

出國報告（出國類別：研究）

赴日本國立感染症研究所研習「新型
日本腦炎疫苗品質管理及檢驗技術」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：陳瓏元技正、侯郁琦技士

派赴國家：日本

出國期間：中華民國 105 年 6 月 26 日至 7 月 9 日

報告日期：中華民國 105 年 9 月 30 日

摘 要

隨著生物技術進步，各藥廠不斷研發新型疫苗以控制新興疾病或改善既有藥品的效能，日本腦炎疫苗為 1950 年問世之傳統疫苗，目前也跟隨生物技術之腳步進行轉型，我國將預定於 2017 年開始引進新興細胞製程日本腦炎疫苗取代傳統以鼠腦產製之疫苗。由於疫苗屬高風險生物藥品，依據我國藥品現行法規，國內所有上市使用之疫苗均須依據藥事法第 39 條申請查驗登記，經審查及檢驗合格後方可取得製造或輸入許可，且依同法第 74 條規定，製造或輸入之疫苗須逐批辦理檢驗封緘，食品藥物管理署(以下簡稱食藥署)即負責我國藥品之品質管理。因應查驗登記檢驗及封緘檢驗業務需求，亟須收集該類新興疫苗檢驗資訊，並與國際間相關機構建立溝通聯繫管道，故規劃本次赴日本國立感染症研究所研習新型日本腦炎疫苗品質管理及檢驗技術，以應用於後續業務推動。

本次出國研習已習得新型日本腦炎疫苗之不活化試驗及斑點抑制試驗(Plaque reduction neutralization test, PRNT)等與疫苗品質相關之關鍵檢驗技術，同時與日本國立感染症研究所所長、病毒第 1 部部長、品質保證暨管理部部長及檢驗與品保部門相關之政府官員密切接觸，並建立交流及聯繫管道，將有助於本署檢驗技術之國際化，增進與國際相關機關間之合作關係。

目次

壹、	前言與目的.....	4
貳、	行程及工作紀要.....	6
參、	研習內容.....	10
	(一)國立感染症研究所.....	10
	(二) NIID 於日本生物製品品質管理扮演之角色及流程.....	16
	(三) 日本腦炎在日本.....	19
	(四) 新型細胞型日本腦炎疫苗之國家檢定研習.....	22
肆、	心得與建議.....	42
	(一) 研習心得.....	42
	(二) 建議.....	43

壹、前言與目的

日本腦炎在我國為第三類法定傳染病，該疾病係由日本腦炎病毒引起之急性傳染病，感染途徑經由三斑家蚊等病媒蚊叮咬傳播予人類，主要流行區域自東北亞日韓延伸至東南亞諸國，臺灣亦列於其中，主要流行季節為每年 5 至 10 月，日本腦炎患者大部分無嚴重症狀，惟有少部分患者出現頭痛、發燒或無菌性腦膜炎等症狀，嚴重者產生神經性後遺症，甚至死亡。該疾病目前無特殊治療藥物，只能針對患者症狀進行支持性療法，故以預防甚於治療之觀點，最好預防方式即施打日本腦炎疫苗。

疫苗類藥品係依據微生物學及免疫學學理製造之生物藥品，該類藥品因製造方式及成分與一般藥物不同，且具有批次差異之特性，故一般被視為高風險藥品，世界衛生組織於此類藥品之管理指引中建議各國國家主管機關應有逐批放行之機制，確保藥品使用安全。於我國，疫苗等生物藥品須依據藥事法第 39 條規定申請查驗登記，查驗登記程序除審查品質與技術文件外，尚須依據藥典及廠規進行藥品檢驗，經審查及檢驗均合格後，方可取得藥物許可證，爾後每批製造或進口之疫苗仍須依據藥事法第 74 條及「生物藥品檢驗封緘作業辦法」規定申請檢驗封緘，經食藥署抽樣、檢驗及審查品質文件皆符合規定後，核發封緘證明書並同時於合格藥品外包裝開口處貼上藥物檢查證後方可放行上市，上述生物藥品封緘檢驗程序即為我國藥物主管機關確保民眾用藥安全之批次放程序。

由於我國為日本腦炎之流行區，日本腦炎疫苗列為我國嬰幼兒公費疫苗之範疇，現行日本腦炎疫苗為鼠腦型(mouse-brain, 以下簡稱 MB)疫苗，該疫苗於 1958 年研發後，1960 年起始於日本使用，並有效控制其國內日本腦炎之流行，該疫苗使用至今雖能預防疾病之傳播，惟仍存有待解決之問題，如傳統 MB 製程之疫苗須將疫苗株於實驗鼠體內增殖，依據現行 3R 觀點，有動物福祉問題，且部分文獻指出 MB 製程之疫苗易有過敏等副作用，亦可能與部分疫苗接種後產生之急性瀰漫性腦脊髓炎(acute dissemination encephalomyelitis, ADEM)有關。

另，目前 MB 製程之疫苗須施打 4 劑才得以產生足夠保護力價，隨著生物技術進步，疫苗製造廠逐漸研發新型疫苗以取代傳統 MB 製程之日本腦炎疫苗。新型日本腦炎疫苗之疫苗株以細胞培養方式增殖，疫苗株型別亦由傳統之中山株 (Nakayama strain) 變更為北京 1 型(Beijing-1) 或 SA14-14-2，此外，疫苗類型除傳統病毒株不活化(inactive)疫苗，亦有藥廠研製基因重組活性減毒疫苗，且接種劑量亦由原本 4 次減少為 2 次(不活化疫苗)或 1 次(活性減毒疫苗)。由於新型細胞製程疫苗之效能較傳統 MB 製程佳，各國陸續轉換新型細胞製程疫苗，甚至國際間第一個生產日本腦炎疫苗之疫苗廠「阪大微生物病研究会(BIKEN)」亦宣布於 2006 年起停止生產 MB 製程疫苗，轉換投入新型細胞型疫苗之生產。我國嬰幼兒預防接種亦將於明年開始導入新型細胞型日本腦炎疫苗。

因應前述新型日本腦炎疫苗導入之需求，為加速本署對新型細胞型日本腦炎疫苗檢驗技術與能力之建立及了解其他國家對於此類新型疫苗之管理程序，並建立與其他國家實驗室間之聯繫合作管道，考量日本為日本腦炎病毒首次分離之國家，且該國在日本腦炎疫苗之發展在國際間均佔有一席之地，故規劃本次赴日本研習計畫，研習單位 - 日本國立感染症研究所(Nation Institution of Infection Disease, NIID)為日本官方負責日本腦炎疾病診斷、日本腦炎疫苗檢定、檢驗用標準品建立及新興檢驗方法開發之國家參考實驗室(National Reference Laboratory)，另外該研究所亦為世界衛生組織指定之日本腦炎國際特定實驗室(Global Specialized Laboratory)。期許藉由本次研習，取得日本官方對於新型細胞型日本腦炎疫苗之品質管理經驗及研究結果，應用於本署對新型細胞型日本腦炎疫苗之查驗登記檢驗及封緘檢驗，並優化現行日本腦炎疫苗檢驗平台，期許藉由本此研習，建立與該國國家實驗室間之聯繫與溝通管道，以利後續持續取得國際間日本腦炎相關最新資訊。

貳、行程及工作紀要

日期	行程及工作紀要
105年06月26日 星期日	啟程(台北→東京→新宿)
105年06月27日 星期一	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區) 2. 會晤品質保證暨管理部加藤部長(Dr. Kato)就雙方疫苗檢驗放行及管理機制進行討論 3. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術 <ul style="list-style-type: none"> ◆ NIID 環境介紹(含實驗動物中心及病毒第 1 部實驗室) ◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(Plaque reduction neutralization test, PRNT) <ul style="list-style-type: none"> - Vero 細胞培養及計數 - 試驗用培養基配製
105年06月28日 星期二	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區) 2. 病毒第 1 部第 2 室田島主任研究官(Dr. Tajima)講述 Japanese encephalitis in Japan 3. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT) <ul style="list-style-type: none"> - 免疫用日本腦炎疫苗(測試檢品)組血清、對照日本腦炎疫苗組血清及標準血清之稀釋配製 - 日本腦炎病毒之稀釋配製 - Vero 細胞日本腦炎病毒中和試驗
105年06月29日 星期三	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區) 2. 參與病毒第 1 部例行實驗室討論會(Lab meeting) 3. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術

	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT) <ul style="list-style-type: none"> - 免疫用日本腦炎疫苗(測試檢品)及對照日本腦炎疫苗回溶 - PRNT 試驗用培養基及試劑(overlay medium、病毒去活化用甲醛等)配製
105年06月30日 星期四	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區) 2. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT) <ul style="list-style-type: none"> - 免疫用日本腦炎疫苗(測試檢品)及對照日本腦炎疫苗之稀釋配製 - 動物免疫(第1次免疫) ◆ 研習新型日本腦炎疫苗之不活化測定試驗(inactivation test) <ul style="list-style-type: none"> - 日本腦炎疫苗腦內接種
105年07月01日 星期五	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 村山廳舍(東京都武藏村山市) <ul style="list-style-type: none"> ◆ 研習日本人用疫苗國家檢定程序及品質系統 <ul style="list-style-type: none"> - NIID 品質保證暨管理部第2室部藤田主任研究官(Dr. Fujita)講述日本生物藥品品質管理體系 - NIID 品質保證暨管理部第2室落合室長(Dr. Ochiai)講述NIID 自行研發之生物統計分析軟體 ◆ 參訪生物安全第四等級實驗室(Biosafety Laboratory level 4)
105年07月03日 星期日	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區) 2. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術 <ul style="list-style-type: none"> ◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT) <ul style="list-style-type: none"> - 病毒去活化及固定
105年07月04日	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區)

<p>星期一</p>	<p>2. 參與病毒第 1 部例行實驗室討論會(Lab meeting)</p> <p>3. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術</p> <p>(1)研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 染色 - Plaque 計數
<p>105年07月05日 星期二</p>	<p>1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區)</p> <p>2. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術</p> <p>◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 免疫用日本腦炎疫苗(測試檢品)組血清、對照日本腦炎疫苗組血清及標準血清之稀釋配製 - 日本腦炎病毒稀釋配製 - Vero 細胞日本腦炎病毒中和試驗 <p>3. 會晤神奈川縣衛生研究所高崎所長(Dr. Takasaki) (前 NIID 病毒第 1 部第 2 室室長)</p>
<p>105年07月06日 星期三</p>	<p>1. 地點:NIID 戶山廳舍(東京都新宿區)</p> <p>2. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術</p> <p>◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 免疫用日本腦炎疫苗(測試檢品)及對照日本腦炎疫苗回溶 - PRNT 結果統計分析(效價計算)
<p>105年07月07日 星期四</p>	<p>1. 研習新型日本腦炎疫苗品質管理檢驗技術</p> <p>◆ 研習新型日本腦炎疫苗之效價測定模式(PRNT)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 免疫用日本腦炎疫苗(測試檢品)及對照日本腦炎疫苗之稀釋配製 - 動物免疫(第 2 次免疫)

	- 心臟採血及血清處理
105年07月08日 星期五	1. 會晤 NIID 倉根一郎所長 2. 總結討論會
105年07月09日 星期六	返程(東京→台北)

參、研習內容

(一)國立感染症研究所

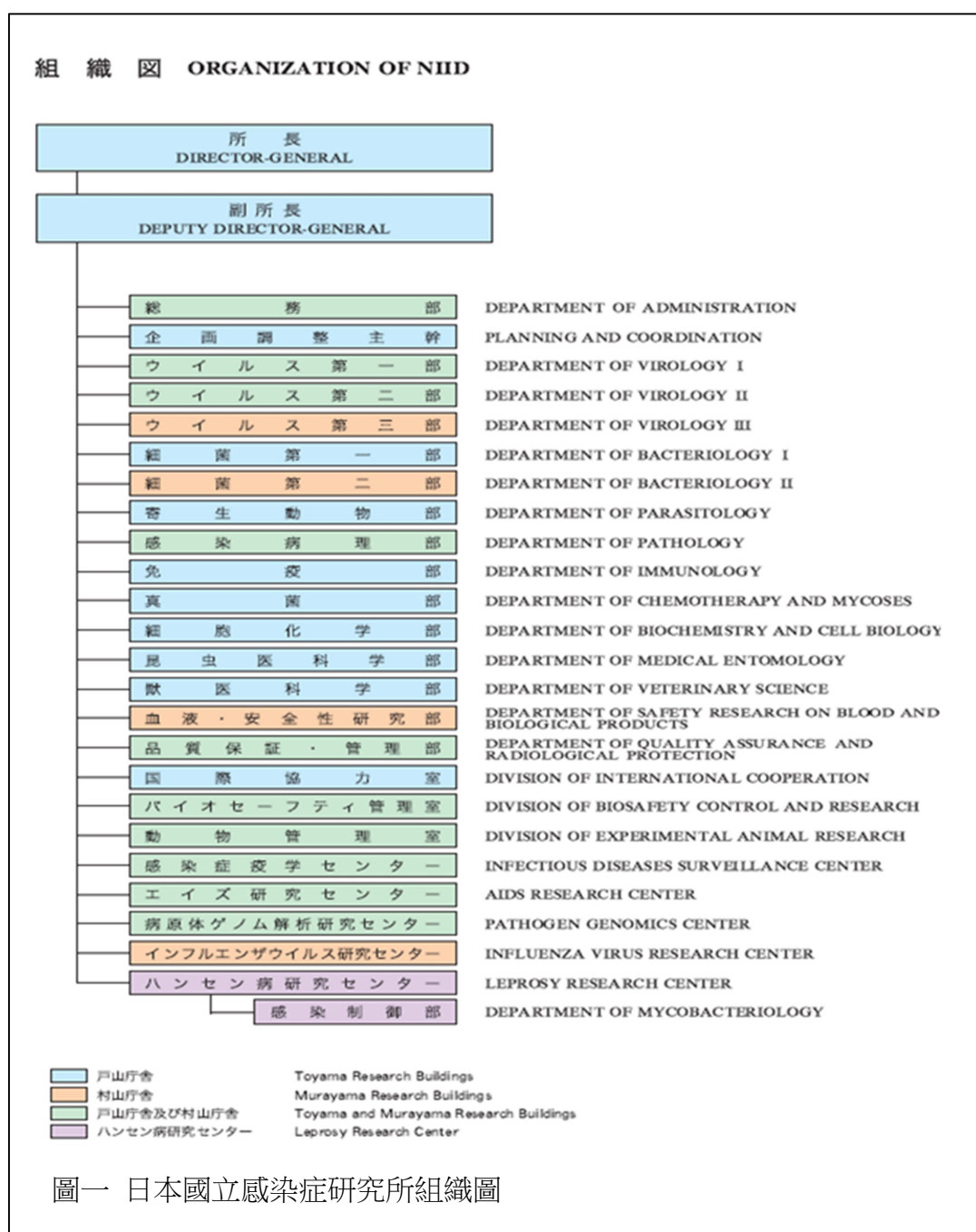
本次研習單位國立感染症研究所(National Institute of Infection Disease, 以下簡稱 NIID)為日本厚生勞動省(Ministry of Health, Labor, and Welfare, 以下簡稱 MHLW)附屬之研究機構，二次大戰結束後日本政府為解決人民生活環境髒亂且結核病、下痢、傷寒、日本腦炎及寄生蟲等感染性疾病橫行之問題，於 1947 年成立國立預防醫學研究所(National Institute of Health, NIH)，該研究所即為 NIID 之前身，NIH 成立之初僅具備檢驗部、檢定部及試驗製造部等 3 個部門，並以東京帝國大學部分校舍為辦公場所，進行傳染病之檢驗與研究，於 1950 年配合研究領域擴大，組織變更為具備細菌、病毒、立克次體、結核桿菌、血清免疫及抗生素等 12 個研究部門，同時也將辦公廳舍搬遷到位於東京都品川區的舊海軍基地，1961 年因應小兒麻痺大流行之疾病檢驗及疫苗檢定需求，於武藏村山市設立村山分室，而品川廳舍亦於 1992 年搬遷至東京都新宿區戶山研究廳舍。1997 年 1 月另於多摩市成立多摩研究所並設置漢生病研究中心，同年 4 月更改組織名稱為國立感染症研究所，研究所主要行政單位設置於戶山廳舍(Toyama research buildings)，高階防護生物安全實驗室及主要之研究與品保部門則位於村山廳舍(Murayama research buildings)。國立感染症研究所主要的任務包含以下項目：

- (1) 傳染病之基礎與應用研究：針對新興傳染病之傳播及免疫機制進行基礎研究，並研發新興檢驗方法(如快速診斷試劑)及治療或預防用疫苗。
- (2) 傳染病之檢驗服務：提供傳染病檢驗相關服務，如病原體之保存與分讓、傳染病之診斷、檢驗方法之標準化及檢驗技術之教學等。
- (3) 傳染病之監測業務：收集、監測及分析傳染病流行概況，提供衛生主管機關進行相關防疫作為。
- (4) 感染症預防或治療藥物之國家檢定及標準品製備：生物藥品(包含疫苗、血液製劑)及抗生素之批次檢驗放行及檢驗用標準品之製

備。

(5) 感染症相關國際合作。

國立感染症研究所目前設置有病毒、細菌、黴菌、寄生蟲、病理學、免疫學、血液安全等 14 個研究部門；傳染病監測、愛滋病研究、流感病毒研究、漢生病研究及基因體研究等 5 個中心及實驗動物管理、生物安全管理、國際合作等 5 個支援單位，詳細組織架構如圖一所示。



圖一 日本國立感染症研究所組織圖

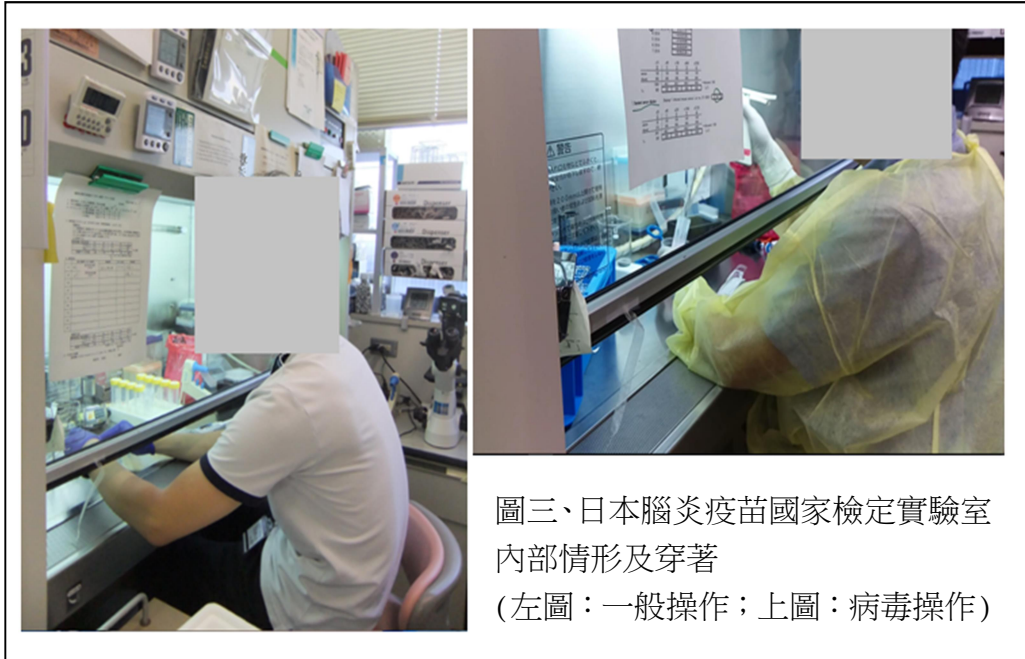
本次研習課程由病毒第 1 部負責，其分為 5 個實驗室，第 1 室負責外源出血性病毒(如伊波拉病毒、馬堡病毒等)之研究與檢驗；第 2 室負責節肢動物媒介病毒(如登革熱病毒、日本腦炎病毒、茲卡病毒等)之研究與檢驗；第 3 室負責神經性病毒(如狂犬病)之研究與檢驗；第 4 室負責疱疹病毒之研究與檢驗；第 5 室則負責立克次體及衣原體之研究與檢驗。因本次研習課程主要針對日本腦炎疫苗之國家檢定(日本稱疫苗批次放行-lot release 為國家檢定)，故由病毒第 1 部第 2 室(以下簡稱 Arboviruses laboratory, ABL)田島茂(Dr. Tajima)主任研究官及相關同仁協助指導。

ABL 為日本節肢動物媒介病毒疾病之國家實驗室，亦為世界衛生組織(World Health Organization, WHO)指定之日本腦炎國際特定實驗室(Global Specialized Laboratory)，其業務為日本腦炎病毒、登革熱病毒、西尼羅病毒、屈公病毒、黃熱病毒及茲卡病毒之診斷、調查、檢驗方法開發、標準品建立及日本腦炎疫苗與黃熱病疫苗之國家檢定。於人員編制方面，ABL 現行編制室長 1 名、主任研究官 2 名及研究員 3 名共 6 名正式人力，另有 4 名臨時人員協助業務執行，前室長為高崎智彥博士(Dr. Takasaki)，因 Dr. Takasaki 於今年 4 月份調陞神奈川縣衛生研究所所長，目前由 Dr. Tajima 主任研究官暫代室長。本署曾於 101 年舉辦日本腦炎疫苗研習會，並邀請 Dr. Takasaki 擔任講座，研習期間適逢其因公返回實驗室，故把握機會與其寒暄並互換名片，以持續維持與 Dr. Takasaki 間之聯繫管道。

ABL 在戶山廳舍及村山廳舍均設有辦公室及實驗室，又以戶山廳舍為主要辦公及檢驗研究場所，病毒第 1 部(含 ABL)辦公室位於研究實驗棟(圖二紅色標示處)地下 1 樓，實驗室則位於地下 1 樓及地下 2 樓，地下 1 樓實驗室主要提供病毒第 1 部研究用，因內部存放有放射性物質，本次研習並未進入參觀，而地下 2 樓實驗室為病毒第 1 部共同實驗室，其為開放式設計，以實驗桌區分不同室別。ABL 於該實驗室所屬空間中設置有 ELISA reader、DNA 定序儀及電泳照膠系統等設備，用於執行 ELISA 及分子診斷等試驗。疫苗國家檢定部分則於研究實驗棟地下 1 樓生物安全第 2 等級實驗室(Biosafety Laboratory level 2, BSL-2)進行，BSL-2 實驗室入口處設有門禁管制，刷卡後方可進入其前室，前室內設有冷凍冷藏設備、高溫高壓滅菌機、烘箱及置物架等，供存放實驗所需檢體耗材及實驗廢棄物滅菌

使用，人員須於前室更換實驗室專用拖鞋。BSL-2 內設置有 2 個獨立區隔之實驗區，其中一區進行水痘疫苗國家檢定(病毒第 1 部第 4 室業務)，另一區則為日本腦炎疫苗國家檢定專用，亦為本次主要之研習場所，2 個實驗區具有隔間牆及門實體區隔，故不易產生相互汙染。BSL-2 內操作一般實驗(如配置培養基、洗盤、染色或斑點計數)及細胞實驗時僅須配戴手套，無須更換實驗衣，惟操作病毒材料時須穿套正面無開口之拋棄式手術衣(BSL-2 穿著詳如圖三)，日本腦炎疫苗國家檢定實驗室內設置有生物安全操作櫃(Biosafety Cabinet, BSC)及細胞培養用二氧化碳培養箱各 2 台，該實驗室內主要進行日本腦炎疫苗斑點抑制測試法(Plaque reduction neutralization test, PRNT)效價測試、不活化試驗檢品稀釋及日本腦炎疾病診斷。動物試驗部分則於戶山廳舍研究實驗棟地下 2 樓後側(圖二綠色標示處)實驗動物中心內進行。





本次研習期間除在戶山廳舍進行日本腦炎疫苗檢定方法研習，亦規劃其中 1 日赴村山廳舍拜會品質保證暨管理部，並由該品保部落合雅樹室長 (Dr. Ochiai) 及藤田賢太郎主任研究員 (Dr. Tsujida) 介紹 NIID 執行生物藥品品質管控之業務流程及生物性試驗之統計分析軟體。於村山廳舍研習當日，另由 ABL 谷口伶研究員 (Dr. Taniguchi) 引導參訪 NIID 的生物安全第四等級實驗室 (Biosafety Laboratory Level 4, BSL-4)，由於 NIID 從事有高危險性伊波拉病毒、馬堡病毒、流行性感冒病毒之檢驗與研究，故於村山廳舍設置 BSL-4 實驗室，該實驗室於 1981 年以 Box-in-Box 規格建置，為目前日本設計等級最高之生物安全實驗室，惟因附近居民反對，啟用後均僅以 Biosafety Laboratory Level 3 規模運作，2013 至 2015 年間非洲地區爆發大規模伊波拉疫情，因應防疫需求，日本政府亦針對是否應啟用 BSL-4 實驗室與地方政府討論重啟議題，2015 年 8 月經武藏村山市政府協議下，厚生勞動省終於宣布正式啟用該國第一個 BSL-4 實驗室，然由於附近住戶持續反對，NIID 仍持續進行溝通，並定期舉辦實驗室開放活動及說明會，建立與居民間之溝通管道，使民眾安心。

NIID 之 BSL-4 坐落於一棟 2 層樓高之獨立房舍，位於村山廳舍中央，四周環繞各研究大樓，其為村山廳舍最低的房舍，由外部無法直接窺視，實驗室內設置管理控制室、前室 (buffer room)、負壓走道及 3 個實驗區，

參訪人員可於控制室攝影系統或經前室換穿實驗衣後，於負壓走道透過景觀窗觀察實驗區內部情形，實驗區內以手套隔離箱(isolator)隔離試驗物質及操作者，故人員無須配戴 Powered Air-Purifying Respirators(PAPR)等主動呼吸防護用具，操作人員離開實驗室前須於盥洗室淋浴及換裝。BSL-4 實驗室中除操作感染性生物材料外，亦可進行動物實驗，若以我國實驗室等級區分應屬動物生物安全第四等級實驗室(Animal Biosafety Laboratory Level 4, ABSL-4)，操作動物種類除齧齒類動物及實驗用兔外，亦包含實驗猴等靈長類動物，由於該實驗室內不可拍照無法留存照片記錄，經由網站上搜尋到日方所釋出之手套箱照片(圖四)可了解其內部狀況。



圖四、NIID 之 BSL-4 之手套箱系統(圖片來源 <http://www.japanbullet.com>)

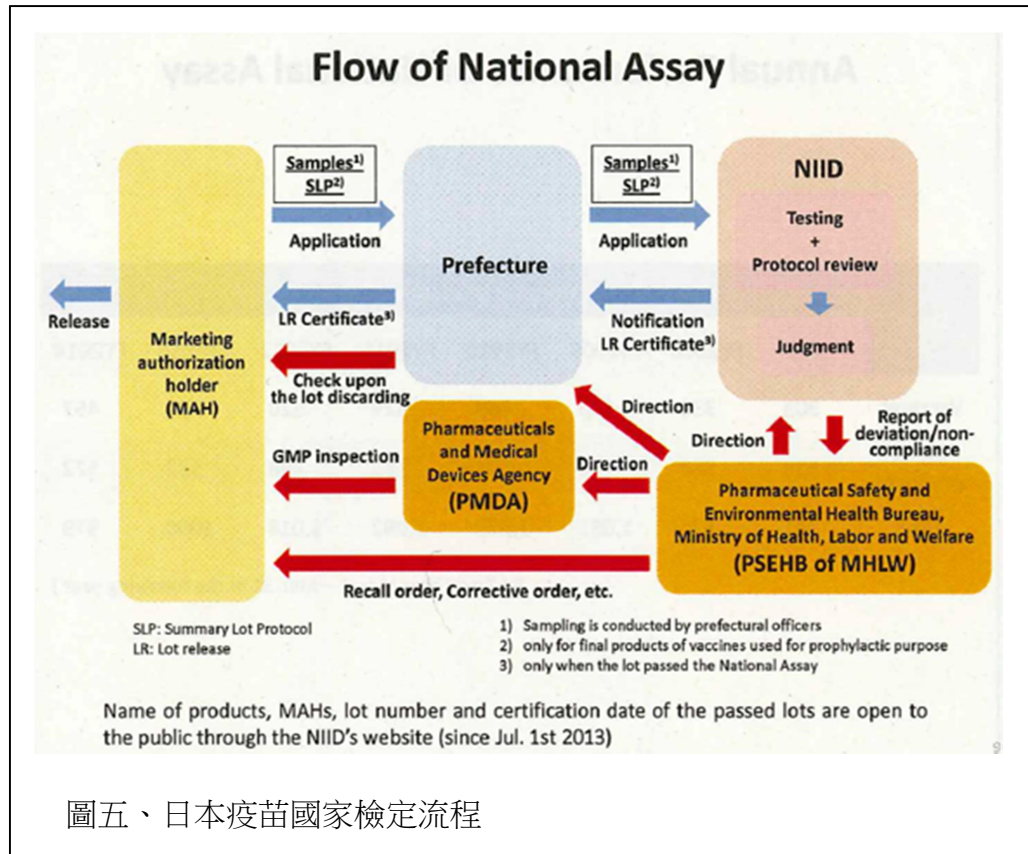
(二) NIID 於日本生物製品品質管理扮演之角色及流程

厚生勞動省(MHLW)為日本藥政管理之最高主管機關，其設有國立感染症研究所(NIID)、國立醫藥品食品衛生研究所(National Institute of Health Sciences, NIHS)及 2 個藥物管理相關之國家實驗室(National Control Laboratory, NCL)，其中 NIHS 負責西藥(drugs)、中草藥(herbal drugs)、新興生技藥品(biotherapeutics)、再生醫學(regenerative medicine)及醫療器材(medical device)之品質管理，而 NIID 則負責生物學相關藥品之管理，內容包含疫苗(vaccine)、抗毒素(antitoxin)、血液製劑(blood product)、干擾素類藥品(interferon)、抗生素(antibody)及血型鑑別用抗體(antibody for blood typing)等，干擾素類藥品(interferon)、抗生素(antibody)及血型鑑別用抗體(antibody for blood typing)之管理以後市場抽樣檢驗為主，其餘生物學相關藥品則需逐批進行國家檢定，NIID 亦協助地方衛生局針對醫院血庫之輸血用血品進行品質檢驗，並協助聯合國兒童基金會(The United Nations Children's Fund, UNICEF)檢驗其所購置之卡介苗疫苗。除檢驗業務外，NIID 亦負責檢驗用標準品之製備與供應，並於藥物查驗登記審查、製造廠 GMP 訪查及生物性藥物檢驗基準(Minimum Requirements for Biological Products, MRBP)編纂時提供科學及技術性支援。

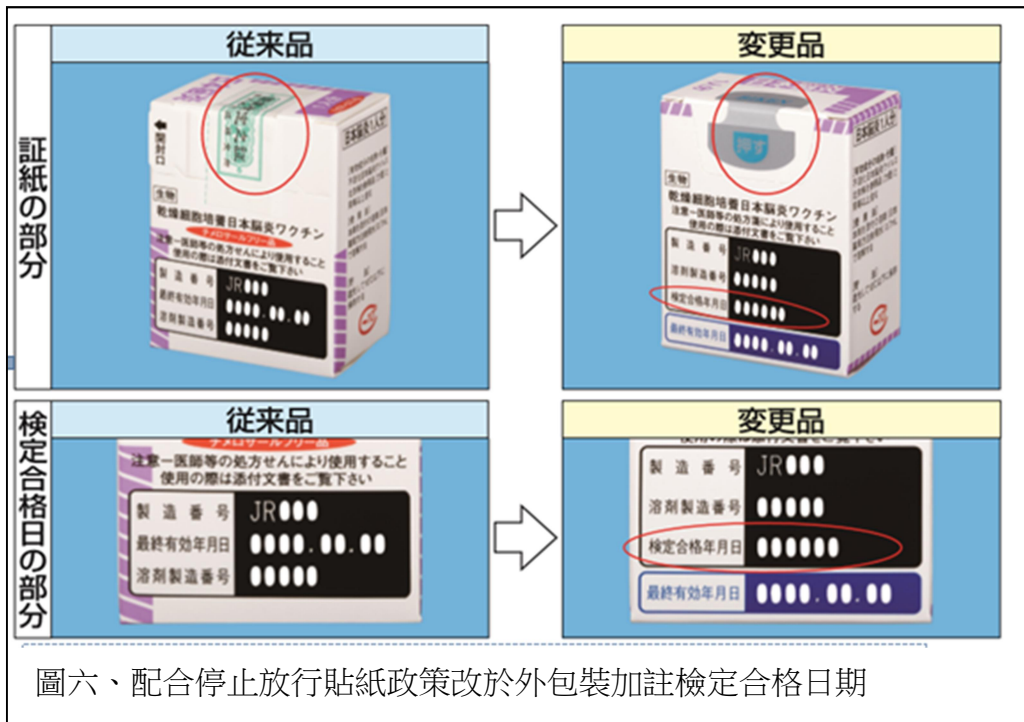
針對醫藥品及醫療器材日本政府訂有檢驗放行之國家檢定程序，依據該國「醫藥品及醫療器材之品質、有效性及安全性確保相關法律」第 43 條第 1 項規定，厚生勞動省指定之醫藥品或再生醫療相關製品應接受厚生勞動省檢驗及放行，如該類藥品未經檢驗合格，禁止販賣、贈與或從事以販賣及贈與為目的之儲藏與陳列，但厚生勞動省另以其他命令規定之醫藥品，則不受本法規範。有關醫藥品及醫療器材檢驗詳細之實施規則另以行政命令方式訂定，可參照該國「醫藥品及醫療器材之品質、有效性及安全性確保相關法律施行命令」第 58-62 條及「醫藥品及醫療器材之品質、有效性及安全性確保相關法律施行規則」第 6 章相關條文辦理。上述法律或規定亦為 NIID 執行生物學相關之製劑(疫苗、抗毒素及血液製劑)國家檢定之法源依據，原則上所有於該國國內販售之生物學相關藥品均應辦理國家檢定，

並依據 MRBP 規定之檢驗項目進行檢驗。

生物學相關藥品在日本之國家檢定流程由製造廠或藥商向所在地之地方衛生主管單位提出申請後啟動，地方衛生單位收到申請書後，由藥事監視員赴藥商所在地抽樣並封存剩餘藥品，完成抽樣程序後，由地方衛生單位將該批次產品之檢定申請及製程摘要(summary lot protocol, SLP)等相關資料連同抽樣檢品寄送至 NIID 辦理審查及檢驗，經 NIID 審查及檢定後，將檢驗結果通知地方衛生單位，合格產品再由地方衛生單位發放放行證明並拆卸封條，完成批次放行程序，詳細流程如圖五。另外，日本國家檢定原僅依 MRBP 規定項目執行檢驗，製程摘要(SLP)之審查係從 2012 年開始導入之程序，以確保批次放行更加完備。日本自 2014 年 6 月起已廢止於放行藥品上加貼封條之流程，改由要求製造廠或藥商於收到放行證明後，於外包裝上加印檢定合格日期(圖六)。依 NIID 統計，每年受理國家檢定案件約 900-1100 件，近 3 年平均為 999 件，於國家檢定業務中，疫苗及血液製劑約各佔一半，然疫苗之檢定批數於 2011 至 2012 年達高峰後，近年略有下降趨勢，血液製劑部分則維持約 500 件(圖七)。



圖五、日本疫苗國家檢定流程



Annual Performance of National Assav

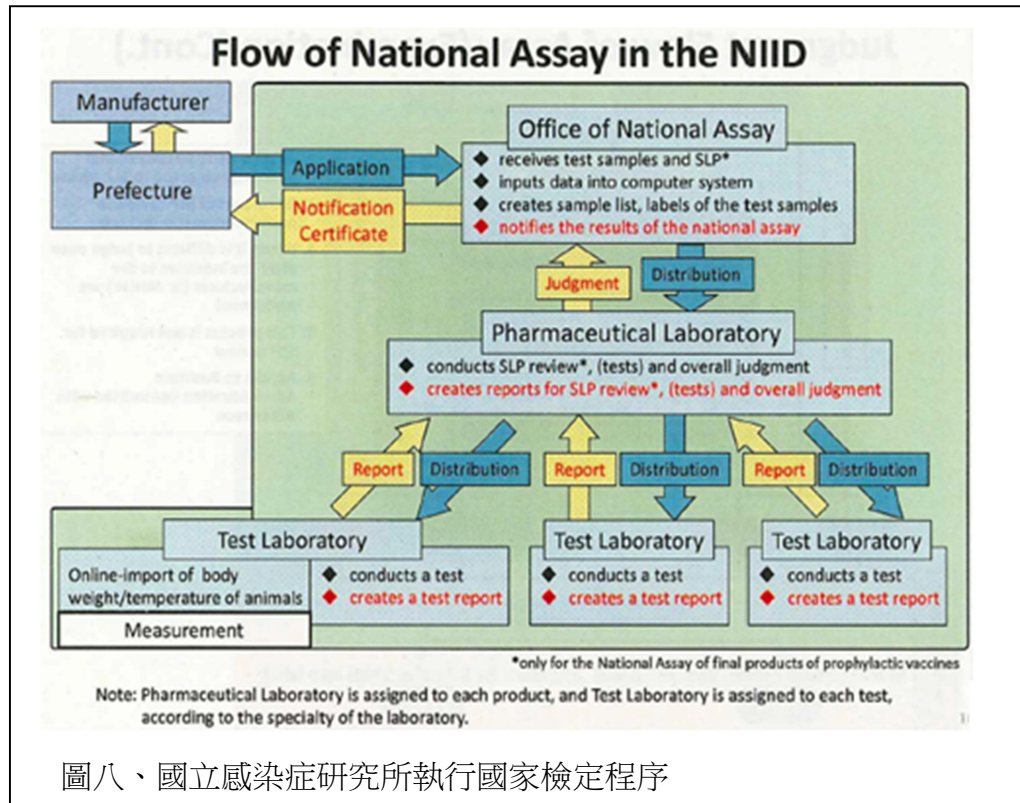
Drugs	Number of samples (lots)							
	FY2007	FY2008	FY2009	FY2010	FY2011	FY2012	FY2013	FY2014
Vaccines	303	338	500	448	529	520	468	457
Blood products	538	538	581	574	563	498	532	522
Total	841	876	1,081	1,022	1,092	1,018	1000	979

FY: Fiscal Year (Apr. 1 – Mar. 31 of the following year)

圖七、2007 至 2014 年日本國家檢定批次量

日本現今領有許可證之疫苗共計 33 類，各類疫苗依 MRBP 規定之檢驗項目進行檢驗，檢驗項目主要針對安全性(如異常毒性試驗)及效價測試。NIID 視各實驗室主管業務，分派各生物學相關藥品國家檢定之主辦實驗室，以日本腦炎為例，病毒第 1 部 ABL 即為主管實驗室(Pharmaceutical Lab)，主管實驗室之任務為收案、審查、檢驗及結果判定，檢驗部分原則由主管實驗室進行，如有共通項目則轉分給其他實驗室協助，以日本腦炎疫苗為例，該疫苗應進行蛋白質含量測定、不活化試驗、效價試驗及異常毒性試驗等 4 個檢驗項目，ABL 僅負責不活化試驗及效價試驗，而蛋白質含量測定及異常毒性試驗則由血液及安全研究部負責，所有實驗結果再由 ABL 負責

整併並判定實驗合格與否，最後交由總務部發行國家檢定結果文件(圖八)。

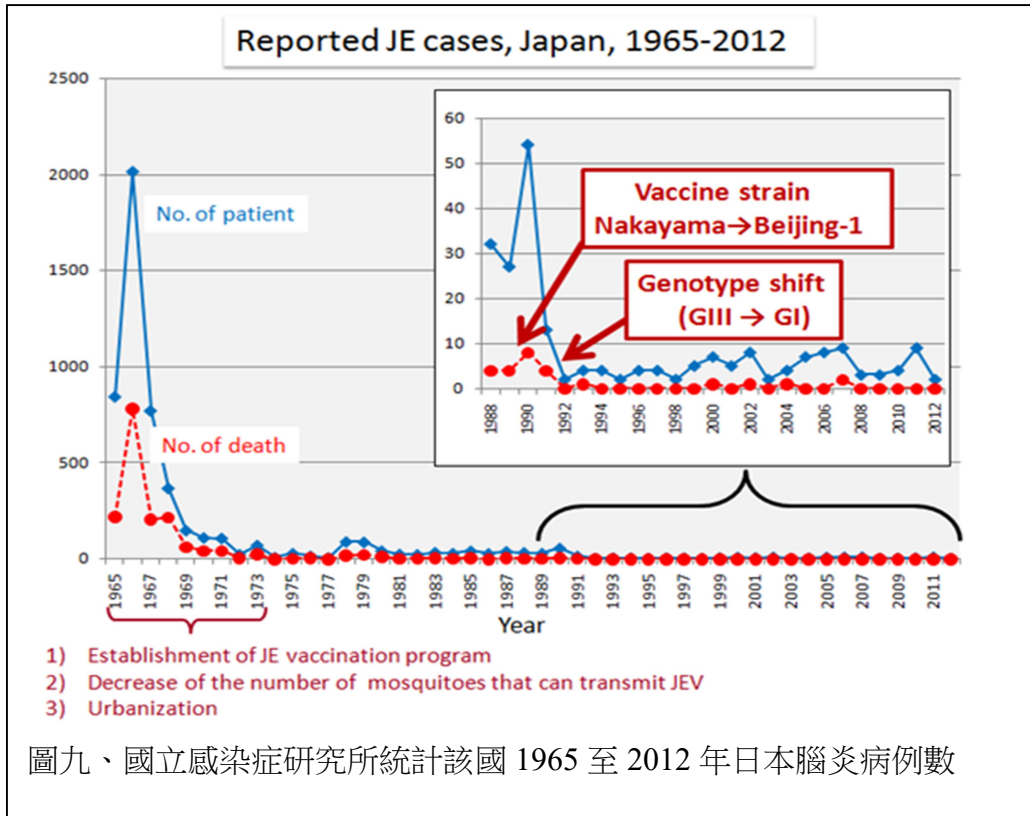


圖八、國立感染症研究所執行國家檢定程序

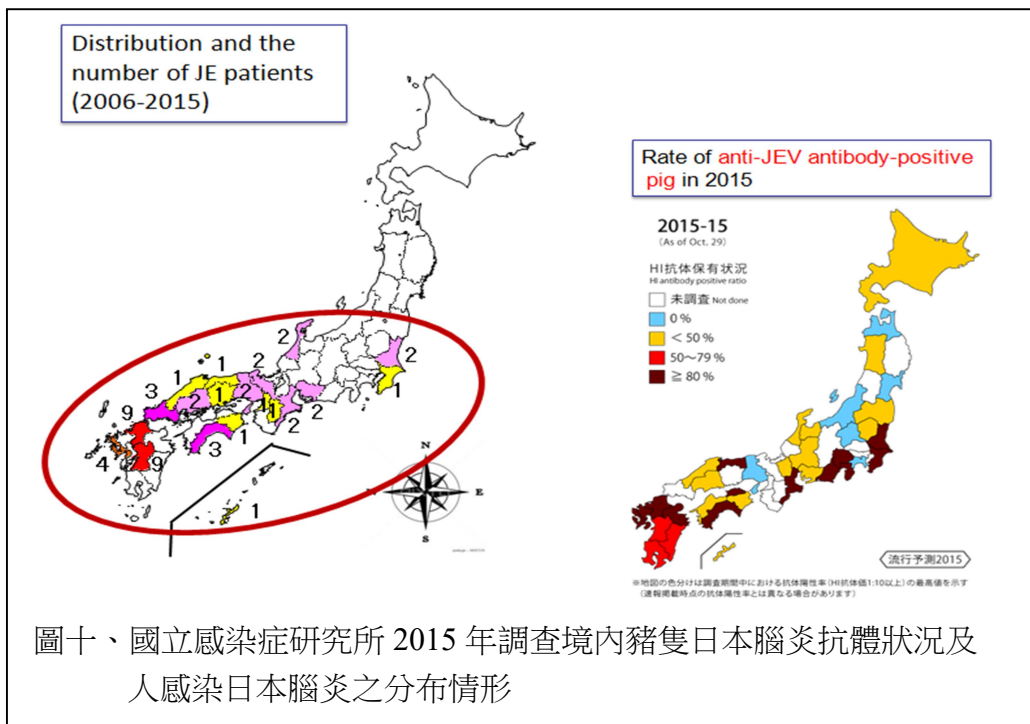
(三) 日本腦炎在日本

西元 1924 年日本爆發無菌性腦炎大流行，直至 10 年後(1934 年)才於日本被分離並鑑別出致病原，該致病原係黃病毒屬之病毒，因分離地在日本且與無菌性腦膜炎相關，故稱為日本腦炎病毒。日本腦炎預防疫苗於 1950 年完成研發，並於 1956 年日本實施全面接種以控制疫情。據 NIID 統計，因導入疫苗接種政策、病媒蚊控制及都市化等因素，日本腦炎病歷數近年已有顯著下降，惟每年於日本仍持續有零星個案(圖九)，統計 2006 至 2015 年 10 年間日本共有 51 人感染日本腦炎，其中 4 人不幸死亡，多數感染者為未接種疫苗且居住於農村或鄉間之年長者。ABL 因負責日本腦炎的疾病監控，除持續監測人類病例數，亦考量日本腦炎之傳播須存在豬等中間宿主，故對於可能帶有日本腦炎病毒之動物一併持續進行監測。近年監測結果發現，日本西南部豬群中大約 50%曾遭受感染並帶有日本腦炎抗體(圖十)，顯示該區域日本腦炎感染風險極高，其結果與人類病患多位於該國西南部之

狀況吻合，反觀東北部豬群帶有日本腦炎抗體少於 50%，甚至部分地區未檢驗出抗體，對比該區域近 10 年均未曾有人感染的病例報告，顯見若減少中間宿主之帶原率，對減緩疫情發生應有相對助益。



圖九、國立感染症研究所統計該國 1965 至 2012 年日本腦炎病例數



圖十、國立感染症研究所 2015 年調查境內豬隻日本腦炎抗體狀況及人感染日本腦炎之分布情形

日本腦炎之型別變異為該研究機構另一個關注的議題，日本腦炎病毒依據其 E 蛋白基因不同，可分為 5 種基因型，東亞及中亞地區(包含台灣、日本、韓國、中國及越南等地)在 1930 至 1990 年多以基因第 3 型為主要流行病毒株，而基因第 1 型流行區域則靠近赤道地區，日本於 1994 年首次於境內分離基因第 1 型之病毒，爾後監測發現基因第 1 型取代第 3 型成為主要流行之病毒株，此現象亦陸續於東亞各國出現，包含韓國(2004 年)、越南(2004 年)及台灣(2008 年)，依 NIID 監測結果及近 10 年文獻報告，目前基因第 1 型已成為全球主要的日本腦炎型別。另須重視的部分，中國及韓國分別於 2011 年發表於境內分離日本腦炎基因第 5 型病毒，伴隨新基因型病毒出現，該兩國之日本腦炎發生率亦略微上升，日本目前尚未監測到基因第 5 型病毒，然由於該國與韓國及中國地域接近且交流頻繁，故 NIID 亦持續關注日本腦炎基因第 5 型是否會在日本境內流行，而日本腦炎基因型變異受到關注的原因在於原有之疫苗是否能有足夠之保護力價，避免遭受疾病威脅。目前用於製備日本腦炎疫苗之病毒株有中山株(Nakayama strain)、北京株(Beijing-1)及 SA14-14-2 等共 3 種，均屬於基因第 3 型病毒，依據 NIID 先前研究發現，無論免疫中山株或北京株疫苗之實驗動物所產生之抗體，對於第 1 型及第 3 型病毒均具有一定能力之保護力價，反觀，如將上述免疫血清與第 5 型病毒進行中和反應，其中和力價甚低(圖十一)，因此對於基因第 5 型日本腦炎之防範不可不慎。

另外，日本自 1956 年將日本腦炎疫苗導入防疫體系後，首先使用中山株鼠腦型疫苗，1990 年開始逐步轉換為北京株細胞型疫苗，依據目前監測數據發現，不論是鼠腦或細胞型疫苗在疾病控制上均可達到滿意的效果，目前該國所使用之日本腦炎疫苗均屬國產，生產廠商共 2 間，其一為阪大微生物病研究会(Biken，以下簡稱阪大)，另一為化學及血清療法研究所(Kaketsuken，以下簡稱化血研)，所使用之劑型別均為細胞型冷凍乾燥疫苗。NIID 於 2015 年檢定並放行之日本腦炎疫苗共計 36 批，依據 ABL 之實驗數據，阪大疫苗經免疫小鼠後產生抗體之保護力價略低於化血研疫苗，此差異對於疫苗接種成效上並無影響，惟於國家檢定之流程上，此兩種疫苗之稀釋方式則略有差異，後續將在檢驗流程敘明。

Neutralization test with JEV vaccine-immunized mouse sera

Genotype	Challenge virus	Nakayama vaccine		Beijing-1 vaccine		
		x2 dilution	x8 dilution	x2 dilution	x8 dilution	
Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	320	320	160	
	Beijing-1(NIID)	80	40	320	160	
GI	Hiroshima/46/1998	80	40	160	80	
	Mie/41/2002	320	80	160	80	
	Tokyo602/2005	160	40	80	80	
	Kochi/25/2005	160	40	160	40	
	Kumamoto/65/2005	80	40	160	40	
	Mie/51/2006	160	80	80	80	
	Kumamoto/81/2006	80	40	80	40	
	Kumamoto/104/2006	80	40	80	40	
	Chiba/150/2007	160	40	160	40	
	Chiba/103/2008	80	40	80	40	
	JaNBo37/2008	160	80	160	80	
	GMT of GI viruses		124.4	48.3	116.8	54.8
	GIII	JaTH160/1960	80	40	160	80
JaTAn1/75/1975		160	40	80	80	
JaTAn1/90/1990		160	80	160	160	
GMT of GIII viruses		127.0	50.4	127.0	100.8	
GV	Muar/1952	20	<10	20	10	

圖十一、國立感染症研究所針對日本腦炎疫苗與不同基因型病毒之保護力價試驗結果

(四) 新型細胞型日本腦炎疫苗之國家檢定研習

本次研習由病毒第1部第2室 Dr. Tajima 室長全程帶領解說與示範完整日本腦炎效價試驗流程。效價試驗步驟詳述如下：

1. 小鼠免疫及免疫血清收集：

1.1. 待測疫苗(Test Vaccine)及對照疫苗(Reference Vaccine)之配製：

(1) 待測疫苗：日方使用之日本腦炎疫苗主要是以其國內阪大或化血研製造之疫苗為主，目前尚無其他國家輸入之日本腦炎疫苗。兩種來源之疫苗於進行 PRNT 之稀釋倍數不同，如阪大疫苗(JE BIK, Beijing-1 strain)稀釋倍數為 1:2、1:4、1:8 及 1:16；化血研疫苗(ENCEVAC, Beijing-1 strain)稀釋倍數為 1:4、1:8、1:16 及 1:32，而本次日方以阪大疫苗示範實驗過程，其回溶及稀釋步驟如下：

a. 進行一次小鼠免疫試驗須使用 15 瓶疫苗，將每瓶疫苗以

0.7 mL 滅菌水回溶並放置室溫至少 30 分鐘，以利粉末充分被溶解，方可進行後續稀釋步驟。

- b. 充分將每瓶已回溶之疫苗置於震盪器(vortex)充分混和均勻，並以長 pipette 吸上吐下 pipetting 數次後吸取，並全部集中到 15 mL 離心管(原液)。
- c. 將上述已集中收集之液體置於震盪器充分混和均勻，並吸取 8 mL 依下表以 PBS 進行 2 倍序列稀釋：

稀釋倍數	2x	4X	8X	16X
疫苗(mL)	8	8	8	8
PBS (mL)	8	8	8	8
總體積(mL)	16 ↗	16 ↗	16 ↗	16 (須捨去 8 mL)
最終體積(mL)	8	8	8	8

※應事前將 PBS 裝入離心管後再進行序列稀釋。

※剩餘之原液則進行小鼠不活化試驗：

不活化試驗係將小鼠以 Isoflurane 麻醉後，利用兩段式針頭將藥液以腦內注射打入 4 週齡小鼠(ddY strain, SPF)，並於注射後觀察 14 日，查看其存活情形。試驗之小鼠須於試驗前 2 日送至實驗室內觀察其生理狀況是否健康及能否適用於試驗等狀況。試驗中每隻小鼠打入 0.03 mL 藥液，每批檢體須注射 11 隻小鼠，注射位置落於小鼠眼睛後方至耳朵之間。試驗結果須至少有 10 隻小鼠存活，若於注射後 48 小時內有小鼠死亡情形，則可能因小鼠生理狀況不佳或操作者施打位置不良等因素，該情形可不列入實驗判定。

(2) 對照疫苗(Reference Vaccine)(圖十二)：日方使用之對照疫苗亦為 Beijing-1 strain，由 NIID 自行製造，其回溶及稀釋步驟如下：

- a. 進行一次小鼠免疫試驗須使用兩種不同批號之對照疫苗各 1 瓶，將每瓶以 10 mL 滅菌水回溶並放置室溫至少 30 分鐘。

b. 取 5 mL 已回溶之對照疫苗加入事先裝有 6 mL PBS 之離心管內
並置於震盪器充分混和均勻(R 液)。

c. 取 R 液 8 mL 依下表以 PBS 進行 2 倍序列稀釋：

稀釋倍數	2x	4X	8X	16X
R 液(mL)	8	8	8	8
PBS(mL)	8	8	8	8
總體積(mL)	16 ↗	16 ↗	16 ↗	16 (須捨去 8 mL)
最終體積(mL)	8	8	8	8

※應事先將 PBS 裝入離心管後再進行序列稀釋。



圖十二、日方使用之對照疫苗

1.2. 第一次小鼠免疫：將已配製好之待測疫苗(稀釋倍數 2X、4X、8X 及 16X，共四管)及對照疫苗(稀釋倍數 2X、4X、8X 及 16X，共四管)等稀釋溶液，以腹腔注射打入 4 週齡小鼠(ddY strain, SPF)，每階稀釋溶液共注射 11 隻小鼠(總計需使用 88 隻小鼠)，每隻注射 0.5 mL 稀釋液，注射完畢後使小鼠體內產生免疫反應持續 7 天。

1.3. 第二次小鼠免疫：事前依步驟 1.1. 配製一批新的待測疫苗及對照疫苗稀釋溶液，將配製好之溶液依步驟 1.2. 以腹腔注射打入同一批已免疫 7 天之小鼠，並再次觀察 7 天。

1.4. 將上述免疫兩次之小鼠進行心臟採血及血清處理：

- (1) 小鼠採血：以 Isoflurane 作為麻醉劑(圖十三)，並在符合動物福祉下進行心臟採血，每隻動物約採 0.5 mL 血量，並將同一組 11 隻小鼠所採取之血液全部集中至 1 管玻璃試管(待測疫苗及對照疫苗各有 4 管玻璃試管之血液)(圖十四)。
- (2) 血液離心處理：將上述 8 管血液(待測疫苗及對照疫苗各 4 管)放置約 2 小時待血液分層(上層顏色較透明之液體為血清，下層顏色深紅且凝固狀液體為血球沉澱)，傾斜試管慢慢將上層血清分別倒入 8 支 15 mL 離心管(圖十五)再將 8 管血清放置離心機離心(1,500 rpm，5°C，10 分鐘)，離心完畢後取上清液(血清)至 3 mL 試管，並將其放置 56°C 水浴槽加熱 30 分鐘去除補體(因補體會干擾病毒感染細胞的能力)，處理好之血清待其冷卻後可保存於-40°C 約 1 個月。

※每管血清可依序標示編號，較易於辨識內容物以避免混淆，如日方檢驗紀錄表：(圈起部分為標示編號)

6. Serum dilution:

1) Ref106VC①	1, 2, 3, 4
2) Ref106VC②	5, 6, 7, 8
3) 2016-	9,10,11,12
4) 2016-	13,14,15,16
5) 2016-	17,18,19,20
6) 2016-	21,22,23,24
7) 2016-	25,26,27,28

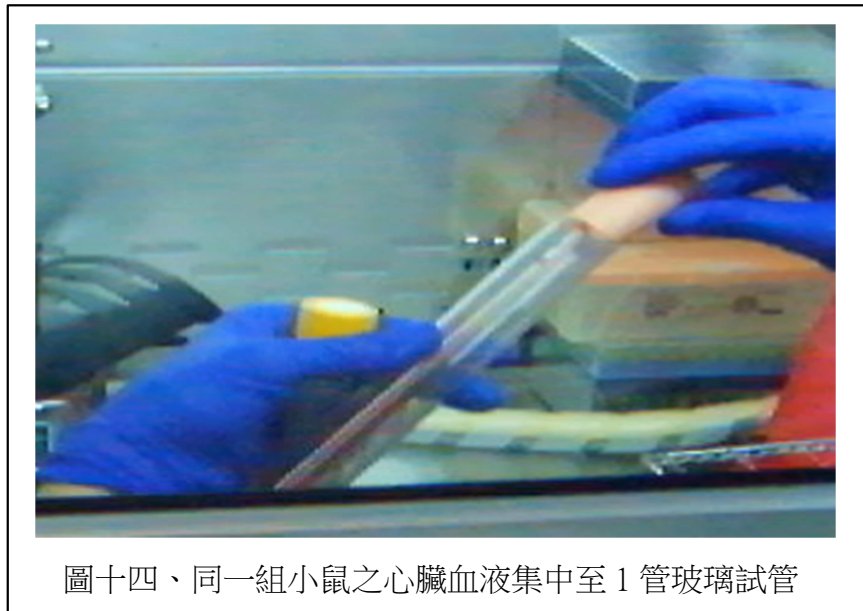
	x10	x40	x160	x640	x2560	
	①	②	③	④		
serum	100	100	100	100	100	
diluent	900	300	300	300	300	
	1000 [↗]	400 [↗]	400 [↗]	400 [↗]	400	→discard 100
f.v.	900	300	300	300	300	(μl)

7. Standard serum dilution: (Bejjinig-1 infected mouse serum; Lot no. 37-2001) ③ "30"

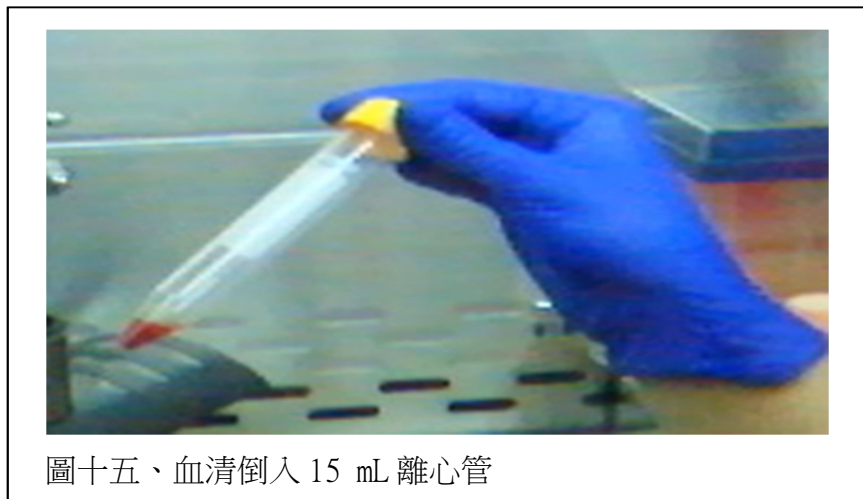
	x20	x80	x320	x1280	x5120	
	①	②	③	④		
serum	30	100	100	100	100	
diluent	270	300	300	300	300	
	300 [↗]	400 [↗]	400 [↗]	400 [↗]	400	→discard 100
f.v.	200	300	300	300	300	(μl)



圖十三、麻醉用 Isoflurane 及相關設備



圖十四、同一組小鼠之心臟血液集中至 1 管玻璃試管

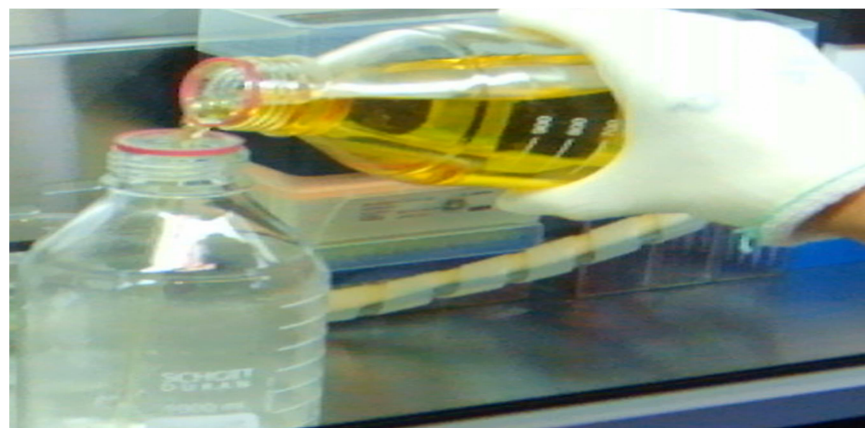


圖十五、血清倒入 15 mL 離心管

2. PRNT 試驗：

2.1. 配置 medium：

- (1) cell growth medium：Eagle's MEM(EMEM)含 10%經熱處理 (heat inactivated)之胎牛血清(FBS)、抗生素(1000 units of Penicillin/Streptomycin)及非必需胺基酸，配製完畢後可存放於 4°C 約 1 個月。
- (2) 血清及病毒稀釋溶液所使用之稀釋劑：EMEM 含 2%熱處理過之 FBS，可存放於 4°C 約 2 個月。
- (3) overlay medium：為病毒及病毒中和液加入細胞後覆蓋於細胞上之培養基，該培養基具有黏性，可防止病毒感染細胞產生之斑點繼續擴大，避免斑點集結，以利計算其數目。overlay medium 需先配置成 A 液，並於使用前添加 L-glutamine、FBS 及 7.5%NaHCO₃後方可使用，詳細配置步驟如下：
 - a. 將適量 EMEM 粉末(可高溫高壓滅菌且內含 Kanamycin)倒入 1000 mL 血清瓶，並加入二次水(ddH₂O)至 1000 mL，再取另一瓶 1000 mL 血清瓶放入 stir bar 及適量 Methyl cellulose 粉末(約為最終總體積 1-1.5%)，分別將前述兩瓶血清瓶以高溫高壓滅菌鍋滅菌。
 - b. 滅菌結束後取出血清瓶，待瓶身溫度降至約 70°C 後，於生物安全操作櫃內將液態 EMEM 倒入內含 stir bar 之 Methyl cellulose 瓶內(圖十六)，旋緊瓶蓋並以電磁攪拌器持續攪拌約 30 分鐘，確認粉末溶解後將血清瓶浸泡於冰水中，並慢慢投入碎冰降溫，直至液體呈清澈、黏稠且 stir bar 無法轉動即完成 A 液配置，A 液可存放於 4°C 約 6 個月。



圖十六、液態 EMEM 倒入 Methyl cellulose(內含 stir bar)

- c. 使用前將 10 mL 200 mM L-glutamine、20 mL 經熱處理 FBS 及 29.3 mL 7.5% NaHCO₃ 加入 1000 mL A 液中(圖十七)，完成 overlay medium 配置，該溶液可存放於 4°C 約 2 個月。



圖十七、overlay medium 最終配置

2.2. PRNT 用細胞製備(DAY 1)：

日本腦炎疫苗 PRNT 試驗使用之細胞為 Vero 細胞(日本細胞庫代號為 9013，對應於 ATCC 應為 CCL81)(圖十八)，最適宜用於本實驗之代數為 143-180 代，細胞以含 10% FBS 之 EMEM 培養基於 37°C /5% CO₂ 環境下繼代培養。試驗前 1 日收集細胞，並將細胞以 10% FBS EMEM 培養基稀釋至 $2 \sim 3 \times 10^5$ /mL，再將細胞稀釋液分別加入 6 孔盤內(每孔 2 mL)(圖十九)，每次試驗至少配置 22 盤。分裝後之

6孔盤應平放於桌面上，前後左右輕輕晃動，使細胞於盤內分布均勻，再於 37°C / 5% CO₂ 環境培養 18-24 小時，此時細胞量約佔孔洞 80-90%，即可進行試驗。

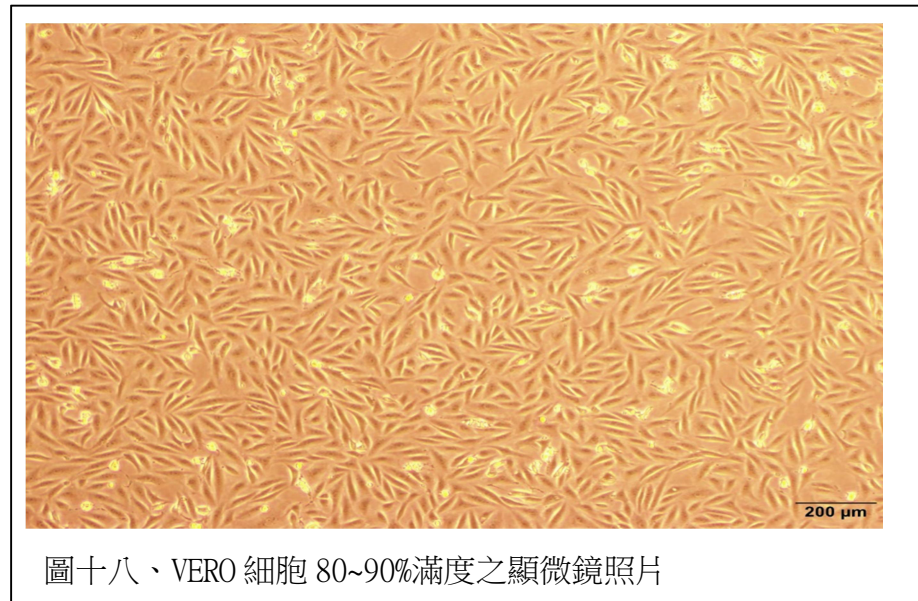
[補充]每次試驗所需盤數之計算方式：

- 實驗開始之病毒控制組(virus control)：12 重複(2 盤)
- 待測疫苗組及對照疫苗組：各血清需 4 個稀釋階，每階 3 重複(16 盤)。

2 組 × 4 種濃度血清 / 組 × 4 階濃度 / 種濃度血清 × 3 重複 = 96 孔 → 16 盤

- 標準血清(Standard Serum)：4 個稀釋階，每階 3 重複(2 盤)。
- 實驗結束之病毒控制組(virus control)：12 重複(2 盤)

配置好之細胞盤面及側身上應標記預定接種之品項(圖二十)，以利接種病毒中和液時易於辨別，亦可於標記過程檢視盤數是否有缺少。



圖十八、VERO 細胞 80~90%滿度之顯微鏡照片



圖十九、細胞分盤



圖二十、於細胞盤面及側身上標記類別

2.3. 中和試驗及病毒感染(DAY 1/ DAY 2)：

先將免疫取得之動物血清進行稀釋，NIID 官員表示依過去經驗，使用塑膠離心管配製會使血清內抗體效價下降，故目前仍使用玻璃試管進行稀釋液配置，中和試驗進行前須先將免疫血清、標準血清及病毒分別依下列方式稀釋：

(1) 免疫血清：

- 操作前一晚將採集自小鼠之血清(待測疫苗及對照疫苗各 4 管)從-40°C 冰箱取出，並放置 4°C 冰箱緩慢解凍。
- 操作當天依下表以 EMEM(含 2%熱處理過之 FBS)配置血清稀釋溶液：

稀釋倍數	10X	40X	160X	640X	2560X
血清(μL)	100	100	100	100	100
EMEM(含 2% FBS)(μL)	900	300	300	300	300
總體積(mL)	1000	400↗	400↗	400↗	400↗
最終體積(mL)	900	300	300	300	300

吸除 100

※僅使用稀釋倍數為 40X 至 2560X 之血清稀釋溶液。

※配製溶液過程皆須先加入 EMEM(含 2%熱處理過之 FBS)於玻璃試管，再加入血清進行稀釋。

(2) 標準血清：

a. NIID 自行製備，該血清係以北京株疫苗免疫小鼠 2 次後取得血清凍乾製成，並經 NIID 舉辦共同標定之標準品。

b. 試驗前依下表以 EMEM(含 2%熱處理過之 FBS)配置標準血清稀釋溶液：

稀釋倍數	20X	80X	320X	1280X	5120X
血清(μL)	30	100	100	100	100
EMEM(含 2% FBS)(μL)	270	300	300	300	300
總體積(mL)	300↗	400↗	400↗	400↗	400↗
最終體積(mL)	200	300	300	300	300

吸除 100

※僅使用稀釋倍數為 80X 至 5120X 之標準血清稀釋溶液。

(3) 病毒稀釋液：

a. 本試驗所使用之病毒為 Beijing-1(smb38)。

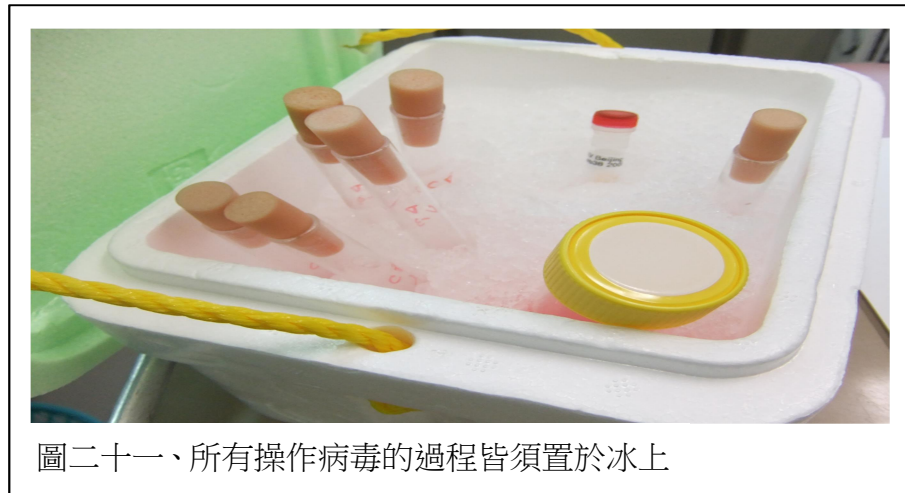
b. 配置前將病毒原液置入 37°C 水浴槽快速解凍，並隨即將已解凍完之病毒原液置於冰上。

c. 依下表以 EMEM(含 2%熱處理過之 FBS)配置 Challenge Virus(C.V.)，所有操作病毒的過程皆須置於冰上(圖二十一)，且須使用玻璃試管配製溶液。

稀釋濃度(10^n)	n=-1	n=-2	n=-3	n=-4	n=-5	C.V.
病毒液(μL)	100	100	100	100	150	1400
EMEM(含 2%熱處理過之 FBS) (μL)	900	900	900	900	1350	36000
總體積(μL)	1000 ↗	1000 ↗	1000 ↗	1000 ↗	1500 ↗	37400

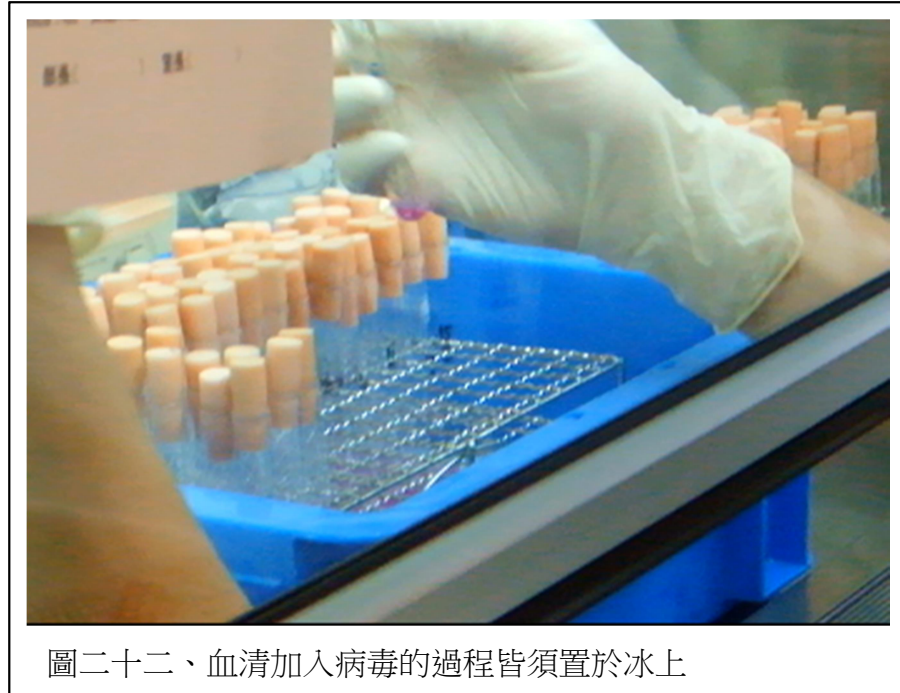
d. Challenge Virus 配製好後，依下表配製 Virus control(V.C.)：

Challenge Virus(μL)	1800
EMEM(含 2% FBS) (μL)	1800
總體積(μL)	3600(V.C.)



圖二十一、所有操作病毒的過程皆須置於冰上

完成各血清稀釋及 C.V 與 V.C.配製後，於每管血清稀釋溶液加入 $300 \mu\text{L}$ C.V，並放置於震盪器充分混和均勻，此步驟全程也須於冰上操作(圖二十二)。完成 C.V.接種後，將總數 36 管玻璃管放入已預熱之 37°C 水浴槽，進行中和反應 90 分鐘(時間由放入 37°C 水浴槽開始計算)，時間結束後應迅速將玻璃管移回冰上。



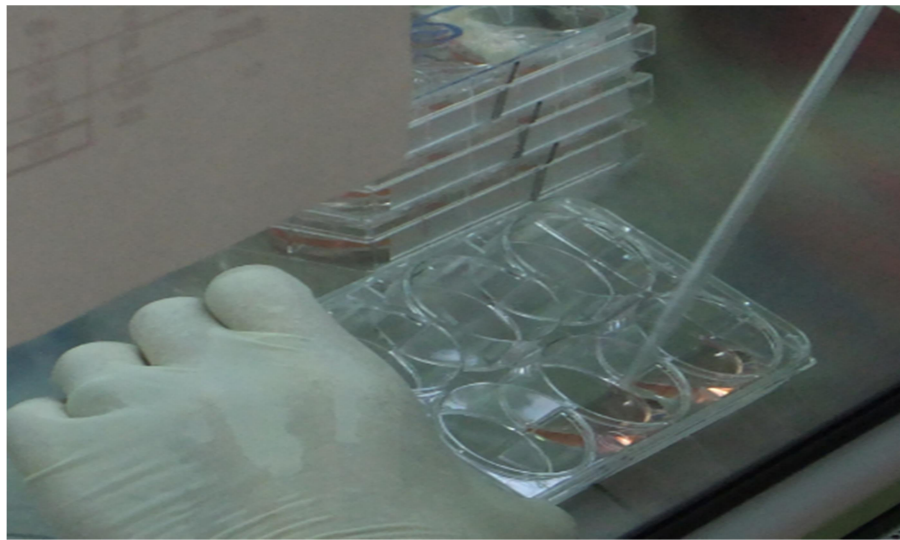
圖二十二、血清加入病毒的過程皆須置於冰上

最後進行病毒攻擊流程，取出先前已配製好之 6 孔細胞盤以真空吸取器依序將每個孔洞內之培養基吸乾(圖二十三)(吸取過程不須將液體吸至全乾)，並陸續將已吸完培養基之細胞盤(以 5 個盤子為一疊)放回培養箱(35°C，5% CO₂)。待所有細胞盤之培養基全數被吸完並放回培養箱，則開始進行病毒中和液接種程序，此程序須以計時器計數病毒攻擊所花費時間，每次接種病毒中和液時，取出 1 疊(5 盤)並依下列順序將 100 μ L/孔之病毒中和液加入對應之孔洞內，接種順序如下：

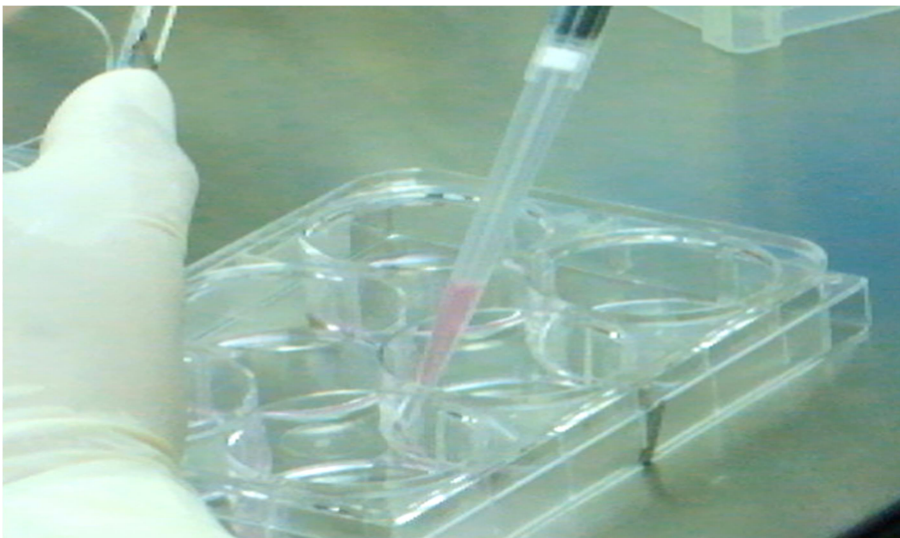
virus control \times 2 盤 \rightarrow 待測疫苗組之小鼠血清與病毒中和液(每管 3 孔) \times 8 盤 \rightarrow 對照疫苗組之小鼠血清與病毒中和液(每管 3 孔) \times 8 盤 \rightarrow 標準血清與病毒中和液(每管 3 孔) \times 2 盤 \rightarrow virus control \times 2 盤

接種病毒中和液時須沿盤壁緩慢加入液體(圖二十四)，完成一疊(5 盤)之接種程序後，應由另一位同仁接手將其前後左右搖晃，使液體均勻覆蓋於細胞上，搖晃好之細胞盤則放回 35°C / 5% CO₂ 培養箱培養 90 分鐘使病毒感染細胞，病毒感染期間每 15 分鐘須將細胞盤取出前後左右搖晃一次，該步驟應至少進行 2 次，病毒感染結束後，於每個孔緩慢加入 2 mL Overlay medium(圖二十五)，並將

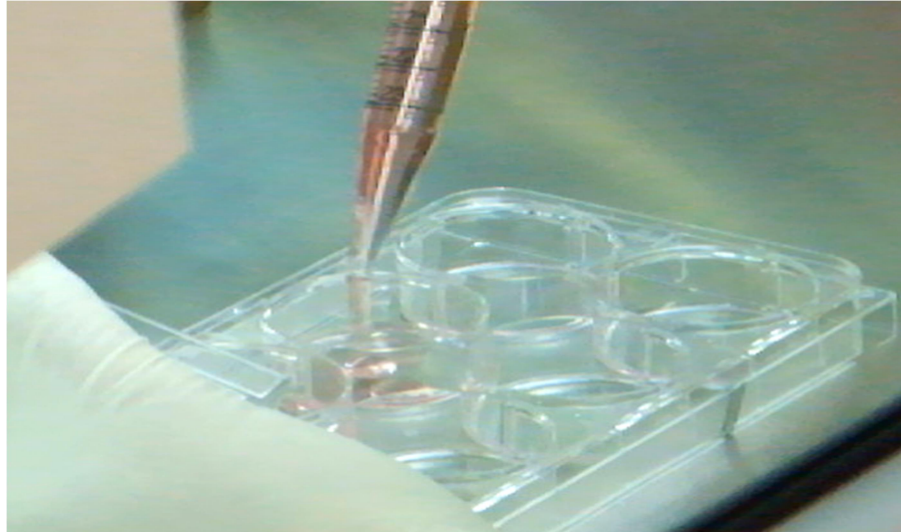
盤子放回培養箱培養 5 天。



圖二十三、吸取細胞盤內培養基



圖二十四、沿細胞盤壁加入液體



圖二十五、加入 Overlay medium 於細胞盤

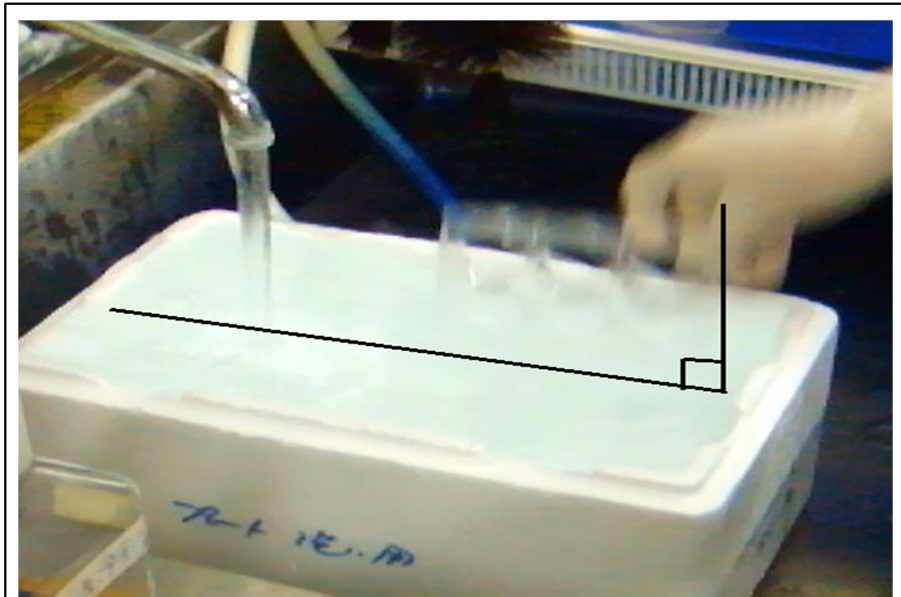
2.4. 細胞固定及染色細胞(DAY 7/ Day 8)：

- (1) 細胞固定：於接種病毒中和液 5 日後，自培養箱取出所有 6 孔盤，每個孔加入 1 mL 3.7% formalin (37% formalin 以 PBS 稀釋配製) 室溫至少 1 小時(NIID 作業流程通常放置隔夜)。此步驟使病毒去活化，並將細胞牢固於 6 孔盤。此過程不須將原本細胞盤內之 overlay medium 吸除，因其體積影響 formalin 濃度之程度不大，且此時細胞狀況較為脆弱，應避免吸取 medium 時傷害細胞的機率。
- (2) 細胞染色：6 孔盤完成細胞固定後，須先將盤內 formalin 液體倒掉收集桶內(圖二十六)，因此廢液含 formalin，有毒性且會造成環境生態汙染，故須妥善處理。去除 formalin 後，則須進行洗盤程序，洗盤時應先準備一個裝滿清水的盆子，將盤子近乎垂直於水面浸入，並撈取清水進行洗盤(圖二十七)。全數盤子洗淨後，依序加入 1-2 mL 以 D.W. 配製之 methylene blue tetrahydrate 溶液進行細胞染色(圖二十八)，並將盤子放置室溫至少 1 小時，使細胞吸收染劑，染色時間結束後，將盤內染劑倒掉，並再次進行洗盤，完成後將盤子甩乾，放置 40-50°C 烘箱進行乾燥。如細胞受病毒感染死亡則無法染上顏色，在肉

眼下將呈現無色斑點。



圖二十六、固定細胞完畢之廢液集中倒入收集桶



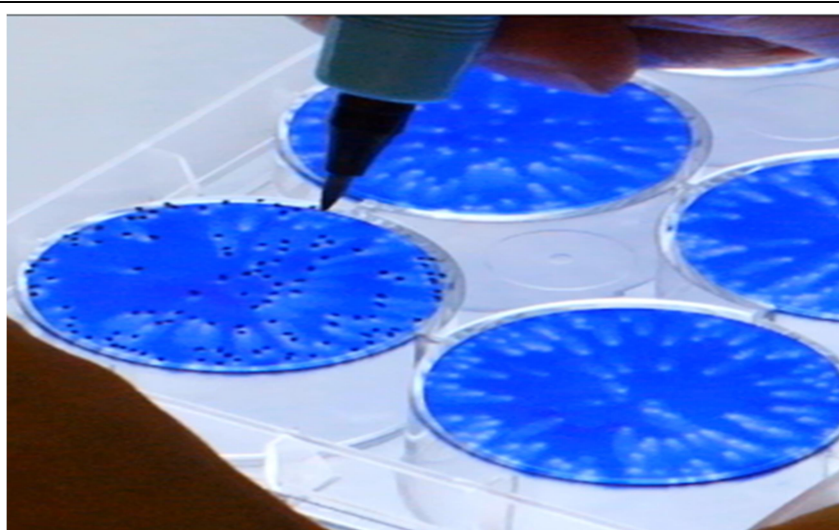
圖二十七、洗盤過程(盤面垂直於水面)



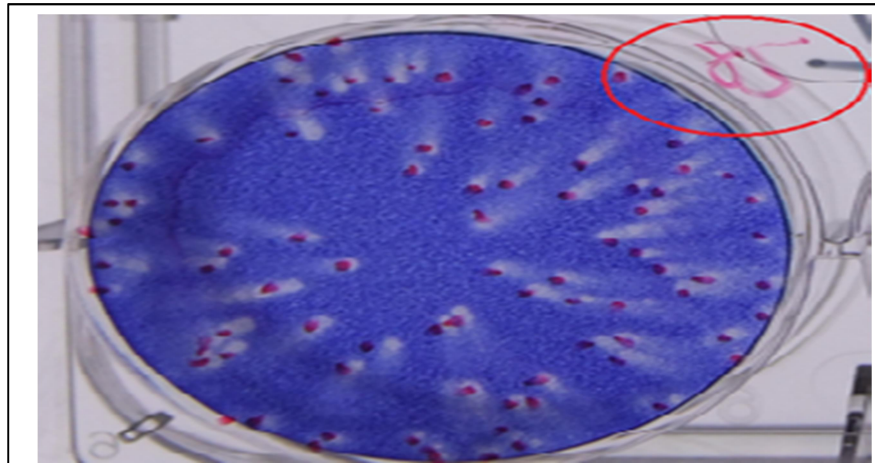
圖二十八、加入 methylene blue tetrahydrate 溶液進行染色

2.5. 觀察並計算斑點：

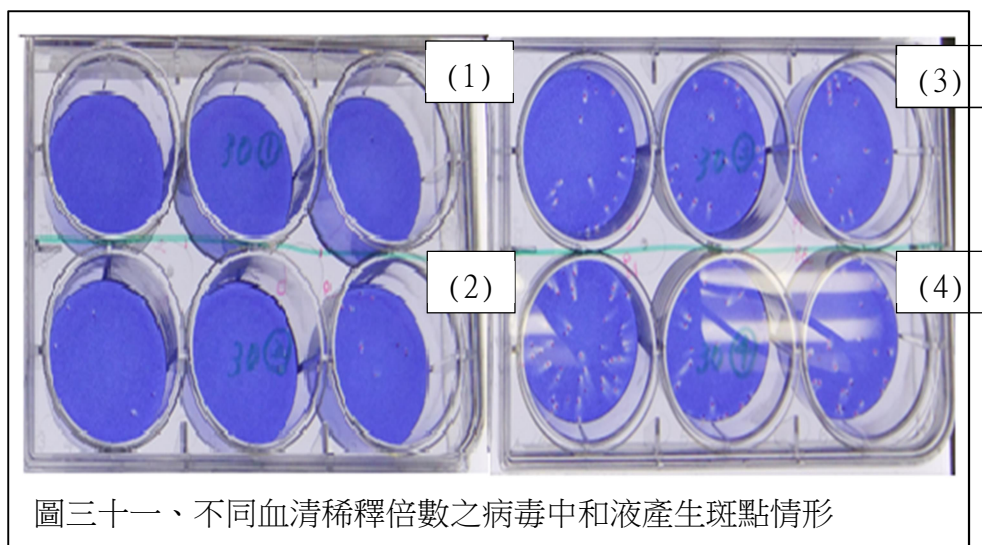
病毒感染細胞後產生之斑點經染色後於光照下呈空洞並帶有拖尾樣貌，後續以計數筆計算斑點數並紀錄之(圖二十九及圖三十)。其中 Virus control 共 12 個孔之斑點平均數如落於 50~150 個斑點範圍內則屬有效試驗，而血清(待測疫苗血清、對照疫苗血清及標準血清)中和液之斑點數目應隨血清稀釋倍數升高而增加(圖三十一)。



圖二十九、以計數筆點擊斑點以計算斑點數目



圖三十、斑點數目標記於每個孔附近



圖三十一、不同血清稀釋倍數之病毒中和液產生斑點情形

2.6. 結果計算：

將每盤計算好之斑點紀錄於專用實驗紀錄紙上(圖三十二)，首先以設有計算公式之 excel 檔計算 Virus control 及標準血清之結果(圖三十三)，Virus control 之 12 個孔斑點平均數目除須落於 50~150 個斑點範圍內，經過卡方檢定 (chi-square test)，其 P 值 > 0.05 ，方可判定此實驗為有效試驗，另，以 excel 檔計算出標準血清之 50%斑點減少率 (50% plaque reduction rate) 僅作為參考用，不列入後續效價計算及結果判定。Virus control 有實驗前後 2 組，僅其中 1 組合格即屬有效試驗，如 2 組均合格，後續在計算實驗數值時，僅須挑選其中 1 組即可。

確認試驗屬有效試驗後，則使用國家檢定專用之電腦計算結果，該

電腦內建有 NIID 自行開發之 Bioassay Assist，僅須將相關數值帶入後，程式會自動計算各血清之 50%斑點抑制率(50% plaque reduction rate)，再使用平行線分析法(parallel line assay)計算待測疫苗對應對照疫苗之相對效價(relative potency) (圖三十四及三十五)。該軟體亦提供民間疫苗廠使用，如待測疫苗對應對照疫苗之相對效價為 0.5(含)以上代表合格，如果相對力價未滿 0.5 須以兩倍動物量免疫所得之血清進行再試驗，如仍未達 0.5 則該試驗不合格。

			w1	w2	w3
V. C.	1	1	125	110	111
			126	137	114
		2	103	105	122
			116	115	108
	2	1	126	121	120
			116	132	118
		2	133	127	107
			126	110	128
Ref106VC	1 (x)	1 (x40)	23	16	18
		2 (x160)	28	37	35
		3 (x640)	41	46	48
		4 (x2560)	66	63	64
	2 (x)	1 (x40)	19	33	24
		2 (x160)	42	24	44
		3 (x640)	57	59	54
		4 (x2560)	71	75	79
	3 (x)	1 (x40)	29	19	27
		2 (x160)	47	46	36
		3 (x640)	56	56	59
		4 (x2560)	73	83	70
	4 (x)	1 (x40)	34	31	26
		2 (x160)	54	51	49
		3 (x640)	85	79	62
		4 (x2560)	86	78	104

圖三十二、紀錄斑點數目於實驗紀錄紙上

			w1	w2	w3	X(Av)	ΣX	ΣX ²	(ΣX) ²	ΣX ² -(ΣX) ² /n (=K)	K/X(Av)	P
V. C.	1	1	125	110	111	116	1392	162550	1937664	1078	9.29	0.50<P<0.75
			126	137	114							
		2	103	105	122							
	2	1	116	115	108							
			126	121	120							
		2	116	132	118							
			133	127	107	122	1464	179348	2143296	740	6.07	0.75<P<0.90
			126	110	128							

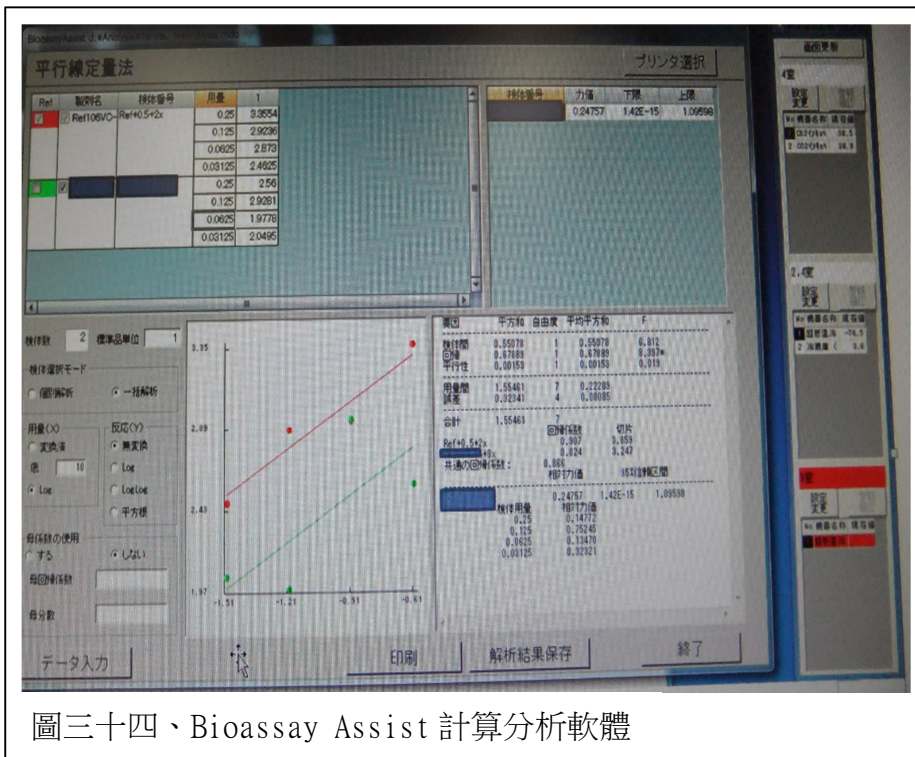
		w1	w2	w3	Av	X(Av)-Av	Inhibit. (%)
Standard (x2)	1 (x80)	2	4	0	2	114	98.28
	2 (x320)	17	9	13	13	103	88.79
	3 (x1280)	32	34	23	29.666667	86.333333	74.43
	4 (x5120)	52	47	55	51.333333	64.666667	55.75

$$\frac{3(x1280) - 50}{3(x1280) - 4(x5120)} \dots A = \frac{24.43}{18.68} = 1.3078158$$

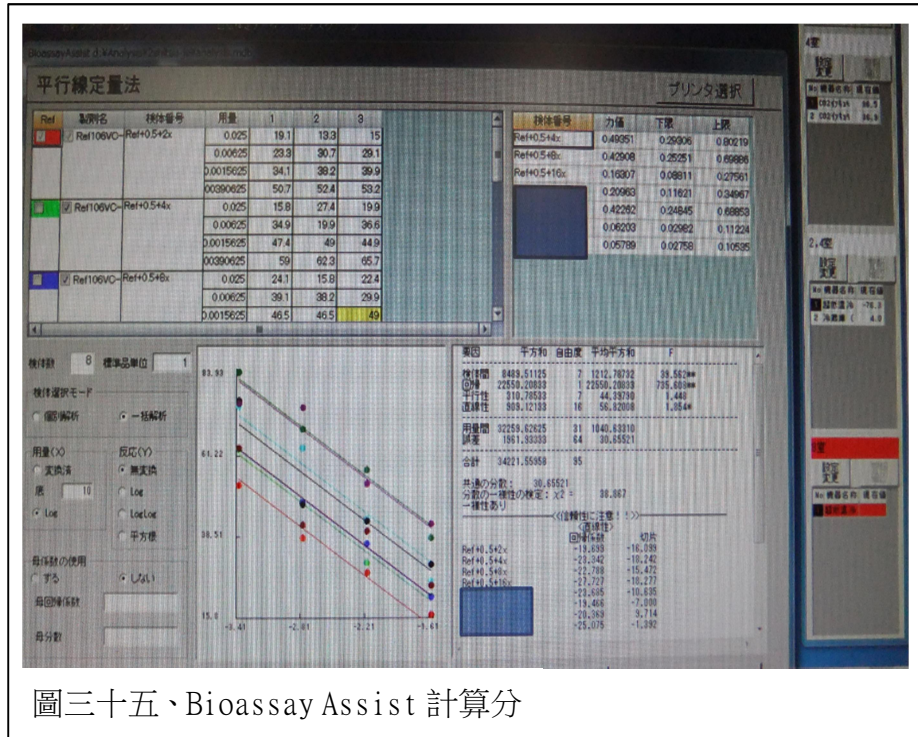
$$A \times 0.602 (\text{傾き}) = B = 0.78731$$

$$1280 \text{ の指数は } 3.107 \text{ なので, } 3.107 + B = 50\% \text{ 抑制希釈} = 3.894$$

圖三十三、已設有計算公式之



圖三十四、Bioassay Assist 計算分析軟體



圖三十五、Bioassay Assist 計算分

肆、心得與建議

(一) 研習心得

1、台日之疫苗批次放行流程比較：

我國與日本相同均依據世界衛生組織建議，建立疫苗等生物藥品之批次檢驗放行系統，日方之批次放行稱為國家檢定，檢驗及文件審查部分由 NIID 負責，申請受理及抽樣程序則由地方衛生單位負責，合格產品將取得官方之放行證明文件，然廠商須自行於外包裝印製檢定合格日期。我國疫苗藥品之批次檢驗放行稱為檢驗封緘，由食藥署全權負責，合格產品除核發封緘證明書，亦會於產品最小包裝加貼藥物檢查證。雙方執行批次放行之流程差異係因國情不同產生，於我國，多數疫苗仰賴進口，國內藥商多負責後端倉儲管理部分，且因應空運需求相關倉儲多位於北部。日本之疫苗則多為國內製造廠自行生產，製造廠多位於九州或四國等離東京較遠的地方，因此由地方衛生單位負責申請案件收受及抽樣，減少人力奔波之支出應可理解。於放行流程上，日本先前與我國相同，均會於檢驗合格之藥品外包裝上加貼藥物檢查證，該國雖自 2013 年 6 月起廢止貼標程序，但改要求製造廠於外包裝上加印檢定合格日期，因應該作業程序，日本藥廠大多於完成充填後，先行申請國家檢定並封存藥品，待檢定合格後，再印製標籤及外盒進行最終包裝作業，因外盒加印有檢定合格日期，民眾可輕易自外盒辨識該藥品是否通過國家檢定。國內藥商多未設有製造廠或包裝廠，移植日方制度尚有困難，故保留現行外包裝上加貼藥物檢查證，仍為滿足管理需求及方便民眾辨識檢驗合格產品之途徑，惟就整體管理面而言，日方及我方大同小異。另外值得一提的是，日方在國家檢定程序中，原僅針對抽樣檢品進行檢驗，於 2012 年才加入製程摘要審查程序，此一部分，我國在檢驗封緘程序建立之初，即要求申請廠商應檢附製程紀錄、檢驗成績書及廠內檢驗結果等相關文件，並進行實質審查，在程序上較日方完備。

2、日本腦炎疫苗檢驗相關：

本次研習期間觀察到日方之實驗室係以專精訓練為主，各實驗室

原則僅專注於某幾類之病原及特定之檢驗項目，故在實驗操作過程動作上較為流暢迅速，我國是由食品藥物管理署生物藥品科負責國內所有生物藥品之檢驗放行，雖專精度上略低於日方，但因可同時接觸多種不同病原的疫苗，故對檢驗知識上，較日方人員豐富。

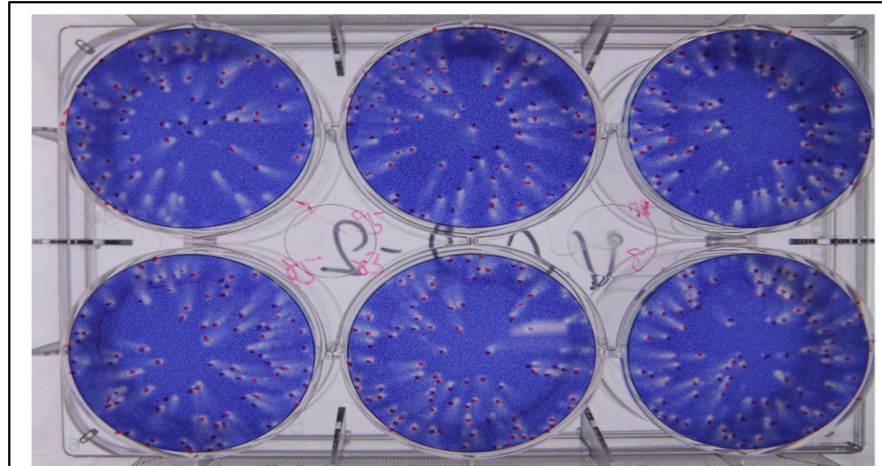
3、國際關係建立：

藉由本次赴日本國立感染症研究所研習日本腦炎疫苗檢驗相關技術，順道會晤該所倉根一郎所長、病毒第 1 部西條政幸部長及品質保證管理部加藤篤部長，同時與林昌宏室長(病毒第 1 部第 3 室)、落合室長(品質保證管理部第 2 室)、田島主任研究官(病毒第 1 部第 2 室)、藤田主任研究官(品質保證管理部第 2 室)、谷口研究官(病毒第 1 部第 2 室)等日方政府官員就疫苗檢驗技術、研究成果及管理業務推動等相關議題進行廣泛交流，再加上該單位為世界衛生組織在亞洲重要的合作實驗室，因此本次研習所建立之聯繫管道與溝通橋梁，除有助於本署檢驗技術之國際化，並對於後續取得國際間最新檢驗新知或情報上亦有一定之助益。

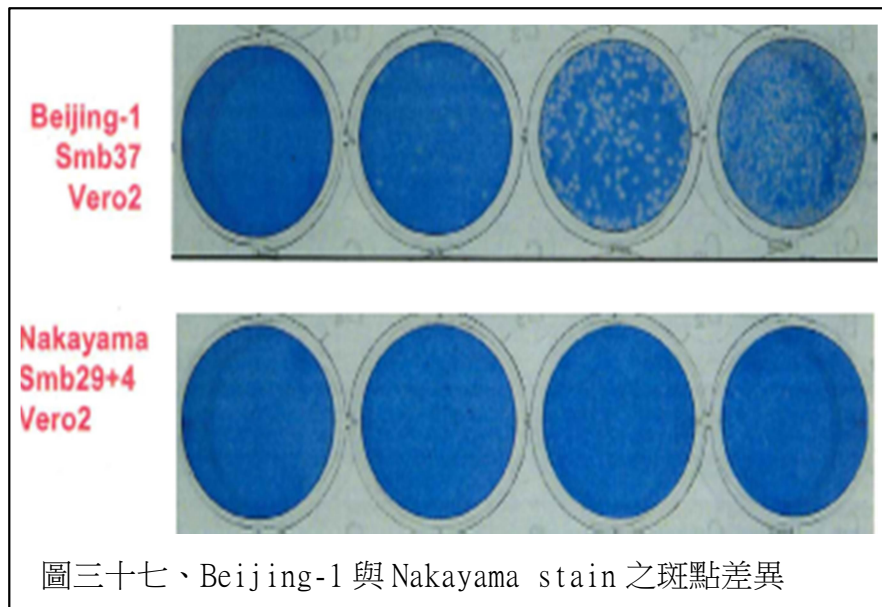
(二) 建議

1、儘速建立適合 PRNT 試驗之病毒株：

本次研習發現，日方實驗結果病毒產生之斑點均清楚易判讀(圖三十六)，且斑點形狀呈現拖尾形態。由於一個斑點具有一條拖尾，因此當許多斑點集結成團時，可依據拖尾數目計算斑點數量。經與日方人員討論，本署規劃用於測試的 Nakayama stain 依日方先前實驗結果，所產生的斑點細小不易判讀如圖三十七，故建議參考日方使用之 Beijing-1 或其他適合於細胞實驗之病毒株，以應用於後續檢驗方法開發。



圖三十六、日方實驗結果之斑點清楚易判讀



圖三十七、Beijing-1 與 Nakayama stain 之斑點差異

2、導入便利的設備：

研習期間觀察日方善用實驗室空間並導入精巧或利於人員操作之設備(如：試液放置專用鐵架、固定文件用磁鐵夾及小型震盪器(vortex)等)以提升操作實驗之效率並減少空間浪費，建議實驗室應導入相關設備。

3、持續派員赴國際實驗室研習新興技術：

本署因負責國內藥物及食品之品質管理，須隨時取得國際間新興藥物及食品相關資訊，為與國際頂尖實驗室接軌，應持續派員赴各國國家實驗室、世界衛生組織之合作實驗室或其他具備先進技術之實驗

室進行研習，除學習各實驗室之優點，亦可建立與各頂尖實驗室之聯絡管道，取得國際之新興資訊。