

出國報告（出國類別：研習）

赴法國研習「登革熱疫苗品質管理檢驗技術」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：張弘技士、廖婉婷技士

派赴國家：法國

出國期間：中華民國 105 年 11 月 19 日至 11 月 27 日

報告日期：中華民國 106 年 2 月 18 日

摘要

因氣候變遷以及國際交流頻繁，使得我國登革熱疫情日趨嚴重，雖阻斷病媒蚊傳染途徑有助於本土登革病例數之下降，但施打登革熱疫苗之預防策略仍是傳染病防治之首要階段，若我國高風險地區民眾或是即將前往疫區之民眾能對登革病毒產生抵抗力，不僅能有效的阻絕登革病毒之傳染，亦能防止境外移入之登革病毒入侵。

由於疫苗為高風險之生物藥品，故依據藥事法第 39 條之規定，國內所有上市使用之疫苗均須經審查檢驗合格後方能取得製造或輸入許可，且依據同法第 74 條之規定，製造或輸入之疫苗需逐批辦理檢驗封緘，而食品藥物管理署(以下稱食藥署)即為我國藥品品質管理之權責機關，為因應查驗登記檢驗及封緘檢驗之業務需求，故藉由單位內爭取之「新興生物藥品檢驗技術研習」相關經費，前往法國賽諾菲藥廠研習「登革熱疫苗品質管理檢驗技術」。

本次研習特別針對登革熱疫苗之效價試驗進行深入了解，對各個操作步驟皆充分觀察與討論，且試驗結果之判讀能力與賽諾菲藥廠之品管人員無異，藉由本次研習對於食藥署進行此疫苗之後續檢驗將可達事半功倍之效！

目錄

壹、前言與目的	4
貳、行程及工作紀要	10
參、研習內容	12
(一)賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠介紹.....	12
(二)登革熱疫苗之效價試驗	13
(三)製造區之參訪	21
肆、心得與建議	23

壹、前言與目的

登革熱(Dengue fever)是一種由登革病毒(Dengue virus)所引起的急性傳染病，登革病毒為核糖核酸(RNA)病毒，屬於黃病毒科(*Flaviviridae*)黃病毒屬(*Flavivirus*)登革病毒亞屬之分類。依抗原不同而有不同的血清型，分別為第 I、II、III、IV 型。感染登革病毒後的症狀依宿主體質不同而有不同程度的反應，約 80% 的感染者只有輕微或不明顯的症狀，但有 5% 的感染者會出現嚴重的發燒、嗜睡、躁動不安、肝臟腫大等臨床症狀，典型登革熱的潛伏期約為 3 至 8 天(最長可達 14 天)，其症狀是突發性的高燒($\geq 38^{\circ}\text{C}$)、頭痛、後眼窩痛、肌肉痛、關節痛及出疹等現象；更嚴重者會出現出血(登革出血熱)、休克(登革休克綜合症)或嚴重器官損傷之登革熱重症。而二次感染者(後一次感染與前一次感染之登革病毒型別不同)發生嚴重症狀之風險較高，如果沒有及時就醫或治療，死亡率將高達 20% 以上。

登革病毒透過埃及斑蚊及白線斑蚊之叮咬來進行傳播，因此登革熱盛行的主要區域為熱帶、亞熱帶等有埃及斑蚊及白線斑蚊分布的國家，包含亞洲、中南美洲、非洲及澳洲北部，以及部分太平洋島嶼地區。而台灣悶熱潮濕的氣候正有利於病媒蚊之生長，故台灣為登革熱流行之高風險地區，此外，全球氣候變遷及國際交流頻繁亦造成登革熱之境外移入，數據顯示 2015 年之登革熱本土病例數高達 4 萬 3 千多人次(圖一)，登革熱之防治實在刻不容緩。

全國登革熱本土病例累積確定病例同期比較趨勢表

月	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	總病例數
2011	11	15	15	15	15	15	19	143	304	694	1283	1545	1545
2012	11	13	13	17	28	37	75	187	590	927	1182	1271	1271
2013	14	15	16	26	44	70	77	99	170	252	442	596	596
2014	12	14	14	14	26	119	498	1457	3704	9189	14146	15492	15492
2015	80	90	97	102	124	176	511	4972	20138	30296	40248	43419	43419
2016	362	369	371	372	372	373	375	376	377	377	380	380	380
2017	0												0

圖一、2011 至 2016 全國登革熱本土病例數趨勢表(Taiwan CDC 2017)

現階段防治策略主要為兩大方向，一為阻斷病媒蚊之散播，另一則為登革熱疫苗之開發。因為登革熱病毒有 4 種血清型，第一次感染其中一種血清型痊癒後可對該血清型產生長期免疫力，但若第二次感染了另一種血清型，反而可藉由抗體依賴性增強作用（Antibody Dependent Enhancement）促進第二次感染之病毒入侵細胞，進而導致嚴重的登革出血熱。由於感染不同型登革病毒可能引起登革出血熱之特殊機轉，故發展登革熱疫苗之首要目標為：疫苗接種後可同時對 4 種血清型之登革病毒產生抵抗力。

TABLE 2: Dengue vaccine candidates currently in different phases of clinical trials.

Type of vaccine	Developer	Phase
Chimeric yellow virus dengue vaccine (CYD)	Sanofi Pasteur	Licensed
Intertypic chimera-DENVax	CDC-Inviragen/Takeda	III
Targeted mutagenesis based LAV-TetraVax-DV	NIH	III
Cell culture based LAV	WRAIR-GSK	II
Purified inactivated vaccine-TDENV-PIV	WRAIR-GSK	I
Recombinant subunit vaccine-V180	Hawaii Biotech, Merck and Co.	I
DNA vaccine expressing prM and E protein	Naval Medical Research Centre, WRAIR	I

圖三、目前各登革熱疫苗之研發進度(Niyati Khetarpal, 2016)

自 1940 年代起全球各藥廠及研究機構皆致力於登革疫苗之研發，至今已有數家疫苗廠之研發進展至人體試驗，甚至已完成人體試驗在各國取得許可證(圖三)。登革熱疫苗之研發設計目前已有 8 種，主要分 2 大類：

(一)Replicating viral vaccines：使病毒之生存能力受損而使毒力減弱，再將毒力減弱之病毒做成疫苗，即為減毒之活病毒疫苗，減毒之方式如下所述。

1. Cell Culture Passage Based LAV(live-attenuated viruses)

利用細胞株進行一系列之繼代培養，培養出減毒之活病毒，並以此減毒活病毒作為疫苗。沃爾特·里德陸軍研究院(Walter Reed Army

Institute of Research, WRAIR)所研發之 F17/Pre 之 4 價疫苗於人體試驗臨床第 2 期發現因疫苗所導致的病毒血症。另一疫苗 F17 與 F19 其人體臨床試驗第 2 期結果顯示在安全性及保護力方面是可接受的，但仍有因儲存安定性而使保護力降低的問題。

2. Targeted Mutagenesis Based Live-Attenuated Vaccine

利用定位突變(site directed mutagenesis)來製造出毒力較弱之病毒株，並以此病毒株作為疫苗。美國的國立衛生研究院(National Institutes of Health, NIH)之國家過敏和感染症病研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID)於 2003 年所研發之 4 價疫苗即是將其 3' UTR 之 30 個核苷酸進行刪除突變(deletion mutation)成為減毒病毒株。

3. Chimeric Dengue Vaccine

將登革病毒與其他減毒之黃熱病毒屬病毒或其他減毒之登革病毒株進行基因體之嵌合，製成嵌合活性減毒登革熱疫苗。

(1) 賽諾菲研發之登革熱疫苗即為此種疫苗，其將減毒黃熱病毒株 17D 之 prM (Premembrane)與 E(Envelope)基因置換成登革病毒之相對基因，製成 chimeric yellow fever-dengue (CYD) vaccine。因為 prM 與 E 基因是登革病毒結構蛋白之基因，該結構蛋白位於病毒顆粒表面，有利於人類抗體之辨識，進而引起免疫保護力，因此保有登革病毒表面蛋白的 CYD vaccine 能引起有效的免疫力進而達到預防效果。

(2) 美國 Inviragen 與 Fort Collins 公司合作研發的嵌合活性減毒登革熱疫苗” DENVax” ，則是將 DENV-2 病毒株以 PDK 細胞株繼代培養 53 代成減毒株後，以此病毒株之基因為骨幹，將其 prM 與 E 基因分別置換成血清型 DENV-1、DENV-3、DENV-4 之相對基因，此四種血清型病毒株依合

適之濃度比例製成疫苗 DENVax，於人體臨床試驗第 1 期結果顯示其具有安全性及免疫原性，目前已展開第 3 期人體試驗。

(二)Nonreplicating viral vaccines：這種疫苗無法複製，因此不具有感染力之風險。

1. Purified Inactivated Virus (PIV)

利用福馬林使病毒不活化所製成之不活化病毒疫苗，這樣的疫苗不會有毒力回復等安全顧慮，但因為此病毒已缺乏複製能力且病毒結構改變，使得其抗原性受到限制。因此，此種不活化病毒疫苗會搭配佐劑 (Adjuvant)或利用免疫接種策略(prime-boost immunization strategy)來提升抗原性。

傳統的免疫接種策略是進行首次疫苗注射後，再以同樣的疫苗進行追加注射，此為 homologous prime-boost 免疫法；非傳統免疫接種策略為首次注射與追加劑之疫苗不相同，稱為 heterologous prime-boost 免疫法。故此種登革病毒疫苗之施打策略為：施打不活化病毒疫苗(PIV)後再施打減毒活病毒疫苗(LAV)，此種策略在恆河猴之動物試驗中能引起完整的保護力。

登革熱不活化病毒疫苗之研發，目前尚處於人體臨床試驗第 1 期階段。

2. Recombinant Subunit Vaccine

以蛋白質表現系統 (Protein expression system) 來表現登革病毒之重組 E 蛋白(重組外套膜蛋白)製成重組次單元疫苗，通常是使用大腸桿菌、酵母菌或昆蟲表現系統來表現重組蛋白，並且會搭配佐劑(如：saponin-based adjuvant, ISCOMATRIX)或載體蛋白(Carrier

proteins)(如：Maltose-Binding Protein)以增加抗原性，目前此種疫苗處於臨床前期之研發階段。

3. Dengue DNA Vaccine

以含有”抗原基因”之質體作為登革熱 DNA 疫苗，”抗原基因”通常為登革病毒之表面蛋白 prM 和 E 基因，此質體施打進入人體後，於細胞內產生相對應之 prM 和 E 蛋白抗原，進而被抗原呈現細胞(antigen presenting cells, APCs)處理並與 MHC 分子一同呈現在細胞表面，並促進免疫系統反應，若搭配佐劑(如：Lipid-based adjuvant, Vaxfectin)能增加疫苗之抗原性。由 WRAIR 所研發之登革熱 DNA 疫苗現處於人體臨床試驗第 1 期階段。

4. Replication-Defective Virus Vectored Vaccines

利用病毒作為載體，攜帶抗原基因(如登革病毒之表面蛋白 prM 和 E 基因)，以此載體病毒製成不具複製能力之病毒載體疫苗，載體病毒通常使用腺病毒載體、委內瑞拉馬腦炎病毒(venezuelan equine encephalitis virus)載體或減毒之麻疹病毒載體。此種病毒載體疫苗現仍處於臨床前期之研發階段。

5. Virus Like Particle (VLP) Vaccines

登革病毒表面蛋白 prM 和 E 基因與其他病毒基因(如 B 型肝炎病毒核心蛋白基因)一起製成類病毒顆粒(virus-like particles, VLP)，以此作為類病毒顆粒疫苗。因為酵母菌系統有較高的產量並且能使抗原適當的糖基化修飾，因此酵母菌系統較適合製造類病毒顆粒。

上述研發登革熱疫苗之 2 大方向，各有其優缺點，分述如下：

(一) Replicating viral vaccines: 具有複製能力之病毒疫苗能夠引起較強大、

較持久、較廣泛之免疫力，且生產成本較低；但將病毒毒力減弱具有其困難性，且基因的不穩定性可能有毒力回復之顧慮，此外，多型別減毒病毒株彼此之間也可能會有干擾作用。

(二) Nonreplicating viral vaccines：不具有複製能力之病毒疫苗，其反應原性較小，適合施打於免疫功能缺乏之個體，4 個血清型別之病毒株彼此之間能達到平衡較不易有干擾；但是引發的免疫力較弱、較不持久，通常需要搭配佐劑使用。

目前各國疫苗廠之登革熱疫苗研發正如火如荼進行中，許多已進入人體臨床試驗階段，賽諾菲所研發之登革熱疫苗目前已於墨西哥、菲律賓、巴西、薩爾瓦多、巴拉圭及哥斯大黎加取得許可證，鑒於賽諾菲藥廠取得全球登革熱疫苗首張許可證，故藉由單位內爭取之「新興生物藥品檢驗技術研習」相關經費，前往賽諾菲諾伊維爾疫苗製造廠研習登革熱疫苗相關之鑑別與效價試驗，以增進本署對於新興疫苗之檢驗技能，為國人疫苗安全把關。

貳、行程及工作紀要

日期	行程及工作紀要
105 年 11 月 19 日 星期六	啟程(台北)
105 年 11 月 20 日 星期日	抵達(法國里昂)
105 年 11 月 21 日 星期一	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點：賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠 Sanofi Pasteur NVL(法國里昂市諾伊維爾索恩河畔區) 2. 賽諾菲製造廠、QC 部門介紹及登革熱疫苗效價試驗之簡報 3. QC 部門之實驗室參觀導覽 4. 研習登革熱疫苗檢驗技術： 效價試驗之前置作業
105 年 11 月 22 日 星期二	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點：賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠 Sanofi Pasteur NVL(法國里昂市諾伊維爾索恩河畔區) 2. 研習登革熱疫苗效價試驗： <ol style="list-style-type: none"> (1) 細胞之計數、稀釋 (2) 疫苗檢體之回溶及稀釋 (3) 感染：將稀釋好之疫苗檢體感染細胞 3. 觀摩完整檢驗技術之操作流程影片，並即時進行討論與意見交流 4. 製造流程之參觀 <ol style="list-style-type: none"> (1) 環境設備之參觀 (2) 細胞培養增殖放大流程 (3) 培養槽管路流向分配之介紹

<p>105 年 11 月 23 日 星期三</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點：賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠 Sanofi Pasteur NVL(法國里昂市諾伊維爾索恩河畔區) 2. 研習登革熱疫苗檢驗技術：實驗結果之判讀 <ol style="list-style-type: none"> (1) 以顯微鏡觀察病毒感染細胞之染色狀態 (2) 以肉眼判讀陽性及陰性之染色結果 (3) 排除偽陽性之判讀技巧 3. 針對 working reagent 進行逐項討論，確保登革熱疫苗效價試驗平台未來在本署能順利進行
<p>105 年 11 月 24 日 星期四</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點：賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠 Sanofi Pasteur NVL(法國里昂市諾伊維爾索恩河畔區) 2. 研習登革熱疫苗檢驗技術： <ol style="list-style-type: none"> (1) 固定作用 (2) 1 級抗體與 2 級抗體之作用 (3) 呈色作用 (4) 呈色結果之判讀
<p>105 年 11 月 25 日 星期五</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 地點：賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠 Sanofi Pasteur NVL(法國里昂市諾伊維爾索恩河畔區) 2. 研習登革熱疫苗檢驗技術： <ol style="list-style-type: none"> (1) 計算疫苗檢體之 CCID₅₀ (2) 比對雙方計算方法所得數據，確保無顯著差異 3. 總結討論會
<p>105 年 11 月 26 日 星期六</p>	<p>返程(法國里昂)</p>
<p>105 年 11 月 27 日 星期日</p>	<p>抵達(台北)</p>

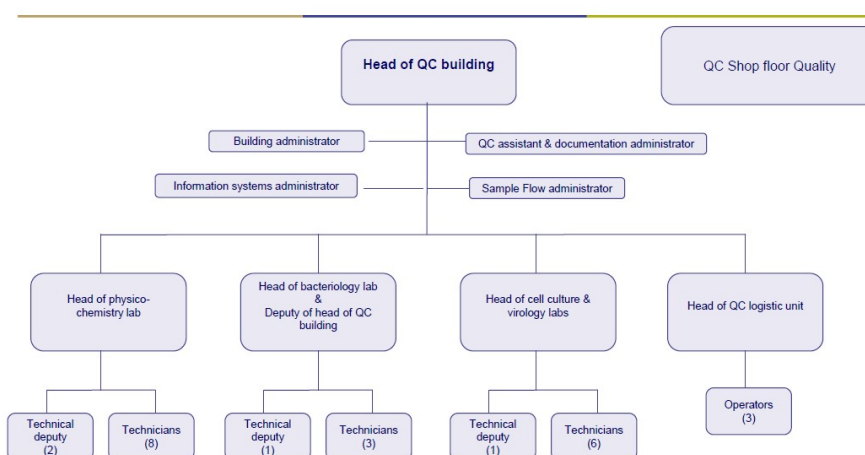
參、研習內容

(一)賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠介紹

本次研習地點位於賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠，賽諾菲是由賽諾菲－聖德拉堡和安萬特兩家公司在 2004 年合併成立，為全球主要製藥公司之一，分布在世界各地近 100 多個國家，其總部設在法國巴黎。賽諾菲產品涵蓋七大領域，概括了心血管疾病、血栓、腫瘤、中樞神經系統疾病、糖尿病、內科用藥及疫苗。於 2010 年興建賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠，此疫苗製造廠包含了 Bulk building、Quality operations building 及 Quality control building，而 Quality control building 即為品質部門(Quality organization)所在建築物。

品質部門包含了品質管制、產品品質與法規、無菌與驗證等單位，而品質管制單位包含了物理與化學實驗室、病毒實驗室、細菌實驗室等(圖四)，其主要的業務為：Dengue Monovalent Bulk 與 Dengue Vaccine 的放行及安定性試驗、試劑與 reference standards 之管理、品管單位員工之教育訓練及能力評定、訂定 SOP 等文件、分析方法與設備之驗證，而此次研習之主要單位即為品質管制單位。

NVL QC Organization chart



圖四、品質管制單位之組織圖

(二)登革熱疫苗之效價試驗

1. 效價試驗之前置作業

- (1) 細胞培養並放大至所需細胞數
- (2) 於 96 孔盤及深盤進行標記，依照不同感作濃度、實驗組別及血清型以不同顏色簽字筆標示(圖五)，以方便後續實驗之進行。

2. 效價試驗

(1)細胞之製備

取磷酸鹽緩衝液(Phosphate buffered saline, PBS)加入細胞培養瓶內，均勻搖晃洗去代謝物等物質，再加入胰蛋白酵素(trypsin)與 vero 細胞作用，待細胞與細胞培養瓶表面附著之蛋白分解後，加入細胞培養液(medium)中和 trypsin，終止其作用。將細胞培養瓶內所有細胞液取出至離心管並離心去除上清液，取少量 medium 回溶沉澱之細胞團，以電動吸管(Pipette Aid)來回吸取及排放，將細胞打散均勻使之成單顆狀態而非多顆聚集成團。

從均勻之細胞液中取出少量進行細胞計數，計算並製備出感作所需細胞濃度之細胞液，以電動八爪將製備好之細胞液加入 96 孔盤內，將 96 孔盤放入培養箱備用。

(2)病毒之製備

取適當氯化鈉溶液回溶疫苗檢體，於 96 孔深盤將檢體以 medium 進行序列稀釋，製備出各種稀釋階之檢體。

(3)感染作用

依照不同感作濃度、實驗組別及血清型之標記，以電動八爪將各稀釋階之疫苗檢體加入已有 vero 細胞之 96 孔盤中，之後置入培養箱進行感染作用。

(4)固定作用(Fixation)

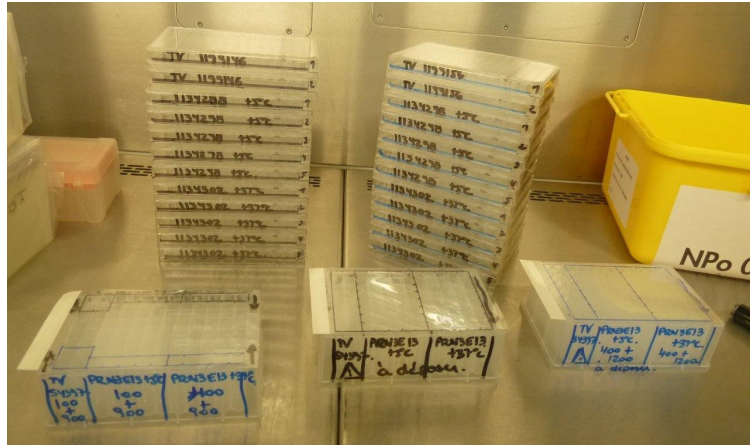
將 96 孔盤從培養箱取出，倒置 96 孔盤以移除病毒液，再以蠕動幫浦(peristaltic pump) (圖六)加入冰丙酮(aceton)於 96 孔盤(圖七)，之後將 96 孔盤放入-20°C 冰箱進行固定作用。固定作用結束後，先倒置 96 孔盤以移除丙酮液體，再將 96 孔盤放至排氣櫃(chemical hood)內抽乾(圖八)。

(5)病毒之專一性辨識作用

專一性辨識病毒之原理為酵素免疫分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)，利用抗體與抗原專一性結合之特性來辨識病毒抗原，如圖九。為了避免抗體之非專一性辨識，先以牛奶進行 blocking 作用，作用完後倒置 96 孔盤以去除牛奶液(圖十)，再將 96 孔盤於 PBS 反覆浸入並倒置以進行 washing(圖十一)，之後以電動八爪(圖十二)加入一級抗體(primary antibody)辨識細胞內之病毒，一級抗體反應完後，倒置 96 孔盤以去除一級抗體，以 PBS 進行 washing 後接著加入二級抗體(secondary antibody)以辨識一級抗體。二級抗體作用完以 PBS 進行 washing 並倒置 96 孔盤以清除多餘液體。

(6)呈色作用

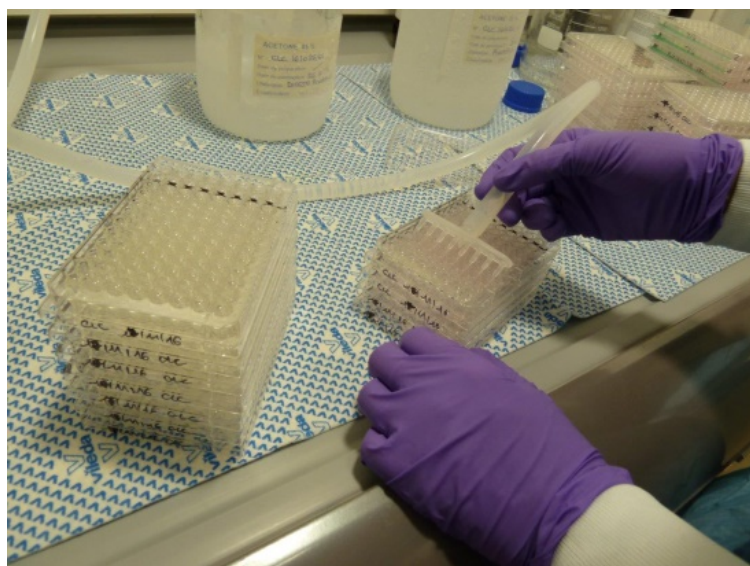
於 96 孔盤內加入受質(substrate)，二級抗體上之酵素會與受質反應，產生出黑色產物(圖十三、十六)，因此黑色為專一性辨識病毒之標記。



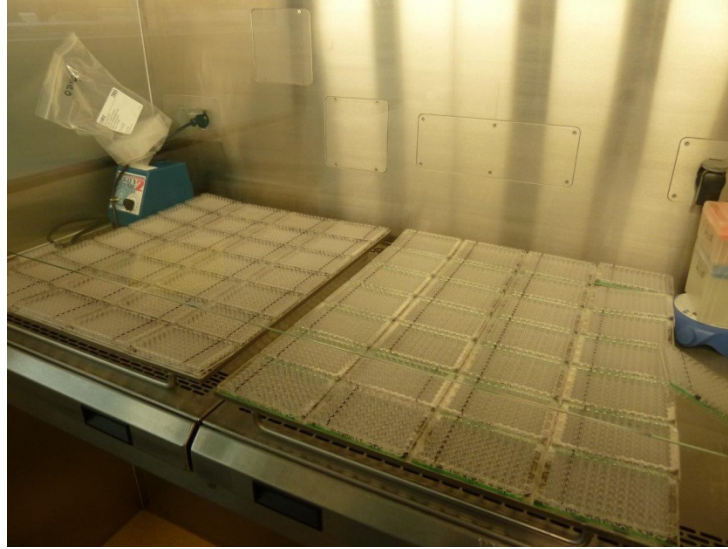
圖五、96 孔盤及深盤之標記



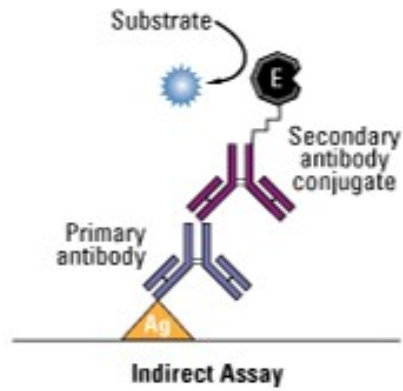
圖六、蠕動幫浦



圖七、以蠕動幫浦依序加入冰丙酮



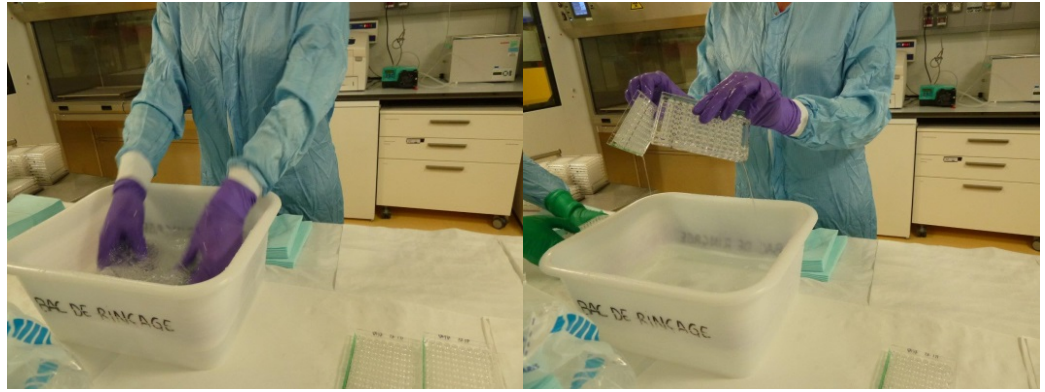
圖八、96 孔盤排列於排氣櫃內以抽乾殘留之丙酮



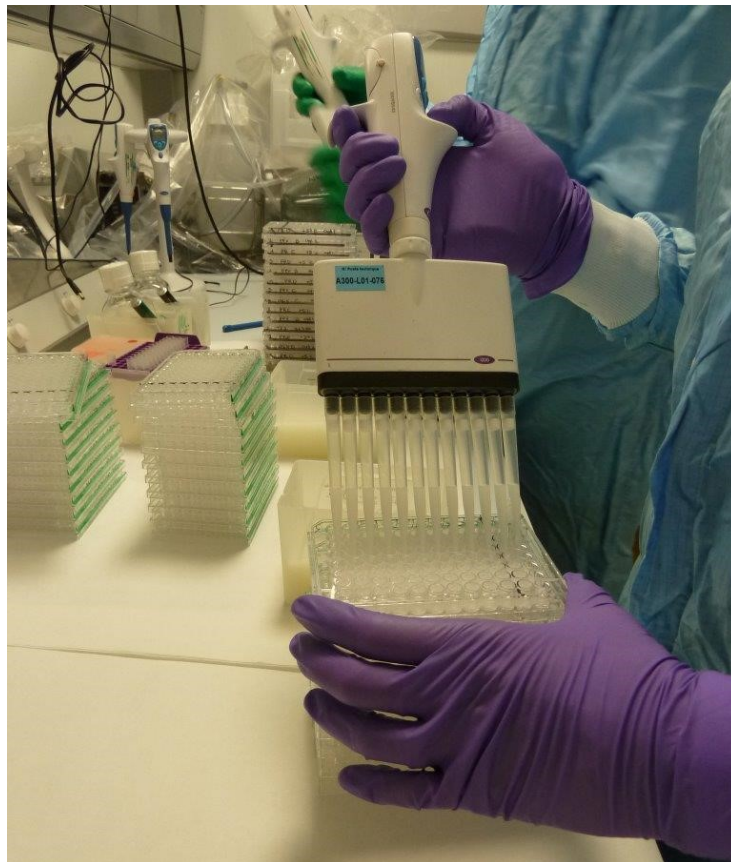
圖九、酵素免疫分析法示意圖(NeoloMed Laboratories)



圖十、將 96 孔盤倒置以去除孔內之液體



圖十一、以塑膠桶內之 PBS 進行 washing



圖十二、以電動八爪依序加入抗體等反應試劑

3. 效價試驗之結果分析

以肉眼或顯微鏡觀察(圖十四、十五)96孔盤中各組別及感作濃度之呈色結果，黑色為陽性，無染色則為陰性，將各組別及感作濃度之陽性數記錄下來，再依據 Spearman-Kärber 之分析方法計算各組別之 TCID₅₀。



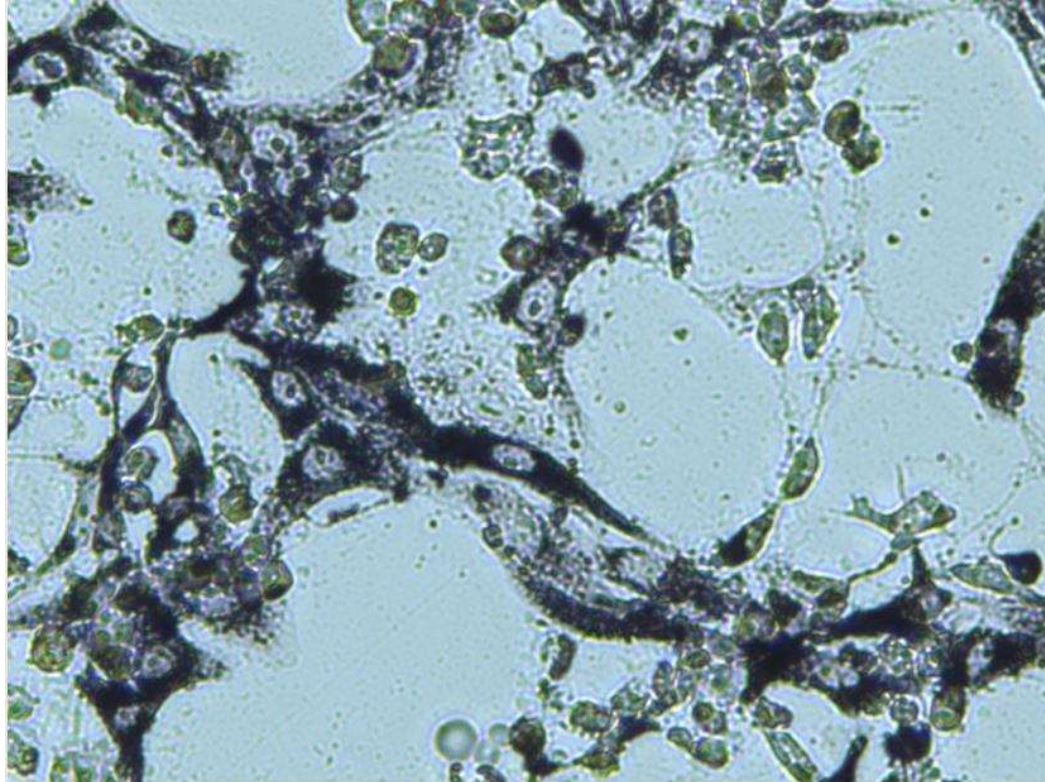
圖十三、96 孔盤內之黑色染色為病毒之專一性辨識



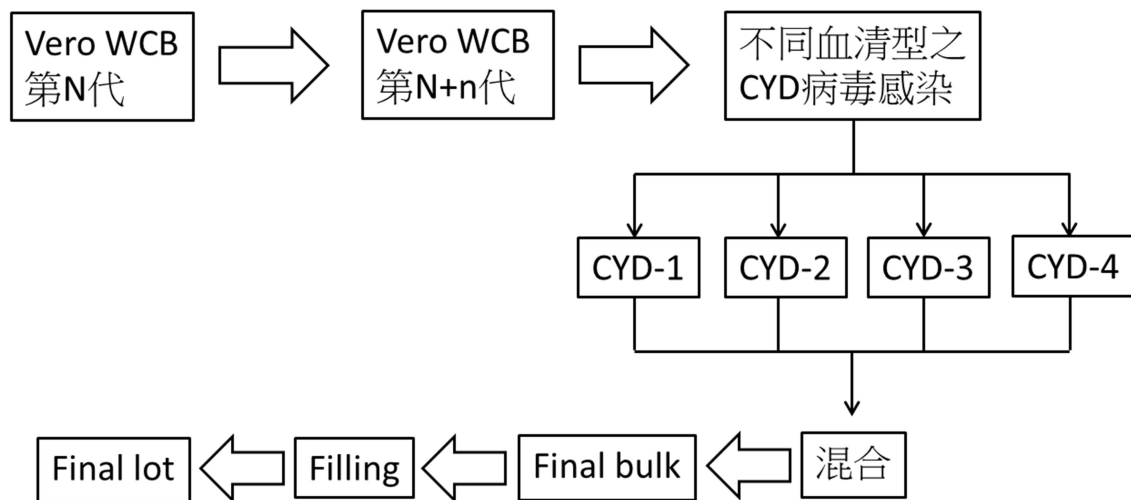
圖十四、顯微鏡觀察被專一性辨識並染色之病毒



圖十五、顯微鏡所觀察之影像可連結並顯示至電腦螢幕



圖十六、黑色之細胞質區為被專一性辨識並染色之病毒



圖十七、登革熱疫苗之製造流程

4. 結果分析之討論

由於登革病毒之增殖位於細胞質中，故因專一性辨識而呈色區域應顯示於細胞之細胞質區(圖十六)。結果判讀時，首先可利用肉眼直接觀察(圖十三)，少數孔內之呈色僅有 1-2 個黑色斑點，此時之判讀如有疑

慮需用顯微鏡觀察以避免偽陽性之誤判，針對此疑慮即時與品管人員進行討論，確認單一孔內如有一顆完整細胞之染色結果如圖十六即判定為陽性。

針對孔內之呈色僅有 1-2 個黑色斑點進行顯微鏡之觀察，發現多數僅為細胞碎片所導致。故認為改用螢光呈色方式或許可利於結果之判讀，經詢問該疫苗廠之品管人員，其表示螢光呈色不利於實驗結果之保存，故採用 alkaline phosphatase 之呈色方式。

另外，判讀過程亦發現極少數孔之細胞有少數細胞脫落，針對此情況之判讀標準即時與品管人員討論及溝通，其表示依照細胞脫落之程度進行判讀，例如某一孔有 1/2 之細胞發生脫落，剩餘 1/2 細胞判讀為陽性，則該孔之陽性判讀數應為：0.5，以此數值與其他孔之結果進行加總後，即為該稀釋階之陽性判讀結果。

針對結果之判讀已充分與品管人員溝通，且實際練習結果後與品管人員之判讀進行比對後，本署之結果判讀能力與疫苗廠品管人員無異。

(三)製造區之參訪

製造區參觀登革熱疫苗之製造流程說明如圖十七，分述如下：

1. Vero 細胞培養

從 Vero working cell bank 之細胞株開始培養，並利用生物反應器(Bioreactors)內之微載體(microcarrier)進行培養(圖十八、十九)。

生物反應器內之溫度、pH 值、氧氣分壓(pO_2)及旋轉速度皆會受到監控並記錄，以確保細胞有良好之增殖環境；微載體為直徑約 40~250 μm 之小圓球體，可使細胞貼附生長於其表面並增殖，微載體是藉由攪拌器而懸浮於培養液中，此法可提高貼附性細胞之產量。

Vero 細胞培養放大至足夠之細胞量後再以胰蛋白酵素(trypsin)處理，使 vero 細胞離開微載體之表面，離心去上清液後將沉澱之細胞回溶，計數細胞後製備出特定濃度之細胞液，以此作為後續培養病毒所需之細胞液。

2. Chimeric yellow fever-dengue (CYD)病毒增殖

根據適當之病毒感染劑量(Multiplicity of Infection, MOI)分別以不同血清型之 CYD 病毒(CYD-1, CYD-2, CYD-3 or CYD-4)感染 Vero 細胞以增殖病毒。

CYD 病毒於生物反應器內感染微載體上之 vero 細胞並增殖，其反應器內之溫度、pH 值、氧氣分壓(pO_2)及旋轉速度皆監控並記錄，培養數天後以過濾法過濾掉微載體、vero 細胞及細胞碎片將可得到病毒液。

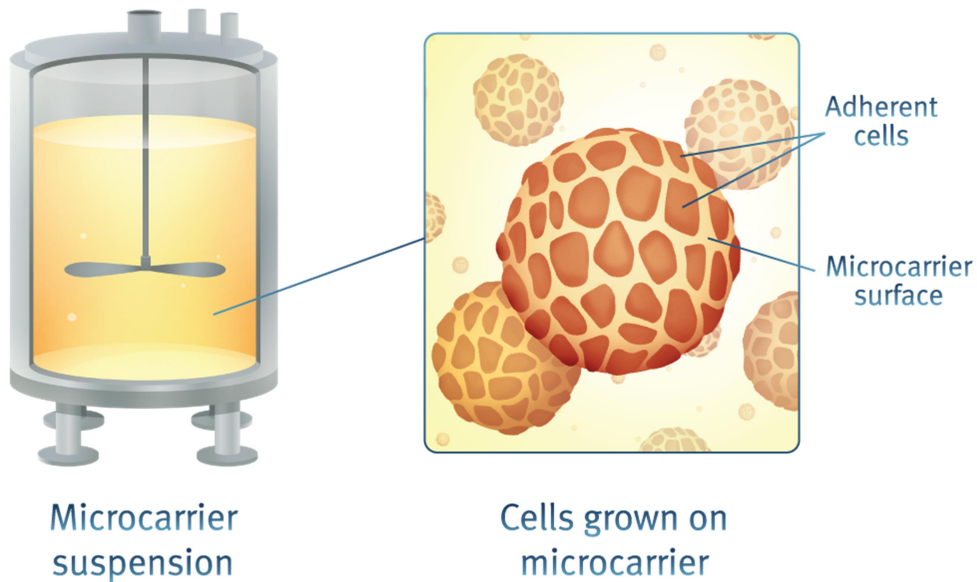
3. 純化

利用層析法以去除病毒液中之核酸，避免 vero 細胞 DNA 之污染，

並利用透析法濃縮病毒液。將各血清型之 CYD 病毒混合後得到登革熱疫苗之 final bulk，經過充填並冷凍乾燥後成為最終產品 Freeze-Dried Product (final lot)。



圖十八、生物反應器(Bioreactors)之示意圖(Cotter Brothers Corporation 官網)



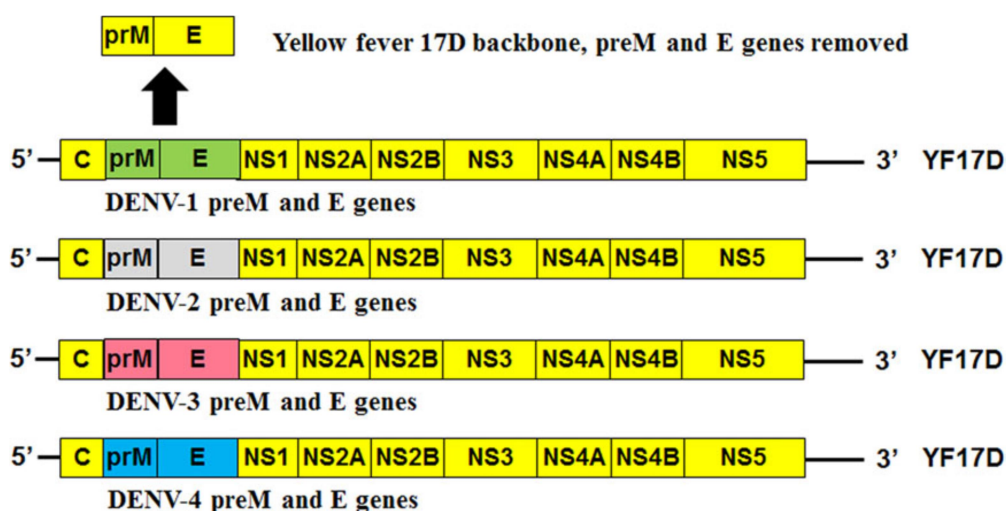
圖十九、微載體(microcarrier)之卡通示意圖(ChemoMetec 官網)

肆、心得與建議

(一) 登革疫苗研發原理

賽諾菲登革熱疫苗之研發原理是以減毒黃熱病病毒株 17D 之基因體作為骨架，將骨架上之 prM(Premembrane)與 E(Envelope)基因置換成登革病毒之相對基因，以此方式製造出 chimeric yellow fever-dengue(CYD) vaccine(圖二十)。而使用減毒黃熱病病毒株作為骨架之原因，文獻表示 YF17D 疫苗株為最有效及安全疫苗之一，其持久免疫力之特性使得它成為常見之活疫苗載體選擇(Robbert G, 2000)。

YF17D 疫苗株成為活疫苗載體之潛力，常見於與其它黃熱病病毒屬 prM 與 E 基因置換之應用案例，例如將 YF17D 骨架基因之 prM 與 E 基因置換成日本腦炎病毒之相對基因，所製成之日本腦炎嵌合病毒，於日本腦炎病毒感染小鼠之致死動物模式中，能夠引起日本腦炎專一性之中和抗體，並且提供優秀之免疫保護力 (Guirakhoo, 1999)。



圖二十、賽諾菲登革熱疫苗原理(Stephen J. Thomas, *Ann NY Acade Sci*, 2014)

(二) 登革疫苗製造之規範

世界衛生組織針對 4 價登革熱疫苗建立了規範指引 [Guidelines on the

quality, safety and efficacy of dengue tetravalent vaccines (live, attenuated), WHO TRS 979 Annex 2], 該指引清楚規範製造過程中之疫苗生產用細胞、病毒種批(種病毒庫及工作病毒庫)、單價病毒收集液(monovalent virus harvest)、最終四價原液(final tetravalent bulk)及成品應完成之各項檢驗項目。建議本署每年編撰之生物藥品檢驗基準可規劃納入登革熱疫苗之品目,以供各界參考。

而 4 價登革熱疫苗之規範指引大致架構如下:細胞培養由 master cell bank(種源細胞庫)依序繼代培養至 working cell bank(工作細胞庫)後需進行品管試驗包含附血性病毒(hemadsorbing viruses)試驗、致細胞病變等外來因子試驗及鑑別試驗(如 DNA 指紋圖譜),細胞培養至足夠數量後將作為培養病毒之細胞基質。各血清型之病毒培養分別依序由 virus master seed(種原病毒庫)、virus working seed(工作病毒庫)培養至單次收穫物(single harvest)後,亦需要進行無菌試驗、宿主細胞 DNA 殘留量試驗、鑑別試驗及效價試驗等品管試驗。

將通過品管試驗之各血清型登革病毒依適當比例濃度混合成 final tetravalent bulk,此批 final bulk 可添加穩定劑(stabilizer)等賦形劑,但不能影響到該疫苗產品之安全性及有效性之規定。final bulk 需進行之品管試驗包含動物血清蛋白殘留量試驗及無菌試驗。通過品管之 final bulk 充填後成為最終產品(final lot),final lot 需進行一系列之品管監控如外觀、pH 值、熱安定性、異常毒性試驗、無菌性試驗、鑑別試驗及效價試驗。

而賽諾菲登革熱疫苗之製造架構符合 WHO 之規範指引,且效價試驗亦符合 WHO TRS 979 Annex 2 所規定之方法 TCID₅₀ test,而研習人員之效價試驗結果判讀能力與賽諾菲品管人員無異,且本署 TCID₅₀ test 之結果分析與賽諾菲品管分析軟體亦無顯著差異,此次研習不僅收穫豐富且亦有助於本署檢驗技術之國際化。

(三) 疫苗放行相關制度

賽諾菲登革熱疫苗除了已於墨西哥、菲律賓、巴西、薩爾瓦多、巴拉圭及哥斯大黎加取得許可證之外，亦於歐盟、澳洲進行許可證之申請，目前尚處於申請階段。藉由本次研習也進一步瞭解歐盟批次放行之制度，其制度詳述如下：

歐盟已建立主管機關批次放行(Official Control Authority Batch Release, OCABR)網絡，該網絡包含 28 個歐盟成員國、3 個歐洲經濟區國家(挪威、冰島及列支敦士登)及 2 個與歐盟簽定 OCABR 特別協議之國家(瑞士及以色列)，其中有 13 個國家(英國、德國、法國、義大利、比利時、荷蘭、挪威、丹麥、瑞士、奧地利、波蘭、匈牙利、保加利亞)具有 Official Medicines Control Laboratory(OMCL)以進行批次放行檢驗，並對合格者核發批次放行證明書(Batch Release Certificate)，該證明在網絡成員國間是相互認可的，當每批次疫苗生產後、上市前，許可證持有者會將適量檢體及相關審查文件送至 OMCL 進行批次放行檢驗，於大部分成員國上市時，會被要求出具 OMCL 發放之批次放行證明書，而少部分成員國(丹麥、瑞典、冰島)則不要求出具批次放行證明書。

而我國亦依據世界衛生組織之建議，建立疫苗等生物藥品之批次放行系統，稱為檢驗封緘，當每批次疫苗生產後、上市前，食藥署會派員前往進行抽樣(非歐盟制度中由許可證持有人自行送樣)，待批次放行檢驗合格後，會對其核發封緘證明書，之後與歐盟制度有所不同處，是我國會於產品外包裝加貼藥物檢查證，以方便民眾辨識檢驗合格之產品。

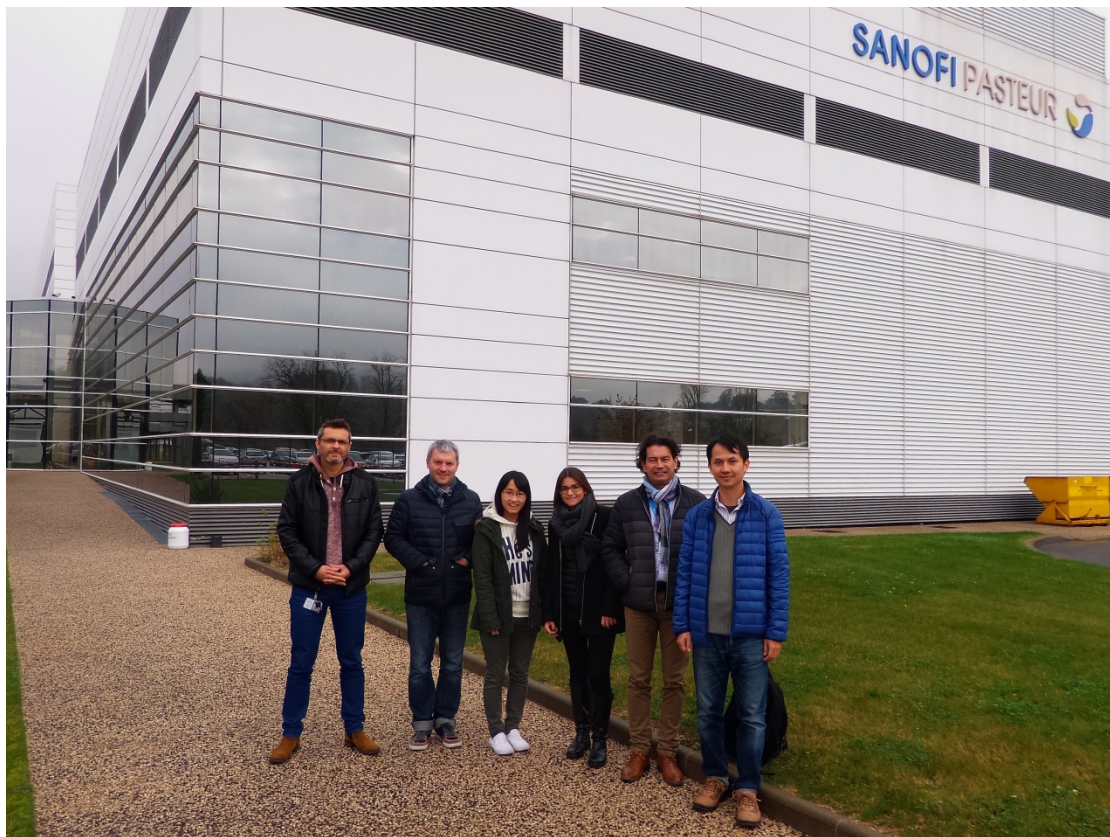
(四) 登革疫苗效價試驗

本次研習登革熱疫苗之效價試驗，其中效價試驗結果之判讀極需經驗，賽諾菲資深品管人員先解說肉眼判讀要領，當肉眼判讀無法確定時，再以顯微鏡觀察確認，因為登革病毒只在細胞質複製，因此在顯微鏡觀察下，可明顯看出黑色染於細胞質的部分(圖十六)，此為對登革病毒專一性辨識的結果，可藉此判定為陽性，此外，亦可排除因細胞碎片被非專一性辨識而呈黑色所造成之偽陽性結果。

研習人員實際依此要領判讀，所得結果再經由賽諾菲品管人員確認，確保研習人員判讀能力與原廠品管人員並無差異，對於新興生物藥品建驗技能之提升有相當大的助益。

(五) 未來展望

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。



圖二十一、研習人員與賽諾菲巴斯德諾伊維爾疫苗製造廠之品管人員合影