7.4 to final conc. of 0.01% thimersol _____ ml
- add 2% thimersol in 1/75M PBS pH7.4 to final conc. of 0.02% thimersol _____ ml



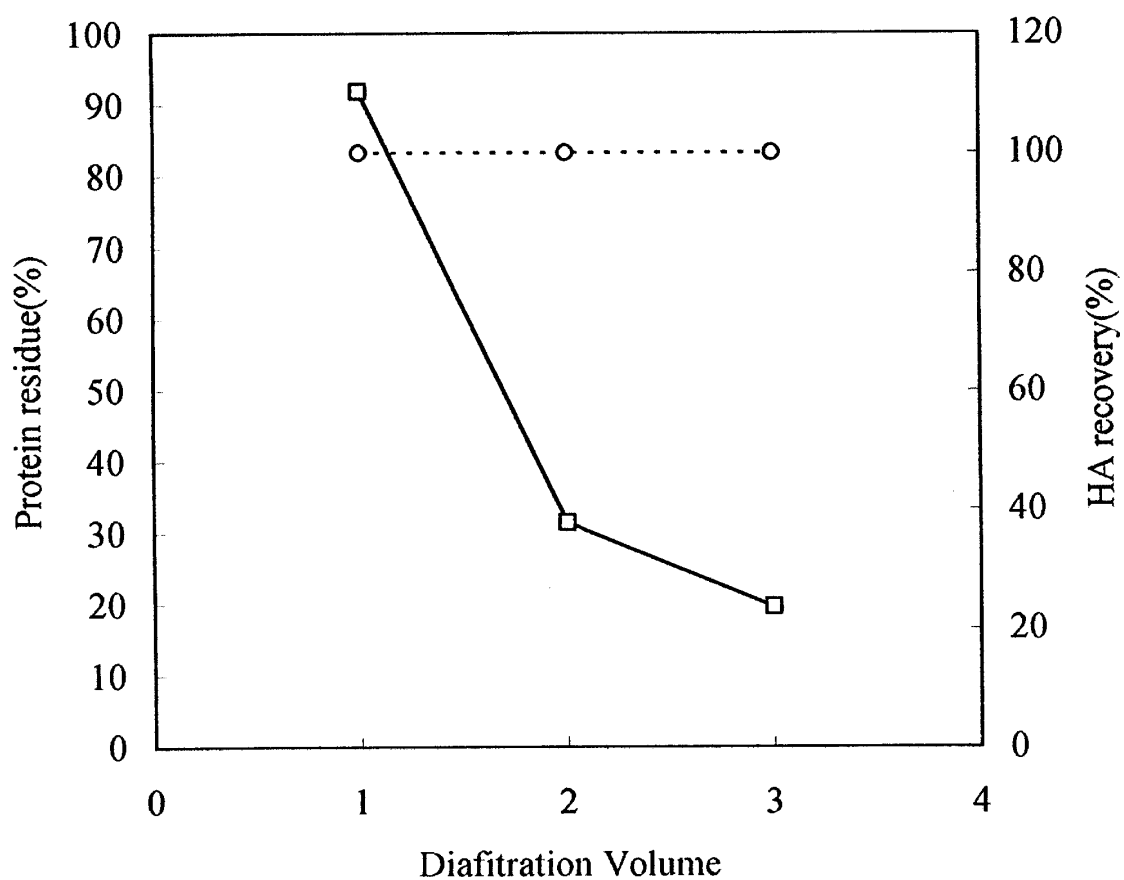
圖一選擇最適當限外超過濾膜



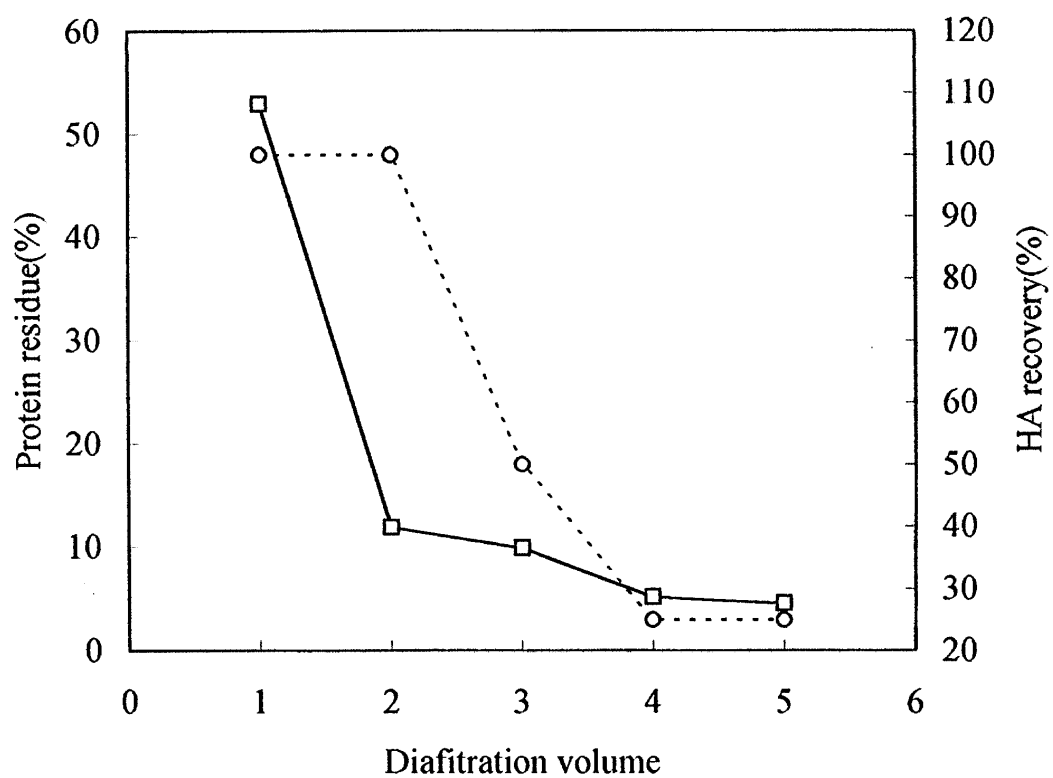
圖二選擇最適當透膜壓力(TMP)



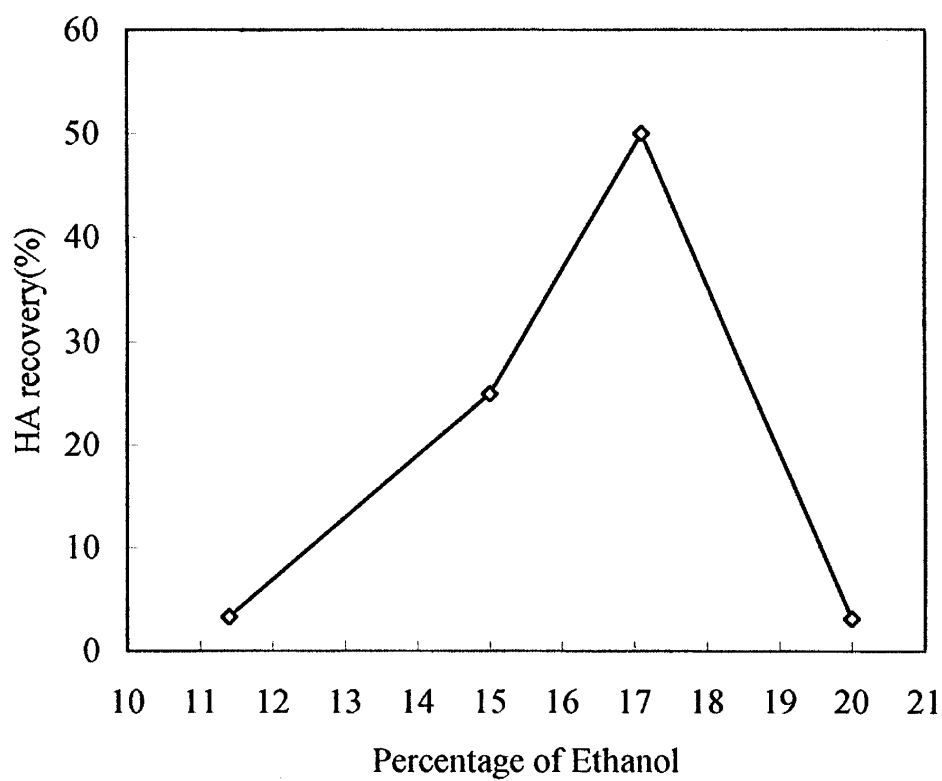
圖三樣品蛋白質含量對限外超過濾效率之影響



圖四 添加明膠對病毒回收率及蛋白質祛除效率之影響
 (-□- protein residue, -○-HA recovery)



圖五 未添加明膠對病毒回收率及蛋白質祛除效率之影響
 (-□- protein residue, -○-HA recovery)



圖六選擇最適當酒精濃度