[PG9410-2348] 94農科-5.1.7-檢-B1(4) (15.P)

本計畫執行機關識別碼：050107B104

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局補助研究期末報告書

計畫主管機關　行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

計畫執行機關　私立台北醫學大學

計畫名稱　微脂粒包覆疫苗注射劑型平台之開發(第2年/全程2年)

國科會審議編號	9421011700050107B125	農委會計畫編號	94農科-5.1.7-檢-B1(4)

九十四年度行政院農業委員會動植物防疫檢疫局科技計畫期末摘要報告

微脂粒包覆疫苗注射劑型平台之開發

審議編號：9421011700050107B125

農委會計畫編號：94農科-5.1.7-檢-B1(4)

主管機關：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

執行單位：私立台北醫學大學

計畫主持人：劉得任

聯絡人：劉得任

電話號碼：(02)27361661~5202

傳真號碼：(02)27390581

期程：　93　年　1　月　1　日　至　94　年　12　月　31　日

經費：　全程　1,400　仟元　94年度　700　仟元

執行情形：

執行進度：		預定%	實際%	比較
	當年	100.0	100.0	0.0
	全程	100.0	100.0	0.0
經費支用：		預定(仟元)	實際(仟元)	支用率%
	當年	700	700	100.0
	全程	700	700	100.0

報告頁數：5　使用語言：中文

全文處理方式：可立即對外提供參考

中文關鍵詞：微脂粒；疫苗；佐劑；

英文關鍵詞：Liposome；Vaccine；Adjuvant

研究人員：

中文姓名	英文姓名
劉得任	Der Zen Liu
鄧明中	Ming Chung Deng

中文摘要：

本計畫主要工作為開發一新型佐劑(注射型微脂粒佐劑)之平臺,利用此平臺技術包覆疫苗開發出更多新劑型之疫苗。今年度主要工作是利用不同微脂粒組成配方及不同型式之微脂粒包覆兔化豬瘟病毒(Lapinization)製備成所謂微脂粒兔化豬瘟疫苗。微脂粒製

備是採用冷凍-加熱回溫法(Frozen then thawed)，疫苗途徑將採皮下肌肉注射。動物試驗部分，我們將進行SPF-Pig之IgG免疫力價追蹤，此外，也將進行豬隻攻毒試驗以評估微脂粒兔化豬瘟疫苗之有效性。

英文摘要：

The objective of the project is to establish a technical plateform of a novel adjuvant (injectable dosage form of liposome) for developing novel liposome-encapsulated vaccines. The main annual work of this year is using different composite formulations and types of liposome to encapsulate lapinized hog choleia virus in producing liposome dosage form of hog cholera tissue culture vaccine. The preparation of liposome is subjected to freeze and thaw method. Subcutaneous injection was adopted for the vaccine delivery. We will monitor the IgG titer of SPF-Pig and assess the vaccine efficiency of lapinized hog cholera vaccine after carrying out pig vaccination-challenge tests.

成果產出表：

<table>
<tr><td colspan="3">科技論文篇數</td><td colspan="3">技術移轉</td><td colspan="3" rowspan="2">研究報告　0篇
技術創新　0項</td></tr>
<tr><td>發表地點

類型</td><td>國內</td><td>國外</td><td>類型</td><td>項數</td><td>經費</td></tr>
<tr><td>期刊
論文</td><td>0篇</td><td>0篇</td><td>國外
引進</td><td>0項</td><td>0千元</td><td colspan="3">技術服務　0項</td></tr>
<tr><td>研討會
論文</td><td>0篇</td><td>0篇</td><td>移轉
國外</td><td>0項</td><td>0千元</td><td rowspan="2">專利權
(核准)</td><td>國內</td><td>0項</td></tr>
<tr><td rowspan="2">專著</td><td rowspan="2">0篇</td><td rowspan="2">0篇</td><td rowspan="2">移轉
企業</td><td rowspan="2">0項</td><td rowspan="2">0千元</td><td>國外</td><td>0項</td></tr>
<tr><td rowspan="2">著作權
(核准)</td><td>國內</td><td>0項</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>國外</td><td>0項</td></tr>
</table>

檢討與建議：

1.微脂粒於疫苗產業之應用除可做載體包覆亦可做佐劑功能
2.傳統微脂粒應用於口服系統並無法完全避開胃酸之破壞微 因此當微脂粒應用於口服系統其微脂粒表面必須改質,例如添加高分子多醣
3.疫苗注射劑型利用微脂粒做控制釋放大體上是可行的

主辦單位意見：

研究成果建議處理情形：

說明：

審查日期：

主辦專家簽章　　單位主管簽章

■公　開

□密件、不公開

執行機構（計畫）識別碼：

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

九十三年度科技計畫研究報告

資訊庫編號：

計畫名稱：微脂粒包覆疫苗之注射劑型平台之開發（第二年/全程二年）

英文名稱：Development of the injectable liposome encapsulated vaccine

計畫編號：94 農科－四.一.八－檢－B1

全程計畫期間：93 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

本年計畫期間：94 年 01 月 01 日至 94 年 12 月 31 日

計畫主持人：劉得任

執行機關：台北醫學大學生物醫學材料所

合作機關：行政院農委會家畜試驗研究所

壹、前言

一、疫苗佐劑

動物用疫苗產業是屬地域性產業，它可針對臺灣動物疾病發展本土化疫苗，解決產業界最迫切問題之產品。家畜禽魚疾病項目疫苗已是台灣生物醫學研究之研發成果之一，惟相關佐劑產品研發無法配合其已發展之家畜禽魚疾病項目疫苗，優良進口佐劑價高，導致疫苗品質及成本之上升，常是疫苗廠商難以平衡之選擇，尤其國產動物疫苗競爭大，在價美物廉之要求下，佐劑之優劣是廠商與外國疫苗產品競爭之成敗關鍵。因此，本計畫擬開發一新型之安全佐劑；並且適用於現已有之疫苗做一奈米微囊包覆(nanoencapsulation)技術。研製有效的疫苗佐劑以期能提高疫苗的穩定性、簡化保存條件、延長保存期和縮短免疫期，可有效發揮疫苗商品化能力，不斷發展和提高生技製品產業的品質。基於此理由，在提高疫苗效能的前提下，開發穩定、提升免疫反應且安全之新型佐劑實有當務急迫性。

眾所皆知，在疫苗之發展過程中，發現馴化活毒，死毒、次單位疫苗雖其安全性(safety)大量提升，但相對地有效性(efficacy)欲隨著降低。因此佐劑(adjuvant)之發展主要功能是協助抗原增進其專一性之免疫促進力，與抗原(antigen)混合注入生物體後，能增加抗原的免疫性或者能改變免疫反應類型。佐劑的作用機制極為複雜尚不完全清楚。目前一般被認為主要有(Cox and Coulter, 1997):

(1)它可能增加抗原的表面面積，易為免疫細胞所吞噬；佐劑一般是乳劑或懸液，當與水溶液抗原混合後形成一種油包水(water-in-oil)或水包油(oil-in-water)的乳狀顆粒，抗原吸附其中增加了跟巨噬細胞的接觸面積。

(2)延長抗原在體內的存留期，增加與免疫細胞接觸的機遇；，這種顆粒延緩了抗原的吸引，增加了局部刺激作用。另有報告指出，佐劑和抗原混在一起注射可以改變抗原的分佈。可明顯地延長抗原從局部吸收的時間。對於低分子量的多胜肽，這一作用較為短暫，而對於鞭毛抗原，這一作用十分明顯。雖然吸收被延緩，但在淋巴結和脾中，抗原的含量都明顯高於不用佐劑的動物。這提示，抗原與佐劑同時應用，可促進抗原

在淋巴組織中存留。

(3)誘發抗原注射部位及其局部淋巴結的炎症反應，有利於刺激免疫細胞的增殖作用。在佐劑一抗原的注射部位，可見到細胞浸潤，幾天後，局部形成肉芽腫（細胞免疫反應）。起初，反應部位以肉芽組織為主，以後則見多量巨噬細胞、漿細胞、巨細胞、類上皮細胞。局部淋巴結和脾中也可見大量漿細胞，提示佐劑可以直接刺激參與免疫反應的細胞並使之增生。有許多佐劑如內毒素(endotoxin)、分枝桿菌(mycobacterium)、小棒狀桿菌(Corynebacterium minutissimum),、DNA、RNA、皂素(saponin)等對細胞膜有活化作用，它們可增加巨噬細胞和淋巴細胞的細胞通透性，促進了對抗原的有效處理。

早期之疫苗研究發展過程中就知道佐劑在疫苗之重要性。所以疫苗發展過程中除在抗原外，無意中也發現一些物資可作為佐劑以增強疫苗之效力。1926 年 Glenney 就開始使用 Aluminum compounds 作為佐劑。此佐劑目前尚是可使用於人用疫苗之唯一合法佐劑(Audibert and Lise, 1993)。40 年代也開始有了 FCA (Freund's Complete Adjuvant)， FIA (Freund's Incomplete Adjuvant)。隨著疫苗抗原之研發外，佐劑之發明也有很明顯之進展。在化學性之佐劑上，如 muramyl dipeptide (MDP)，CpG 及細菌核酸都是自然界取得之化學品(Allison and Byars, 1992)。在物理性之佐劑如微脂體(Liposome), microencapsulation, ISCOM 及油質乳化劑都是以包埋，緩慢釋放等物理性方法加強疫苗之效用。在生物性佐劑方面一些細胞激素(cytokine)類之物質，破傷風(tetanus)、外毒素(exotoxin)、內毒素(edotoxin) 等細菌成份發現都是優良的佐劑。這些佐劑依其功能分類，但一些佐劑因其確實機制不明則以其成份歸類。但並非所有疫苗皆需佐劑，普通活毒全毒或活菌全菌之馴化疫苗並不太需佐劑。人用疫苗在法規上因安全考量，目前也只能用 Alum 類之水質佐劑，尚不准許使用 Alum 水質佐劑外之成份(Audibert and Lise, 1993)。但在人用及動物用疫苗之製造上，化學功能性佐劑，物理功能性佐劑及生物功能性佐劑皆有使用或進行產品研究，尤其是油質佐劑已是畜禽用疫苗之主要佐劑。此外，佐劑是不同廠牌疫苗品質差異的關鍵因素，是為各疫苗配方之要件，而且佐劑之選擇、純化也成為國際著名疫苗廠商之重要研發方向。為增加疫苗之效用、不同佐劑可相互加入應用，如在油質佐劑也可加入菌體作為佐劑。雖

然佐劑在國外疫苗研發頗受重視，但在國內產學界研發者並不多。

二、疫苗載體

除了上述佐劑之說明，開發一疫苗載體也是另一項之重點。如何利用疫苗載體包覆疫苗以達到保護疫苗本質(活性)或者利用載體包覆達到疫苗之控制、延緩釋放以開發長效型疫苗更是未來生物疫苗技術需突破之重點，因此，我們期許開發一新型之奈米微脂粒載體達成上述之功能目標。

三、微脂粒

微脂粒是在 1965 年由英國科學家 Bangham 所發現，當磷脂質薄膜處於水相環境系統中，會形成許多類似洋蔥多層結構(multilamellar structure)的中空球體，此即為微脂粒。由於微脂粒的結構組成類似生物膜(biomembrane)，因此微脂粒間接提供了科學家用來模擬細胞膜與膜蛋白(membrane protein)間交互作用之系統模式，包含細胞膜的滲透性、細胞膜的融合以及細胞膜與蛋白質的反應。此外，也因為微脂粒(liposome)的特殊中空球體構造，在微脂粒脂雙層的結構中，可保留疏水性藥物；其內部水相區中，可包覆水溶性藥物，因此，微脂粒幾乎可說是全方位藥物之載體。此外，更因為微脂粒之類似細胞膜結構，使得微脂粒易與細胞膜融合，因此微脂粒具有佐劑功效。基於此，

本研究期許利用微脂粒載體功能(包覆疫苗抗原)以及微脂粒佐劑功效開發出一微脂粒劑型疫苗。

豬瘟乃豬隻高傳染性及高致死性的疾病，一旦爆發疫情常引起畜主相當大的經濟損失。長久以來，我國豬瘟防疫主要採用兔化豬瘟活毒疫苗，但至今仍無法完全撲滅豬瘟。過去兔化豬瘟疫苗使用馬血清或脫脂乳作為保護劑，常造成豬隻免疫施打後引起過敏反應，目前市面上已有開發組織培養之疫苗，但仍有其他生物性病原污染或培養基引發過敏之虞。為開發更有效且更安全的疫苗，利用現今最新的微脂粒包埋技術進行兔化豬瘟佐劑研發，希望將來能提供廣大畜主更經濟有效的疫苗，

亦期能為早日撲滅豬瘟大業貢獻薄力。

貳、實驗方法

一、實驗材料

細胞

豬瘟病毒常使用初代豬睪丸細胞如 ST 或豬腎來源的細胞株，如 PK-15 或 SK-6 進行增殖，本實驗是以 PK-15 細胞株作為病毒增殖及力價測定之用。將豬腎化細胞 (PK-15 cell) 培養於含 5% 胎牛血清 (Biological Industries) 之 MEM (50 μg/ ml gentamycine 及 2 mM L-glutamine 之 Modified Eagles medium (MEM) (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.) 中，待 75cm^2 之細胞培養角瓶長滿後，並以 HBSS (Hanks balanced salt solution) 細胞緩衝液沖洗二次，再加入少量之 0.25%細胞消化液 (trypsin- versene) 後將細胞培養瓶置於 37℃消化 4 分鐘，待細胞圓形化後隨即以含 5%胎牛血清之 MEM 以套管長針沖散細胞，於 10℃下以 1000 rpm 離心 5 分鐘後，將細胞懸浮於含 5% 胎牛血清之 MEM 並計算其細胞數，將細胞數調整至 1×10^6 cells/ ml。

二、兔化豬瘟病毒之增殖及病毒力價之測定

(1)病毒增殖

實驗中所使用的兔化豬瘟病毒株（LPC）是將種毒接種至兔子四天後，收取脾臟並研磨成乳劑並以 PK-15 細胞繼代分離而來。LPC 病毒先以 PK-15 細胞株進行增殖，培養於含 5%胎牛血清之 MEM 培養液，待細胞長至 8-9 分滿時則加入病毒液，經 5 天培養後，將細胞及細胞培養液以超音波擊碎細胞，經離心 (2000 rpm，10 分鐘) 後，取上清液並少量分裝於 1.5 ml 微量離心管中，保存於-70℃中，待經病毒力價測定後以供實驗使用。

(2)病毒力價之測定 (viral titration)

首先將 PK-15 cell 培養於 96 孔微量平底培養盤 (Costar, Cambridge, MA)，每

一孔接種 1×10^4 之細胞數，經置於 37℃，5%二氧化碳之恒溫培養箱內培養。待隔夜培養至細胞長滿 70%以上時進行病毒力價測定，首先將待測樣品 (包括病毒液、10 倍臟器乳劑、血清及脫纖血、陽性及陰性對照組)，以不含血清之 MEM 做 10 倍連續稀釋，稀釋倍數由 10^{-1} 至 10^{-6}，再將每個稀釋倍數的病毒液均接種到 96 孔微量平底培養盤中，每一孔加入 50 μl 之樣品稀釋液，並進行 8 重複。將 96 孔培養盤置於 37℃，5%二氧化碳之恒溫培養箱內培養 2 天，再依照間接免疫螢光染色法 (indirect immunofluorescent assay; IFA) 進行病毒力價判讀。而病毒力價 (50% tissue culture infection dose; $TCID_{50}$) 係採 50% 螢光抑制計算之，亦即在可抑制一半細胞孔出現螢光 (病毒斑灶) 之血清最高稀釋倍數為抗體之力價。依 Reed-Muench Method 之方法計算之。

三、實驗動物

無特定病原 (Specific pathogen free; SPF) 豬

購買無特定病原豬，該系統之特定疾病是指無萎縮性鼻炎、流行性肺炎、疥癬蟲症、放線桿菌胸膜肺炎、豬赤痢、假性狂犬病及弓蟲症感染。本試驗選取 6 週齡之 SPF 豬隻用來進行 LPC 及 Liposome 包覆之免疫試驗。

LPC 及 Liposome 包覆之免疫試驗

(1) Liposome 佐劑組成配方之調製

利用 DOPC、60% PC 及膽固醇按一定之比例混合製成微脂粒系統 (Liposome system)。微脂粒具有方便與細胞融合之優點，依此基礎開發成為佐劑將有助提升豬瘟疫苗之免疫效力。

(2) 疫苗效力評估

為評估配方之微脂粒系統可誘發體內最佳之免疫反應，計畫以豬隻進行評估測試。

將已製備好之免化豬瘟疫苗株與配方之微脂粒進行包覆。分為免疫一次及兩次兩組，每組選擇三隻六週齡之 SPF 豬分別以肌肉注射 2ml 測試疫苗。免疫一次之實

驗組經免疫七天及十四天後採取其血清，免疫兩次之實驗組則分別於第一次免疫後七天及十四天及第二次免疫後七天及十四天採取血清樣品，應用間接螢光染色法偵測實驗動物是否產生抗豬瘟病毒之中和性抗體。並取商品化之 LPC 疫苗及生理食鹽水各 2ml，作為陽性及陰性對照組。

中和抗體力價檢測 (移行抗體之測定)

在測定一般豬隻之 SN 時，首先利用已知抗原檢測血清中的抗體，將待測血清置於水浴中以 56℃非動化 30 分鐘。先於 96 孔細胞培養盤內加入等量 (50μl) 不含胎牛血清之 MEM，再加入待測血清於 96 孔細胞培養盤之每行首孔，而直接於平底培養盤上以 MEM 做 2 倍連續稀釋，最終體積每孔為 50μl。每孔再加入每 50μl 含 200× $TCID_{50}$ 的 CSFV (LPC)，並同時進行陽性及陰性對照，並將細胞培養於 37℃含 5% CO_2 培養箱中感作 2 小時，俟作用之後每孔則加入 50μl 含 $1x10^4$ 個 PK-15 細胞懸浮液，置於 37℃含 5% CO_2 培養箱中經培養 48 小時後，進行間接免疫螢光染色法 (IFA)。最後於螢光顯微鏡下判讀染色結果，以血清中的最高稀釋倍數都不會產生特異性螢光，則以該稀釋倍數判定為中和抗體力價。

四、豬隻血液學檢查

豬隻於免疫前抽取頸靜脈賣血液 10 ml，所採集之病毒血液分成二部分，第一部分每毫升血液以 10 unit 肝素抗凝，並以全自動血球計數儀 (Sysmex CC-180) 計算各類血球數，包括白血球總數、紅血球及血小板總數。另一部份則保留脫纖血於 -70℃以供測定血液中 CSFV 之力價。

參、實驗結果

一. 免化豬瘟病毒包覆率

微脂粒製程:其中(一)薄膜水合法:包覆率約 35% (二)酒精注射法:包覆率約 55% (三)冷凍-加溫法:包覆率約 39%

微脂粒型態: 其中(一)MLV 型:包覆率約 42 % (二)LUV 型: 包覆率約 35 % (三)SUV 型: 包覆率約 24 %

微脂粒 編號	微脂粒型態	微脂粒配方組成	微脂粒包覆率
1	SUV	Cholesterol 5%	22%
2	SUV	Cholesterol 10%	25%
3	LUV	Cholesterol 5%	33%
4	LUV	Cholesterol 10%	37%
5	MLV	Cholesterol 5%	41%
6	MLV	Cholesterol 10%	44%

二. 微脂粒組成穩定度

(1)就微脂粒之配方組成而言，由於本劑型主要應用於注射劑型，為了避免微脂粒載體被血液流場之剪應力破壞，我們於體外先行做一體外流場對微脂粒載體表面耐受力反應，實驗結果發現微脂粒之配方組成是必須添加適量之膽固醇，以提高微脂粒載體表面之耐受力。

(2)就微脂粒包覆兔化豬瘟活毒而言，目前可達到之包覆率大約 35 % 。

(3)就體外物理穩定度試驗，微脂粒包覆兔化豬瘟活毒之洩漏量，4℃下大約可達 90 天然而 25℃下大約只可達 30 天。

(4) MLV 型微脂粒之包覆率最高 SUV 型微脂粒之包覆率最低。

三.兔化豬瘟活毒疫苗賦型微脂粒動物試驗結果

第一組

材料：八隻五至六週齡之無特定病原豬（SPF pig）、第一次免疫（100μl 濃縮病毒液＋liposome）5ml、第二次免疫（60μl 濃縮病毒液＋liposome，於 4℃下放置兩週）5ml。動物編號 895-897 免疫一次、編號 898-900 免疫兩次、編號 876、1000 為陰性對照組。

病毒濃度 $1x10^{8.91}$/ml $TCID_{50}$

動物編號	免疫前中和抗體力價	第二週中和抗體力價	第四週中和抗體力價	第七週中和抗體力價
895	≦3	4	45	512
896	≦3	4	32	362
897	≦3	8	64	724
898	≦3	32	362	724
899	≦3	≦3	16	181
900	≦3	45	128	512
876	≦3	≦3	≦3	≦3
1000	≦3	≦3	≦3	≦3

第二組

材料：十隻五至六週齡之無特定病原豬（SPF pig）、第一次免疫（病毒液＋liposome）5ml、第二次免疫（病毒液＋liposome）5ml。動物編號 1053、1054 免疫一次、編號 1055、1056 免疫兩次、編號 1057、1058 為免疫家畜衛生試驗所兔化豬瘟活毒疫苗成品、編號 1059、1060 免疫組織培養兔化豬瘟病毒上清液、編號 1061、1062 為注射生理食鹽水之陰性對照組。

病毒濃度 $1\times10^{5.87}$/ml $TCID_{50}$

動物編號	免疫前中和抗體力價	第二週中和抗體力價	第四週中和抗體力價	第七週中和抗體力價
1053	≦3	16	8	256
1054	≦3	6	45	362
1055	≦3	8	64	362
1056	≦3	4	91	362
1057	≦3	6	6	362
1058	≦3	≦3	4	362
1059	≦3	4	6	91
1060	≦3	4	16	256
1061	≦3	≦3	≦3	≦3
1062	≦3	≦3	≦3	≦3

四.豬隻攻毒試驗

標準強毒株 ALD 攻毒(10^4 MLD)　14 天統計

(一)量體溫

有打疫苗之 SPF 豬隻體溫並無明顯上升，然沒有打疫苗之 SPF 豬隻體溫則有明顯

上升並有發病現象。

(二)致死率

有打疫苗之 SPF 豬隻致死率為 0%，然沒有打疫苗之 SPF 豬隻致死率為達 100 %。