

出國報告（出國類別：研究）

赴日本研習「細胞製程日本腦炎疫苗品
質管制試驗」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：張弘 技士

派赴國家：日本

出國期間：104年12月13日至12月19日

報告日期：105年3月10日

摘要

我國位於亞熱帶地區，與東南亞、中國、日本及韓國同屬日本腦炎流行區域，現行使用之疫苗仍為傳統鼠腦型日本腦炎疫苗。鼠腦型日本腦炎疫苗是1950年代由日本科學家將中山株日本腦炎病毒，於鼠腦中增殖後予以不活化製成，由於該類型疫苗曾在日本等地發生接種後嚴重副作用事件，因此許多疫苗廠皆以研發細胞製程之新型日本腦炎疫苗為目標，以取代傳統鼠腦型日本腦炎疫苗。目前在我國已申請查驗登記之新型日本腦炎疫苗有：1. Intercell biomedical之產品IXIARO，為細胞製程不活化SA14-14-2日本腦炎疫苗，並於2015年11月取得我國上市許可；2. Sanofi Pasteur之產品IMOJEV，為以黃熱病疫苗株Y17D為骨架之鑲嵌型活性減毒SA14-14-2日本腦炎疫苗；此外，Kaketsuken之產品ENCEVAC，為細胞製程不活化北京株日本腦炎疫苗，也可望來台申請查驗登記。

近10年來，臺灣每年確定病例數介於20-30名之間，且主要感染族群已由幼兒轉變為青壯年人口，新型日本腦炎疫苗，除具有接種劑數少、安全性高等優點外，更可適用於成人或所有年齡層，其中IXIARO不管是在美國或歐洲的研究都顯示，成人於接種2劑IXIARO疫苗後，具有很好的免疫反應，且針對過去曾接種過3劑或3劑以上鼠腦型疫苗的人，僅需再追加接種一劑，其產生的抗體效價比過去不曾接種過鼠腦型疫苗，但僅接種2劑IXIARO疫苗的人高；而IMOJEV疫苗亦經研究統計推估，僅接種1劑之抗體保護力可維持10年甚至更久。

為因應國外各類新型日本腦炎疫苗之查驗登記及封緘檢驗，確保國人施打之安全性，因此本次赴日本一般財團法人化學及血清療法研究所，研習細胞製程日本腦炎疫苗品質管制相關試驗，包含效價試驗、不活化試驗及抗原含量試驗，以提升此類疫苗之品質檢驗技術。

目次

一、 前言及目的	4
二、 參訪行程	6
三、 研習內容	
(一) 日本一般財團法人化學及血清療法研究所參訪	7
(二) 細胞製程日本腦炎疫苗—抗原含量試驗研習	8
(三) 細胞製程日本腦炎疫苗—不活化試驗研習	9
(四) 細胞製程日本腦炎疫苗—效價試驗研習	10
四、 心得與建議	18
五、 附錄	20

一、 前言與目的

鼠腦型日本腦炎疫苗 (Japanese encephalitis mouse-brain vaccine, JE-MB) 是 1950 年代由日本科學家將中山株 (nakayama strain) 日本腦炎病毒，於鼠腦中增殖後予以不活化製成，1960年代 JE-MB 開始使用於日本腦炎盛行區，並有極佳的預防能力，JE-MB 所引發的副作用，常見的有蕁麻疹及血管性水腫等過敏反應，嚴重的話則會引發神經性症狀，包含腦炎、抽蓄、步態障礙及急性瀰漫性腦脊髓炎 (acute disseminated encephalomyelitis, ADEM)。因推測 JE-MB 所引發的副作用與鼠腦製程有關，所以許多疫苗廠皆以研發細胞製程之新型日本腦炎疫苗為目標，以取代傳統鼠腦型日本腦炎疫苗。國際間第一個生產日本腦炎疫苗的大阪大學微生物研究會 (BIKEN)，也宣布自 2006 年起停止 JE-MB 疫苗生產，並開發細胞製程不活化日本腦炎疫苗取代。

新型日本腦炎疫苗可分三類：

1. 利用 Vero 細胞培養北京株 (Beijing strain) 或 SA14-14-2 減毒株，再經過不活化處理後製成之疫苗，代表藥廠如日本 BIKEN (於 2009 年取得日本之上市許可)、日本 Kaketsuken (於 2011 年取得日本之上市許可) 及英國 Intercell biomedical (於 2009 年取得美國、加拿大、澳洲及歐洲之上市許可)。
2. 美國機構 PATH 協助開發之活性減毒 (live attenuated) SA14-14-2 疫苗，是利用初代倉鼠腎臟細胞 (primary hamster kidney cell) 培養 SA14-14-2 減毒株製成。代表藥廠為成都生物製品研究所，並陸續於亞洲國家中取得上市許可，中國於 1988 年、尼泊爾於 2001 年、南韓與斯里蘭卡於 2002 年、印度於 2006 年、寮國於 2008 年、柬埔寨於 2009 年、馬來西亞與越南則於 2013 年許可該產品上市。
3. 賽諾菲巴斯德藥廠 (Sanofi Pasteur) 所開發的鑲嵌型 (chimeric) 活性減毒 SA14-14-2 疫苗，是利用 DNA 重組技術將 SA14-14-2 減毒株之 prM 及 E 兩段基因置換至黃熱病疫苗株 Y17D-204 之骨架上，再於雞胚蛋中增殖、純化後製成，並於 2011 年取得澳洲及泰國之上市許可。

數據顯示近 10 年來，臺灣每年確定病例數介於 20-30 名之間，且主要感染族群已由幼兒轉變為青壯年人口，新型日本腦炎疫苗，除具有接種劑數少、安全性高等優點外，更可適用於成人或所有年齡層，其中 IXIARO 不管是在美國或歐洲的研究都顯示，成人於接種 2 劑 IXIARO 疫苗後，有很好的免疫反應，且針對過去曾接種過 3 劑或

3劑以上鼠腦型疫苗的人，僅需再追加接種一劑，其產生的抗體效價比過去不曾接種過鼠腦型疫苗，但僅接種2劑IXIARO疫苗的人高；而IMOJEV疫苗亦經研究統計推估，僅接種1劑之抗體保護力可維持10年甚至更久。

為因應國外各類新型日本腦炎疫苗之查驗登記及封緘檢驗，確保國人施打之安全性，故派職赴日本研習細胞製程日本腦炎疫苗品質管制相關試驗，以提升此類疫苗之品質檢驗技術。

二、參訪行程

研習內容及會晤人員：

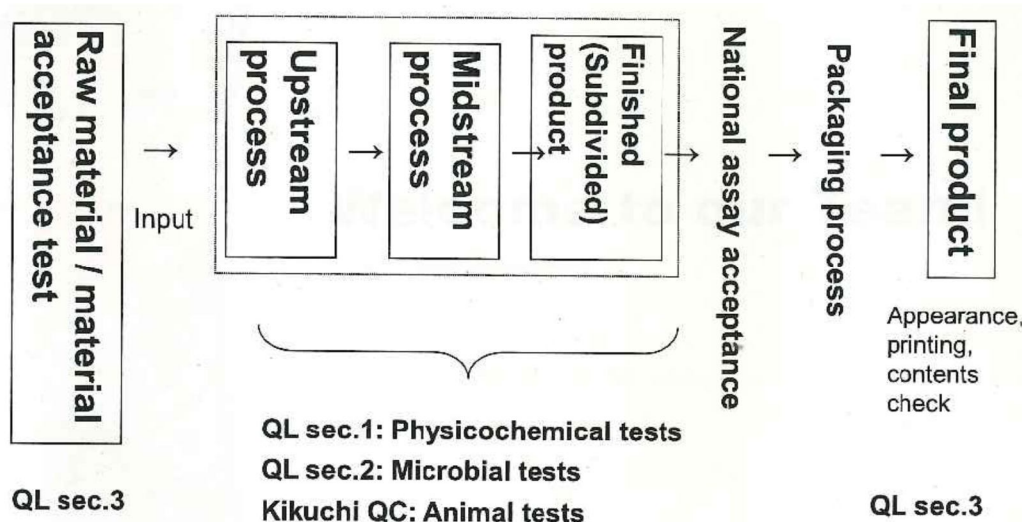
Date	Schedule	Remark
2014.12.13 (Sun)	Taipei→Fukuoka→Kumamoto	
2014.12.14 (Mon)	(1) Introduction to Kaketsuken Quality Control department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute. (2) Lecture of Antigen content test	Mr. Nobuyuki Ariyoshi Mr. Kyoichi Sato
2014.12.15(Tue)	(1) Lecture of potency test and inactivation test (2) Inactivation test : cerebral inoculation (3) Potency test : Japan encephalitis reference vaccine and sample immunization.	Ms. Tomoni Koga Ms. Natsuki Nozaki
2014.12.16(Wed)	(1) Potency test : Plaque staining and counting Preparation of cells for neutralization assay	Ms. Tomoni Koga Ms. Natsuki Nozaki
2014.12.17(Thu)	(1) Potency test : Serum and virus dilution Neutralization assay Infection and tilting	Ms. Tomoni Koga Ms. Natsuki Nozaki
2014.12.18(Fri)	(1) Potency test : Bioassay Assist system analysis (2) Q&A	Ms. Tomoni Koga Ms. Natsuki Nozaki Mr. Nobuyuki Ariyoshi
2014.12.19(Sat)	Kumamoto→Fukuoka→Taipei	

三、 研習內容

(一) 日本一般財團法人化學及血清療法研究所參訪

第一天於化血研總部會晤品質管理部次長Mr. Tochiara、品質管理課課長Mr. Ariyoshi、品質管理課Mr. Sato、事業推進部次長Mr. Matsuoka、事業推進部Mr. Inoue、事業開發部Mr. Katsuo、Mr. Yagi，首先由Mr. Ariyoshi進行公司及品管系統之簡介。

日本一般財團法人化學及血清療法研究所 (Japanese General Incorporated Foundation, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute) 設立於1945年，研發、製造及行政人員計1,927人，年營業額約475億日圓，係日本第一大生物製劑廠，主要負責各類人用疫苗、血液製劑、抗毒素、動物疫苗及診斷試劑之研究、開發及製造。該公司之製造廠區分為三區塊，有總部（主要製造白喉、百日咳、破傷風、狂犬病、細胞製程日本腦炎等疫苗，各類白蛋白、免疫球蛋白、凝血因子等血液製劑，動物用流感、日本腦炎及狂犬病等疫苗）、菊池研究中心（主要製造A型肝炎、基因重組B型肝炎、季節性流感等疫苗）及阿蘇實驗室（主要製造蛇毒抗毒素、肉毒桿菌抗毒素、破傷風抗毒素、產氣莢膜梭胞桿菌抗毒素）。品質管理部共分為5個課，其中4個課位於總部，1個課位於菊池研究中心，負責品管檢驗之項目超過730項，每年檢驗檢體數目超過10萬個，其品管流程如圖一。



圖一、品管流程

隨後於會議中雙方對於細胞製程不活化日本腦炎疫苗所需檢驗項目（表一）進行討論，日方並分享去年申請韓國上市許可之經驗，當時韓國衛生主管機關進行品質管制試驗時，遇到最大困難的項目為效價試驗，為此日方還特別派員赴韓國實地指導實驗操作。因此次研習行程只為期1週，所以僅針對抗原含量試驗、不活化試驗、效價試驗進行行程安排，尤其效價試驗為此次研習之重點項目。

Test Items
1. Test for pH
2. Test for protein content
3. Sterility test
4. Bacterial endotoxin test
5. Test for freedom from abnormal toxicity
6. Test for formaldehyde content
7. Test for moisture content
8. Inactivation test
9. Potency test

表一、藥典所載細胞製程不活化日本腦炎疫苗成品檢驗項目

（二）細胞製程日本腦炎疫苗-抗原含量試驗研習

第一天下午安排由 Mr. Sato 簡介抗原含量試驗之原理及實驗步驟。

1. 原理：

使用 sandwich ELISA 方法，首先利用兔來源之抗日本腦炎病毒 IgG 當作 primary antibody 與檢體或標準品作用，再加入抗日本腦炎病毒 E 蛋白之單株抗體（HRP labeled）當作 secondary antibody，適當時間反應後加入 OPD 作為受質，經 HRP 作用後呈色讀取吸光值，最後利用檢體吸光值與標準曲線對照，即可測得檢體抗原含量。

2. 步驟：

- 2.1 於 96 孔盤中每孔各加入 100 μ L 之 primary antibody(抗體濃度 5 μ g/mL)，並於室溫作用隔夜。

- 2.2 用 PBS 溶液清洗 3 次後，每孔各加入 300 μL 之 blocking solution (1% BSA solution)，並於 4°C 作用隔夜。
- 2.3 用 PBS 溶液清洗 3 次後，每孔先加入 50 μL 之 buffer A，之後再各別加入 50 μL 之檢體稀釋液、標準品稀釋液及品管樣品 (QC control)，並於 37°C 作用 2 小時。
- 2.4 用 PBS-T 溶液清洗 5 次後，每孔各加入 100 μL 之 secondary antibody (抗體濃度 100 ng/mL)，並於室溫作用 90 分鐘。
- 2.5 用 PBS-T 溶液清洗 5 次後，每孔各加入 100 μL 之 substrate solution，並於 37°C 作用 30 分鐘。
- 2.6 每孔各加入 100 μL 之 stop solution (1.5 mol/L sulfuric acid) 以停止反應。
- 2.7 以 microplate reader 測定 490 nm 及 650 nm 之吸光值，其中 650 nm 為背景吸光值，因此以 490 nm 減去 650 nm 之吸光值對標準品序列濃度製作標準曲線，以 excel 計算出標準曲線之線性方程式後，再將檢體吸光值代入標準曲線方程式，即可求得檢體抗原含量。
- 2.8 試驗要符合下列規定才成立：
 1. 標準曲線之 $r \geq 0.99$
 2. 標準曲線之斜率在 2-11 之間
 3. 品管樣品測定值在 6.0-9.4 $\mu\text{g/mL}$ 之間
 4. 樣品之 CV 值 $< 15\%$

(三) 細胞製程日本腦炎疫苗-不活化試驗研習

第二天至第五天之實驗皆在菊池研究中心進行，第二天早上首先由 Ms. Koga 及 Ms. Nozaki 解說及示範不活化試驗。

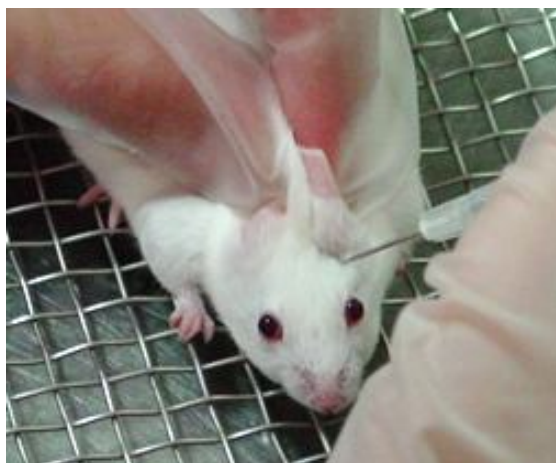
1. 原由：

因日本腦炎病毒會侵犯中樞神經系統，造成神經元細胞死亡，導致痙攣、癱

癱、神智不清等嚴重神經症狀。因此，不活化日本腦炎疫苗之成品在上市前必須經過不活化試驗，將疫苗檢體以腦內注射至小鼠，以確認製程中不活化流程已完全將活病毒去活化，成品中無任何活病毒殘留，如此才能保障施打此疫苗者免於因殘留之日本腦炎病毒而造成疾病、損害。

2. 步驟：

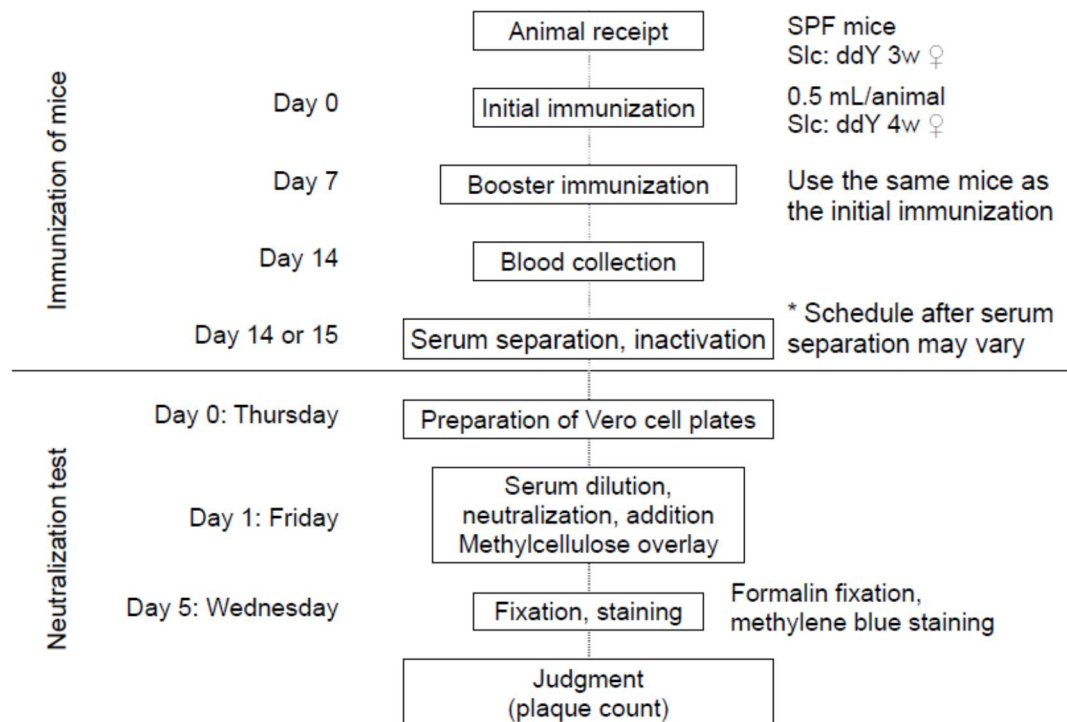
- 2.1 購買3週齡之小白鼠，每一檢體需10隻，飼養1週後進行試驗。
- 2.2 以兩段式針頭腦內注射器抽取檢體，試驗動物每隻各以0.03 mL於眼睛至耳朵之中間部位施行腦內注射（圖二，網狀區域，並應避開兩條虛線交會處）。此步驟與本署現行日本腦炎不活化試驗所注射之部位有些許不同，但經討論並不影響實驗結果。
- 2.3 觀察14日，觀察期間試驗動物不得呈現異常現象（如癱瘓、運動失調、死亡等）。



圖二、不活化試驗之腦內注射部位示意圖

（四）細胞製程日本腦炎疫苗-效價試驗研習

第二天下午至第四天下午由Ms. Koga及Ms. Nozaki解說及示範效價試驗，其流程圖如圖三。



圖三、效價試驗流程圖

1. 原理：

斑點抑制中和試驗法 (Plaque reduce neutralization test, PRNT)，為現階段日本官方載於 Minimum Requirements for Biological Products 最常使用於細胞製程日本腦炎疫苗之效價試驗方法。該方法係將日本感染症研究所 (NIID) 製造之對照標準品與待測檢體分別作連續 2 倍稀釋後，進行小鼠活體之二次免疫，再經 7 天後採血分離其抗血清，與日本腦炎病毒進行中和試驗，之後數算其所形成之病毒斑 (plaque) 數目，並以統計方法計算出疫苗檢體相對於對照標準品之相對效價。

2. 步驟：

2.1 購買 3 週齡之小白鼠，每一檢體稀釋濃度需 20 隻，飼養 1 週後進行試驗。

2.2 日本腦炎疫苗對照標準品稀釋：

利用 10 mL 無菌注射用水回溶對照標準品，並於 4°C 放置 30 分鐘，待完全回溶後取適當量以滅菌過之 PBS 稀釋 2.21 倍，作為稀釋之起始濃度。

之後以此濃度稀釋 4 倍、8 倍、16 倍、32 倍，稀釋範例如下：

Reference standard:	×4*	×8	×16	×32
Diluent:	6 mL 18 mL	12 mL 12 mL	10 mL 10 mL	6 mL 6 mL

2.3 疫苗檢體稀釋：

以滅菌過之PBS將疫苗檢體稀釋4倍、8倍、16倍、32倍，稀釋範例如下：

Sample:	×4*	×8	×16	×32
Diluent:	6 mL 18 mL	12 mL 12 mL	10 mL 10 mL	6 mL 6 mL

2.4 第一次免疫：取稀釋過之對照標準品及疫苗檢體，每隻小鼠以0.5 mL 進行腹腔注射。

2.5 第二次免疫：第一次免疫後 1 週，以相同於第一次免疫之條件再次免疫。

2.6 第二次免疫後 1 週，先利用 isoflurane 麻醉氣體將小鼠麻醉後，再對小鼠進行心臟採血，每隻小鼠採血至少 0.6 mL 各別裝入 1.5 mL 離心小管，之後放置於 4°C 使血清從血液中分層。

2.7 血清分離：

將置於4°C之離心小管取出，以3000 rpm離心15分鐘。每試驗組有20支含血清之離心小管，由20支離心小管中各別吸取等量血清至15 mL離心管中混和。於56°C水浴中作用30分鐘去活化補體後置於-20°C保存，作為與病毒進行中和試驗之用。

2.8 準備Vero細胞6孔盤：

1. 將vero細胞（ATCC CCL-81）解凍後，置於含20 mL生長培養液（配方見附錄之1）之T-75細胞培養瓶中，並於37°C/5% CO₂之培養箱中培養。
2. 當細胞長滿成monolayer後，以0.25% Trypsin-EDTA solution進行繼代培養，將細胞分至含20 mL生長培養液之T-75細胞培養瓶中培養。重複此步驟至細胞數目足夠試驗所需。
3. 取數個長滿細胞之T-75細胞培養瓶，以0.25% Trypsin-EDTA solution

處理細胞得其懸浮液，之後計算細胞數目並調整細胞密度至 3.0×10^5 cell/mL。

- 於6孔盤中每孔加入2 mL之細胞液，之後置於 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 培養箱培養隔夜，待孔內細胞密度達8-9成滿時進行後續病毒斑試驗（plaque assay）。

2.9 病毒中和試驗：

- 步驟2.7所分離之血清共有2組，第1組為疫苗檢體組（再分為4倍、8倍、16倍、32倍稀釋組），第2組為對照標準品組（再分為4倍、8倍、16倍、32倍稀釋組），將上述各組各稀釋階之血清先以稀釋劑（配方見附錄之2）稀釋10倍後再進行4倍序列稀釋至10240倍，稀釋範例如下：

	$\times 10^*$	$\times 40$	$\times 160$	$\times 640$	$\times 2560$	$\times 10240$
Immune serum	0.2mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL
Diluent	1.8mL	1.5mL	1.5mL	1.5mL	1.5mL	1.5mL

各血清組中4倍、8倍、16倍稀釋組之血清使用後續稀釋40倍到10240倍之濃度進行中和試驗。而各血清組中32倍稀釋組之血清則使用後續稀釋10倍到2560倍之濃度進行中和試驗。

- 將小鼠免疫血清標準品（由 NIID 製造，針對北京株日本腦炎病毒，抗體中和效價：3.45-3.60）先以稀釋劑稀釋 10 倍後再進行 4 倍序列稀釋至 10240 倍，稀釋範例如下：

	$\times 10^*$	$\times 40$	$\times 160$	$\times 640$	$\times 2560$	$\times 10240$
Standard serum	0.05mL	0.3mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL	0.5mL
Diluent	0.45mL	0.9mL	1.5mL	1.5mL	1.5mL	1.5mL

使用稀釋 160 倍到 10240 倍之濃度進行中和試驗。

- 根據病毒效價，將北京株日本腦炎病毒以稀釋劑稀釋至最終濃度為 200 PFU/100 μL 。
- 中和反應：

共分 3 大組，第 1 組為血清-病毒中和組（取 500 μL 之各組血清稀釋液加入至 500 μL 之日本腦炎病毒稀釋液中），第 2 組為病毒控制

組（取稀釋劑與日本腦炎病毒稀釋液等量混和），第 3 組為只有培養液之控制組，於 37°C 進行中和反應 1.5 小時，待反應時間終了，立即將各試管置於冰水浴中以終止反應。

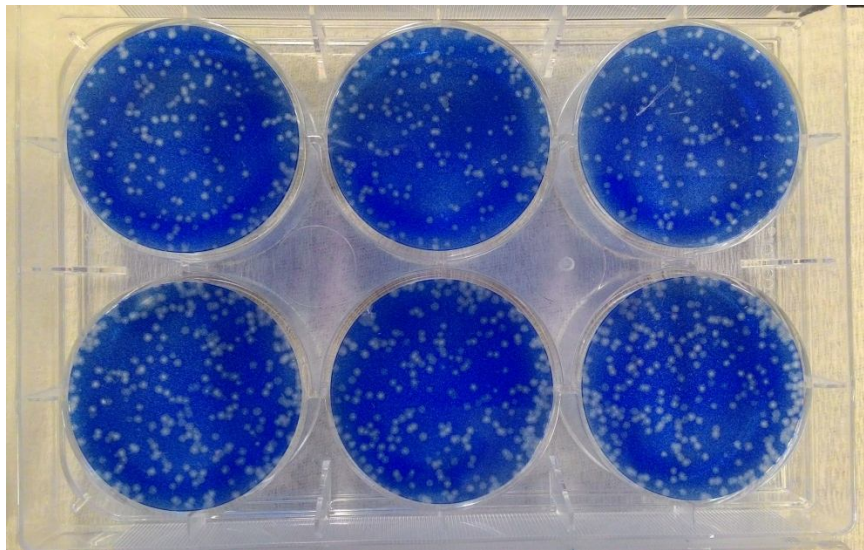
5. 病毒斑試驗：

- (1) 將步驟2.8中已準備好的Vero細胞6孔盤中之培養液吸掉，然後將上述中和反應之各組接種於6孔盤中（100 μL/well），其中血清-病毒中和組及只有培養液之控制組各接種3孔，而病毒控制組則接種12孔。
- (2) 接種完畢後，將6孔盤前後左右搖晃以使得接種液均勻蓋滿於細胞表面上，之後置於細胞培養箱中37°C作用1.5小時，以讓病毒吸附於細胞表面。
- (3) 最後每孔加入3 mL之overlay medium（配方見附錄之3、4），並置於細胞培養箱中37°C培養5天。
- (4) 5天後，每孔加入1.5 mL之福馬林溶液（10% formaldehyde），並置於室溫作用至少1個小時以固定細胞。
- (5) 固定作用結束後，先將6孔盤中之overlay medium到掉，再於注有流動自來水之水缸中清洗所殘留之overlay medium及福馬林溶液（圖四）。福馬林溶液之成分為甲醛，甲醛為毒性化學物質，對皮膚、眼睛及呼吸道有刺激性，長期吸入則會有致癌性，因此日方在進行固定作用及後續清洗時皆在配備有水槽之化學抽氣櫃中進行，以減少吸入甲醛的機會。



圖四、清洗6孔盤中殘留之overlay medium及福馬林溶液

- (6) 最後每孔加入1.5 mL之甲基藍溶液（配方見附錄之5），並置於室溫作用1個小時以進行染色。
- (7) 染色完畢後，先以自來水清洗染劑再將6孔盤倒扣晾乾，之後進行病毒斑數量計算（圖五、圖六）。



圖五、日本腦炎病毒斑型態



圖六、以菌落計數筆計算病毒斑數目

- (8) 在本署封緘檢驗案中也有利用病毒斑形成數目來計算疫苗效價的試驗，例如水痘、帶狀疱疹、黃熱病疫苗，對於此類疫苗之病毒斑計數，通常是利用細字奇異筆於病毒斑形成處作標記並同時以人工計算數目，此方法之缺點為計算過程中稍微分心即可能算錯數目，且一旦檢測數目過多，以本次研習之日本腦炎疫苗效價試驗為例，一次試驗就需要計算 150 個孔之病毒斑數目，若以此方法計數需耗費許多時間、效率欠佳。日方進行病毒斑計數是利用菌落計數筆，此設備輕巧簡便，前端為細字奇異筆，可於病毒斑形成處作標記，主體可感應奇異筆筆尖之壓力並自動計數後於顯示器中顯示（圖七）。建議本署也可採購相似功能之菌落計數筆以提升檢驗效能。



圖七、菌落計數筆

2.10 統計分析：

利用Bioassay Assist Version 3.0 (BAA) 統計軟體分析數據，首先計算

出各組50%斑點減少率（50% plaque reduction rate），再利用平行線分析法（parallel line assay）計算出疫苗檢體相對於對照標準品之相對效價（relative potency）。

2.11 試驗要符合下列規定才成立：

1. 病毒控制組：12個孔之病毒斑平均數應落於50~150的範圍內。且數據經過卡方檢定（chi-square test），其P值 >0.05 。
2. 小鼠免疫血清標準品：其效價應落於0.86~14.4的範圍內。
3. 各組數據經過ANOVA統計分析，其regression F值應有**或*，而parallelism F值應沒有**或*。
4. 進行病毒斑判讀時，細胞不能有脫落現象（detachment）。

2.12 左右效價試驗成功與否的關鍵因素：

1. 日方人員表示，準備Vero細胞6孔盤時所下的細胞密度很重要，因此他們會對稀釋後之細胞液，利用細胞計數器進行3重複的細胞數目計算，取其平均值後確認其細胞密度是否為 3.0×10^5 cell/mL。
2. 病毒控制組，其12個孔之病毒斑平均數應落於50~150的範圍內，因此在決定病毒稀釋倍數時就非常關鍵，在本次研習所示範之效價試驗中，就因為病毒控制組其病毒斑平均數超過150很多，而無法顯現出血清與病毒中和後使病毒斑減少的效應。

四、心得與建議

1. 由日方分享去年申請韓國上市許可之經驗，得知當時韓國衛生主管機關進行品質管制試驗時，遇到最大困難的項目為「效價試驗」，透過本次研習實際觀摩日本疫苗廠對細胞製程日本腦炎疫苗之品質管制試驗，尤其透過跟其資深檢驗人員討論的過程，吸收到可能左右效價試驗成功與否的關鍵因素，對於回國後進行細胞製程日本腦炎疫苗相關查驗登記及封緘檢驗有相當大的助益。
2. 日方疫苗廠因需進行大量例行性品質管制試驗，因此必須提升人員工作效能及降低危害因子暴露，在此次研習中發現，在效價試驗及不活化試驗進行時，皆是藉由兩位技術員一同分工操作使得檢驗流程更快速、順暢，並且也利用菌落計數筆計算病毒斑數目，大幅降低此步驟所需要的時間。此外，因效價試驗之固定作用需使用到大量福馬林溶液（以一次試驗需150孔，每孔加入1.5 mL之福馬林溶液計算，總共需225 mL），為避免操作人員長期吸入甲醛而發生對健康的危害，因此日方皆在配備有水槽之化學抽氣櫃中清洗6孔盤中殘留之福馬林溶液。此等作法皆對本署具高度參考價值。
3. 傳統鼠腦型日本腦炎疫苗以新型日本腦炎疫苗取代已為世界趨勢，為因應日本腦炎疫苗之轉型，本署研究檢驗組已於104年初步建立「斑點抑制中和試驗法」檢測平台，與該研究團隊討論後，發現其方法與本次赴日本研習之技術略有差異，建議經由經驗分享及實際操作示範，進行細部比較研究，以利方法之最佳化。

4. 目前在我國已申請查驗登記之新型日本腦炎疫苗有：1. Intercell biomedical之產品IXIARO，為細胞製程不活化SA14-14-2日本腦炎疫苗，並於2015年11月取得我國上市許可；2. Sanofi Pasteur之產品IMOJEV，為以黃熱病疫苗株Y17D為骨架之鑲嵌型活性減毒SA14-14-2日本腦炎疫苗；此外，Kaketsuken之產品ENCEVAC，為細胞製程不活化北京株日本腦炎疫苗，也可望來台申請查驗登記。我國已規劃細胞製程日本腦炎疫苗施打，為因應廠商封緘檢驗與查驗登記檢驗需求，建議應儘速建立本署「細胞製程不活化日本腦炎疫苗效價試驗」之標準檢驗流程（SOP）。
5. 因應各類型新興疫苗持續問世，建議持續派員赴國際疫苗製造廠或官方實驗室實際觀摩，研習最新疫苗品質管制試驗技術，以提升本署品質管制試驗技術能力並增進查驗登記及封緘檢驗業務之效率。

附錄

1. Growth medium (MEM medium containing 10 vol% FBS, pH7.35)
Prepare by adding the following reagents before use.
Eagle's MEM medium...900 mL
L-Glutamine... 10 mL
7% NaHCO₃...15.7 mL
Inactivated FBS... 100 mL
Amphotericin B or Fungizone...2 mL
P.S...1 mL
2. Dilution medium (MEM medium containing 2 vol% FBS, pH7.35)
Prepare by adding the following reagents before use.
Eagle's MEM medium...1000 mL
L-Glutamine... 10 mL
7% NaHCO₃...15.2 mL
Inactivated FBS...20 mL
Amphotericin B or Fungizone...2 mL
P.S...1 mL
3. Methylcellulose medium
{When preparing 1 L}
A) Eagle's MEM medium "Nissui" [1]...9.4g
B) Methylcellulose (Wako practical grade Methyl Cellulose 4000cP)...13 g
(Put in a 1000-mL bottle with a stirring bar)
Purified water... 1000 mL
4. Overlay medium (2 vol% FBS-Eagle's MEM-1.3% methylcellulose medium)
Prepare by adding the following reagents and stirring before use.
Methylcellulose medium...1000 mL
L-Glutamine... 10 mL
7% NaHCO₃...31.5 mL
Inactivated FBS...20 mL
Amphotericin B or Fungizone...2 mL
P.S...1 mL
5. Staining solution (30× concentrated methylene blue solution)
{When preparing 200 mL: methylene blue bulk material}
Methylene blue (Wako, for vital staining MethyleneBlue Tetrahydrate)...2.25 g
Sterilized water...200 mL
1N NaOH...0. 375mL