

出國報告(出國類別：考察)

動物組織培養疫苗量產技術之研習

服務機關：行政院農業委員會家畜衛生試驗所

姓名職稱：邱淑君 助理研究員

派赴國家：日本

出國期間：94 年 10 月 11 日至 94 年 10 月 24 日

報告日期：94 年 12 月 6 日

出國報告審核表

出國報告名稱：動物組織培養疫苗量產技術之研習		
出國人姓名	職稱	服務單位
邱淑君	助理研究員	行政院農業委員會家畜衛生試驗所
出國期間：94 年 10 月 11 日至 94 年 10 月 24 日		報告繳交日期：94 年 12 月 6 日
出國計畫主辦機關審核意見	☐ 1.依限繳交出國報告 ☐ 2.格式完整（本文必須具備「目的」、「過程」、「心得」、「建議事項」） ☐ 3.內容充實完備 ☐ 4.建議具參考價值 ☐ 5.送本機關參考或研辦 ☐ 6.送上級機關參考 ☐ 7.退回補正，原因： ☐ ←不符原核定出國計畫 ☐ ↑以外文撰寫或僅以所蒐集外文資料為內容 ☐ →內容空洞簡略 ☐ ↓電子檔案未依格式辦理 ☐ °未於資訊網登錄提要資料及傳送出國報告電子檔 ☐ 8.本報告除上傳至出國報告資訊網外，將採行之公開發表： ☐ 辦理本機關出國報告座談會（說明會），與同仁進行知識分享。 ☐ 於本機關業務會報提出報告 ☐ 9.其他處理意見及方式：	
層轉機關審核意見	☐ 1.同意主辦機關審核意見 ☐ 全部 ☐ 部分_____（填寫審核意見編號） ☐ 2.退回補正，原因：_____ ☐ 3.其他處理意見：	

說明：

- 一、出國計畫主辦機關即層轉機關時，不需填寫「層轉機關審核意見」。
- 二、各機關可依需要自行增列審核項目內容，出國報告審核完畢本表請自行保存。
- 三、審核作業應儘速完成，以不影響出國人員上傳出國報告至「出國報告資訊網」為原則。

壹、摘要

組織培養疫苗具有易於控制品質，可以大量生產，物美價廉之優點，又可免去臟器疫苗製作時之麻煩及病毒迷入之風險，為目前動物活毒疫苗製造之最終目標，目前國內各動物用生物藥品均有動組織培養疫苗之生產，惟尚停留在小批量生產階段，必須要能控制品質又能大量生產，才能達到價廉物美之境界，故擬派員赴日本獨立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所，製劑研究部製造二科，研習大批量生產組織培養疫苗細胞培養技術。本次參訪行程中有幸參與藍舌病瓊脂凝膠凝集反應抗原製備、SPF 豬隻建構、牛流行熱弱毒活毒疫苗製造生產等多項實驗及製造工作，實感獲益良多。

貳、目次

摘要	第 3 頁
目次	第 4 頁
研習目的	第 5 頁
研習過程	第 5 頁
研習機構介紹	第 8 頁
研習心得	第 12 頁
建議事項	第 20 頁
附錄	第 22 頁

參、研習目的

組織培養疫苗具有易於控制品質，可以大量生產，物美價廉之優點，又可免去臟器疫苗製作時之麻煩及病毒迷入之風險，為目前動物活毒疫苗製造之最終目標，目前國內各動物用生物藥品均有動組織培養疫苗之生產，惟尚停留在小批量生產階段，必須要能控制品質又能大量生產，才能達到價廉物美之境界，故擬派員赴日本獨立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所，製劑研究部製造二科，研習大批量生產組織培養疫苗細胞培養技術。

肆、研習過程

本次研習始於民國九十四年十月十一日：

10 月 11 日（星期二）：

上午：九時搭乘中華航空 CI 100 班機啓程前往日本。

下午：13:20 抵達成田機場，製造二科科長高木 昌美及牛口 仁美小姐至機場接機並轉往茨城縣筑波市動物衛生研究所，進入製造二科實驗室，會見該實驗室成員：新井 啓五、內村 昭彦、照井 和哉、佐藤 美江等同仁。

10 月 12 日（星期三）：

上午：1.經由動物衛生研究所製造二科科長高木 昌美介紹，拜會動物衛生研究所所長谷口稔明、企劃組長、國外交流科科長小野寺、製劑研究部主任等長官。

2.參觀該所種原庫，學習種毒株、種菌株、細胞株之保存。

3.學習藍舌病凝集抗原安瓶封瓶製造流程。

下午：進入二科實驗室實習組織培養技術，將細胞培養瓶內生長之倉鼠腎臟 (HmLu)細胞利用胰蛋白酶 (Trypsin) 消化、離心，計算細胞數後將細胞繼代培養於三支長約 120 公分之玻璃長迴轉細胞培養瓶、64 支細胞培養試管、96 孔細胞培養盤內。

10 月 13 日（星期四）：

上午：1.HmLu 細胞換培養液。

2.藍舌病不活化病毒濃縮。

下午：1.牛流行熱病毒 10 階段稀釋，不同病毒力價接種至短玻璃迴轉瓶內長滿之 HmLu 細胞。

2. 瓊脂凝膠玻片製作。

3.藍舌病病毒瓊脂凝膠沉降反應測試 AGID TEST。

10 月 14 日（星期五）：

上午：1.牛流行熱病毒力價測定 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 階段稀釋，接種至 64 支玻璃試管及 96 孔細胞培養盤。

2.後藤義之博士討論牛流行熱活毒疫苗製造流程。

下午：藍舌病不活化病毒濃縮液透析。

10 月 15 日（星期六）：例假日

藍舌病不活化病毒濃縮液透析之 PBS 液更換及取樣。

10 月 16 日（星期日）：例假日

藍舌病不活化病毒濃縮液透析之 PBS 液更換及取樣。

10 月 17 日（星期一）：

上午：1.收取前三天藍舌病不活化病毒濃縮液透析之 PBS 採樣液以 $100 \mu\text{L}$ 三氮化鈉（ NaN_3 ）試劑檢測化學呈色反應。

2. 瓊脂凝膠玻片製作。

3.測試藍舌病不活化病毒濃縮液瓊脂凝膠沉降力價。

下午：1.與後藤義之博士討論懸浮細胞製備及培養。

2.玻璃角瓶中之 HmLu 細胞 112 繼代至一支短玻璃迴轉細胞培養瓶及二盤 96 孔細胞培養盤。

3.觀察 10 月 14 日接種之牛流行熱病毒之 HmLu 細胞 64 支玻璃培養試管及 96 孔細胞培養盤，紀錄 CPE 以測定病毒力價。

10 月 18 日（星期二）：

上午：1.至 SPF 豬舍學習二胎懷孕末期母豬犧牲以無菌操作方式生產 SPF 仔

豬，學習仔豬接生方式及飼養保溫環境。

- 2.觀察 10 月 14 日接種之牛流行熱病毒之 HmLu 細胞 64 支玻璃培養試管及 96 孔細胞培養盤，紀錄 CPE 以測定病毒力價。

下午：1. 瓊脂凝膠玻片製作

- 2.觀察藍舌病不活化病毒濃縮液沉降反應計算病毒力價。
- 3.牛流行熱病毒 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 階段稀釋，之後將稀釋 10^{-4} 、 10^{-5} 之病毒 2ml 接種至長滿 HmLu 細胞長約 120 公分之玻璃長迴轉細胞培養瓶中繼續培養。

10 月 19 日（星期三）：

上午：1.觀察 10 月 14 日接種之牛流行熱病毒之 HmLu 細胞 64 支玻璃培養試管及 96 孔細胞培養盤，紀錄 CPE 以測定病毒力價。

- 2.測定藍舌病不活化病毒濃縮液沉降反應計算病毒力價。

上午：1. 瓊脂凝膠玻片製作。

- 2.藍舌病不活化病毒各稀釋 2 倍、3 倍、4 倍分裝於安瓶，利用小型冷凍乾燥機進行病毒安瓶真空冷凍乾燥。
- 3.牛流行熱病毒 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 階段稀釋， 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 病毒液接種至二盤長滿 HmLu 細胞之 96 孔細胞培養盤中。

10 月 20 日（星期四）：

上午：1.藍舌病不活化病毒真空冷凍乾燥之安瓶進行封瓶。

2. 瓊脂凝膠玻片製作。
- 3.測定藍舌病不活化病毒沉降抗原力價。

下午：觀察前一日接種牛流行熱病毒之 HmLu 細胞 96 孔細胞培養盤，紀錄 CPE 以測定病毒力價。

10 月 21 日（星期五）：

上午：1.瓊脂凝膠玻片製作。

- 2.測定藍舌病不活化病毒沉降抗原力價。

下午：觀察前二日接種牛流行熱病毒之 HmLu 細胞 96 孔細胞培養盤，紀錄

CPE 以測定病毒力價。

10 月 22 日（星期六）：例假日

10 月 23 日（星期日）：例假日

10 月 24 日（星期一）：

結束行程啓程返國，搭乘中華航空 CI 101 班機返抵國門。

伍、研習機構介紹

日本政府於 2001 年成立獨立行政法人農業技術研究機構（National Agriculture Research Organization; NARO）將原農林水產省之農業研究場所整合行政法人化，機構內包括：中央農業綜合研究所、作物研究所、果樹研究所、花藝研究所、蔬菜茶葉研究所、畜產草地研究所、動物衛生研究所、北海道農業研究中心、東北農業研究中心、近畿中國四國農業研究中心、九州沖繩農業研究中心等十一個單位。動物衛生研究所位於該機構東邊，緊鄰行政中心，該所除所長室之外，共細分為 10 個部門，各司其職。該所組織如下：

日本獨立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所組織		
所 長 谷口稔明	企画調整部	研究企画科 研究交流科 情報資料課 衛生検査科 実験動物管理科 炎症性腸疾患研究
	總務部	
	総合防疫研究官	後藤義之
	疫学研究部	上席研究官 臨床疫学研究室 予防疫学研究室 疫学情報室 微生物・血清管理室 病性鑑定室
	感染病研究部	上席研究官 病原細菌研究室 細菌病研究室 病原ウイルス研究室 ウイルス病研究室 複合感染病研究室 寄生虫病研究室 原虫病研究室 感染病理研究室
	免疫研究部	上席研究官 免疫機構研究室 免疫制御研究室 應用免疫研究室 免疫病理研究室
	海外病研究部	上席研究官 海外病研究管理官 病原研究室 診断研究室 預防研究室
	生産病研究部	上席研究官 代謝障害研究室

		臨床繁殖研究室 病態生理研究室 病態病理研究室
	安全性研究部	上席研究官 安全性評価研究室 毒性物質制御研究室 毒性病理研究室
	生物学的製剤センター	製造第 1 科 製造第 2 科 品質管理科

在拜訪所長谷口稔明博士時，所長簡介該研究所前身爲農林水產省家畜衛生試驗場，爲動物疫病之主要研究單位，如同本所（行政院農業委員會家畜衛生試驗所）。

該所負責診斷鑑定及技術研發業務，並接受農林水產省之委託辦理獸醫人員訓練。該所目前之研究人員有 130 人（全所員工有 230 人），一年執行的研究計畫約有 170 個，其中研究主題有一半是和人畜共通傳染病相關。目前該所已完成人畜共通傳染病診斷實驗室，採 P3 級生物安全標準設計建築，該實驗室負責 BSE 診斷鑑定工作。

谷口所長相當關心我國家禽流行性感冒防疫計畫，瞭解台灣現階段已全面警戒，希望保持無高病原性家禽流行性感冒之非疫國。日本因爲在今年（2005）一月及七月爆發 H5N1 的高病原性家禽流行性感冒(HPAI)，但發病場已經迅速採取撲滅政策，發生場周圍 10 公里爲限制移動區，需管制 21 天經 2 次抗體檢查皆呈現陰性才取消管制。惟爲建立防護機制，該國仍採購七百萬劑不活化疫苗（H5N2）血清型家禽流行性感冒病毒珠供緊急狀況之用。谷口所長因此希望台灣要審慎注意 HPAI 的防疫政策。

該所之生物製劑研究部，主要是生產任務性之動物用生物製劑，補充民間不生產之必要性製劑。至於生物製劑之檢驗，則由國立動物醫藥檢查所執行，採生產與檢驗分開之原則。該項制度與台灣目前之執行方法相同。生物製劑研究部分爲製造一科、製造二科、及品質管理科，製造一科負責細菌性抗原診斷試劑製

造，品質管理科負責製劑研究部各項產品之品質管制。此次赴日主要於製造二科實驗室研習，該科生產病毒性相關疫苗及診斷抗原製備包括：

- 1.牛瘟活毒疫苗
- 2.牛流行熱疫苗
- 3.藍舌病瓊脂凝膠沉降反應診斷抗原
- 4.家禽流行性感冒瓊脂凝膠沉降反應診斷抗原
- 5.鳥型結核菌素補體結合反應用抗原
- 6.副結核菌素研發

疫苗部分並未提供生產銷售，僅保留生產技術及種毒株、種細胞之繼代保存，藍舌病瓊脂凝膠沉降反應診斷抗原每年生產二次，其他診斷試劑則視實際需求生產。由於原定八月赴日研習，卻因為七月日本爆發高病原性家禽流行性感冒，該科緊急生產家禽流行性感冒瓊脂凝膠沉降反應診斷抗原，因此研習時間順延至 10 月成行。

陸、研習心得

一、 日本動物衛生研究所的職場環境：

日本動物衛生研究所隸屬於獨立行政法人農業技術研究機構，該機構位於東京之東北方，佔地幅員遼闊，今年(2005)九月筑波快速電車已通車，起站為筑波站，終點站為東京之秋葉原站，最接近該機構的站名為 MIDORINO 站，經由此站到達該機構車程約 5 分鐘交通堪稱便利。各研究所間以道路花籬櫻花路樹區隔，風景優美，該機構各項設備完善，猶如一間小型社區，小型商店，且機構內有多家餐廳可以選擇提供早、中、晚餐，物美價廉。

該機構建有一棟學員宿舍，提供機構內各研究所研習人員住宿用，由於該機構位於筑波郊區，離市區車程約 15 分鐘，因此宿舍相當具實用性，宿舍內應有盡有，分為國內人員宿舍及國外人員宿舍二部分，國外人員宿舍還可分成單人套房及家眷套房，足以提供日本國內各地與各國研習人員住宿用，除了中央空調、視聽室、廚房、洗衣房外，還有娛樂室以提供住宿人員做室內球類運動用，外國研習人員短則數週長則數年停留於該機構研習，因此該宿舍發揮很好的功效。

動物衛生研究所改制為行政法人，所負擔的業務量如同往常，人員並未減少，獸醫人數佔總工作人員之 1/2，專業人員眾多，研究風氣興盛，所內人員和善有禮，態度親切，研究氣氛融洽。該所包含多棟建築物各自區分部組，雖然建築物分隔各部組，但各建築內有天橋相通，行進間還可了解其他研究室研究重點，並可交換研究心得，各棟建物與樓層具有緊急門，平時為開啓狀態，遇緊急疫情可關閉，實驗室可各自獨立。

該所占地遼闊，環境清幽，且具備一完善之草地球場，各部組人員亦自發性組成球隊，每利用中午午休時間展開各部組間球隊對抗賽，氣氛和樂，無論是否參賽或上場，所內人員幾乎全員到齊，各自為隊友同仁加油吶喊，除同仁間更深入了解，亦與其他部組建立友誼，此外更可呼吸新鮮空氣，擺脫實驗室密閉環境，運動筋骨增進身體健康。

二、 高密度細胞培養：

此次赴日研習主為學習日本高密度培養技術，目前組織培養技術已建立二套系統，其一為利用細胞培養瓶系統，包含細胞培養角瓶及細胞培養迴轉瓶，使用細胞迴轉瓶需建立相關的技術及設備；其次為生物反應器系統，需要更精密的生物反應器及精湛的操作技術。

此二套操作系統比較可發現：細胞培養迴轉瓶由於開發時間較久，生產技術已臻成熟，且價格低廉，利用此套系統培養細胞及增殖疫苗毒作為生產工具較好控制又便於操作，故目前之疫苗廠在生產組織培養疫苗時均使用此套系統。生物反應器需要特殊儀器，儀器較為複雜，動物細胞一般為貼壁性生長，要將動物細胞培養於生物反應器必須將細胞變成懸浮培養，技術建立較為困難，細胞懸浮培養需要使用微載體(Microcarriers)，而生物反應槽內的代謝產物則需要相關儀器控制，生物反應器的生長環境狀況如氧氣、氮氣、二氧化碳、流體動力學、溫度、酸鹼度和被溶化的氧氣值和轉速（speed/circulation）需要嚴密監測和控制。目前生物反應槽的動物細胞培養技術還在構築中。

日本動物衛生研所的疫苗高密度培養生產技術以細胞培養瓶系統為主，該所已建立一系列培養設備與技術，人員訓練亦已技術完備，該所使用的細胞培養迴轉瓶為 120 公分長，一瓶約可生產 200ml 病毒力價大於 $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml 之流行熱病毒，用以生產疫苗相當具有經濟價值，另值得學習的地方，使用於細胞培養的細胞繼代培養液中只添加 2% 的成年牛血清，而在接種病毒後更換維持培養液，維持培養液配方改變，不使用成牛血清僅使用酵母萃取物，因此有效節約生產成本又能達到高的病毒量。而細胞培養迴轉瓶及細胞培養角瓶均為玻璃製品，經過洗滌後又能重複使用，相當經濟實惠。

製造研究部尚有生物反應器，但由於目前使用上還不甚理想，僅止於實驗研究用，未使用於疫苗製造生產，據悉其生產之細胞數及病毒力價均不及細胞培養迴轉瓶來得高，故目前生產疫苗均使用細胞培養迴轉瓶。

製造二科尚有一特殊的懸浮培養細胞，為小倉鼠腎臟細胞株(BHK Cell)，此細胞株的開發過程非經一般的馴化過程：貼壁性細胞經震盪馴化培養轉成懸浮細胞，此項技術還相當困難。二科所開發的懸浮細胞是將一般貼壁性 BHK cell

進行細胞迴轉瓶培養時，當細胞長滿於瓶壁後會有一些許的細胞游離至細胞培養液中，將這些微量游離細胞收集起來，離心並秤重後再次繼代於一瓶細胞培養迴轉瓶中，期間捨棄會貼壁生長的細胞，再取出游離細胞繼代，經過反覆的培養收集游離細胞，在長時間增殖之後則可以獲得真正可以懸浮培養不需藉助微載體(Microcarriers)的懸浮細胞株，由於獲得懸浮細胞的方式需要相當多的時間去增殖，倒也不失為另一種思考模式，這也是一個優良的研究方式值得學習。

此外關於玻璃瓶的洗滌方面，動物衛生研究所非常講究環保觀念，所內的實驗耗材盡量採玻璃製品，而使用過後需要再清洗的物品如試管、吸管、角瓶、細胞培養瓶、塑膠離心管等等，每間實驗室皆準備專門放置的水桶並標示實驗室名稱，在收集之後統一送入中央洗滌室，物品由洗滌室人員洗滌、包裹、滅菌後，送回各自的實驗室重複使用，減少使用塑膠製品，全所集中洗滌節省相當多的人力物力又兼具環保功效。且該所亦致力所內的垃圾分類，所內使用的紙張也都使用再生紙。

經與動物衛生試驗所製造二科高木科長討論該所疫苗生產，他認為該所雖然有能力生產疫苗，但他們只轉移生產技術，並不生產販售疫苗，這是跟本所最大不同的地方，他們認為診斷試劑跟疫情監測有關，而一般藥廠不會去生產這些少量又沒經濟效益可期的產品，故由該所製造，而疫苗生產需花費許多人力，有些疫苗國內藥廠可以生產或者進口品質優良的產品即可，他們可空出人力去進行相關疫情監測及試驗開發更有用的產品。

此外日本藥廠的疫苗產銷的售後服務方面，日本各藥廠均有客服專線，疫苗產品之包裝盒上亦標示服務專線電話，只要客戶有使用上的問題或意見皆可先透過電話與藥廠聯繫，之後再依顧客的問題做更進一步的相關服務。

三、牛流行熱疫苗(bovine ephemeral fever live vaccine)製造

此次由於製造二科具有製造牛流行熱活毒疫苗的生產技術，因此特地要求學習此項技術，因為本所相關人員對台灣之牛流行熱進行監控，並檢測台灣牛隻施打牛流行熱死毒疫苗後之抗體。目前台灣的牛流行熱的疫苗為死毒疫苗並無牛

流行熱活毒疫苗供應，且僅本所及全亞洲藥廠生產牛流行熱死毒疫苗，提供國內牛隻於春秋二季施打。在與動物衛生試驗所總合防疫研究官後藤義之博士討論過台灣牛流行熱疫苗使用的現況後，他強烈建議預防牛流行熱應該使用活毒及死毒疫苗互相搭配，牛隻產生之中和抗體成效才會更高，對牛流行熱才更具防疫效果。

根據後藤義之博士提供的數篇論文報告顯示，日本分離的 Yamaguchi 株牛流行熱病毒在經過數種細胞株繼代，每代均接種於牛隻，進行臨床症狀觀察及血清中和抗體測試，經過實驗比較測試後，經過約 7 次的繼代牛流行熱病毒已無臨床症狀發生，顯示減毒成功，病毒毒力消失，而使用 BHK-21 cell 繼代的病毒，中和抗體力價產生最好，表示抗原性保持很好，用以生產活毒疫苗為最佳選擇。

而根據另一篇報告顯示，使用死毒、活毒、二劑死毒或第一劑活毒第二劑死毒牛流行熱疫苗分別接種於牛隻身上時，其中中和抗體力價以接種第一劑活毒加上第二劑死毒牛流行熱疫苗的抗體效果最好，最具保護力，HmLu cell 繼代的病毒，無病原性且抗原性佳，固一般皆採用此種細胞生產牛流行熱疫苗，目前日本接種牛流行熱疫苗的方式為第一劑活毒加第二劑死毒疫苗。

目前國內只使用死毒疫苗抗體表現成效不佳，台灣迫切需要牛流行熱活毒疫苗，以健全防疫體系。因此，在研習期間內亦要求學習牛流行熱疫苗病毒繼代增殖及相關力價檢定工作。學習期間將牛流行熱病毒生長期間、溫度、CPE 及培養技術均仔細操作詳實紀錄，並於回國後積極準備申請文件向主管機關行政院農業委員會動植物防疫檢疫局申請，並已於 94.11.22.由防檢局核准，已準備相關申請資料向日本動物衛生研究所分讓牛流行熱疫苗毒，目前並著手進行疫苗相關開發研究。

四、 藍舌病(bluetongue)瓊脂凝膠沉降診斷抗原

2002 年台灣羊隻血清被檢測出陽性，2003 年苗栗及金門縣發現羊隻藍舌病病例後，台灣已對此病進行相關監測及研究，目前檢測該並可使用瓊脂凝膠沉降反應(AGID or AGP)、血清中和抗體測試及酵素免疫吸附測試 (ELISA test) 來檢測血清抗體，一般實驗室須具備細胞培養相關技術，而 ELISA READER 及 KIT

需要較高資本及設備，目前台灣沒有 AGID 的診斷抗原製造產品。日本基層獸醫監測系統一般在抽血檢驗均以 AGID 方法先行測試篩檢抗體陽性之牛羊，AGID 具有便宜、方便又不需複雜的設備的優點，台灣獸醫基層在進行抗體篩檢時，AGID 似乎是種不錯的選擇，因此本次赴日研習亦增加學習此項技術，以建立本所未來進行基層教育及防疫監測之用。

藍舌病瓊脂凝膠沉降反應用抗原製備方式：

1. 培養倉鼠肺臟細胞株（HmLu cell line）。
2. 將藍舌病病毒（BTV）T04-3 株接種至 HmLu cell。觀察細胞 CPE。
4. 收集培養液離心取病毒上清液。
5. 將 BTV 上清液加入 0.2% 福馬林不活化。
6. 放入 4°C 攪拌感作三星期。
7. 病毒濃縮取 1000ml 不活化之 BTV 緩慢加入 1000ml 飽和硫酸氨放置 30 分鐘。
8. 將溶液以 3000rpm 離心 30 分鐘。
9. 收集沉渣加入 1000ml 之 PBS。
10. 再緩慢加入 330ml 飽和硫酸氨放置 30 分鐘。
11. 將溶液以 4°C、3000rpm 離心 30 分鐘。
12. 收集沉渣加入 1000ml 之 PBS。
13. 再緩慢加入 330ml 飽和硫酸氨放置 30 分鐘。
14. 將溶液以 4°C、3000rpm 離心 30 分鐘。
15. 收集沉渣加入少量 PBS 約 10ml 溶解。
16. 將 BTV 病毒濃縮液放入透析膜中。
17. 透析膜置入 10L 之 PBS 中置於 4°C 攪拌持續透析。
18. 透析約進行 4~5 天，每日更換 10L 之 PBS 液並取樣 5ml 留待檢測用。
19. 收取藍舌病不活化病毒濃縮液透析之 PBS 採樣液以 100 μ L 三氮化鈉（ NaN_3 ）試劑檢測化學呈色反應，當褐色出現表示 PBS 內還存在硫酸氨，需測試無顏色反應時才表示透析過程已完成。
20. 抽取透析膜中之 BTV 病毒濃縮液以 4°C、10,000rpm 離心 1 小時

21. 收集上清液力價檢測，並調整力價最終為 8 單位。
22. 分裝至安瓶，冷凍乾燥一天，完成白色固體狀之 BTV 抗原製備。

藍舌病瓊脂凝膠沉降反應用指示血清製備：

1. 將藍舌病病毒 T04-3 株感染鼠之腦取出製成乳劑。
2. 接種於健康子牛。
3. 接種後 4~5 週追加免疫一次。
4. 接種後 4~5 週追加免疫第三次。
5. 經過 4 週採取感染牛隻血清。
6. 以 56°C 30 分鐘非動化後調整為 8 單位力價。
7. 置入安瓶凍結乾燥完成藍舌病瓊脂凝膠沉降反應用指示血清。

瓊脂凝膠玻片製備方式：

1. 將 8g 之 agar 加入 100ml 蒸餾水加熱溶解。
2. 待 agar 溫度降至 50°C 左右時準備分裝至玻片。
3. 吸取 5.5ml 之 0.8% agar。
4. 將玻片灌滿 agar 呈現表面張力狀態。
5. 待 agar 凝固後利用不銹鋼壓片器壓出七個小洞，排列方式為中央一孔，外圈六孔孔洞間距約 3mm。
6. 吸棄洞內 agar，完成瓊脂凝膠玻片製備。
7. 若需測試大量血清時，可另外以培養皿製備 agar 測試盤。

藍舌病瓊脂凝膠沉降反應抗原測試(AGID)

1. 將藍舌病沉降反應用抗原乾燥安瓶以蒸餾水 1ml 稀釋。
2. 將抗原以 PBS 稀釋，2 階段稀釋至 1024 倍。
3. 取出已經製備完成之瓊脂凝膠玻片。
4. 將稀釋完成之 1~1024 倍抗原各吸取 50 μ l 各放入瓊脂凝膠玻片外圈六個孔洞

中。

5. 再吸取將標準陽性抗血清 50 μ l 置入中間孔洞中。
6. 將瓊脂凝膠玻片放入製物盒中，盒底部鋪上濕紙保持 agar 溼度。
7. 將置物盒於室溫下靜置，隔天觀察抗原抗體凝集反應線。
8. 計算藍舌病瓊脂凝膠沉降反應抗原力價。

藍舌病瓊脂凝膠沉降反應測試(AGID)

1. 將藍舌病沉降反應用抗原以蒸餾水 1ml 稀釋成 8 單位備用。
2. 取出已經製備完成之瓊脂凝膠玻片。
3. 將稀釋完成 8 單位抗原取 50 μ l 放入瓊脂凝膠玻片中間二側孔洞。
4. 取出待測血清，各抽取 50 μ l，分別加入瓊脂凝膠玻片外圈上下四個孔洞中。
5. 抽取 50 μ l 標準指示陽性血清加入中間孔洞中。
6. 將瓊脂凝膠玻片放入製物盒中，盒底部鋪上濕紙保持 agar 溼度。
7. 將置物盒於室溫下靜置，隔天觀察抗原抗體凝集反應線。
8. 計算藍舌病瓊脂凝膠沉降反應抗體。

本次學習製造藍舌病瓊脂凝膠沉降反應用抗原發覺 BTV 在病毒不活化過程中，病毒力價降低太多，病毒濃縮後的力價僅只 32 倍，分裝稀釋至可用的 8 單位抗原沒有太多的稀釋空間，並且再經冷凍乾燥病毒力價也會影響而降低。病毒力價在濃縮繁複的過程後雖能達到市場供應需求，但就製造過程看來似乎並不經濟，經與製造二科高木科長討論後，均認為藍舌病瓊脂凝膠沉降反應用抗原的製造過程可以再行研究以及具有很大改善的空間，除了培養病毒的階段提高病毒力價外，還可於不活化的過程中進行改良，如果病毒力價提高，濃縮及透析過程即可省略，以節省時間人力及物力，但這還需要再行實驗才會有結果。

五、 建立 SPF 豬隻

此次研修期間剛巧動物衛生研究所正在生產 SPF 仔豬，由於機會難逢因此亦

要求能夠進入 SPF 豬舍，學習 SPF 仔豬生產接生過程，學習此一技術有備無患。

SPF 豬舍為獨棟建築，內有隔離保育豬舍、母畜繫留場等設施，當日共有二頭達分娩期母豬欲進行犧牲取 SPF 仔豬，該二頭母豬由一般養豬場購回，一頭母豬為第 12 產次，另一頭為第 10 產次，當天約有十多名工作人員，六名負責母豬清洗固定、犧牲及取子宮角，四名人員負責仔豬處理，四人負責仔豬移動管制，另一人總指揮及一名紀錄人員。

母豬以自來水及刷子清洗乾淨，後肢固定利用絞盤吊車將母豬由後肢調起離地，運送至指定位置，以乾冰桶套入母豬口鼻進行安樂死，待母豬停止掙扎死亡後以最快速度腹部碘酒消毒二次，剖解人員於倒數第一對乳頭中央部位下刀，並十分小心不傷及子宮角，慢慢將子宮角導引出腹腔，待子宮全部露出後迅速將之切斷，將整串含胎兒之子宮角穿過消毒藥水槽，進入已準備好完全無菌密閉恆溫控制之處理台內，台內已先行準備好滅菌器械、布巾及棉繩，二名工作人員經由連在工作台之橡膠手套，將手灑上痲子粉後套入手套深入工作台內準備等待中，一人利用小刀快速切開子宮角將胎兒取出，另一人則取出消毒好的止血鉗夾緊臍帶，再利用已消毒好的布巾快速擦拭仔豬，甩出仔豬口內液體，所有仔豬均以布巾細細擦拭，用以模仿母豬舔舐小豬，擦拭至仔豬生命狀況穩定後再以消毒的棉繩綁緊臍帶並斷臍。

在無菌之密閉恆溫控制之處理台後方有一連接孔，該孔可連接一台小型無菌飼養籠，此籠下方為不銹鋼高架床，上方為透明 PVC 罩，外接空氣過濾器及恆溫控制器，裡面已放置消毒過的罐裝牛奶，每籠可飼養 3~4 隻仔豬，未來仔豬在此需居住 4~6 週再遷移至無菌豬舍室內。將仔豬透過傳遞孔由無菌之密閉恆溫控制之處理台移至小型無菌飼養籠，同時將公母計算及分開飼養，待仔豬全數通過後，再由內部將傳遞口封住，外側再利用膠帶密封，之後將傳遞管拆除留下單獨之小型無菌飼養籠，將之推入 SPF 恆溫控制保溫房內，此時再次無菌操作，連接傳遞孔，該孔再連接一台小型無菌飼養籠，將一胎仔豬分成二籠，由專人負責飼養照顧。

在場由總指揮指導並發號司令，每個人均訓練有素，由於母豬死亡後仔豬需

快速取出以提高生存率，工作人員均動作迅速確實，在過程中紀錄人員均詳實紀錄母豬來源、品種、產次、每個步驟時間及每步驟相關處理人員，計算生產頭數及存活頭數，還有計算仔豬公母，此次二胎次中各有 10 隻仔豬，但每胎都死亡 3 隻仔豬，共生產 14 隻小豬，公母各 7 頭，在生產之前，這些仔豬已被預約將進行動物實驗。

柒、建議事項

高密度細胞培養

日本目前生產動物用組織培養疫苗大都使用細胞培養迴轉瓶，除了設備容易操作製成溶液控制之外病毒培養出來的力價亦不低，故就目前來說細胞培養迴轉瓶系統來說還是最好用、使用最廣的方式，生物反應器細胞培養方式還需投入更多的時間及物力研究，流體動力學之分析及培養液的添加與調整都須再進一步測試，建立一套有效的細胞培養製程還需持續進行研究，若能開發出優良製程亦是未來生物製劑產業努力的方向。日本所研發出懸浮培養的細胞方式是值得學習的，雖然需要長時間投入收取少量的懸浮細胞，若可培養出可在細胞培養瓶中懸浮生長的細胞，細胞數增加，病毒力價推論應可獲得較高之力價。

牛流行熱疫苗

目前國內只使用死毒疫苗抗體表現成效不佳，台灣迫切需要牛流行熱活毒疫苗，以健全防疫體系。學習期間將牛流行熱病毒生長期間、溫度、CPE及培養技術均仔細操作詳實紀錄，目前主管機關行政院農業委員會動植物防疫檢疫局已同意進口牛流行熱疫苗株，目前已準備相關申請資料向日本動物衛生研究所分讓牛流行熱疫苗毒，依據在日本實際培養此株病毒株的成績看來，使用 120 公分長的細胞培養迴轉瓶，一瓶約可生產 200ml 病毒力價大於 $10^{7.2}$ TCID₅₀/ml 之流行熱病毒，用以生產疫苗相當具有經濟價值。而目前全球狂牛症的影響下，組織培養疫苗已進入不使用牛隻血清的階段，日本的組織培養的細胞繼代培養液中只添加 2 % 的成年牛血清，而在接種病毒後更換培養液，維持培養液配方改變，不使用成

牛血清僅使用酵母萃取物，因此有效節約生產成本又能達到很高的病毒量。而細胞培養迴轉瓶及細胞培養角瓶均為玻璃製品，經過洗滌後又能重複使用，相當經濟實惠。

藍舌病瓊脂凝膠沉降診斷抗原

日本獸醫界普遍使用藍舌病瓊脂凝膠沉降診斷抗原作藍舌病的初步診斷，操作方便又不需高深技術與繁複的設備。2003 年台灣的苗栗縣及金門縣發現羊隻藍舌病病例後，台灣已對此病進行相關監測及研究，目前檢測使用酵素免疫吸附測試（ELISA test）來檢測血清抗體，一般實驗室須具備細胞培養相關技術，而 ELISA 判讀機及 ELISA KIT 需要較高資本及設備，目前台灣沒有 AGID 的診斷抗原製造產品，因此本次赴日研習亦增加學習此項技術，以建立本所未來進行基層教育及防疫監測之用。

今年日本爆發家禽感染 H5N1 高病原性家禽流行性感冒，日本獸醫基層就先以 AGID 的檢測方式篩檢病例，在目前高病原性禽流感於我國附近國家肆虐時，為防範家禽流行性感冒病毒之入侵，似乎可研發家禽流行性感冒瓊脂凝膠沉降診斷抗原給予國內各獸醫現場檢測用，而依據日本的經驗得知，可疑發生場應即予撲殺，再對場周圍進行監測控制，是對可能發生高病原性家禽流行性感冒（HPAI）之最佳清除方式。

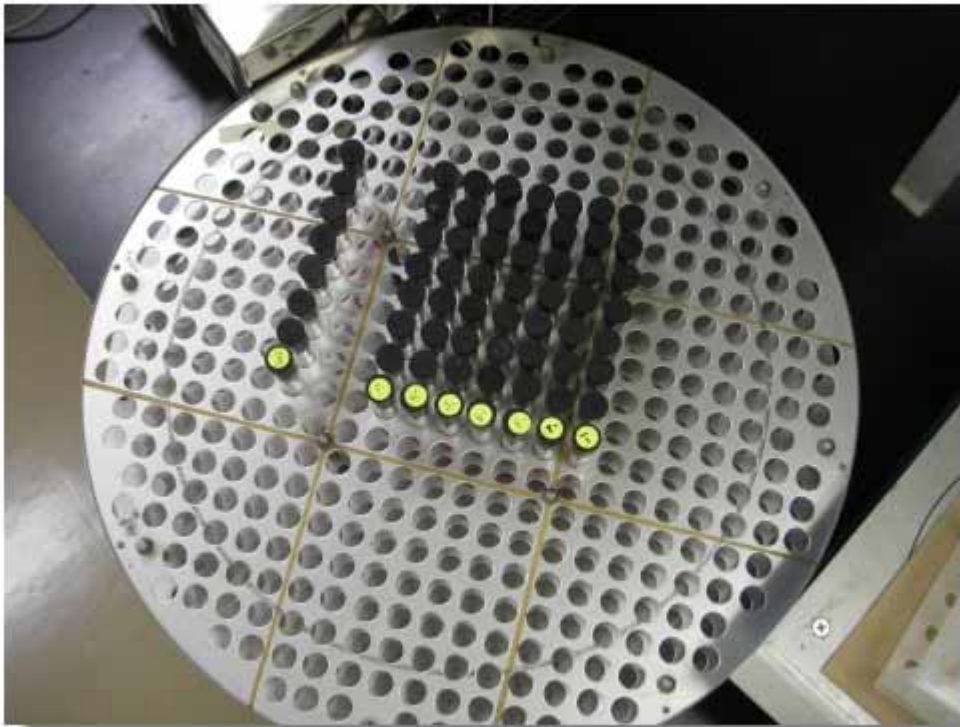
捌、附錄



圖一、玻璃細胞培養迴轉瓶系統



圖二、玻璃細胞培養角瓶



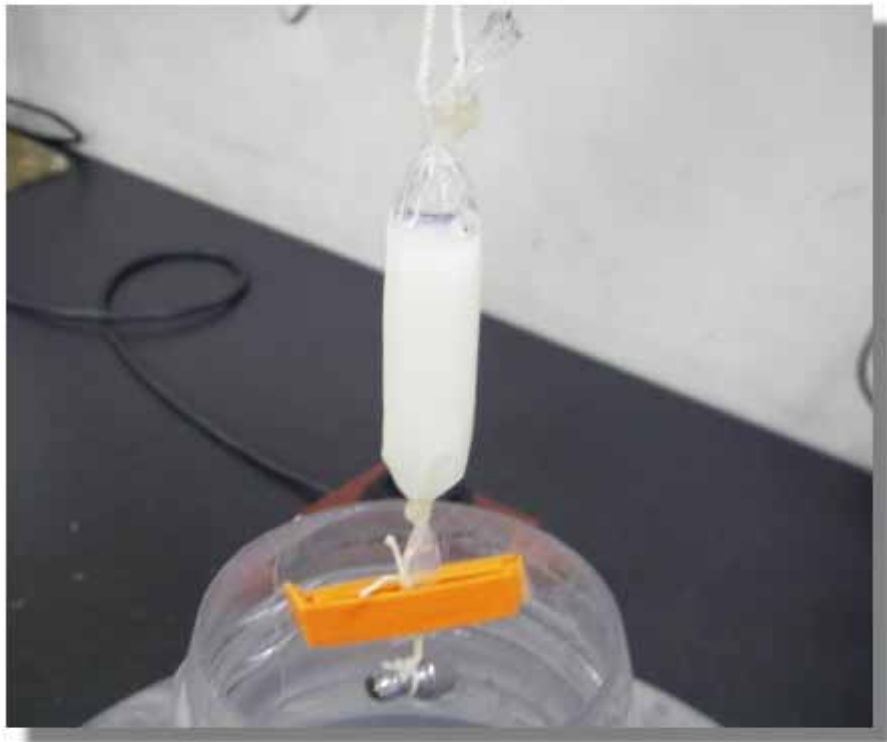
圖三、病毒力價測試用試管及轉盤



圖四、病毒力價測試用轉盤恆溫培養箱



圖五、藍舌病病毒滴入飽和硫酸氨溶液



圖六、藍舌病病毒濃縮與透析



圖七、藍舌病病毒凍結乾燥



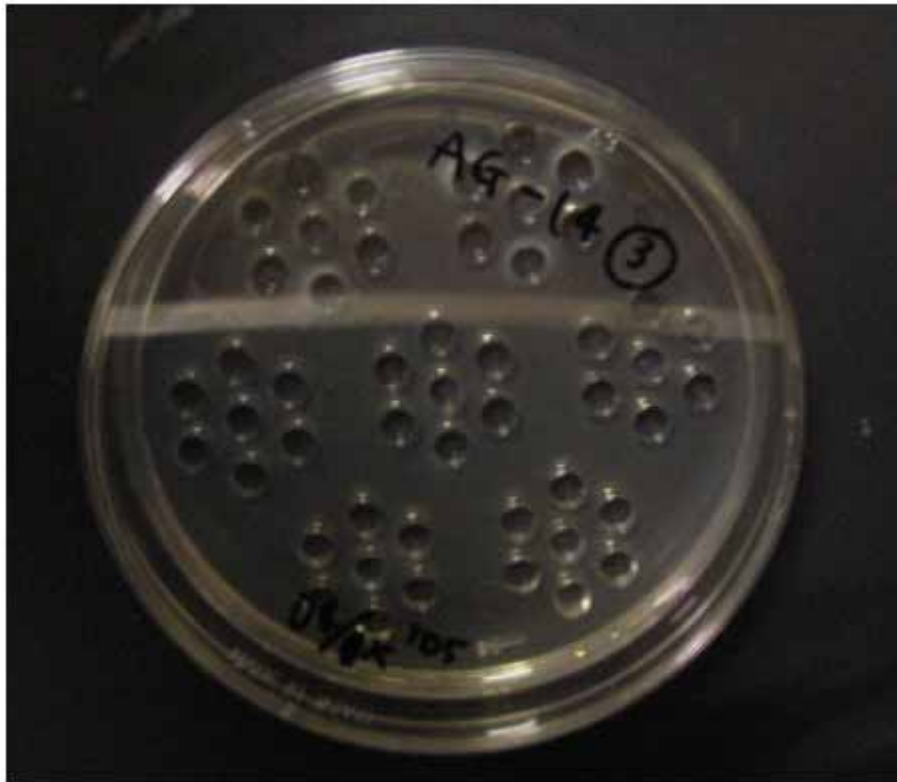
圖八、藍舌病病毒安瓶封瓶



圖九、藍舌病病毒安瓶乾燥成品



圖十、藍舌病病毒瓊脂凝膠培養皿製備



圖十一、藍舌病病毒瓊脂凝膠成品



圖十二、藍舌病病毒瓊脂凝膠抗原抗體沉降反應(AGID)



圖十三、SPF 仔豬建立



圖十四、SPF 仔豬小型無菌飼養籠