

計畫編號：DOH93-DC-1109

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

卡介苗口服劑型技術之開發

計畫名稱

研究報告

執行機構：國防醫學院

計畫主持人：江樵熹

研究人員：葉明功、陳錦龍、陳甄伶、周梅芳

執行期間：93年3月1日至93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 \*

## 正文目錄

頁碼

### 摘要

1. 中文摘要 -----1
2. 英文摘要-----2

### 主文

1. 前言-----3
2. 材料與方法-----7
3. 結果-----15
4. 討論-----23
5. 結論與建議-----25
6. 參考文獻-----26
7. 附圖-----29

## 圖目錄

	頁碼
圖一、各配方之厚度的變異係數。 -----	16
圖二、拉張力試驗之校正曲線。 -----	16
圖三、將 BCG 製劑放置於不同溫度下活性變化之趨勢。 -----	20
圖四、口服 BCG 疫苗製劑之活體免疫誘發 Ig G 效價之經時變化。 -----	21
圖五、口服給予 BCG 疫苗不同劑量與血液中 Ig G 效價之經時變化。 -----	21
附圖一、以塑膠膜製備膠囊殼過程中採用旋轉盤裝置。 -----	29
附圖二、研製之腸溶性膠囊殼。 -----	29
附圖三、控制溫度及濕度之無菌操作櫃用於 BCG 疫苗口服製劑之製備。 -----	30
附圖四、充填 BCG 疫苗之於腸溶衣膠囊溶劑。 -----	30
附圖五、天竺鼠經口服卡介苗疫苗製劑七週後進行柯霍氏試驗之結果。 -----	31

## 表目錄

	頁碼
表一、腸溶衣薄膜配方	
-----	7
表二、腸溶性膠囊殼配方	
-----	9
表三、口服 BCG 疫苗配方之組成	
-----	10
表四、取樣時間點	
-----	11
表五、各配方之厚度	
-----	15
表六、各配方之彈性範圍、Young's Modulus 及破裂張力	
-----	17
表七、研製薄膜之溶媒及水之殘餘量	
-----	18
表八、將 BCG 製劑放置於不同溫度下評估活性之變化	
-----	19
表九、天竺鼠經由口服給藥方式後所得到之柯霍氏試驗結果	
-----	22

## 中文摘要

本計畫係進行口服卡介苗 (BCG) 疫苗製劑之研發，以製備具有療效之口服 BCG 疫苗製劑。本研究之重點如下：(1) 研製腸溶性薄膜可用於包載 BCG 疫苗以供口服投與，保護 BCG 疫苗免於胃酸破壞，遞送疫苗至腸道誘發免疫反應；(2) 建立小量製備口服卡介苗疫苗製劑之製法，以期發展成工業生產之技術。

腸溶性薄膜之材料包括：甲基纖維素衍生物、塑化劑及製備成溶液之溶媒。製成之薄膜也進行物化性質之評估，包括：厚度、洩漏性、溶媒殘餘量等之分析。腸溶性薄膜經包載有 BCG 疫苗之製劑經崩散試驗，評估配方之組成對薄膜性質之影響，以最佳化腸溶性薄膜之配方。所研製之口服 BCG 疫苗製劑進行下列評估，包括：(1) 體外試驗：BCG 力價測定及安定性試驗；(2) 體內試驗：柯霍式反應及免疫誘發反應之測試 (ELISA)。

本研究之初步成果已建立了小量製備腸溶性薄膜之技術、研製出良好腸溶衣之口服疫苗製劑。BCG 製程中，有關安定性的評估顯示疫苗製劑在 -20 存放 2 個月後仍有 10% 活菌。在一般室溫 (25 ) 放置一天則仍有 25% 的活菌存活，顯示在短時間內使用此製劑應仍有其效價。經由初步的動物試驗評估，製劑可誘發顯著之柯霍氏免疫效果，研製之 BCG 疫苗口服製劑也具潛能開發成預防肺結核之口服疫苗製劑。

中文關鍵詞(至少三個)：口服卡介苗、腸溶衣製劑、柯霍氏試驗、BCG 力價試驗

## Abstract

The aim of the study is to develop an oral delivery system of BCG vaccine. Two important goals are described as following: ( 1 ) to develop an oral vaccine delivery system to carry BCG vaccine in enteric film in order to protect BCG vaccine from the attack of gastric acid and deliver onto the intestinal tract of vaccinated subjects for eliciting mucosal immune response; ( 2 ) to establish a small scale preparing method of oral BCG vaccine delivery system for applying in the development of industrial technology.

The enteric polymer( a derivative of methyl cellulose )and plasticizers were dissolved in methylene chloride to prepare enteric films. The physicochemical properties of prepared films, including thickness, leakage and solvent residual, were evaluated. The delivery systems of BCG vaccine were further studied in disintegration test for optimizing formulation factors. The investigated oral BCG vaccine delivery systems were conducted following studies: (1) *in vitro* study: stability and BCG potency, ( 2 ) *in vivo* study : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and the Mantoux Test.

From preliminary study results, we had established a technique to prepare enteric film which was successfully applied to prepare oral BCG vaccine delivery system in small scale. The preparation still maintained about 10% and 25% of BCG potencies in -20 for 2 months or in room temperature( 25 ) for 24 hrs. From *in vivo* study, the prepared oral BCG vaccine delivery system could elicit mucosal immune response by the using the Mantoux test, which might be potentially developed as an oral vaccine preparation for controlling tuberculosis.

Key words : Oral BCG Vaccine, enteric delivery system, Mantoux Test, BCG potency

## 前言

結核病是目前全球各種傳染病中引起最多死亡的疾病。根據世界衛生組織的統計：1990 年全世界約有 750 萬的發病結核病人(每十萬人口 143 人)，約有 50 萬人死於結核病。我國古典小說中「紅樓夢」女主角林黛玉也罹患肺結核在青春年華就結束生命更是家喻戶曉的故事。以肺結核發生率而言，男性比女性高，老年人比年輕人高，社會階層低的比社會階層高的高。台灣地區結核病死亡率由民國 36 年約每十萬人口 294.44 人逐年降低，並於民國 74 年結核病首度排除於十大死因之外，而於民國 86 年降為 7.48 人。台灣地區 20 歲以上成年人，在民國 77 年的 X 光診斷肺結核盛行率為 1.29%，民國 82 年所作 20 歲以上成人胸部 X 光診斷之肺結核盛行率為 0.65%，目前結核病的死亡率，大都維持在每十萬人口，7 人左右（1999 年為 6.88 人）。而近幾年結核病仍是嚴重威脅國人的疾病，如以民國 89 年及 92 年為例，國人男性結核病死亡率皆列入十大死亡原因，每十萬人男生人口分別是 10.7 人及 8.98 人。而世界衛生組織所訂結核病之控制標準為 0.14%，因而國人在肺結核之防治仍需努力。

目前肺結核的預防措施主要是施打卡介苗，其優點是沒有施打時間的限制，在出生時或以後的任何時間施打皆可以，且便宜、副作用小，並相當的穩定。但其缺點是留下疤痕。而一些研究，如美國疾病管制中心( Centers

for Disease Control ), 世界衛生組織( WHO )及印度醫療研究機構( The Indian Council for Medical Research ) 等的合作計劃, 於 1979 年發表經歷十年 (1968-1978) 在印度所作大規模臨床試驗之首次報告, 顯示卡介苗之施疫於印度效果不顯著。雖然卡介苗的效果目前仍有爭論, 但它對小孩子結核性腦膜炎及原發性病灶散播之預防效果卻是大家所公認。因而若能在製劑研究改進目前卡介苗製劑缺點, 如增進製劑安定性, 提升施疫時之活性以增進療效, 不需經由注射給藥, 避免在接種處留下疤痕, 將能獲得大家之接受, 得到更佳的結核病防治效果。

口服疫苗製劑已是目前疫苗發展的主要趨勢。然而疫苗通常為減毒的活菌如 BCG 疫苗, 或死菌如霍亂疫苗, 其性質類似蛋白質藥物, 在腸胃道中容易受腸胃道之酵素或酸分解而失效, 且因受腸胃道排空之影響, 滯留在腸胃道時間也短, 不易產生免疫效果, 而限制了口服疫苗製劑的發展。

疫苗經口服後, 主要是在腸道區域產生免疫作用<sup>1,2</sup>, 特別是在 Gut-associated Lymphoid Tissues<sup>3-5</sup>, 這是在腸道的大片淋巴組織, 稱作皮耶氏板(Peyer's Patches, PP), 具有獨特的表皮組織, 主要由 M-cells 所構成, 一些抗原可經由表皮細胞所攝取。經由 M-cells 吞食的粒子, 可能不被消化, 而將完整的粒子被送到下面的淋巴組織, 即黏液淋巴系統細胞, 最後可促使腸道分泌 IgA 等產生免疫<sup>6</sup>。

卡介苗經注射給藥除了造成結痂留下不可磨滅之註記，且注射給藥方式僅能誘發 IgG 抗體，不能像口服直接給藥產生有效對抗感染之免疫力<sup>7</sup>。此外，口服疫苗具有使用方便且可在 Peyer's patches 誘發黏膜免疫系統之優點，經由黏膜免疫系統同時誘發 IgG, IgM 及 IgA<sup>8-10</sup>，因而卡介苗疫苗很適合於開發為口服製劑。然而口服卡介苗，因是為活菌之抗原，在製備過程、貯存皆容易造成 BCG 疫苗之死亡。此外，口服後在消化道中易被胃酸及消化酵素破壞、疫苗抗原性差且不易存活，而無法產生預期的作用，因而如何增加口服效率、保護抗原、增強腸道黏膜局部免疫反應為重要發展方向。

一種理想的疫苗製劑通常包括下列七點<sup>11</sup>：一、能口服，僅需一次用藥；二、好的耐受性；三、具有高度的免疫作用，刺激產生抗菌珠及抗毒素之抗體；四、良好的效果(>85% 保護效果)；五、很快產生保護作用(施藥後四週)；六、不昂貴；七、能製成一實用製劑。本研究乃參照上述原則進行疫苗製劑之研發。

口服疫苗要能產生其效果，須能夠達到下列三項目標<sup>12</sup>：(1) 疫苗能具活性在腸胃道能夠維持完整性不受胃酸或腸液的破壞；(2)疫苗能夠到達作用或吸收位置；(3)疫苗能夠滯留而有持續作用之特性。

本計畫進行口服卡介苗疫苗之製劑研發以新穎製劑技術開發卡介苗之新劑型<sup>13-16</sup>，增加療效降低副作用並增加施疫之方便性<sup>17,18</sup>。由文獻資料證

實,在埃及使用碳酸氫鈉緩衝溶液的疫苗製劑在傷寒預防保護可達 90%,而在智利使用腸溶衣膠囊製劑其效果是較一般膠囊製劑為佳,對學童傷寒保護可達 66%<sup>19</sup>。一般製備腸溶衣製劑皆是將製備好之錠劑或膠囊劑半成品表面包覆一層腸溶衣材質。在錠劑製備過程中,需經過強大壓力擠壓成型。此外,在包衣過程中,必須揮發溶媒需要加熱升高溫度,對於熱敏感性高之 BCG 疫苗無疑亦是一大威脅。而腸溶衣包覆不均勻,可能導致疫苗製劑在口服用藥後,於口腔、食道或胃等位置在運送過程中即發生洩漏,造成局部黏膜發炎反應,或受胃酸之分解破壞而導致無效。因此製備與疫苗具相容性之腸溶性載體,能以口服方式將 BCG 疫苗運送至腸道誘發免疫反應,是本研究之重點。

在研究中將利用腸溶衣材質結合了塑化劑以溶媒揮發法製成腸溶性薄膜,再經填充 BCG 疫苗之組成物,製備成膠囊製劑<sup>1</sup>。研製之疫苗製劑能在腸胃道吸收體液後,薄膜形成膠黏性物質,可增加製劑於腸道中之滯留時間,讓疫苗集中在腸黏膜細胞,使不至於受腸胃道蠕動排空的影響,以產生較佳的免疫作用。本計畫經由製劑之研究建立卡介苗疫苗口服製劑之製備技術,並能提供此研究模式到其他口服疫苗之製劑開發。

## 材料與方法

### 一、 腸溶衣製備與評估

#### (一) 鑄模法製膜

取 DCM 及 EtOH 以 1 : 1 的比例混合作為溶媒，秤取適量甲基纖維素衍生物腸溶衣材質 (HP) 加入溶媒中，經電磁攪拌器攪拌溶解。將溶解的溶液抽器過濾，濾除雜質，製備成 10% HP。

以表一所列腸溶衣膜配方製備薄膜。製程中以攪拌棒將塑化劑包括 DP 及 TC，與 10%HP 溶液攪勻並去除氣泡，再將混合液緩慢加入已調好水平的鋼模中，揮發溶媒製備成薄膜。

表一、腸溶衣薄膜配方

配方	10 % HP <sup>a</sup>	EP <sup>b</sup>	TC <sup>b</sup>
一	20 ml	0.67 g	0
二	20 ml	0.85 g	0
三	20 ml	1.1 g	0
四	20 ml	0.67 g	0.2 ml
五	20 ml	0.85 g	0.2 ml
六	30 ml	1.3 g	0.3 ml

<sup>a</sup>HP：甲基纖維素衍生物；<sup>b</sup>EP 及 TC：塑化劑

## (二) 腸溶衣薄膜的評估

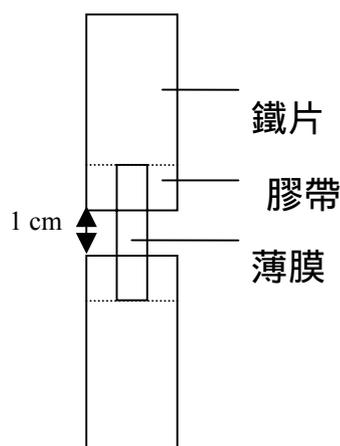
### a. 厚度

以厚薄計 ( SM-1201, Teclock Co., Japan ) 測量薄膜的厚度

### b. 拉張力試驗

使用 50 1500 g 砝碼製備校正曲線 ( 砝碼重量對 peak high 作圖 )。將薄膜剪裁成  $0.5 \times 3$  cm 的寬度 $\times$ 長度，並測量其厚度。

以膠帶將薄膜固定於鐵片上，再將鐵片固定於壓力轉能器 ( transducer )，測定  $0.5 \times 1$  cm 薄膜的拉張力。



### c. 洩漏性試驗

取 5 ml 擬胃液、擬腸液分別置於試管中，以腸溶衣薄膜封住試管口，秤重並記錄之。將封好的試管倒置 ( 瓶口向下 )，於設定的時間點秤重，觀察膜的洩漏情形。

d. 有機溶媒殘餘量試驗

將試驗膜裁成面積為 1 cm<sup>2</sup> 放入秤量瓶中分別秤重，記錄其乾燥前的重量值，再於 70 °C 下烘乾。烘乾 10 小時後，記錄其乾燥後的重量值。將乾燥後的薄膜分別放置於 25 °C 之 76% 及 95% 相對濕度的 Desiccator 中，24 小時後記錄其重量值的變化。

二、 腸溶性膠囊殼製備

於無菌櫃下操作，以圓錐形之塑膠模具沾取腸衣配方溶液（表二），隨即架於旋轉盤上揮發有機溶媒（如附圖一），揮發乾後褪殼，製得無菌腸溶性膠囊殼（如附圖二）。另外亦使用壓制膜法製成軟膠囊，在動物實驗中，餵食動物之腸溶衣膠囊殼之 EP 含量調升為 35 % (w/v)。

表二、腸溶性膠囊殼配方

配方	40% HP <sup>a</sup>			EP <sup>b</sup>	TC <sup>b</sup>
	HP <sup>a</sup>	DCM <sup>c</sup>	EtOH <sup>d</sup>		
含量	40 g	50 ml	50 ml	17 g (30 % w/v)	12 ml (1 % v/v)

<sup>a</sup>HP：甲基纖維素衍生物；<sup>b</sup>EP 及 TC：塑化劑

<sup>c</sup>DCM：Dichloromethane；<sup>d</sup>EtOH：Ethanol

### 三、 製劑製備

將 BCG 與賦型劑 (表三) 以幾何稀釋法在冷房之無菌操作箱 (溫度 : 4.5 ; 濕度 : 40%) 中進行 (如附圖三), 將混合物裝填於腸溶性膠囊殼中, 膠囊內容物為 61mg, 含 1mg 之 BCG 菌 (如附圖四) 餵食動物之膠囊內容物為 21mg, 含 1mg 之 BCG 菌。

表三、口服 BCG 疫苗配方之組成

組成	mg/unit	所需總量 <sup>a</sup> (g)
BCG	1	1.1 ( excess 10 % )
吸著劑	15	16.5 ( excess 10 % )
稀釋劑	45	49.5 ( excess 10 % )
總量	61	67.1

<sup>a</sup> 製備總量為 1000 unit

#### 四、製程因子評估

##### (一) 各配方之相容性試驗

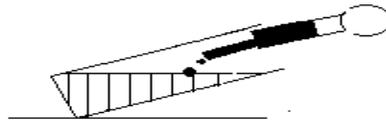
將 BCG 疫苗製劑配方於-20、4、25 及 37 環境下貯放，於特定時間點取樣（如表四所列），進行效價之測定。

表四、取樣時間點

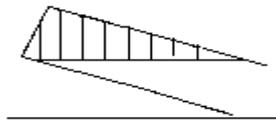
貯放環境溫度	取樣時間點
-20	1 週、1 個月、2 個月
4	1 週、2 週、3 週、1 個月
25	1 天、3 天、5 天、2 週
37	8 小時、1 天、3 天、5 天

##### (二) 菌落培養

1. 將製備好之製劑取出內容物，逐步稀釋 BCG 濃度為【A】 $2 \times 10^{-5}$  mg/mL 及【B】 $1 \times 10^{-5}$  mg/mL 測定其效價，並與純的 BCG 疫苗做比較。
2. 在 BBL 培養基之斜面上各別加入【A】或【B】0.1 ml (n=3)，於細菌培養箱中培養(培養環境：37，5%CO<sub>2</sub>)，並將其斜面向上，調整水平。



3. 24 小時將試管架反轉，斜面朝下，調整水平，進行菌落培養，觀察菌落生長情形，記錄至 28 天



## 五、動物實驗

### (一) 活體免疫誘發試驗：

使用 32 隻天竺鼠進行試驗，分成四組，每組八隻。

組別	
A	空白不含藥膠囊
B	1.0mg BCG 疫苗口服製劑
C	2.0mg BCG 疫苗口服製劑
D	3.0mg BCG 疫苗口服製劑

於 0 ( 給予空白不含藥膠囊 )、2、4、6 週經由耳朵取血，檢品以 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ( ELISA ) 方法測量 Ig G 含量，以評估製劑之免疫誘發反應。

ELISA 分析法：

以 10%福馬林前處理 BCG，並將處理過之 BCG 溶於 PBS 中 (10mg/ml)，各加入 100  $\mu$ l 於 ELISA 分析盤之每個槽中，將分析盤置於 4  $^{\circ}$ C 中風乾。分析盤取出後依序加入一抗、blocking agent 及二抗，期間並利用 PBS 洗去多餘之反應物，再加入呈色反應之酵素，反應 90 分鐘。最後以 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，用 ELISA reader 測定 492nm 吸光值。

(二) 柯霍氏試驗：

使用 16 隻天竺鼠進行試驗，分成四組，每組四隻。

組別	
E	空白不含藥膠囊
F	1.0mg BCG 疫苗口服製劑
G	2.0mg BCG 疫苗口服製劑
H	3.0mg BCG 疫苗口服製劑

經過 7 週後，將結核菌淨素(PPD)以無菌蒸餾水稀釋至 20 Tu/mL，再由皮內注射至各組之天竺鼠，每隻 0.1mL。觀察 1 天，並以測微器量測紅腫大小之柯霍氏現象。

## 六、 安全試驗

1. 試驗動物：選用 250-350 公克，結核菌素測驗陰性之同性別健康天竺鼠 12 隻。

2. 試驗法：

每隻天竺鼠以至少給予 10 倍人體接種量 ( 0.5mg 以上 )，6 隻天竺鼠給予 0.5 mg；另外 6 隻天竺鼠給予 1 mg。膠囊劑之內容物或顆粒劑先分散於生理食鹽水，再行皮下注射，觀察 6 週以上。觀察期間死亡及觀察結束後之天竺鼠均做解剖檢查。

## 結果

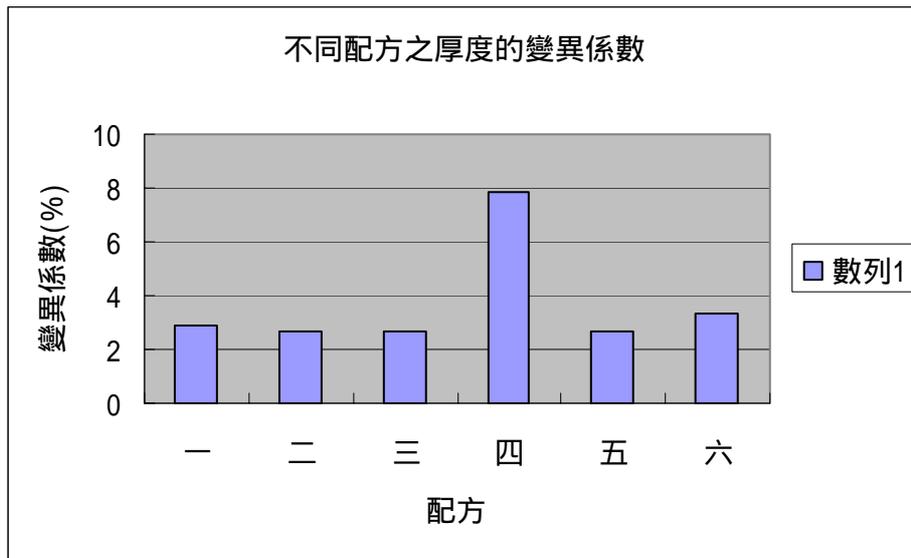
### (一) 腸溶衣膜的評估

#### 1. 厚度

本實驗測得各配方製成薄膜之厚度，如表五。薄膜表面光滑，透明無色，厚度均一。其厚度之變異係數均  $< 10\%$ 。變異係數與配方作圖(圖一)，顯示二、三及五配方均一性較佳。

表五、各配方之厚度

配方	厚度 ( $\mu\text{m}$ )			平均 ( $\mu\text{m}$ )	STDEV	CV%
一	155	164	161	160	0.0045	2.86
二	153	148	156	152	0.0040	2.65
三	181	19	182	184	0.0049	2.67
四	141	152	165	153	0.0120	7.87
五	185	192	195	191	0.0051	2.69
六	239	235	224	233	0.0077	3.34



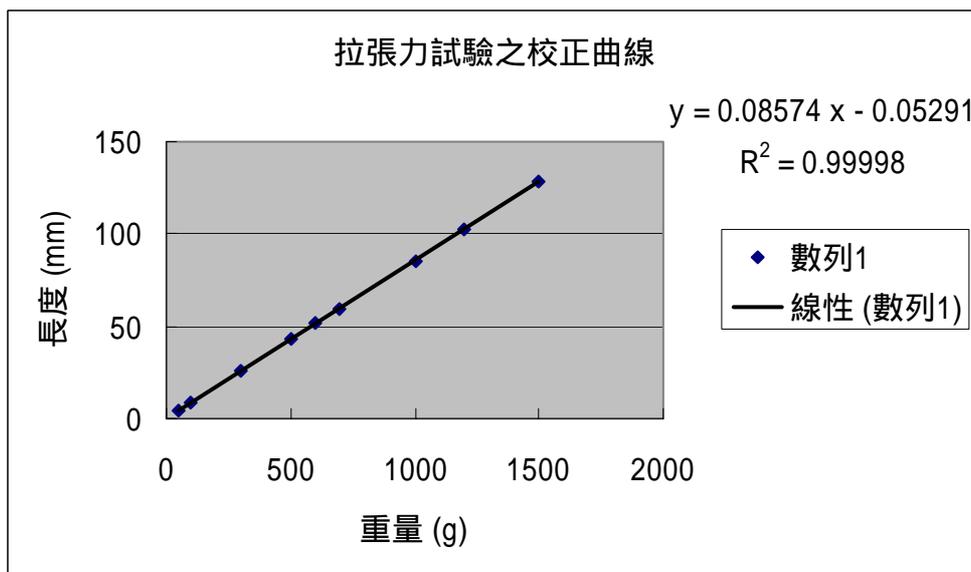
圖一、各配方之厚度的變異係數

## 2. 拉張力試驗

### a. 拉張力試驗之校正曲線

試驗重量範圍 ( 5 1500 g ) 所測得積分器所顯示的波峰高度

與法碼重量有良好的線性關係，其  $R^2$  值為：0.99998 ( 圖二 )



圖二、拉張力試驗之校正曲線

b. 彈性範圍、Young's Modulus 及破裂張力

不同配方之薄膜在離型後，以拉張力機測定其彈性範圍、

Young's Modulus 及破裂張力，結果如表六

表六、各配方之彈性範圍、Young's Modulus 及破裂張力

配方	截面積 (mm <sup>2</sup> )	彈性範圍 (cm)	Young's Modulus psi (lb/in <sup>2</sup> )	破裂張力 (dyne)
一 <sup>a</sup>	0.75	--	--	--
二	0.73	0.14	530.75	99677.45
三	0.94	0.13	187.21	54761.93
四	0.61	0.11	344.35	43054.66
五	0.88	0.10	64.78	33536.98
六	1.12	0.16	150.04	55852.72

<sup>a</sup> 配方一之薄膜不具彈性體之特性。

3. 洩漏性試驗

以腸溶衣薄膜封住試管之試管口，內含 37 5 ml 擬胃液 (pH 1.2)，經 4 小時後，各試管之重量未改變；取 5 ml 擬腸液 (pH 7.4) 置於試管中，以腸溶衣薄膜封住試管口，1 小時內，各配方薄膜產生破洞。

4. 殘餘揮發性液體試驗

$W_1$  : 乾燥前  $1 \text{ cm}^2$  面積的薄膜重

$W_d$  : 烘乾後薄膜重

$W_{rh}$  : 分別放置於 25 76%及 95%相對濕度的 Desiccator 中, 24 小時後的重

$W_1 - W_d = W_{w+o}$  ( 所移除的水及有機溶媒的重量 )

$W_{rh} - W_d = W_w$  ( 最大吸水量之重量 )

表七、研製薄膜之溶媒及水之殘餘量 ( % )

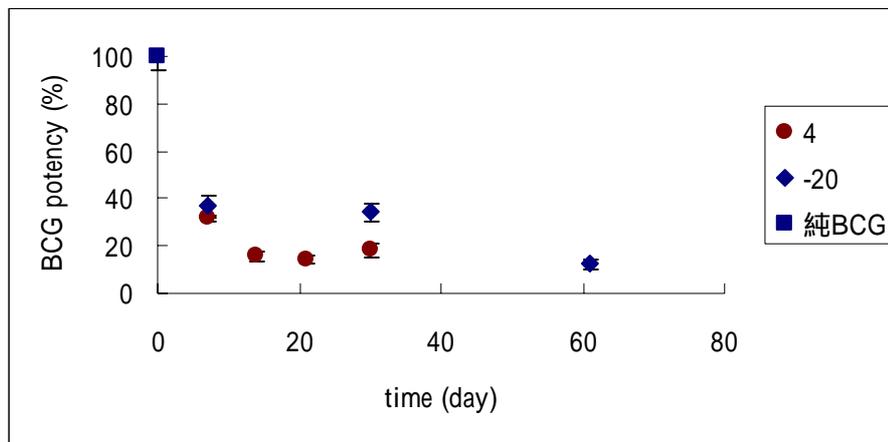
配方	$W_1$ ( mg )		$W_d$		$W_{95}$		$W_{w+o}$		$W_w$	
	95% R.H.	76% R.H.	95% R.H.	76% R.H.	95% R.H.	76% R.H.	95% R.H.	76% R.H.	95% R.H.	76% R.H.
一	13.7	19.6	12.1	18.0	13.7	19.6	1.6	1.6	1.6	1.6
二	19.0	14.8	17.1	12.9	19.0	13.8	1.9	1.9	1.9	0.9
三	17.8	16.4	14.9	14.0	16.9	15.0	2.9	2.4	2.0	1.0
四	20.2	19.0	17.6	16.8	19.9	18.4	2.6	2.2	2.3	1.6
五	20.2	22.0	17.6	20.8	19.7	20.9	2.6	1.2	2.1	0.1
六	24.5	23.7	21.6	21.9	24.3	23.2	2.9	1.8	2.7	1.3

## (二) 製程因子評估

製備好之製劑放置於不同的溫度評估 BCG 活性之變化。結果如表八及圖三所示。此結果顯示在平常溫度如 25、37 下，BCG 相當脆弱，在 37 8 小時僅剩下不到 10%，而 25 經 1 天後約僅 1/4 存活，但在 4 及 -20 則可有較佳的存活比率，一個月及二個月在二個溫度分別為 18.3% 及 12.2%。

表八、將 BCG 製劑放置於不同溫度下評估活性之變化

類別	貯放條件		CFU ( $10^5/\text{mg}$ )	效價 (%)
純 BCG	0 hr		$13.7 \pm 2.8$	$100 \pm 5.7$
製劑	37	0.3 天	$1.0 \pm 5$	$7.3 \pm 1.0$
		1 天	-	-
		3 天	-	-
		5 天	-	-
	25	1 天	$3.5 \pm 1.7$	$25.6 \pm 1.7$
		3 天	-	-
		5 天	-	-
		14 天	-	-
	4	7 天	$4.0 \pm 1.0$	$31.6 \pm 1.0$
		14 天	$2.2 \pm 1.0$	$15.9 \pm 2.1$
		21 天	$2.0 \pm 1.7$	$15.8 \pm 1.7$
		30 天	$2.5 \pm 1.5$	$18.3 \pm 3.0$
-20	7 天	$5.0 \pm 2.6$	$39.5 \pm 5.0$	
	30 天	$4.7 \pm 1.8$	$34.2 \pm 3.5$	
	61 天	$1.7 \pm 1.3$	$12.2 \pm 2.5$	



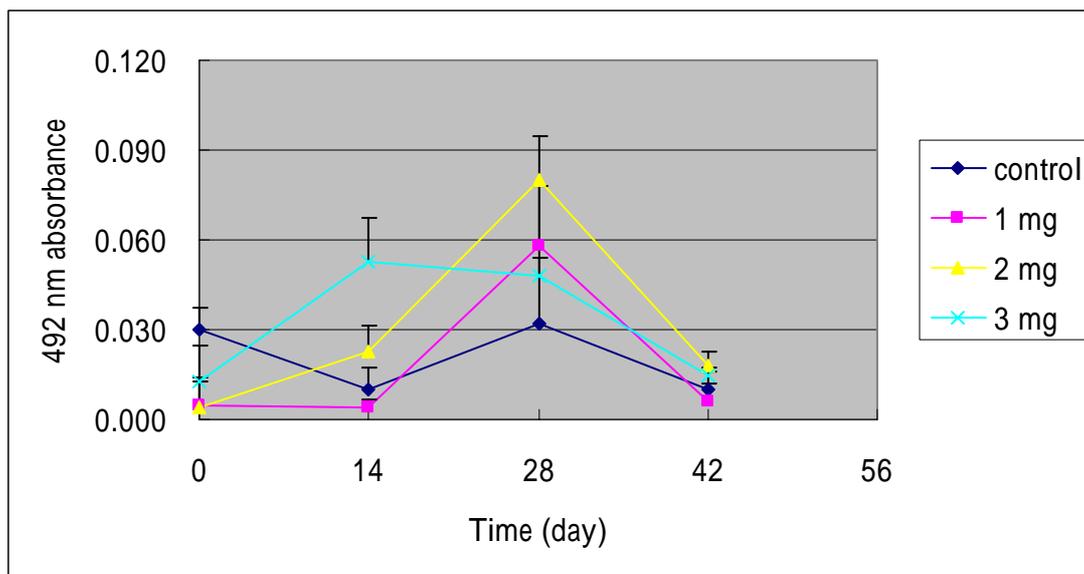
圖三、將 BCG 製劑放置於不同溫度下活性變化之趨勢

### (三) 動物實驗

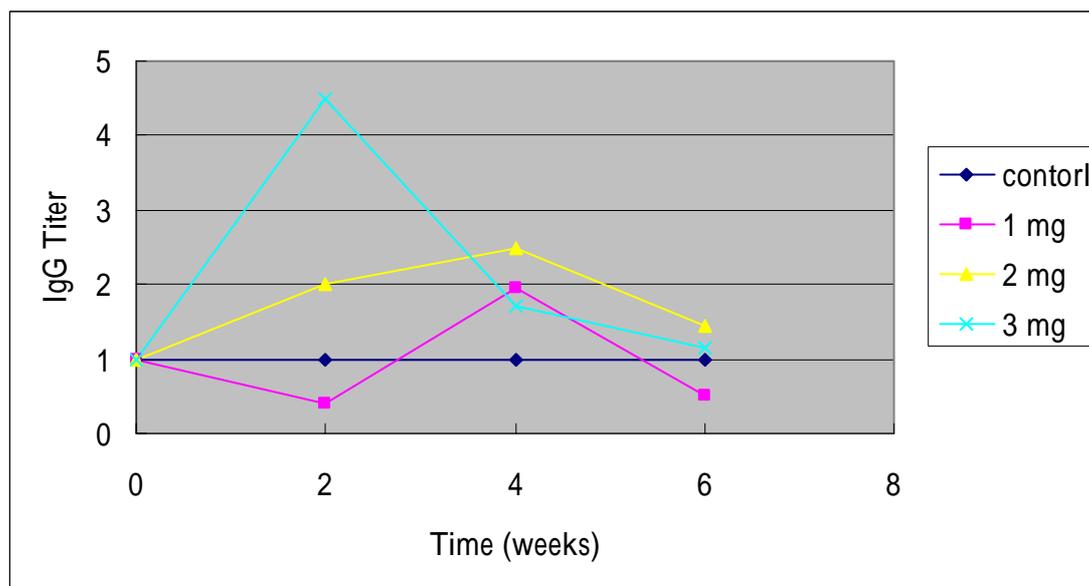
#### I. 活體免疫誘發試驗：

天竺鼠 BCG 口服疫苗膠囊後，於 0( 給予空白不含藥膠囊 ) 2、4、6 週經由耳朵取血，檢品以 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ( ELISA )方法測量 Ig G 含量( titer )，結果如圖四。以空白膠囊餵食天竺鼠作為控制組，顯示在各組中，Ig G 之變化量並不明顯。但若以「給予空白疫苗膠囊」之天竺鼠血液 Ig G 效價為參考值，比較 BCG 疫苗劑量對血液中 Ig G 效價變化之影響。結果如圖五。口服 1 mg BCG 疫苗後兩週內，血液中 Ig G 效價尚無明顯變化，之後則逐漸上升，在第 4 週時，已較「給予空白疫苗膠囊」者為高，為 1.871 倍，之後又逐漸下降。口服 2 mg BCG 疫苗後四週內，血液中 Ig G 效價皆持續上升( 1.0 2.0

2.52 倍), 之後則是下降。口服 3 mg BCG 疫苗後兩週內, 血液中 Ig G 效價明顯上升( 2.0 2.52 倍), 為「給予空白疫苗膠囊」者 4.417 倍, 之後則逐漸下降。



圖四、口服 BCG 疫苗製劑之活體免疫誘發 Ig G 效價之經時變化(n = 8)



圖五 口服給予 BCG 疫苗不同劑量與血液中 Ig G 效價之經時變化(n = 8)

## II. 柯霍氏試驗：

經由柯霍氏試驗，評估天竺鼠是否對結核桿菌產生抗體 附圖五為口服 BCG 疫苗製劑之天竺鼠，給藥七週後，進行柯霍氏試驗，24 小時內觀察之結果。在空白控制組及較小劑量 1.0 及 2.0 mg 之 BCG 記苗口服製劑並無明顯的紅腫反應。但 H 組給予 3 mg BCG 疫苗製劑 4 隻皆產生明顯紅腫之柯霍氏現象，且紅腫範圍>5 mm，呈陽性反應。柯霍氏試驗各組之結果整理於表九。

表九、天竺鼠經由口服給藥方式後所得到之柯霍氏試驗結果

組別 (n=4)	口服給予之劑量	紅腫範圍直徑				mean	SD
		(mm)					
E	空白不含藥膠囊	—	—	—	—	—	—
F	1.0mg BCG 疫苗口服製劑	—	—	—	—	—	—
G	2.0mg BCG 疫苗口服製劑	—	—	—	—	—	—
H	3.0mg BCG 疫苗口服製劑	7	7	15	12	10.25	3.95

—：無紅腫，mean ± SD

### (四) 安全試驗

12 隻天竺鼠在注射 BCG 疫苗口服製劑後，在六週內之觀察，所有的天竺鼠皆存活，動物的活動及狀況良好，體重也有顯著增加。而動物經解剖後並未觀察到結核桿菌感染的症狀。

## 討論

1. 本計畫中所研製之薄膜經由物化性質評估，包括：厚度、洩漏性、溶媒殘餘量等分析以挑選適當的腸溶衣膜配方。經由組成物之不同比例組合可得到較佳配方，薄膜壓封後密合性與添加塑化劑的含量有密切關係，配方須同時添加有 EP 及 TC 兩種塑化劑，如配方四、五、六較佳。而拉張力的性質則與各組成物之比例有密切關係。配方五其 Young's Modulus 及破裂張力最小，薄膜柔軟度佳，此外該配方之溶媒殘餘量亦最小。綜合製得之薄膜之物化性質挑選配方五（10% HP, 30% EP, 1% TC）進行膠囊殼之製備。
2. 膠囊殼可由塑膠模具經沾附膜衣液再揮發溶媒得到。可用一般的填充法將 BCG 疫苗之半成品填充於膠囊殼中。此填充之環境控制在低溫及低濕度之氮氣操作櫃中進行。此方面將來可設計成工業之生產方法如同抗生素分裝之製備。
3. 本研究初步建立小量之製備法，製備出具有腸道標之釋出的口服 BCG 疫苗製劑，保護口服用藥時 BCG 疫苗於腸道具較佳的活菌比率。在安定性的評估顯示疫苗製劑在-20 存放 2 個月後仍有 10%活菌。在一般室溫（25 ）放置一天則仍有 25%的活菌存活，顯示在短時間內使用此製劑應仍有其效價。而長時間存放之效價則有待進一步評估。

4. 動物實驗經由 ELISA 評估活體免疫誘發之效能,由於目前無法購置 IgA 之分析試劑,不能進行 IgA titer 之測定,而採用 IgG 分析所測得之結果,給藥組與控制組並無明顯之差異,但給藥組仍然可看到 IgG titer 逐漸升高再下降之趨勢,較起始點為高。其原因可能是與黏膜相關淋巴組織主要免疫反應與 IgA 或 IgE 合成相關,而在 IgG 的反應則較不明顯。在柯霍氏試驗,天竺鼠以 PPD 經皮內注射在 3 mg BCG 疫苗口服製劑有較佳的反應,但在較低劑量與控制組無紅腫反應。顯示研製之口服疫苗製劑具有潛能於臨床上用於預防肺結核的產生。

## 結論與建議

1. 本研究已初步建立了小量於低溫、低濕度之氮氣操作櫃中經由特製之膠囊填充，製備出 BCG 疫苗口服製劑，此製備法相當簡便。但要放大做為工業生產之方法，必須配合相關機器之設計等才能達成。
2. 而 BCG 疫苗口服製劑安定性，由於受研究期間之限制僅有短期之安定性，其效價在二個月內於適當溫度貯存仍有療效，但其長期之安定性仍有待進一步的評估。
3. 經由初步的動物試驗評估，製劑可誘發顯著之免疫效果(柯霍氏試驗)，顯示所研製之 BCG 疫苗口服製劑具有潛能開發成預防肺結核之口服疫苗製劑。

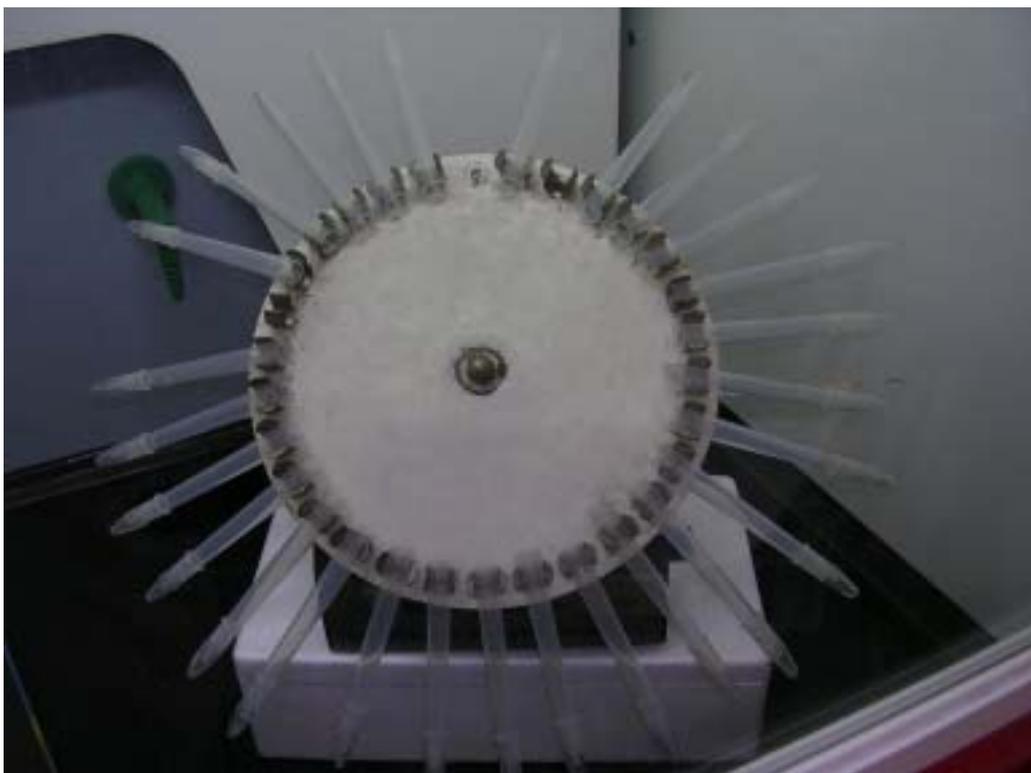
## 參考文獻

1. Lee V.H.L., Dodda-Kashi S., Grass G.M., and Rubas W. Oral Route of Peptide and Protein Drug Delivery, *Peptide and Protein Drug Delivery* (V.H.L. Lee ed.), Marcel Dekker, New York, 1991, pp. 691~738.
2. Jordan D. and Keynes G.B. Gastroadhesives in Controlled Drug Delivery, *Bioadhesion-Possibilities and Future Trends* (R. Gurny and H.E. Junginger, editors), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1990, pp. 165~176.
3. Johansen P., Gander B., Merkle H and P. Sesardic D. Ambiguities in the preclinical quality assessment of microparticulate vaccines. *Trends in Biotechnology*. 18:203-211, 2000.
4. O'Hagan D.T. The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *Journal of Anatomy*. 189:477-482, 1996.
5. Lebens M., and Holmgren J. Mucosal vaccine based on the use of cholera toxin B subunit as immunogen and antigen carrier. *Recomb. Vectors in Vaccine Development*. 82:215-227, 1994.
6. Bhagat H.R., Dalal P.S., and Nellore R. Oral Vaccination by Microspheres, *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines* (S. Cohen and H. Bernstein, editors), Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 381~399.
7. Lagranderie M., Chavarot P., Balazuc A.M., and Marchal G. Immunogenicity and protective capacity of Mycobacterium bovis BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine*. 18:1186-95, 2000.

8. De S.N. and Chattejee D.N. An experimental study of the mechanism of action of vibrio cholerae on the Intestinal mucosal membrane. *J. Pathol. Bact.*, 66:559~562, 1953.
9. Dasgupta U., Guhathakurta I., and Das J. Excretion of cholera toxin from *Escherichia coli*: a potential oral vaccine for cholera. *Biochem. Biophysical Res. Communi.*, 153: 967~972, 1988.
10. Chattaraj S.C., Rathinavelu A., and Das S.K. Biodegradable microparticles of influenza viral vaccine: comparison of the effects of routes of administration on the in vivo immune response in mice. *J. Contl. Rel.*, 58: 223-32, 1999.
11. Khan M.Z.I., Opdebeeck J.P. and Tucker I.G. Immunopotential and delivery systems for antigens for single- step immunization: recent trends and progress. *Pharm. Res.*, 11: 2-11, 1994.
12. Levine M.M. and Kaper J. B. Live Oral Vaccines Against Cholera: an Update. *Vaccine*, 11: 207~212, 1992.
13. Yeh M.K., Coombes A.G.A., Jenkins P.G., and Davis S.S. A novel emulsification-solvent extraction technique for production of protein loaded biodegradable microparticles for vaccine and drug delivery. *J. Contl. Rel.*, 33: 437-445, 1995.
14. Yeh M.K., Jenkins P.G., Davis S.S., and Coombes A.G.A. Improving the delivery capacity of microparticle systems using blends of poly (DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene glycol). *J. Contl. Rel.*, 37: 1-9, 1995.
15. Yeh M.K., Davis S.S., and Coombes A.G.A. Improving delivery of proteins from microparticles using blends of poly(DL lactide co- glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. *Pharm. Res.*, 13:

1693-1698, 1996.

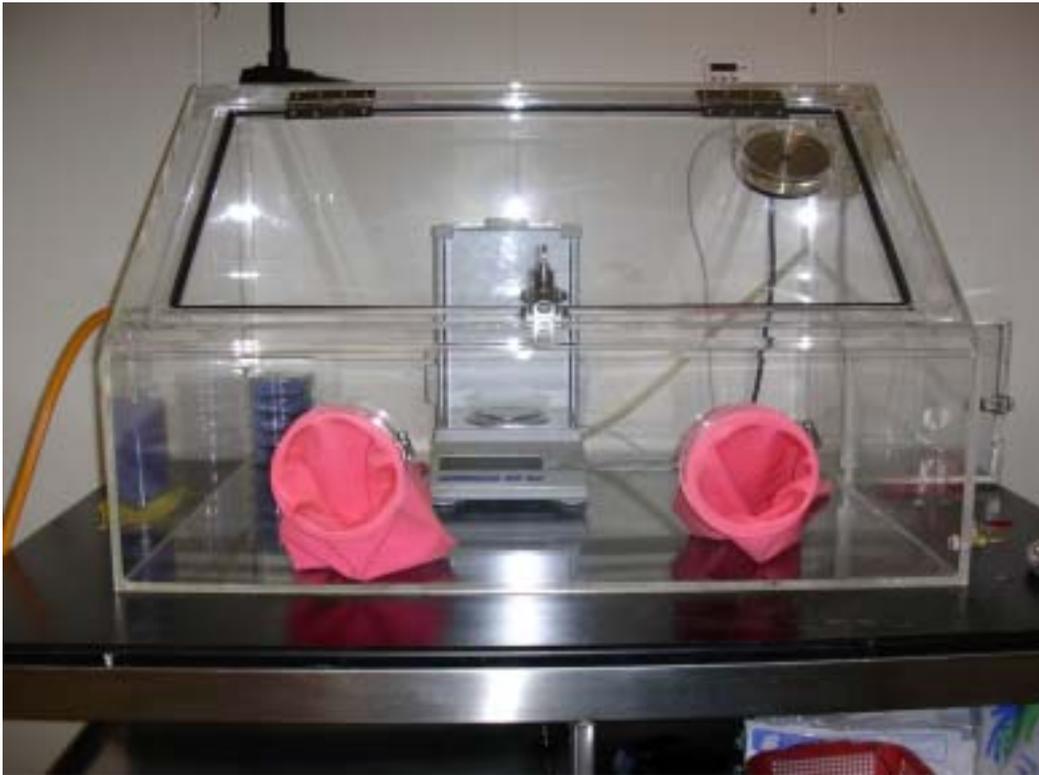
16. Coombes A.G.A., Yeh M.K., Eavelle E.C., and Davis S.S. The control of protein release from poly (DL lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method. *J. Contl. Rel.*, 52: 311-320 , 1998.
17. Jenkins P.G., Coombes A.G.A., Yeh M.K., Thomas N.W., and Davis S.S. Aspects of the design and delivery of microparticles for vaccine application. *J. Drug Targeting*, 3: 79-81, 1995.
18. Coombes AG., Lavelle EC., Jenkins PG., and Davis SS. Single dose, polymeric, microparticle-based vaccines: the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen. *Vaccine*. 14: 1429-38, 1996.
19. Holmgren J., and Svennerholm A.M. Bacterial enteric infections and vaccine development. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 21: 283-302, 1992.



附圖一、以塑膠模具製備膠囊殼過程中採用旋轉盤裝置。



附圖二、研製之腸溶性膠囊殼。



附圖三、控制溫度及濕度之無菌操作櫃用於 BCG 疫苗口服製劑之製備。



附圖四、充填 BCG 疫苗之於腸溶衣膠囊溶劑。



直徑 = 7 mm



直徑 = 7 mm



直徑 = 15 mm



直徑 = 12 mm

附圖五、天竺鼠經口服卡介苗疫苗製劑(3 mg/隻)七週後進行柯霍氏試驗之結果。