出國報告（出國類別：研究）

赴日本 NIID 研習流感疫苗種株製備技術

服務機關：衛生福利部疾病管制署
姓名職稱：楊季融 技正
派赴國家：日本
出國期間：106 年 12 月 5 日至 12 月 16 日
報告日期：107 年 1 月 5 日

摘要

近年來，國際間新興 A 型流感病毒感染人類的疫情頻傳，對於公共衛生所造成的威脅日益增加。除此之外，該等人畜共通傳染病原體亦持續在國內外的禽類動物傳播，造成疾病防疫困難。由於這些禽源性病毒(例如 H5 及 H7 亞型)對人類所造成的疾病經常較季節性流感病毒(例如 H1 或 H3 亞型)嚴重，因此政府權責機關對於疫情的防治工作刻不容緩。為有效預防及控制這些新興病毒對我國可能造成的威脅，持續監測病毒以掌握其基因體或抗原性特徵，並評估該等病毒可能之致病力及傳播力；亦或製備疫苗提升國人對於病毒保護力等作為皆須同步進行。在疫苗整備策略方面，我國目前已有符合規範的疫苗廠，每年利用世界衛生組織所提供的種株生產疫苗；惟自行製備疫苗種株之經驗仍較欠缺。為提升我國針對新興流感病毒自我防禦及整備實力，脫離疫情發生時等被動等待外單位提供疫苗株之窘境，本次赴世界衛生組織位於日本國立染感症研究所之流感合作中心研習，即為學習如何在符合規範的情形下，製作適合用於生產人用大流行疫苗之種株，並熟悉實驗設計及相關國際規範，作為我國權責單位未來制定疫苗相關政策時之參考。期望日後能將本次研習所學應用於傳染病防治業務，再次強化我國對於新興流感病毒疫情整備之實力。

目　　　次

摘　　　要 ………………………………………………………………….. **2**

目　　　的 ………………………………………………………………….. **4**

過　　　程 ………………………...………………………….……………… **8**

心得及建議 ………………………………………………………………….. **24**

附　　　錄 ………………………………………………………………….. **27**

目的

流感病毒可分 A, B, C 三型，A 型流感病毒又再依其表面 HA 以及 NA 醣蛋白次分為不同亞型，到目前為止 HA 的亞型有 18 種（H1 至 H18）；NA 則有 11 種（N1 至 N11）。流感病毒自 1918 年開始有文獻記載侵襲人類至今，已陸續引發多次全球大規模的疫情，包括 1918 年由 A 型 H1N1 亞型引發之西班牙流感(Spanish flu)、1957 年 A 型 H2N2 亞型之亞洲流感 (Asia flu)、1968 年 A 型 H3N2 亞型之香港流感 (Hong Kong flu)以及 2009 年由另一種全新 A 型 H1N1 亞型引發之大流行流感等。至今每年持續引發人類季節性流感的病毒亞型為 A 型 H1N1、A 型 H3N2 以及 B 型流感病毒，其中 A 型流感病毒引發的疾病嚴重度常較 B 型流感病毒高。除了這些人類流感病毒亞型之外，源自病毒自然宿主--「禽類」之亞型例如 H5, H6, H7, H9 及 H10 等，亦曾且持續引起零星人類感染案例，例如 1997 及 2003 年 H5N1、2013 年 H6N1 及 H7N9、2014 年 H5N6 等，感染後的死亡率也較 H1 或 H3 病毒為高，但其至今仍無法有效人傳人。這些突如其來的疫情，規模可大可小，難以預測，亦可能造成全球無數患者的傷亡。依照世界衛生組織的資料，流感病毒每年於全球約侵襲 20-30%的兒童、5-10%的成人，更是導致嬰兒、老人或慢性病患等高危險族群住院和死亡的元凶，估計每年約造成 3～5 百萬名嚴重病例，而有 25~50 萬人死亡。

流感病毒具有藉由突變而持續演化之自然特性，小規模的變異如抗原飄移(antigenic drift)，即是病毒在複製的過程中，於可決定其抗原性特徵之表面蛋白基因(例如 HA 或 NA)，持續累積突變，使其蛋白質的抗原性一點一滴慢慢偏離較為早期之病毒株，甚至產生抗原性截然不同的變異株 (variant)。此種變異常使疫苗對病毒的保護效力減低，也是造成世界衛生組織每年皆須更新人類季節性流感疫苗病毒株的主要原因。此外，又如禽流感病毒(例如 H5 亞型)的 HA 基因亦在近十幾年間，演化成為引發全球禽類大規模流行的新病毒(例如 clade 2.3.4.4)，並增加其 HA 與 NA 蛋白的組合適應性(compatibility)，使 H5 病毒亞型更為多元

(例如出現 H5N2、H5N3、H5N6 及 H5N8 等)。另一種規模更大的變異稱為抗原轉移 (antigenic shift)，是造成某新興流感病毒於全球大流行的元兇。此類變異是藉由不同流感病毒間的基因互換，例如當不同來源的病毒株同時感染一個中間宿主時 (此種宿主目前推論可能為豬)，使兩種不同病毒於各自的複製過程中產生基因片段的互換及重新排列組合 (reassortment)，導致組裝完成的病毒抗原性大幅轉變，形成一種全新的流感病毒。然而，因此種變異之幅度過於劇烈，人類的免疫力往往無法辨認這類新興流感病毒，因此絕大多數的族群皆為易感者，這也是該病毒容易造成全球大流行的主因。除了表面蛋白的抗原性大幅改變之外，病毒藉由基因重組後，其於宿主細胞的複製能力，或所造成的病變亦可藉由其他基因(例如 PB2 或 NS 等)的各種組合隨之改變，針對宿主的感染專一性也可能同時受到影響。

疫苗是目前防治流感病毒染感的最有效方法之一，但由於流感病毒的基因體具有高度變異性，因此病毒特性改變而使疫苗失去其應有保護效力的情形是可預期的。有鑑於此，世界衛生組織每年皆需依照北半球與南半球各國當年所流行的流感病毒株，分別預測下一個流感季可能的主流病毒株，並同時決定疫苗的病毒組成；其中北半球決定的時間為每年 2 月，南半球則為每年 9 月。以北半球為例，每年疫苗株的決定，係由世界衛生組織集結各方代表，包含全球各大流感合作中心(Collaborating Center)、必要規範實驗室(Essential Regulatory Laboratory)以及各疫苗廠代表等，依共同討論的決議完成。自疫苗株公布後，後續一系列疫苗生產所需程序隨即展開，包括製備疫苗種株及標準品管試劑、疫苗抗原定量、分裝及運送等，以因應各國於每年 10 月起之流感疫苗施打計畫，為即將面臨之流感高峰期預做準備。目前用於人類施打的流感疫苗，最廣為使用的成分為去活化的病毒顆粒，該病毒先以雞胚蛋(embryonated chicken eggs)作為生物反應器增殖放大，其後再以乙醚萃取 HA 表面蛋白成分，並利用福馬林去除病毒活性，確保疫苗抗原不具感染性。除了雞胚蛋之外，以細胞培養方式製作流感疫苗抗原，是現階段

世界衛生組織正在進行研發的目標。利用細胞作為生物反應器，預期將可更為有效因應突如其來的新興流感病毒疫情，此優勢的主因在於製作流感疫苗所需的雞胚蛋需提早準備，然而當這些雞蛋已預計用於季節性流感疫苗生產時，並無法於另一個新興流感病毒疫情所需時，即時轉移生產量能產製該新興病毒疫苗。相較於雞胚蛋，細胞可利用體外培養方式大量且快速增殖，產線較具彈性，惟其因整體生產成本現階段仍較雞胚蛋製程為高，在生產疫苗上仍無法成為主流方式。

無論是以雞胚蛋或細胞生產流感疫苗，其關鍵皆為前端的疫苗病毒種株製備。一個良好的疫苗種株，可在雞胚蛋或細胞等生物反應器表現良好的生長能力，進而在相同的生產成本下，產製最大量的疫苗劑量。為達此一目的，目前用於製備人用季節性流感疫苗或大流行前流感疫苗的種株，為經由人工修飾後的重組病毒，而非直接使用野生病毒株。需要以重組病毒作為疫苗生產種株的原因，是期望能藉由基因改造，使該疫苗種株可在保留其原始抗原性特徵的前提下，在雞胚蛋或細胞展現較野生株更為優異的複製能力。惟因以重組方式製備種株，或種株於雞胚蛋及細胞增殖複製後，皆可能因自然產生的突變再次改變其原有特性，因此除了良好的生長能力外，疫苗種株的抗原性、病原性及基因體穩定性等特徵，皆為決定疫苗種株是否適合用於疫苗生產的重要因素，並與疫苗效益有關。包含我國在內，目前全球各疫苗廠用於生產季節性流感疫苗之種株，係每年由世界衛生組織流感合作中心及紐約醫學大學(New York Medical College)等單位依疫苗選株大會決議製作後提供；生產大流行前流感疫苗種株，則由世界衛生組織流感合作中心、美國 St. Jude 兒童醫院及英國生物標準與控制研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)等機構製作，當有疫情需要時，可即時提供疫苗廠生產大流行疫苗。

我國自 2009 年 H1N1pdm09 新型流感疫情發生後，疫苗廠對於流感疫苗製作技術已有大幅度的突破，至今從接獲外單位提供的疫苗種株起直到生產符合規範的疫苗，已具多年經驗，表現穩定；惟從最前端野生病毒株製作成為重組疫苗種

株，仍欠缺相關經驗。近年來全球流行的新型A型流感病毒包括H7N9以及H5Nx亞型等，皆源自於中國，我國因與該國鄰近，且國人旅遊或商務往來頻繁，再再顯示我國長期處於該等新興病毒的高風險區域。本署為我國傳染病防治之最高主管機關，每當各種新興流感病毒於國際(內)出現後，已可立即掌握該病毒之基因體特性、開發對該病毒之檢驗方法、評估該病毒可能之致病力及傳播力、評估疫苗對該病毒之保護力等。然而，在疫苗製造相關作為的實質運作上，我國雖有符合國際標準的疫苗製造廠，惟仍僅能於大流行疫情爆發時，被動等待世界衛生組織所製備的疫苗種株，方可完成疫苗生產及供應，如此恐錯失阻絕病病散播的黃金時機。另台灣至今仍非世界衛生組織的正式會員，當某新興病毒未來於我國引爆大流行時，世衛組織能否因我國需要協助製備疫苗種株，仍具變數。因此，為持續強化我國對於新型流感病毒大流行的疫苗整備，提升自行製作流感疫苗種株的能力勢在必行，如此將可暢通整體疫苗生產鏈。

本次出國研習地為世界衛生組織位於日本國立感染症研究所(National Instituteof Infectious Diseases)之流感合作中心，主要目的即是學習如何在符合世界衛生組織的規範下，製作可用於生產人用流感疫苗種株之實驗室技術，藉以精進本署對新興流感病毒疫情的應變能力，提升我國未來自主產製流感疫苗之技術層次。此外，我國目前針對流感疫苗種株製備，並無相關規範可供依循，藉由研習期間實地了解世衛組織流感合作中心製作種株時所依照的規範，可作為我國權責單位未來制訂新興流感病毒疫苗相關政策時之重要參考依據。除了技術面的交流之外，我們亦期望可藉此機會建立與日本 NIID 更為暢通之聯繫管道，拓展本署國際人脈，俾利台日雙方未來對於流感病毒相關資訊之分享與交流。

過程

壹、行程

此次奉派赴日本研習地點為國立感染症研究所流感研究中心 (Influenza Virus Research Center)之第四室 (Laboratory for pandemic and seasonal vaccine virus development)。該中心位於東京都武藏村山市，屬國立感染症研究所之村山廳舍，而流感研究中心第四室位於該廳舍之 9 號棟。研習期間為自民國 106 年 12 月 5 日起至 12 月 16 日止，含路程共計 12 天。相關時間、地點及行程內容詳述如下：

日期	工作日誌	地　　點	行　程　內　容
106/12/05	啟程/抵達	台北→東京	路程/抵達
106/12/06~ 106/12/15	研習	東京	流感疫苗種株製作技術研習
106/12/16	返程/抵達	東京→台北	路程/抵達

貳、研習內容

流感疫苗種株製備相關流程

本次赴日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases)研習的主要內容，為學習如何以一個良好且符合規範的製程，製備人用流感疫苗所需病毒種株(candidate vaccine virus)。研習地點為該所流感研究中心(Influenza Research center，為世界衛生組織全球流感合作中心之一)之第四室，由該室室長 Dr. Eri Nobusawa 以及研究員 Dr. Yasushi Suzuki 指導。NIID 流感中心第四室的工作職掌，為配合世界衛生組織疫苗選株會議所需，從當前具有大流行潛勢(pandemic potential)的流感病毒亞型中，挑選適當標的，由野生病毒株，製備大流行前流感疫苗種株(pre-pandemic candidate vaccine virus)，以備日後於該亞型病毒所引起的

大流行發生時，可以該種株為材料，即時提供全球疫苗廠製備大流行疫苗(pandemic vaccine)。該室前於 106 年 3 月間，已完成 H5N6 亞型人用大流行前疫苗種株的製備，野生株材料為 2016 年由日本鴨子所分離的本土病毒；該疫苗種株已通過安全性試驗等必須規範，現已列入世界衛生組織的種株清單，供全球疫苗廠在有疫情需要時無償索取。

取得適當的流感疫苗種株為製備流感疫苗的第一步，目前針對人用流感疫苗的製備流程，根據世界衛生組織發布的文件，可分為兩大部分，第一部分為季節性流感(seasonal influenza virus)疫苗製備；其二為大流行前流感(pre-pandemic influenza virus，以 H5N1 亞型為例)疫苗製備，流程如下圖一，原則上該流程已涵蓋整體流感病毒監測、疫苗株選擇，以及疫苗種株與疫苗製備等，包含 9 個步驟，說明如下：

一、 收集臨床檢體以及疾病流行病學趨勢(Collection of specimens and disease/epidemiological data)：

臨床檢體為所有野生病毒株的來源，以日本為例，全國各地的臨床醫師須由符合疾病病例定義的患者採集臨床檢體，並掌握具流行病學條件的患者趨勢，例如年齡、性別、症狀嚴重度等，提供國家防疫單位，藉以推估當年度各時期流感病毒活動力(activity)。上述由患者採集的臨床檢體，將送往各縣(prefecture)病毒實驗室進行初步檢驗。

二、 臨床檢體診斷、病毒分離培養以及初步分析鑑定(Diagnosis, virus isolation in MDCK, preliminary analysis)：

各縣病毒實驗室接獲臨床檢體後，需針對該檢體進行流感病毒檢測，再由陽性檢體以雞胚蛋或細胞進行病毒分離培養。檢測時需進行病毒型(A 或 B 型)或亞型(AH1N1pdm09、AH3N2 或特殊亞型例如 H5N1 或 H7N9 等)區分鑑

定，藉以分析病毒流行趨勢。完成分離鑑定後的病毒株須送往日本 NIID 流感研究中心(代表世界衛生組織流感合作中心)進行後續分析。

三、 雪貂抗血清製備(Ferret antisera production)：

雪貂抗血清為監測流感病毒變異株的有效工具之一，當 NIID 流感研究中心接獲各縣病毒實驗室寄送的病毒株後，即以現有具抗原代表性的雪貂抗血清，以紅血球凝集抑制試驗法(hemagglutination inhibition test)進行初步病毒抗原性分析，分析該病毒流行株凝集紅血球的能力是否可被由同時期類疫苗標準株所產製的抗血清中和。若血清中和病毒流行株的力價與中和自身類疫苗病毒的力價(homologous titer)相比差異在四倍及其以下，表示該病毒流行株的抗原性與類疫苗標準株類似；反之若力價差異在八倍(含)以上，表示該病毒流行株的抗原性與類疫苗標準株已有差異。此外，針對與現有標準病毒雪貂抗血清反應力價差異為八倍以上的病毒流行株，NIID 將評估是否須以該病毒產製新的雪貂抗血清，作為後續評估其他病毒流行株與該血清反應性之試劑。

四、 完整的病毒株抗原性與基因體分析(Thorough antigenic and genetic analysis)

藉由上述針對各病毒株的初步分析結果，NIID 將於當年度所收集的病毒流行株中，進一步挑選部分病毒作為代表株，進行一系列完整的抗原性與基因體分析。此時將以更多的雪貂抗血清以及相對應的標準病毒，針對各病毒代表株的抗原性進行測試，詳細評估該等病毒的抗原性特徵；各病毒代表株的 HA 與 NA 表面蛋白基因序列亦將同步進行分析，並利用樹狀圖演化分析法，探討其與當年度疫苗株或類疫苗標準株的親緣關係，亦同時檢視病毒株是否具有抗病毒藥物(例如神經胺酸酶抑制劑)抗藥性。

五、 疫苗病毒株選擇(Review and selection of candidate viruses for vaccine use)：

當完成上述病毒流行株的抗原性、親緣演化與抗藥性等分析之後，NIID 流感研究中心將根據各個結果，進行綜合研判，並選擇適合作為下一季季節性流感疫苗或大流行前流感疫苗病毒株之標的，提交世界衛生組織疫苗選株會議討論。疫苗選株會議時，來自世界衛生組織其他流感合作中心或規範實驗室的專家代表，將集合各自所提交的病毒分析報告，確認下一季季節性流感疫苗或新的大流行前流感疫苗病毒株，並於會後副知全球各疫苗廠，隨即開始後續產製疫苗相關所需的一系列流程。

六、 製備重組病毒株，作為候選疫苗種株(Reassortment of high-growth viruses)

當世界衛生組織疫苗選株會議決定下年度季節性流感疫苗，或新增大流行前流感疫苗病毒株後，各流感合作中心或相關實驗室隨即開始製備用以生產疫苗之重組病毒種株。在此階段需製備重組病毒種株的原因，在於目前全球生產流感疫苗的平台大多以雞胚蛋(embryonated chicken eggs)為生物反應器，增殖病毒抗原。但大多數季節性流感病野生株(wild type virus)在雞胚蛋的增殖效率不佳，可能降低疫苗產量，增加生本成本，並不適合直接用來作為疫苗種株，因此，為提高單位雞胚蛋的疫苗抗原產量，並兼顧疫苗種株可維持原野生病毒株的抗原性特徵，針對季節性流感疫苗種株的製備，世界衛生組織建議以傳統重組法(classical reassortment)，將疫苗病毒株與另以一株可於雞蛋大量生產的 H1N1 流感病毒(A/PR/8/1934)共同感染單一雞胚蛋，使疫苗病毒株的 HA 以及 NA 蛋白基因，與 A/PR/8/1934(H1N1)病毒之 PB2、PB1、PA、NP、MP 及 NS 等六個內部蛋白基因，於雞蛋中互相重組，經由抗體篩選後，形成另一株重組疫苗種株，該病毒種株預期將可在不改變原疫苗病毒株抗原特徵的情形下，具備在雞胚蛋大量生產的能力，有效降低成本，提高

疫苗產量。

另，針對大流行前流感疫苗種株的製備，其概念與季節性流感疫苗種株製備類似，主要差別在於大流行前疫苗病毒野生株常屬高病原性病毒(highly pathogenic viruses, HPAI)，對於雞胚蛋具高致死率，不易增殖抗原；該毒力因子目前被認定主要決定於病毒 HA 蛋白切割位(cleavage site)所帶有的多個鹼基胺基酸序列。因此，用於製備大流行前疫苗的重組病毒種株，在其 HA 蛋白來自野生疫苗病毒株之前，須以分子生物學的基因突變法(mutagenesis)，先將切割位的多個鹼性胺基酸以人造突變的方式移除，其後再以”反式遺傳法(reverse genetics)”，將疫苗病毒株的 HA、NA 與 A/PR/8/1934 病毒的六個內部蛋白基因互相結合，形成重組疫苗種株。此類經移除 HA 蛋白切割位多個鹼性胺基酸的重組病毒，除可在雞胚蛋大量生長外，目前已被證實可減輕其在雞隻的致病性(低病原性，low pathogenic virus, LPAI)；對於人類的致病能力也可能同步降低，以符合成為大流行前疫苗種株的規範。

七、 重組疫苗種株抗原性與基因體分析(Antigenic and genetic characterization of reassortants)：

重組疫苗種株完成製備後，需再次針對其抗原性與基因體序列特徵進行分析，並與其前驅野生病毒株(parental virus)相互比較。病毒抗原性的分析方法與世界衛生組織監測病毒流行株相同，首先須利用雪貂製備重組疫苗種株之標準抗血清，其後將該血清與前驅野生病毒株反應，並與自身病毒的反應力價相比，觀察兩病毒抗原性之差異程度。一個可用於製造疫苗的種株，其抗原性需與前驅野生病毒株相同，以維持疫苗之預期保護效力。另關於種株基因體序列特徵分析，主要目的為定序其 HA 蛋白切割位的核苷酸序列，確保前驅野生病毒株之多個鹼性胺基酸已被移除。

此外，這個階段的另一個重點，為評估疫苗種株的安全性特徵(safety

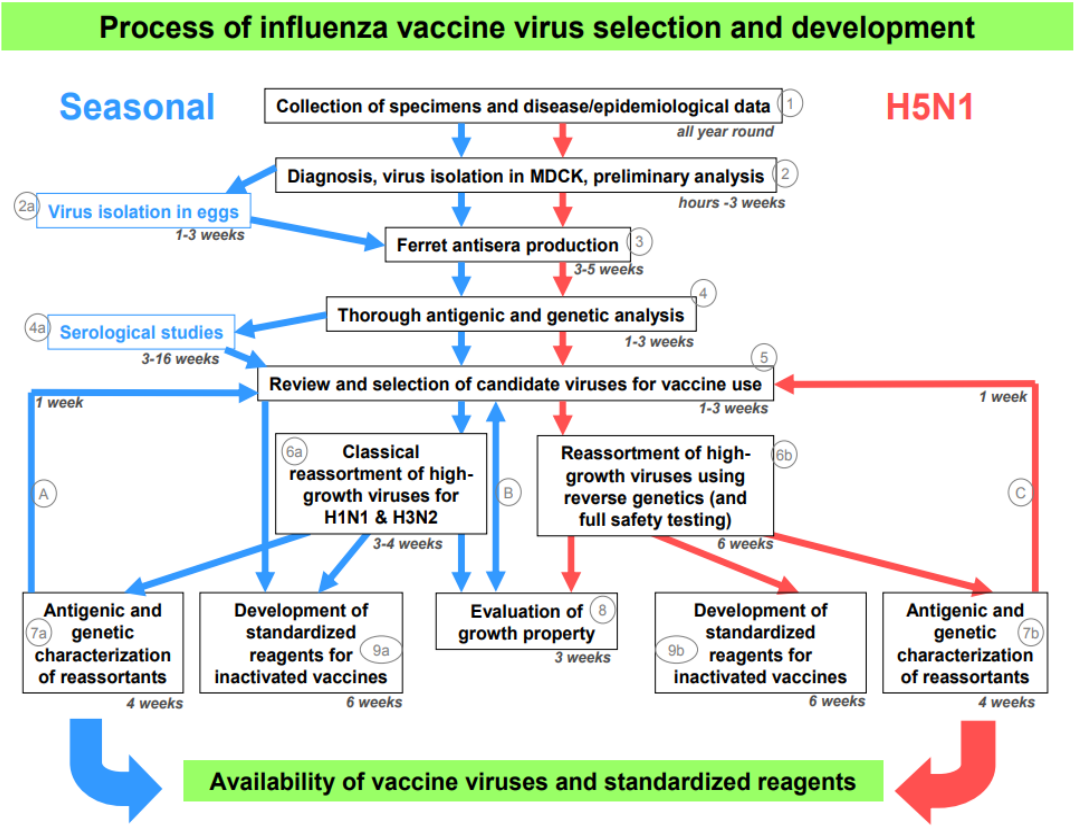
tests)。在正式用於製作疫苗之前，疫苗種株的安全性須以多個體外(*in vitro*)及體內(*in vivo*)試驗等多方面驗證，相關流程世界衛生組織另以規範明訂，這也是本次研習的重點學習項目，將於後段章節逐一說明，

八、 重組疫苗株生長特徵評估(Evaluation of growth property)：

通過上述抗原與安全性等評估之重組疫苗種株，將可送至國內外各疫苗廠，評估疫苗種株於雞胚蛋的生長效率，若生長情況良好，則該種株於疫情來臨時的實質應用價值將被確立；反之，若生長速度不如預期，在必要的情況下，負責種株製備的實驗室須循上述 1~7 之流程，重新製備另一個重組疫苗種株。

九、 製備去活化流感疫苗用標準品管試劑(Development of standardized reagents for inactivated vaccines)：

去活化流感疫苗用標準品管試劑的功用，在於定量以疫苗種株製備之疫苗中，其單位體積所帶有的 HA 蛋白含量。目前市售的三價去活化季節性流感疫苗，每 0.5 毫升(ml)所帶有的各亞型 HA 蛋白含量均為 15 ug。因此，為確保該等抗原含量符合標準，當疫苗廠完成疫苗製作後，須交由世界衛生組織流感合作中心，或其他具分析能力之實驗室公證單位，以標準品管試劑進行 HA 蛋白定量。目前日本 NIID 流感中心用於流感疫苗定量的標準品管試劑包含標準抗原及來自於該抗原的標準抗血清，分別由該國疫苗廠以及外包公司製作；用於檢測 HA 蛋白含量的方法為單向輻射擴散法(single radial diffusion)，作法為當疫苗抗原與標準品管抗原分別與標準抗血清於瓊脂凝膠作用時，將分別產生因抗原抗體相互反應的免疫沉澱圈，然因免疫沉澱圈的大小與抗原濃度成正比，故其後可藉由比較疫苗抗原與標準抗原免疫沉澱圈的範圍大小，推算疫苗抗原的 HA 蛋白含量，確保疫苗符合品質要求。



圖一、世界衛生組織流感疫苗病毒株選擇與種株製備流程

圖中左半部(藍色部分)為季節性流感疫苗製備流程；右半部為大流行前流感疫苗(以 H5N1 亞型為例)製備流程。

大流行前流感疫苗種株(prepandemic candidate vaccine virus, CVV)製備

依據世界衛生組織的指引，大流行前流感疫苗種株的製備，可由其流感合作中心(Collaborating Center)，或各國經由法規認證通過的實驗室進行。在實務上，日本 NIID 流感研究中心針對流感疫苗種株的製備，係配合世衛組織的政策，偏重於 H5 與 H7 等具引起大流行潛勢的病毒亞型，並以反式遺傳法(reverse genetics)進行；然而製備每年季節性流感疫苗所需的季節性流感病毒種株，則仰賴國內外疫苗廠或其他世界衛生組織合作中心提供，該中心並未自行製作。本次赴日研習的主要標的即為學習此大流行前疫苗種株製作技術與相關品管要求，期間日方安

排於實驗室實地操作，由其製備好的質體(plasmid)DNA 為起始材料，製備重組疫苗種株。惟日方考量 H5 或 H7 等大流行前流感病毒亞型皆屬生物風險第三等級(RG3)，較具操作危險性，並不適於作為短期研習教材，因此，針對本次大流行前流感疫苗種株製備技術訓練，全程以製備生物安全等級第二級(RG2)病毒為範例，以相同的實驗流程與方法，產製重組 A/PR/8/1934(H1N1)流感病毒。以下將針對整體實驗流程以及各別實驗技術進行說明。這些實驗係依據世界衛生組織前於 2007 年所公布的「WHO risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines」指引要求設計，實驗原理與方法則與其他世界衛生組織流感合作中心相同。

一、以反式遺傳法製備大流行前流感疫苗種株

反式遺傳法係以 DNA-based 細胞轉染(transfection)分子生物學技術，依實驗者的不同需求，以自由組合的方式，製造各類重組流感病毒。以製備大流行前流感疫苗種株為例，目前世界衛生組織各流感合作中心所使用的方式為利用基因轉殖技術，將大流行前流感病毒之 2 個全長基因體片段(HA 與 NA)，以及可於雞胚蛋大量生長的 A/PR/8/1934(H1N1)病毒之 6 個全長基因體片段(PB2、PB1、PA、NP、MP 與 NS)，分別建構成可於哺乳動物細胞內表現的質體 DNA，其後將該 8 個質體 DNA 同時轉染至哺乳動物細胞，使各質體 DNA 於細胞內表現蛋白質並轉錄病毒基因體 RNA，最終組裝成病毒顆粒。此外，以反式遺傳法製作重組疫苗種株的另一個好處，係該方法可同時於建構病毒質體 DNA 的過程中，同時移除高病原性病毒 HA 蛋白切割位所帶有的多個鹼性胺基酸序列，使製備完成的疫苗種株病原性特徵，轉變為低病原，以符合人用大流行前流感疫苗種株的製作規範。

現階段世界衛生組織各流感合作中心以反式遺傳法用來製作重組流感病毒時，所使用的細胞株不盡相同，日本 NIID 係採用 LLCMK2 細胞，屬於猴

子的腎臟細胞。為符合優良製作規範，該細胞已由 NIID 斥資鉅額(約 1 億日圓)，經由國際機構驗證，不具危害人體的潛在物質；另 A/PR/8/1934(H1N1)病毒六個內部蛋白表現質體來源為美國疾病控制與預防中心(CDC)，疫苗病毒之 HA 與 NA 蛋白表現質體則自行建構。在反式遺傳法的原理方面，由於所使用的各個表現質體同時具備 human polymerase I promotor、polymerase I terminator 及 RNA polymerase II promotor 等序列，故將 8 個質體共同轉染（co-transfection）於 LLCMK2 細胞後，可使帶有病毒基因體序列的質體 DNA 同時於細胞內表現病毒 RNA(vRNA)與蛋白，當病毒所需的 8 段 vRNA 與結構蛋白都已完備，病毒顆粒便可進行組裝(assembling)，其後以芽出(budding)的方式將重組病毒釋放至宿主細胞外。

當以 8 個質體共同轉染至 LLCMK2 細胞後，原則上 48 小時內細胞即可將組裝好的重組病毒釋放至培養液中。然因這個階段病毒含量較少，因此後續須以培養液接種至雞胚蛋，增殖放大病毒量，放大完成的重組疫苗種株將須交付安全性試驗，並於確認該病毒符合安全性試驗的各項指標後，始可作為人用大流行前流感疫苗種株，當有疫情需要時可交由疫苗廠進行疫苗生產。

二、大流行前流感疫苗種株之安全性試驗

進行安全性試驗的目的，在於確保經由反式遺傳法所製備的重組疫苗種株，在其 HA 蛋白切割位移除多個鹼性胺基酸後，已不具有野生株之高病原性特徵，而為低病原性病毒。當疫苗種株通過安全性試驗後，始可交由疫苗廠進行後續疫苗產製流程，目前世界衛生組織針對大流行前流感疫苗種株的安全性試驗項目，可能因疫苗種株亞型的不同而略有差異，但至少須包含以下五項：

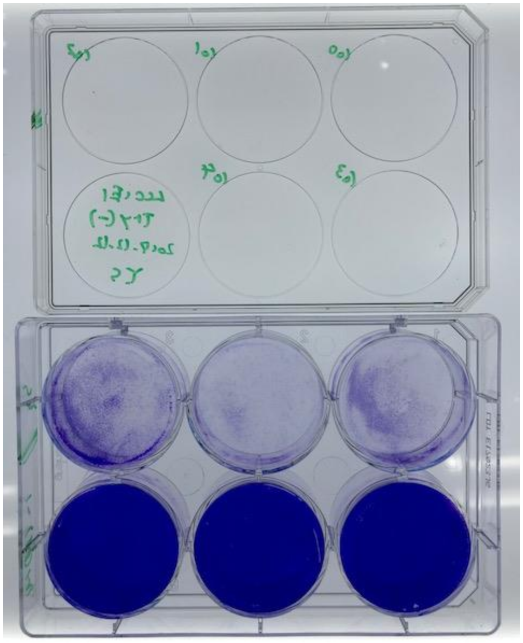
(一) 以細胞 plaque assay 測定重組疫苗種株於細胞的複製是否需依賴胰蛋白酶 (trypsin)：

流感病毒對於胰蛋白酶的依賴性可作為其是否容易造成動物或人類全身性感染的一項重要指標，尤其針對 H5 與 H7 亞型的疫苗種株，評估此一指標具相當意義。在流感病毒感染宿主的過程中，病毒須利用宿主自身的酵素(例如胰蛋白酶)對其 HA 蛋白進行切割，進而使切割後的 HA 蛋白可與宿主細胞受器(receptor)結合並進入細胞，其後再於細胞內與細胞膜互相融合，將病毒蛋白及基因體釋放至宿主細胞內，進行後續複製增殖等流程。一般來說，高病原性流感病毒因其 HA 蛋白切割位具有多個鹼性胺基酸，使該切割位除了可被胰蛋白酶辨認外，亦可被其他蛋白酶(例如 furin 類蛋白酶)切割，故在缺乏胰蛋白酶的環境仍可有效複製；反之，低病原性流感病毒因其 HA 蛋白切割位並不具多個鹼性胺基酸，使切割位僅能被胰蛋白酶辨認，在缺乏胰蛋白酶的環境並無法有效複製。以人類來說，由於胰蛋白酶大多表現於呼吸道，因此低病原性流感病毒感染人體後，僅能限於呼吸道進行增殖複製，造成局部感染；反之高病原流感病毒除了可於呼吸道有效增殖外，亦可於不表現胰蛋白酶但卻具有其他蛋白酶的器官內複製，進而引起全身性感染。因此，當大流行前流感疫苗重組種株的 HA 蛋白切割位的多個鹼性胺基酸被移除後，該病毒對於在不具胰蛋白酶的環境下，生長效能將受影響；反之，高病原病毒野生株在不具胰蛋白的條件下仍可利用宿主細胞的其他蛋白酶，生長情形不受影響。藉由比較大流行前疫苗種株與前驅野生株對於胰蛋白酶的依賴性，將可作為體外(*in vitro*)安全性特徵的一項重要指標。

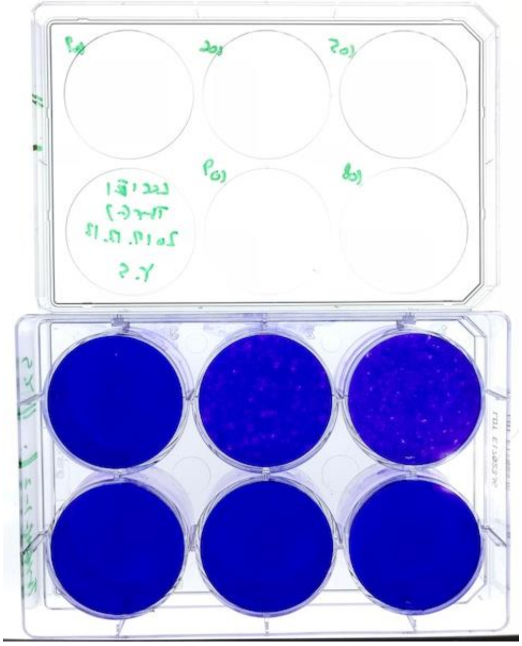
以下圖二的結果為例，此為於日本實驗室實地操作 A/PR/8/1934(H1N1)病毒之胰蛋白酶依賴性試驗結果。由於 A/PR/8/1934(H1N1)病毒屬低病原性，其 HA 蛋白切割位不具多鹼性胺基酸，因此該病毒於不添加胰蛋白酶的培養環境下，與添加胰蛋白的環境相比，在同樣的稀釋倍數下，病毒斑(plaque)

較小，顯示其生長複製時對於胰蛋白酶的依賴性。

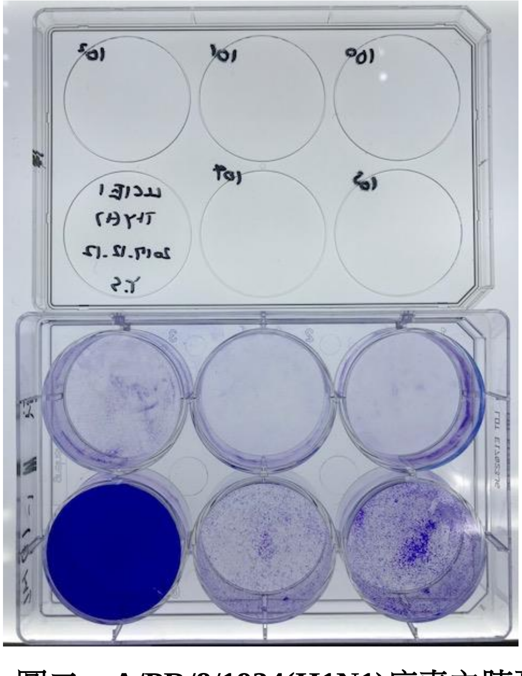
(A) 培養環境不添加胰蛋白酶



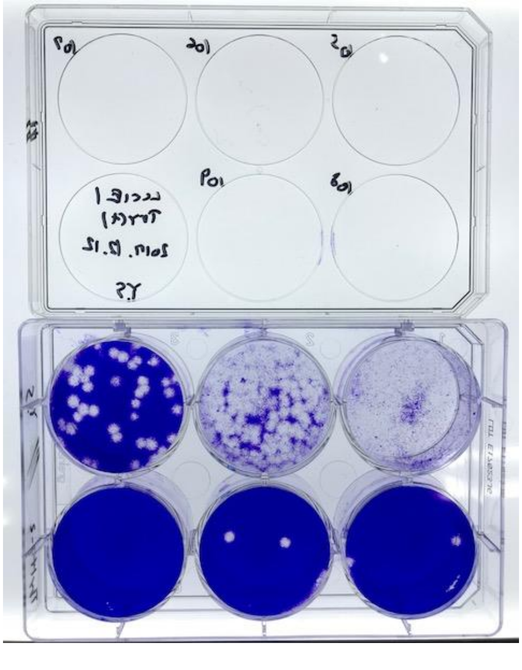
(C) 培養環境不添加胰蛋白酶



(B) 培養環境添加胰蛋白酶



(D) 培養環境添加胰蛋白酶



圖二、**A/PR/8/1934(H1N1)**病毒之胰蛋白酶依賴性試驗結果

(二) 50%雞胚致死率測試(50% chicken embryo lethal dose, $CELD_{50}$)：

高病原性流感病毒於接種至雞胚蛋後，通常在一到二天內，可殺死該雞胚；反之低病原性病毒通常對雞胚不具致死率。因此，比較重組疫苗種株以及其前驅病毒野生株對於雞胚的致死程度，將可了解該病毒於 HA 蛋白切割位的多個鹼性胺基酸被移除後，是否確實降低其病原性，作為該種株的安全性試驗指標之一，而該指標也可與雞隻病原性試驗(如下介紹)的結果相互佐證。

實驗進行時，需將疫苗種株以及前驅病毒野生株進行一系列 10 倍序列稀釋，並將各濃度病毒接種至雞胚蛋，經 37℃培養 48 小時後，觀察雞胚存活情形，即可計算 **$CELD_{50}$** 數值。

(三) 疫苗種株於雞隻的病原性(pathogenicity)試驗：

疫苗種株於雞隻的病原性特徵評估屬於直接於雞隻體內(*in vivo*)進行測試的方法。原理係將種株病毒感染雞隻後，觀察該病毒是否對於雞隻具致死性，進而評估病毒的病原性程度。一般來說，高病原性病毒可以感染後 1~2 天內使雞隻死亡；低病原性病毒則僅出現輕微症狀，不會出現致死情形。因此，同時將疫苗種株以及前驅野生病毒株對雞隻進行感染，可藉由比較雞隻被感染後出現的症狀及死亡率，了解該疫苗種株於 HA 蛋白切割位的多個鹼性胺基酸被移除後，是否確實降低其病原性。依據目前世界衛生組織的規範，疫苗種株對於雞隻須呈現低病原性特徵，此病原性的判定標準為靜脈內病原性指數(Intravenous Pathogenicity Index, IVPI)，依據世界動物衛生組織的規範，當病毒 IVPI 指數大於 1.2 時屬高病原性，反之為低病原性。

實務操作上，進行疫苗種株於雞隻的病原性試驗時，使用 4 週齡的 SPF 雞隻，每次至少需使用 8 隻雞。將疫苗種株以及其前驅野生病毒株分別對雞隻進行攻毒，以注射方式，將病毒由靜脈注入，其後觀察雞隻的臨床症狀以及死亡情形。日本 NIID 基於生物安全風險考量，此一部分於本次研習期間

僅以課程方式授課，並無法進行實地操作教學。值得注意的是，當大流行前流感疫苗種株尚未確認對雞隻為低病原性前，所有須操作種株的實驗皆須於動物第三等級(ABSL-3)或一般第三等級實驗室(BSL-3)進行；惟經確認對雞隻為低病原性後，接續實驗可於生物安全第二等級實驗室操作。

(四) 疫苗種株於雪貂的病原性(pathogenicity)試驗：

病毒於雪貂的病原性特徵評估亦屬直接於雪貂體內(*in vivo*)測試種株安全性的另一個方法，藉由比較將疫苗種株與前驅野生病毒株分別感染雪貂之後，觀察雪貂所產生的臨床症狀，評估該疫苗種株對於哺乳動物的致病能力。使用雪貂測試疫苗種株安全性的原因，在於雪貂已是被廣為使用於評估流感病毒對人類致病力的模式動物。雪貂之上呼吸道具備與人類較為類似之流感病毒受體，故可被人類流感病毒感染，此外，雪貂於感染流感病毒後，會產生與人類相似之症狀例如發燒、打噴嚏、倦怠、食慾不振及體重下降等。一般來說，季節性流感病毒或疫苗種株的骨架病毒(A/PR/8/1934(H1N1))，在雪貂僅呈現微弱致病特徵，甚至無任何致病力，受感染的雪貂並不會產生症狀；反之高病原性大流行流感病毒野生株(例如 H5N1 亞型)有時可對雪貂產生嚴重疾病，甚至死亡。因此，依據世界衛生組織的規範，一個可用於製備人用疫苗的種株，與其前驅野生病毒相比，在雪貂引起疾病的程度需較野生株輕微，且需與人類季節性流感或 A/PR/8/1934(H1N1)骨架病毒接近。

在實驗做法上，使用 4-12 月齡的雪貂，每次試驗至少需使用 4~6 隻雪貂。將疫苗種株以及前驅野生病毒株分別對雪貂進行攻毒，將病毒由雪貂的鼻孔慢慢滴入，其後觀察雪貂的臨床症狀以及死亡情形。當以疫苗種株或野生病毒感染雪貂第三或第四天後，先犧牲 2~3 隻雪貂，經解剖取得其多個臟器後(包含脾、小腸、肺、腦以及鼻甲)，測定病毒於該等臟器的含量，評估病毒於雪貂宿主複製的能力。剩餘的 2~3 隻雪貂，則持續觀察其臨床症狀，包括

體重下降趨勢、倦怠、呼吸道及神經症狀以及體溫升高情形等。此外，自雪貂被病毒感染後，須每日持續採集鼻沖洗液(nasal wash)達七天，評估疫苗種株於上呼吸道複製的能力。最後，於感染後的 14 天，將該等雪貂犧牲進行解剖，觀察各臟器的病理特徵。

針對疫苗種株於雪貂的病原性特徵，須達以下條件以證明具安全性：

(1). 以疫苗種株感染之雪貂，其臨床症狀嚴重度，須符合已定義之低病原程度範圍。種株製作實驗室可利用已被國際公認為具低病原性之病毒(例如 A/PR/8/1934(H1N1))，將其感染雪貂後所產生的各項臨床症狀指標給予計分，並以該項計分結果作為標準；經疫苗種株感染之雪貂，臨床症狀計分結果不得高於前述標準。

(2). 疫苗種株感染之雪貂，其呼吸道樣本的病毒量，須符合已定義之低病原範圍。種株製作實驗室可利用已被國際公認具低病原性之病毒(例如 A/PR/8/1934(H1N1))，將其感染雪貂後，紀錄病毒於呼吸道組織如氣管及肺臟等之力價，並給予計分，該項計分結果將作為標準。經疫苗種株感染之雪貂，病毒於呼吸道樣本的含量計分結果不得高於前述標準。

(3). 疫苗種株於雪貂的複製僅能在發生在呼吸道。

(4). 疫苗種株不能於被染感的雪貂腦中被偵測。當雪貂出現神經性症狀，或其腦組織切片已偵測出病毒抗原，則代表該疫苗種株尚未完成減毒，可能具引發人類全身性感染潛勢。

然而本次研習過程中，NIID 基於生物安全風險考量，因此上述內容僅由流感研究中心第六室室長 Dr. Asanuma 以簡報方式授課，並無法於動物負壓實驗室進行實地操作教學。

(五) 疫苗種株 HA 基因定序(sequencing)與基因穩定性(stability)

針對疫苗種株的 HA 基因序列分析，可掌握其蛋白酶切割位的多個鹼性

胺基酸是否已確實移除，以基因體層次佐證其低病原性的表現特徵。此外，因疫苗廠在疫苗製備過程中可能需以疫苗種株進行多次繼代，提高疫苗產能。為確保在此過程中疫苗種株的 HA 蛋白切割位序列不會回復成原前驅野生病毒株的多鹼基狀態，因此需針對疫苗種株的基因穩定性進行測試。該疫苗種株需在雞胚蛋至少進行十次的連續繼代培養，並於每次繼代後監視病毒 HA 基因序列的變化，確保其切割位基因的穩定性。

除了上述安全性評估之外，針對反式遺傳法所製備的疫苗種株，亦須評估其於雞胚蛋複製增殖的能力以及抗原特徵。疫苗種株於雞蛋增殖後的力價，可反映出其感染雞胚蛋的效力，一個好的疫苗種株，必須擁有在雞胚蛋良好的複製能力，以提高疫苗產量。此外，當以疫苗種株進行雞隻病毒性或雪貂病原性測試時，往往需使用相對高濃度的病毒(10^6~10^7 EID_{50}/ml)進行攻毒，因此測定疫苗種株的50%雞胚蛋感染力價(50% egg infectious dose, EID_{50})是必要工作。而疫苗種株的抗原性，必須確保與其前驅野生病毒株相同，因此當疫苗種株製備完成後，須以其免疫雪貂，製備免疫抗血清，後續再以該血清與由野生株衍生的血清，共同針對疫苗種株的抗原性進行分析，測定方法為利用紅血球凝集抑制試驗。前述 50%雞胚蛋感染力價測定方法如下：

50%雞胚蛋感染力價(50% egg infectious dose, EID_{50})

本次研習期間因實地以反式遺傳法製備 A/PR/8/1934(H1N1)重組病毒，因此學習 50%雞胚蛋感染力價分析時，以該病毒為材料進行。病毒 EID_{50} 力價的分析原理，係以一系列經 10 倍序列稀釋的病毒，接種至雞胚蛋，經培養 48~72 小時後，測量病毒於個別雞胚蛋是否生長，進而計算 EID_{50} 數值。實驗進行時，每個病毒稀釋倍數進行 6 重複接種，因 A/PR/8/1934(H1N1)屬於低病原性病毒，在雞胚蛋的複製能力良好，因此實驗設計由病毒液稀釋 10^6 倍至 10^{11} 倍後進行接種，

共 36 個雞胚蛋。測量病毒於個別雞胚蛋是否生長時，係抽取少量尿囊液，以紅血球凝集試驗測定該尿囊液是否可凝集紅血球，若可，表示尿囊液中含有病毒；反之，尿囊液不具病毒。本次實地操作實驗結果如下：

稀釋倍數	**病毒紅血球凝集試驗結果**					
10^6	+	+	+	+	+	+
10^7	+	+	+	+	+	+
10^8	+	+	+	+	+	+
10^9	+	+	+	+	+	+
10^{10}	+	-	-	-	-	-
10^{11}	-	-	-	-	-	-

由於接種至雞胚蛋的各病毒稀釋液的體積為 0.2 ml，經計算，病毒力價為 $10^{9.6}$ EID_{50}/0.2 ml，換算結果為 $10^{10.3}$ EID_{50}/ml。

參、心得與建議

心得

本次奉派赴日本 NIID 流感研究中心研習流感疫苗種株製備技術著實獲益良多。衷心感謝本署長官給予研習之寶貴機會，使我得以利用出差期間，學習世界衛生組織流感合作中心以反式遺傳法製作流感疫苗種株的技術，以及應所依循的相關規範，這些資訊未來將可提供我國防疫相關單位參考，提升流感大流行應變及整備量能。

日本 NIID 的流感研究中心目前包含六個研究室，除了本次研習的第四室之外，第一室為 Laboratory for influenza virus surveillance，任務為配合世界衛生組織政策，執行全球流感病毒監測及分析。第二室為 Laboratory for molecular diagnosis and international training，負責開發各類流感病毒檢測方法，尤其在全球出現新興流感病毒時，配合世界衛生組織需要，對全球公布該病毒之分子生物學檢測技術。第三室為 Laboratory for quality control of influenza vaccine viruses，針對流感疫苗種株的製程品質及安全性特徵資料進行審核，並以標準品管試劑檢測疫苗產品之 HA 蛋白含量，作為該疫苗是否符合規範而可施打於人類之依據。第五室為 Laboratory for cell-based vaccine virus development，主要藉由研究計畫，與國內外多個疫苗廠合作，建構以細胞培養製作流感疫苗之產線，儲備日本因應流感大流行的疫苗整備實力。第六室為 Laboratory for mucosal vaccine development，亦藉由研究計畫，開發新式以黏膜免疫為基礎的流感疫苗，並協助流感中心各種動物實驗相關技術支援。綜觀該中心的整體組織架構，其工作包括執行世界衛生組織所需流感病毒監測、疫苗種株製備、疫苗品管以及其他相關研究等部分，業務執掌層面涵蓋範圍甚廣。本署國家流感中心與其相比，業務性質雖為相似，惟現階段仍以病毒檢驗及監測方面為主(亦即 NIID 流感中心第一室及第二室的業務)，尚未跨足疫苗種株製備。另一方面，因大流行前流感疫苗種株製備以及疫苗 GMP 品管，亦為 NIID 流感中心的重點業務項目，此種任務編

制應可使疫苗產製相關品質規範及技術層面的要求較容易結合，有助面對大流行疫情時，加速疫苗生產等應變作為。反觀我國疫苗查驗相關權責單位目前並無針對疫苗種株製備訂定規範，本署日後若將跨足疫苗種株製備，需再與其進一步溝通討論，協調職掌及業務分工責任，相對來說成效可能較為事倍功半。此外，NIID 流感中心的第六室為專責實驗動物研究室，該室室長 Dr. Asanuma 為獸醫學博士，具多項動物實驗相關技術經驗。此種專業單位的設立對於流感疫苗種株製備極為重要，也顯示日方對於流感病毒相關動物實驗的重視。因此除了種株製備技術外，本署國家實驗室未來仍需持續培育動物實驗背景之專業人才，使流感疫苗整備更為全面。

近年來許多新興流感病毒包含 H7N9 以及 H5Nx 亞型等皆源自於中國，我國在地理位置上因與該國鄰近，且國人旅遊或商務往來頻繁，再再顯示你我長期處於該等新興病毒的高風險區域，因此，在疫情整備方面，平時必須以紮實的根基，因應戰時量能所需。我國至今仍非世界衛生組織的正式會員，當某新興病毒未來於我國引爆大流行時，世衛組織能否因我國需要協助製備疫苗種株，仍具變數。因此，強化我國對於新型流感病毒大流行的疫苗整備，提升自行製作流感疫苗種株的能力，應為我國未來在流感防治上的一大重點，以暢通整體疫苗生產鏈。日後若政策方向確立，本署相關單位包含整備組與檢驗中心，應與食品藥物管理署及疫苗製造廠共同研商，除審酌國情訂定規範供疫苗種株或品管試劑製作依循，亦在明確的分工下發揮各自所長共同努力。在經費方面，製作人用疫苗種株所需細胞必須經由驗證，以日方為例，現階段所用來製作重組流感病毒的 LLCMK2 細胞株，係斥資約 1 億日圓，經由國際機構驗證不具危害人體的潛在物質，方可符合優良製作規範。因此，在我國整體大流行流感疫苗產業的長遠發展上，穩定的經費挹注不可或缺。總結以上，憑藉本次赴日所學，疫苗種株製備之基本技術已可於本署國家實驗室建立。雖我國目前尚無需立即自行製備流感疫苗種株，基於備戰需要，期許日後政府相關權責單位可有交流及互動機會，使因應流感大流

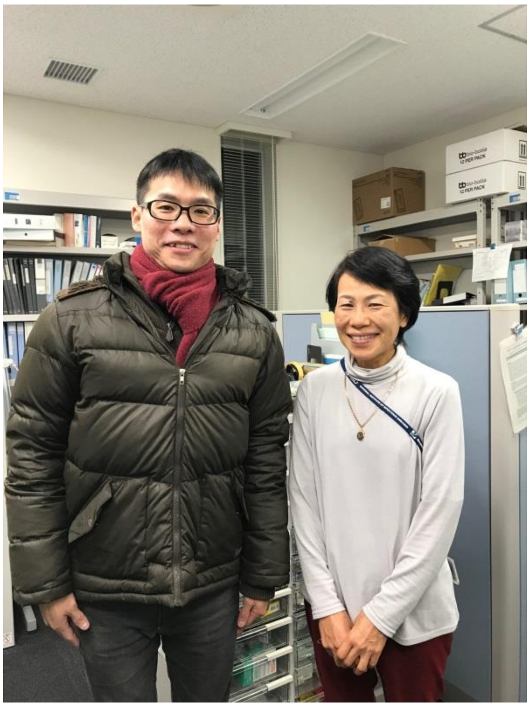
行相關疫苗整備規劃有更為多元的發展空間。

建議

1. 良好的技術是一個專業實驗室運作的根本，而良好技術的建立除需實驗室人員本身的專業知能外，亦需藉由持續的技術交流激發精進的火花。本署長官常年來皆持續支持檢驗中心派員赴世界各國學習新技術，至為感謝。建議未來可再持續編列經費，提供我國家實驗室人員與他國專家接觸交流的機會，在了解雙方技術之異同後，以對方的優點改進自己的缺點，本署國家實驗室之軟實力將會持續累積與成長。
2. 除了良好的技術之外，國家實驗室的設施必須能提供實驗人員足夠支援，以符合各項業務執行時所需的生安及職安等規範。本署檢驗中心昆陽實驗室目前各項設施的穩定運作亟需仰賴國內外包廠商協助,此作法與日本 NIID 相同。因此。在實驗室維護相關經費方面，建議未來仍需持續給予挹注，作為實驗室因應各項疫情來臨時最強而有力的後盾。

附錄

附圖

	
圖一、與 NIID 流感研究中心第四及第五室成員合照。本圖前排左一為第四室室長(現階段亦為第五室代理室長)Dr. Nobusawa，右一為第五室 Dr. Hamamoto。中間右一為第四室 Dr. Arita。後排左一為第五室 Dr. Takahashi，右一為第四室 Dr. Suzuki，亦為本次研習主要技術指導者。	**圖二、與 NIID 流感研究中心第四室室長 Dr. Nobusawa 合照。**

圖三、與 **NIID** 流感研究中心第四室研究員 **Dr. Suzuki** 合照。	圖四、與 **NIID** 流感研究中心第五室研究員 **Dr. Takahashi** 合照。

圖五、與 NIID 流感研究中心第一室成員合照。本圖右一為第一室室長 Dr. Watanabe，左一為第一室主任研究員 Dr. Fujisaki。	**圖六、與 NIID 流感研究中心主任 Dr. Odagiri 合照。**

全文完