

出國報告（出國類別：其他—國際會議）

## 參加 2017 年「次世代定序技術應用於 生物製劑外來病原檢測研討會」

服務機關：衛生福利部食品藥物管理署

姓名職稱：巫博智技士

派赴國家：美國

出國期間：中華民國 106 年 10 月 25 日至 10 月 29 日

報告日期：中華民國 107 年 01 月 09 日

## 摘要

外來病原檢測為生物製劑品質管制不可或缺的檢驗項目，通常透過動物試驗法或細胞培養法來進行檢測，然而，礙於傳統方法不易檢測出特定病原體及鑑別出未知病原體，且過去研究曾發現輪狀病毒疫苗存有豬環狀病毒核酸片段等事件，因此，次世代定序(Next generation sequencing, NGS)技術運用於生物製劑外來病原檢測受到高度重視，各研究機關、製造廠及藥品管制實驗室紛紛投入相關研究及標準方法建立。2013年世界衛生組織(WHO)所屬之生物製劑標準化專家委員會(Expert Committee for Biological Standardization, ECBS)更將次世代定序技術納入 WHO 正式文件中，以規範相關技術運用於生物製劑外來病原檢測，確保該類產品品質安全。

本次「次世代定序技術應用於生物製劑外來病原檢測」研討會是由生物製劑標準化國際聯盟(International Alliance for Biological Standardization, IABS)與美國食品藥物管理局(FDA)於 106 年 10 月 26 日至 10 月 27 日於美國藥典委員會(USP)總部辦理，透過會議邀集各藥廠、學術單位及相關法規單位專家共同討論次世代定序技術運用外來病原檢測之議題，讓衛生主管機關瞭解製造廠研發生產時所面臨的難處，同時也讓製造廠理解主管單位審查時所關注的重點，使相關管理規定之制定能更切合實務，期能加速次世代定序檢測方法標準化之建立。藉由參與本次會議獲取國際間次世代定序技術檢測新知及相關運用發展，將持續深入了解並運用於生物藥品品質管理，並與國際接軌。

## 目次

壹、	前言與目的.....	4
貳、	行程及工作紀要.....	6
參、	會議內容重要摘錄.....	7
	一、次世代定序分析觀點概況.....	7
	二、次世代定序技術標準化及方法確效.....	12
	三、次世代定序技術運用於外來病原檢測之參考物質建立.....	18
	四、次世代定序技術相關運用.....	22
肆、	心得與建議.....	24

## 壹、 前言與目的

疫苗是由細菌、病毒或培養細胞等生物體所製成的生物製劑，因其抗原分子結構複雜，再加上疫苗中佐劑或保藏劑皆會影響疫苗品質及效力，因此每批生產出之疫苗具有高度批次間異質性，為確保該類產品品質安全，其原料來源、製造過程、製程管制及製程確效等步驟皆須加以管控。由於動物細胞基質(cell substrate)或胚胎蛋(embryonic egg)等疫苗抗原生產來源易受外來病原體污染，因此進行外來病原檢測為品質管制不可或缺的步驟。常見的外來病原檢測通常是透過動物試驗法或細胞培養法來進行檢測，然而，礙於這些傳統方法不易檢出特定病原體及檢測未知病原體，再加上 2010 年利用總體基因體學(metagenomics)方式研究活病毒疫苗，發現輪狀病毒疫苗中存有豬環狀病毒核酸片段等事件，自此，次世代定序(NGS)技術運用於生物製劑外來病原檢測受到高度重視，各研究機關、製造廠及藥品管制實驗室紛紛投入相關研究及標準方法建立。2013 年世界衛生組織(WHO)所屬之生物製劑標準化專家委員會(Expert Committee for Biological Standardization, ECBS)更將次世代定序技術納入 WHO 正式文件中，以規範相關技術運用於生物製劑外來病原檢測，確保該類產品品質安全。

生物製劑標準化國際聯盟(International Alliance for Biological Standardization, IABS)係為世界衛生組織所屬生物製劑標準化專家委員會之技術性質非營利國際組織，由各國執掌疫苗、血液製劑等生物製劑管理之國家管制實驗室(National Control Laboratory, NCL)及產學界等技術專家所組成，其使命係以科學方法建立人用或動物用生物藥品研發、製造、品管之全球標準化規範。IABS 每年皆會舉辦生物製劑檢驗技術相關國際性研討會，邀集產業界、學術界及各國衛生主管機關等專家與會分享，共同研提各項最新技術及相關管理規範，供世界衛生組織建立相關產品及品質檢驗的國際標準。106 年 10 月 26 日至 10 月 27 日 IABS 與美國 FDA 於美國藥典委員會(USP)總部共同舉辦「次世代定序技術應用於生物製劑外來病原檢測」研討會，參與成員包括學術界、製造廠及各衛生主管機關等專家。本研討會係就次世代定序技術應用於生

物製劑外來病原檢測進行討論，內容涵蓋次世代定序分析之觀點概況、次世代定序技術標準化及方法確效、參考物質建立及次世代定序技術之相關運用。藉由會議中來自各國衛生主管機關及相關領域專家聚集討論，研擬解決現階段面臨之問題，期能降低各實驗室間次世代定序檢測方法之差異性，以加速方法標準化之建立。本次奉派參與此次研討會，期能達成以下目的，

- 一、瞭解次世代定序技術運用於生物製劑外來病原檢測之發展及面臨之挑戰。
- 二、瞭解國際上如何進行次世代定序技術標準化及方法確效等議題。
- 三、瞭解先進國家對於次世代定序技術運用於生物製劑外來病原檢測之管理規範研擬，以作為我國未來生物製劑外來病原檢測技術基準規範研擬之參考，持續與國際接軌。

## 貳、 行程及工作紀要

日期	工作紀要
10月25日	啟程(台北→東京→美國華盛頓 DC→羅克維爾)
10月26日	<p>報到/參加「次世代定序技術應用於生物製劑外來病原檢測研討會」</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 開場介紹 (Speaker : IABS 之 Dr. Pleter Neels 及美國 FDA 之 Arifa Khan)</li> <li>● Current Perspective on NGS (Speaker : Arifa Khan 等 5 位講者; 主持人 : Philip Minor 及 Knezevic)</li> <li>● Efforts on NGS standardization for virus detection (Speaker: Ed Mee 等 5 位講者; 主持人 : Laurent Mallet and Guanhua Wang)</li> </ul>
10月27日	<p>參加「次世代定序技術應用於生物製劑外來病原檢測研討會」</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● NGS application for biologics (Speaker: Eric Delwart 等 5 位講者; 主持人 : Dieter Deforce 及 Dietmar Mayer)</li> <li>● Current virus detection assays and NGS (Speaker: Marc Eloit 等 4 位講者; 主持人 : Johannes Blumel 及 Luca Benetti)</li> <li>● Panel discussion</li> </ul>
10月28日	返程(羅克維爾→美國華盛頓 DC→東京)
10月29日	返程(東京→台北)

## 參、會議內容重點摘要

本次會議由 IABS 與美國 FDA 於美國藥典委員會總部共同舉辦「次世代定序技術應用於生物製劑外來病原檢測」研討會，會議為期兩天，會議主席由 IABS 的 Dr. Piter Neels 及美國 FDA 的 Dr. Arifa Khan 擔任，首先由主席介紹會議主軸，接著邀集各方專家演講分享，並針對每一項主題進行討論，本次會議為期兩天，內容涵蓋次世代定序分析之觀點概況、次世代定序技術標準化及方法確效、參考物質建立及次世代定序技術之相關運用。

### 一、次世代定序分析觀點概況

#### (一) 次世代定序(Next generation sequencing, NGS)

NGS 又稱為第二代定序或高通量基因定序法，建構在第一代定序方法基礎上所開發的定序方法，隨著人類基因體計畫，第一代定序之低通量、高成本及耗時長等缺點不足以因應計畫的進行，進而 NGS 技術開始出現並蓬勃發展。近年來，NGS 技術廣泛地運用於臨床檢測，加速精準醫療之實現。亦被運用於生物製劑外來病原(adventitious agent)檢測，檢測產品是否未受外來病原體污染，確保相關產品之品質安全。NGS 定序平台之基本原理及操作流程，主要可分為樣本庫製備(library preparation)、樣本庫擴增(library amplification)、定序反應(sequencing reaction)及數據分析(data analysis)等四個步驟。

##### 1. 樣本庫製備(library preparation)

將待測之樣品經核酸萃取後，利用物理性方法(如超音波震盪法)或酵素裁切等方式將基因序列進行核酸片斷化(fragmentation)。這些短片段基因序列之末端再接上轉接子(adaptor)，以作為樣品庫。

##### 2. 樣本庫擴增(library amplification)

藉由基因片段上的轉接子會與微磁珠(micro-beads)或晶片上的互補序列相結合，而固定於固相介質上，進行乳化聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)或橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)。乳化聚合酶鏈鎖反應係指欲放大之模板 DNA 均勻分散

至油滴中，每個油滴中含有球狀微粒，藉由球狀微粒中的引子及聚合酶醱素及試劑進行聚合反應。而橋式聚合酶連鎖反應藉由將擴增之 DNA 片段聚集於晶片表面，以快速擴增單一 DNA 片段。

### 3. 定序反應(sequencing reaction)

次世代定序法依不同的定序平台有不同的定序原理。Roche 454 定序平台是運用焦磷酸定序法(pyrosequencing)來定序的，過程中依序置入帶有 4 個不同鹼基的去氧核苷酸，當核酸聚合酶將去氧核苷酸接合時，釋出焦磷酸根離子(pyrophosphate)，釋出的焦磷酸根因 ATP 硫酸酶(ATP sulfurylase)轉換產生 ATP，藉由冷光酶(luciferase)接收 ATP 能量將冷光素(luciferin)進行氧化，最後由感測器測得訊號，透過反覆的試劑置換與偵測，得到大量定序的結果。Illumina HiSeqX 定序平台則是藉由 reversible terminator 的定序原理。將帶有螢光標記的去氧核苷酸進行接合反應，當去氧核苷酸接上正在合成的 DNA 片段，螢光分子會釋放，藉由反覆進行獲得大量定序結果。另外亦有運用接合性定序反應(sequencing by ligation)取代傳統聚合酶接合反應。

### 4. 數據分析(data analysis)

將定序後的大量資訊與現有的資料庫進行比對(mapping)及計數(counting)的分析，設法還原出原始待測基因片段序列。

## (二) WHO 次世代定序技術指導原則

疫苗類產品因異質性高且製程中易遭受外來微生物或其他病毒的汙染，若僅依賴最終產品品質檢測難以確保該類產品品質及一致性，因此，原料來源、製造過程、製程管制、製程確效及安定性試驗等皆須加以管控。2010 年 WHO 出版「Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks」，將疫苗抗原來源使用之動物細胞基質納入品質安全評估，包括種細胞庫(master cell bank, MCB)及工作細胞庫



(working cell bank, WCB)之致瘤性(tumorigenicity)、致癌性(oncogenicity)及外來病原(adventitious agents)汙染等安全性評估，並引入細胞培養優良規範(good cell culture practice)概念，以確保該類產品品質安全。

由於動物細胞基質或胚胎蛋等疫苗抗原來源易遭外來病原體汙染，因此，對於該類產品執行外來病原檢測為品質管制不可或缺的步驟。常見的外來病原檢測係透過動物試驗法或細胞培養試驗法來進行檢測，然而，這些方法卻不易偵測出非細胞病變作用(non-cytopathic effect, non-CPE)或非致病性(non-pathogenic)的病原體，例：豬環狀病毒(porcine circovirus)因不易產生細胞病變，於例行性的外來病原檢測中不易被檢出。2010 年美國學術單位運用次世代定序方法發現口服輪狀病毒疫苗中含有豬環狀病毒核酸片段，引發各國衛生主管機關調查等情事，甚至要求相關產品暫停銷售。自此，次世代定序方法運用於生物製劑外來病原檢測受到高度重視，於 2013 年經 WHO 所屬之生物製劑標準化專家委員會(Expert Committee for Biological Standardization, ECBS)將次世代定序技術納入 WHO 文件中，透過此項技術針對特定生產使用之細胞基質進行基因體穩定性監測，確保生產用細胞之均質性，並運用於生物製劑外來病原檢測，確保該類產品品質安全。

### (三) 美國 FDA 次世代定序技術管理概況

隨著生物科技蓬勃發展，疫苗等生物製劑製程也漸漸改變，例如運用連續細胞株(continuous cell line)、細菌質體表現系統(bacteria plasmid expression system)及桿狀病毒表現系統(baculovirus expression system)等方式來進行疫苗生產。由於製程方式的改變，傳統的外來病原檢測方法已不再完全適用，如細胞培養方法受限於病毒本身特性，當病原體本身不易對培養的細胞產生細胞病變作用(CPE)，將不易偵測出是否有外來病原體汙染。另外，傳統的分子生物檢測方式較難分析及檢測出未知病原體，因此，若有新外來病原體之汙染，則不易被發現，因此次世代定序技術等外來病原新興檢測技術開始受到重視。美國 FDA 特別頒布技術指引，提供製造廠進行外來病原檢測之參

考及應注意事項，指引內容包括更新現有的檢測方法，並提供新興外來病原檢測技術之建議，提升外來病原偵測能力，避免遭受外來病原污染之產品流入市面，確保用藥安全。

除此之外，美國 FDA 更與國際無菌製劑協會(Parenteral Drug Association, PDA)及各製造廠合作成立新興病原檢測技術利益團體(advanced virus detection technologies interest group, AVDTIG)，AVDTIG 成立宗旨是提供一個平台供各方專家進行討論，以精進次世代定序技術運用於外來病原檢測之分析方法。目前已超過 100 位專家投入參與，並固定時間舉行會議討論。AVDTIG 分為五個任務小組(subgroup A、subgroup B、subgroup C、subgroup D 及 subgroup E)，各小組之任務分別如下，

1. subgroup A: 次世代定序平台差異性比較及檢品基質效應評估
2. subgroup B: 標準病毒及參考物質之建立
3. subgroup C: 軟體分析及完整之參考病毒資訊資料庫建立
4. subgroup D: 生物資訊管道(bioinformatics pipeline)分析標準建立
5. subgroup E: 後續結果之追蹤分析方法流程建立

各小組成員分別針對任務進行合作並定期舉行討論會議，希冀能解決現階段面臨之問題，加速次世代定序應用於生物製劑外來病原檢測標準化之建立。

#### (四) 次世代定序技術運用於生物製劑外來病原檢測面臨的挑戰

次世代定序技術可同時對大量的短片段進行快速定序，且樣品不需經質體複製就能進行定序，減少複製過程可能出現的錯誤率。將定序出來的資料與已建立好的基因資料庫進行搜尋比對，得知定序出來的核酸片段來自哪個病原體。然而，次世代定序平台、使用之化學試劑及數據分析軟體具多樣性，加上生物資料庫不斷推陳出新，不同實驗室可能因使用不同的定序平台或資料庫分析，實驗結果就有所不同，甚至同實驗室間每次分析的結果也不致於完全相同，因此，該方法尚有許多須解決之地方。其面臨的挑戰大可區分為以下三點，

## 1. 方法標準化及方法確效

由於次世代定序技術複雜且不斷推陳出新，各家定序平台的靈敏度及精確度存在著差異，再加上各實驗室間對檢品處理方式不同及檢品本身之基質效應等原因，造成實驗結果不一致性，導致方法確效執行及標準化建立之困難。現階段美國 FDA 與各製造廠間進行次世代定序技術共同標定研究，利用各製造廠間 in-house method 分別進行 virus spiking 研究，比較各定序平台之差異性，以瞭解分析方法系統適用性之評估，並積極建立標準病毒與參考物質，以便方法標準化之建立及方法確效之執行。

## 2. 生物資訊(bioinformatics)

由於次世代定序結果訊號仰賴軟體分析確認及序列拼裝，拼裝後之序列再與現有資料庫進行比對分析，以得知原待測之病原體。因此。資料庫資訊完整性及數據解讀將是優先解決之課題。除此之外，對於方法的轉移 (method transfer)及資料數據儲存(data storage)亦是各國努力克服解決之重要課題。

## 3. 後續研究(follow-up study)

後續研究的議題為次世代定序技術面臨的最大的挑戰，當發現有正向訊號(positive signal)時，要如何利用其他的分析方法驗證訊號是否為真，及證實訊號為真後，如何探討該污染物風險來源將是後續研究待解決之議題。

## 二、次世代定序技術標準化及方法確效

### (一) 方法標準化-歐洲藥典篇章

目前歐洲藥典收載外來病原檢測相關篇章有 3 篇，分別為，

#### 1. <50203> cell substrates for the production of vaccines for human use

此篇章主要概述人用疫苗抗原生產使用之細胞基質，內容涵蓋種細胞(cell seed)、種細胞庫系統(cell-bank system)、細胞基質穩定性(cell substrate stability)及外來病原物質(infectious extraneous agents)等部分。2017 年歐洲藥典第 9.3 版中針對外來病原物質內容部分進行修訂，增修訂內容分別如下，

- (1) 外來病原物質(infectious extraneous agents): 於外來病原物質檢測中增修訂分子檢測方法，如:次世代定序技術(massive parallel sequencing, MPS)、degenerative PCR 及微陣列分析(microarray)等 (圖一)。
- (2) 細胞株檢驗(Testing of cell lines): 種源細胞庫、生產細胞庫新增 mycobacteria 及 spiroplasmas 檢測。
- (3) 「Test in animals」、「Test in eggs」及「Test for specific viruses」部分增修技術細節。

**Infectious extraneous agents.** Cell lines for vaccine production shall be free from infectious extraneous agents and a testing strategy must be developed based on a risk assessment. One such strategy is given in Table 5.2.3.-1, but alternative strategies could focus on more extensive testing at the MCB or WCB level. In any case, any strategy must be justified and lead to the same level of safety as outlined in Table 5.2.3-1. New, sensitive molecular techniques with broad detection capabilities are available, including massive parallel sequencing (MPS) methods, degenerate polymerase chain reaction (PCR) for whole virus families or random-priming methods (associated or not with sequencing), hybridisation to oligonucleotide arrays and mass spectrometry. These methods may be used either as an alternative to *in vivo* or specific NAT tests or as a supplement/alternative to *in vitro* culture tests, in agreement with the competent authority. If positive results are obtained with either broad molecular methods or NAT tests, a follow-up investigation must be conducted, in agreement with the competent authority, to determine whether detected nucleic acids are due to the presence of infectious extraneous agents and/or are known to constitute a risk to human health. For cell lines of insect origin, tests

圖一、歐洲藥典 5.2.3 新增修訂內容(資料來源:會議資料)

## 2. <20616> Tests for extraneous agents in viral vaccines for human use

此章節主要概述人用病毒性疫苗產品進行外源病原檢測，自 2010 年口服輪狀疫苗檢測出含有豬環狀病毒片段之外來病原，次世代定序技術運用於於活性減毒病毒疫苗受到高度重視，編修內容如下

- (1) 外來病原物質檢測增修訂新興分子檢測方法，如次世代定序技術，以提高未知病原體探知之可能性。
- (2) 增加需執行外來病原檢測之細胞基質種類，如:VERO、MRC5、HeLa、MDKC、A549、BT、RK13 及 CHO cell 等。要求這些常用於生產病毒疫苗之細胞基質執行外來病原檢測。
- (3) 新增加 mycobacteria 及 spiroplasmas 檢測。
- (4) 修正章節結構，段落結構本以「生產階段(stage of production)」來作區分，改以「建議執行檢測項目(recommendations on the tests to be performed)」來作區分。

## 3. <50214> Substitution of in vivo method(s) by in vitro method(s) for the quality control of vaccines

此為新修訂之章節，內容概述傳統之外來病原檢測仰賴動物試驗法，該方法執行試驗時間較長且不易發現未知病原菌。而次世代定序等新興技術可同時對不同樣本進行分析，縮短分析時程，且可鑑知是否有未知病原菌之污染，因此，該技術成為外來病原檢測的一項重要技術。次世代定序技術係運用定序出來的不同序列片段，將定序片段與資料庫進行比對，找出其病原菌，然而，本章節於後段敘述中強調利用次世代定序方法定序出某片段的的存在，並不能完全確認病原菌之存在，仍需進行感染試驗(infectivity assay)來證明病原菌是否具有活性及可能造成之風險。

## (二) 分析方法確效

分析方法確效係指進行相關試驗及佐證以評估該分析方法之適用性，確認該分析方法符合預期目的，而評估時需導入風險評估概念，訂定確效指標，作為判定之規格，又稱為允收標準(acceptance criteria)。根據 ICH Q2A 及 Q2B 之內容，藥廠製造藥物時應針對藥品分析方法予以確效，確效時，須加以考量內容確效研究的特定項目及確效指標。有鑒於次世代定序技術逐漸被運用於生物製劑外來病原檢測，其分析結果之影響力日益增加，該分析方法之確效將是當前各製造廠或主管機關持續面臨的挑戰，本次會議中，由 Dr. Siemon Ng 分享目前製造廠如何進行該分析方法之方法確效，以及針對哪些特定步驟及分析項目應予以注意，並針對面臨之困難予以討論。

### 1. 分析方法確效計畫

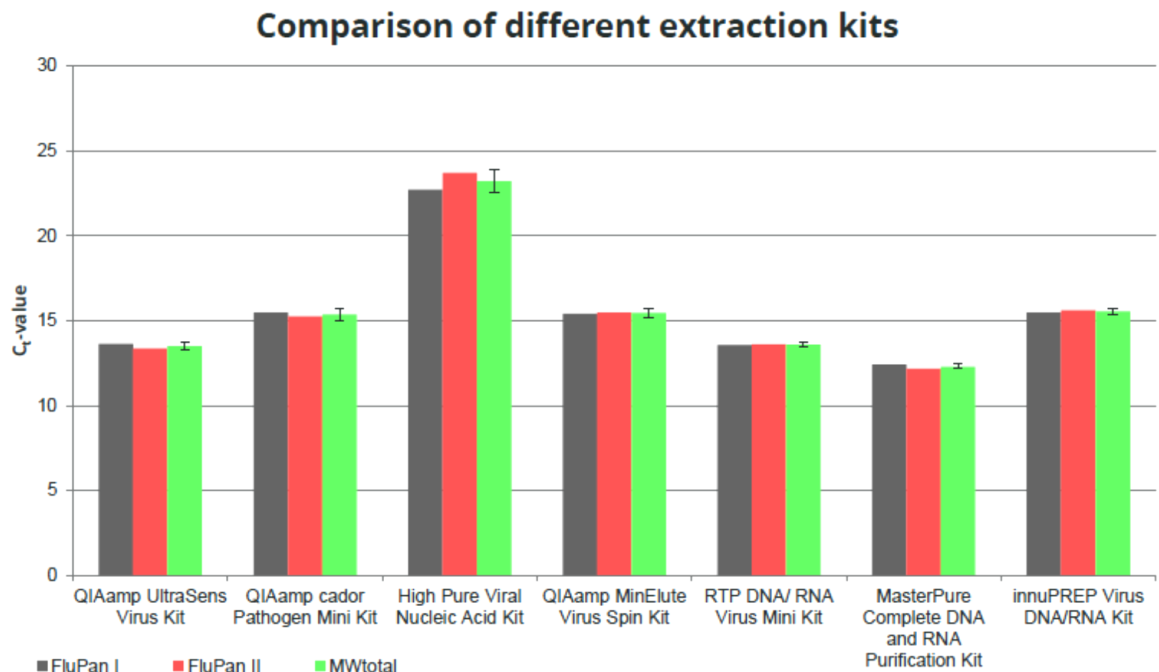
次世代定序技術檢測外來病原為一個複雜的分析方法，其檢測流程包含多個實驗步驟，依主要關鍵性之步驟，將方法確效計畫分為「樣本製備(sample preparation)」、「機器設備(equipment)」、「軟體確效(validated software)」、「系統平台確效(validated computing platform)」及「解讀分析(analysis interpretation)」等步驟，而每步驟所關注的特定項目詳列如圖二，

Sample Preparation	Equipment	Validated Software	Validated Computing Platform	Analysis / Interpretation
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sample handling</li> <li>• Nucleic extraction</li> <li>• Controls</li> <li>• Barcoding</li> <li>• Library preparation</li> <li>• Sample flow</li> <li>• Personnel flow</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermocycler</li> <li>• Bioanalyzer</li> <li>• Sequencer</li> <li>• Misc. Lab Equip.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PhylolD (in-house)</li> <li>• Sequencer Software</li> <li>• Big Data analysis</li> <li>• Database</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Computing cluster</li> <li>• Big-Data storage</li> <li>• Archiving</li> <li>• Data transfer</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SMEs (Molecular / Virology / Bioinformatics)</li> <li>• Follow-up design</li> <li>• Investigations</li> <li>• Report generation</li> <li>• Regulatory submission</li> </ul>
Security, Audit trail 21 CFR Part 11 Compliant				
<b>GMP Quality</b>				

圖二、分析方法確效計畫流程(參考來源:會議資料)

### (1) 樣本製備

樣本製備為次世代定序分析之第一步驟，就步驟中易產生分析結果不一致之環節為方法確效關注項目之優先考量。核酸萃取為樣本製備重要關鍵，其所萃取出來的含量及品質將影響後續樣本擴增之品質，目前市售之核酸萃取套組有 7 種，但不同核酸萃取套組萃取效率皆不一致(圖三)，故訂定接受之確效指標將是重要的課題。另外，樣本庫擴增時所使用之引子(primer)、轉接子(adpater)及生物條碼(biological barcode)將影響擴增之效率，亦是方法確效關注項目。



圖三、核酸萃取套組萃取效率比較(參考來源:會議資料)

## (2) 機器設備

目前市售的定序反應機器多樣化，有 Roche 454、Illumina HiSeqX 等定序平台，各定序平台差異比較詳如表一。

	454	Illumina	Life technologies
代表公司	Roche	HiSeqX	SOLiD
定序原理	Pyrosequencing	Reversible terminators	Ligation
擴增方法	Emulsion PCR (in vitro)	Bridge PCR (in vitro)	Emulsion PCR (in vitro)
單一反應讀取長度 (bp)	600-1000	36-250	50-75
準確度	99%	99.9%	99.9%
最大產出數據(bases pair reads/day)	700Mbp	900Gbp	320Gbp
定序費用 (USD/million bp)	9.5-40	0.07-0.23	0.07-0.13

表一、定序平台差異比較表(參考來源:整理自會議資料)

雖各廠牌定序平台運用之定序原理稍有不同，但若機器設備經確效後皆可使用，常見確效項目則包括熱循環器(thermocycler)、生物分析器(bioanalyzer)、定序儀(sequencer)及相關實驗設備等項目。

## (3) 軟體確效及系統平台確效

次世代定序結果訊號需仰賴軟體分析確認，確認符合分析所需之品質後，再進行後續之序列拼裝(contig mapping)，拼裝後的序列與現有之系統資料庫進行比對分析，得知原待測之病原體。因此，定序結果或組合序列的品質管



控為重要的一環，關係到分析結果之有效性及準確性。而定序結果或組合序列決定於軟體及系統平台，因此軟體及系統平台確效為不可或缺之步驟，其確效考量目前軟體或系統使用的版本、測試目的、輸入或輸出規格及環境需求等項目，並引進風險評估概念來進行測試確效，以確保維持正常功能。

#### (4) 解讀分析

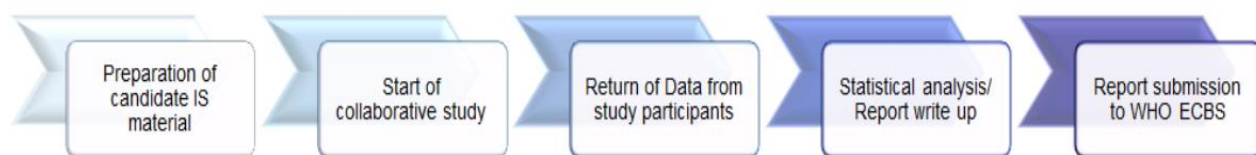
在次世代定序技術分析中，解讀分析將影響結果之註解及後續比較基因體學的分析，常見的解讀方式則是將次世代定序資料與資料庫進行分析比對，因此資料庫的定期更新及確效為必要的。然對於新物種的解讀，不只是比對序列資料庫而已，必須要重視所有處理資料及步驟的品質，對每個步驟所產生的衍生性資料，都要確實檢驗，確認是否有達到品管的要求，以作為後續研究(follow-up study)之基礎。例如對於新物種之全基因體解讀，除檢視序列組合長度分佈外，還會用原始定序序列再比對率(remapping ratio)、基因預測狀況(包含基因數目、基因長度、外顯子數量分佈、與相近物種之基因差別大小、新穎基因的數量、及基因的鹼基比例等)來進行精細的評估，並考量是否有外來物種污染之影響，對定序結果進行解讀分析，若這些結果與預期之範圍差異甚大，可能表示定序結果或序列組合並不理想。

### 三、次世代定序技術運用於外來病原檢測之參考物質建立

建立次世代定序技術標準化的作業流程必須具有代表性之參考物質，以作為不同定序平台間實驗結果的比較參考。目前英國國家生物標準品暨管制研究所（National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC）正著手建立適用於次世代定序之參考物質，此參考物質是由已知的多種病毒組成一個病毒核酸套組，運用此套組來確定檢品中特定病毒或特定病毒類型的偵測極限(limits of detection, LOD)。

建立生物性標準品一直以來皆是重要的課題，隨著新興生物科技的發展及藥物市場的需求，生物性藥品近年來為藥品市場主要需求，因生物性藥品不同於傳統化學合成藥品，其藥品本身結構及製程等皆比化學合成藥品來得複雜，因此，若僅進行物化特性分析是不足以確保該類產品品質安全，必須進一步進行生物測定法(bioassay)進行品質評估，而參考依據就得依賴生物性標準品來比較參考。生物性標準品之建立流程大致可分為以下五個步驟(圖四)，

- (1) 製備國際性候選標準品
- (2) 共同標定研究
- (3) 標定實驗室之實驗結果收集
- (4) 數據分析及報告撰寫
- (5) 送生物製劑標準化專家委員審查



圖四、生物性標準品製備流程簡圖(資料來源:NIBSC 官方網頁)

次世代定序生物性標準物質之建立為該技術標準化重要的環節。若能建立一個運用於外來病原檢測之參考物質，將可作為不同次世代定序檢測平台間的比較參考依據，瞭解各平台間的差異性，以便建立該技術的標準化作業流程。多重病毒核酸套組(Viral multiplex 11/242-001)本欲為多重病毒聚合酶鏈鎖反應之對照試劑套組，然而，因其無

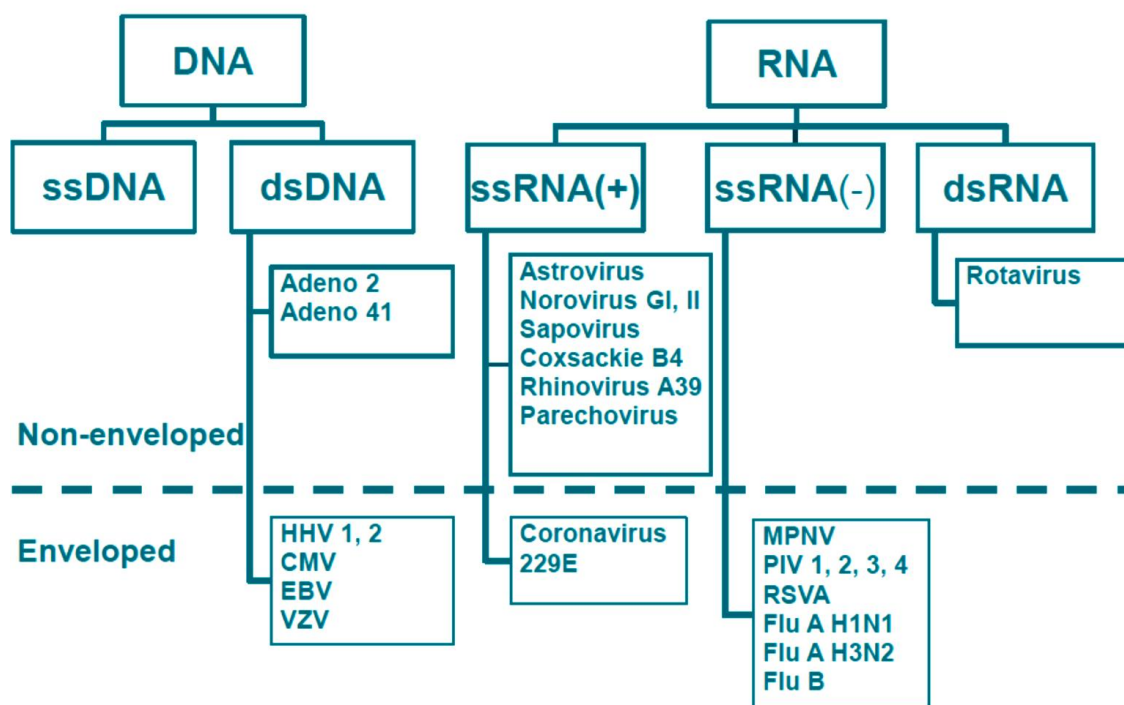
法精準的定量各種病毒的組成，再加上聚合酶鏈鎖反應無法有效地偵測出所有組成的病毒，所以不適用於作為病毒聚合酶鏈鎖反應之對照試劑。然而套組內含有多種病毒類型的核酸分子，且已知各種不同核酸分子的病原體來源，將可開發成為外來病原檢測參考物質之可能性。NIBSC 於是運用此多重病毒核酸套組進一步進行共同研究，詳細流程如下：

(1) 病毒粒增殖(Enrichment of viral particles)

選定 25 種病毒(包括有套膜及無套膜病毒)進行增殖，運用細胞培養法或雞胚胎蛋培養法進行病毒粒增殖，而不易增殖的病毒(如 Astrovirus、Norovirus 等病毒)則是從病人檢體中純化而得，再將增殖後或純化後的病毒粒進行過濾。

(2) 病毒核酸萃取(Extraction of nucleic acid)

將過濾後的病毒粒進行核酸萃取，此 25 種病毒的核酸分子有 DNA 及 RNA 之分，依單雙股又可分為四大類，分別為雙股 DNA (dsDNA)、正向單股 RNA (ssRNA(+))、負向單股 RNA (ssRNA(-))及雙股 RNA (dsRNA)，詳如圖五。



圖五、多重病毒核酸套組病毒核酸分子組成(參考資料:會議資料)

### (3) 建立定序樣本庫(sequencing library)

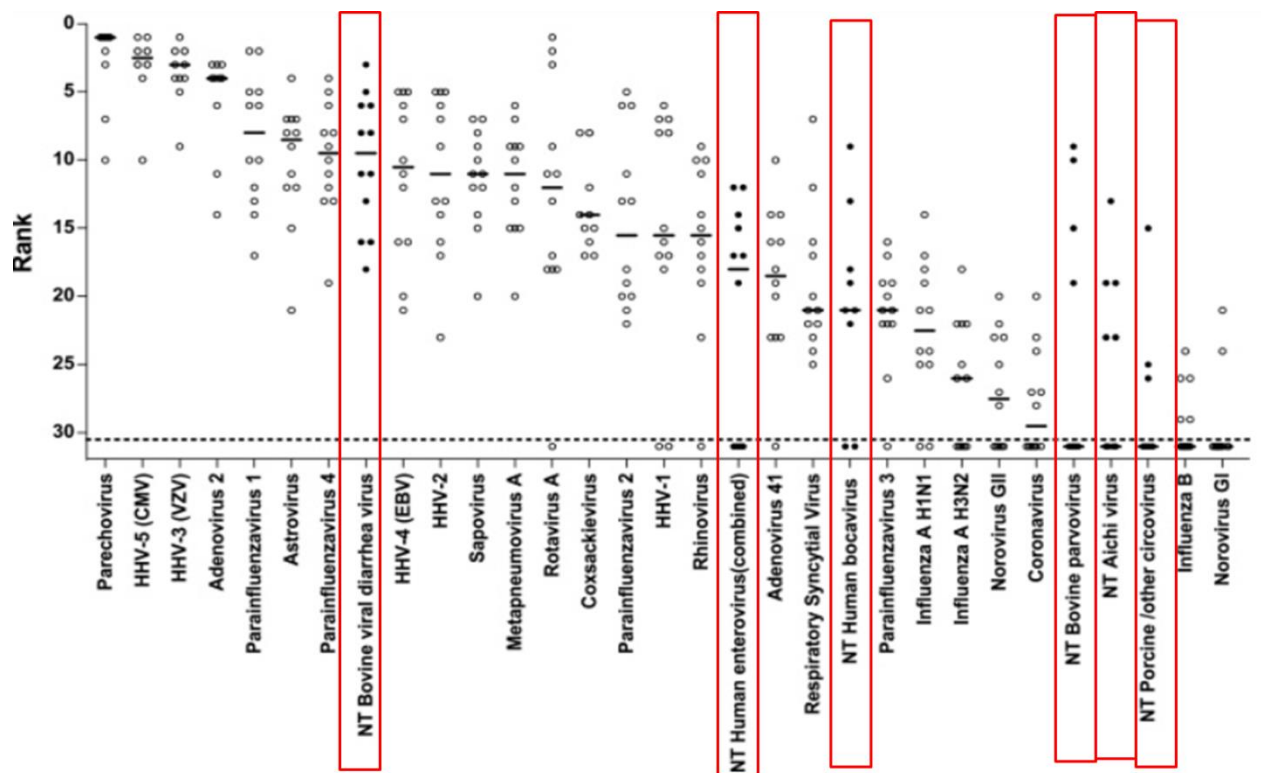
將萃取的核酸分子進行聚合酶鏈鎖反應後，進行核酸片斷化，再將欲定序的短片段上接上轉接子，製成定序樣本庫。

### (4) 定序反應(Sequencing)及資料庫比對分析

參與共同研究的實驗室利用自家次世代定序平台進行定序，並利用 in-house 的資料庫進行分析。

### (5) 結果

本次參與共同研究的實驗室針對 25 種病毒核酸分子運用次世代定序技術進行檢測，結果如圖六所示，其中 6 種病毒皆被所有實驗室檢測出，而其餘的病毒未被所有的實驗室檢測出來。另外，尚有 6 種未知的病毒亦被幾個實驗室偵測出來，如圖六紅色框線所示。



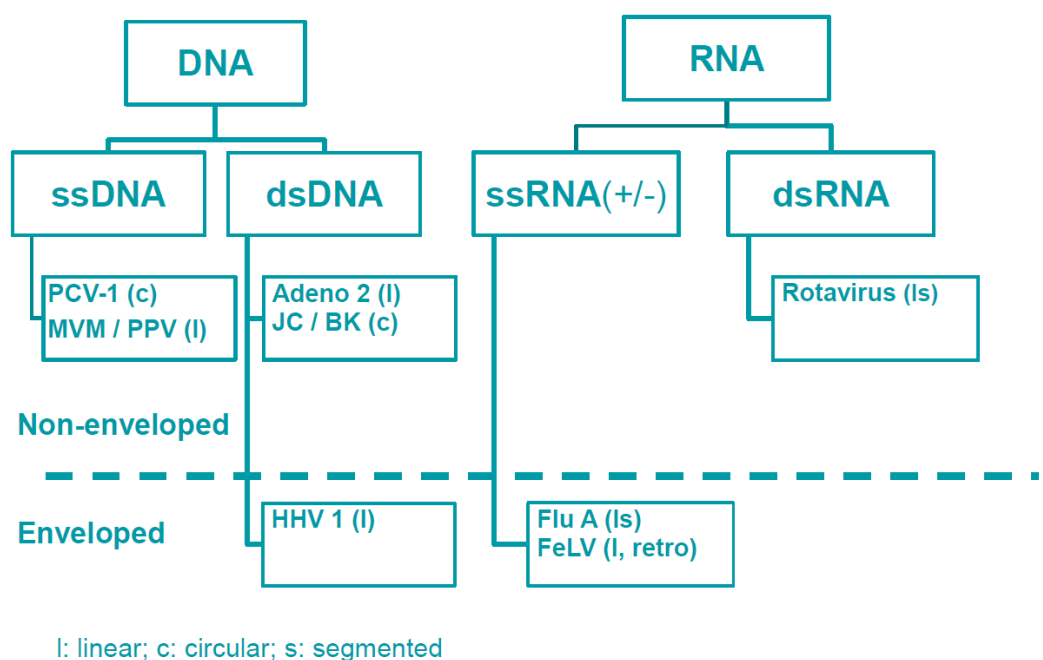
圖六、共同研究結果(資料來源:會議資料)

研究結果中顯示相同病毒利用不同實驗室的次世代定序平台來檢測，其病毒含量差異甚大，且不同實驗室能找到的病毒種類也不盡相同，甚至有些未知的病毒亦被某些實驗室的檢測平台檢測出來。究其原因可能為次世代定序技術是將小片段的基因序列，與現有的資料庫進行搜尋比對，然而，因基因序列中可能存在著保守序列(**conserved sequence**)，故與資料庫進行比對分析時，比對出未知之病原體。而各實驗室使用的資料庫不盡相同，比對結果亦造成差異，因此資料庫的差異是次世代定序技術標準化面臨的一大挑戰。然而，該多重病毒核酸套組(**Viral multiplex 11/242-001**)因不含單股 DNA 核酸分子的病毒且不適合定量分析，再加上未考慮基質效應(**matrix effects**)，故該套組只能作為定性分析之對照參考物質。

NIBSC 目前刻正建立第二代次世代定序生物性參考物質，希冀可作為定量分析之參考物質。此次建立的多重病毒核酸套組以較少的病毒種類所組成，但涵蓋五種核酸分子，包括單股 DNA、雙股 DNA、正向單股 RNA、負向單股 RNA 及雙股 RNA (**dsRNA**)，且考量基質影響病毒的偵測極限(**LOD**)。該多重病毒核酸套組選定的代表性病毒，以下列特性作為優先考慮：

- (1) 具主要病毒結構代表性
- (2) 屬 BSL-2 等級或非屬動物特定性病原體(**non-Specified Animal Pathogens Order, non-SAPO**)
- (3) 能於宿主內產出高力價(**high titer**)的病毒
- (4) 非疫苗內原有的病毒(才可用於區分是否為外來病原體)

該多重病毒核酸套組選定之代表性病毒，病毒核酸類型包含單股 DNA、雙股 DNA、正向單股 RNA、負向單股 RNA 及雙股 RNA (**dsRNA**)，各代表性病毒詳列如圖七所示，NIBSC 目前正建立各病毒之病毒庫，預計於 2018 年進行多重病毒核酸套組製備，2019 年進行共同研究，希望該多重病毒核酸套組可以作為外來病原檢測之參考物質(定性分析)，並且確定檢品中外源病毒含量(定量分析)。



圖七、 第二代多重病毒核酸套組病毒核酸分子組成(參考資料:會議資料)

#### 四、次世代定序技術相關運用

##### (一) 運用於生物製劑外來病原檢測及基因體穩定性監測

疫苗製劑因製程複雜，且使用之胎牛血清、胰蛋白酶、生長因子等生物性材料易受外來病原污染，因此，外來病原檢測為品質管控必須執行的檢驗項目。傳統的外來病原檢測方法無法有效檢測特定之病原體，且無法同時進行多個檢品分析，而次世代定序技術因其高通量且能鑑知未知病原的特性，其運用於生物製劑外來病原檢測則受到高度重視，以確保產品品質安全。除此之外，次世代技術亦可運用於監測產品中病毒基因的穩定性(genome stability)，考量病毒基因變異性大，且減毒疫苗中尚保有病毒之活性，假若產品中病毒基因序列因製程中發生變異，導致病毒回復其毒力，將可能造成用藥安全之疑慮。

##### (二) 運用於體外診斷試劑(in vitro diagnostics, IVDs)之開發

近幾年隨著精準醫療之治療趨勢，次世代定序技術開始運用於找尋疾病之易感基因或相關變異，因而相關檢測試劑之開發相繼出現。目前臨床實驗室所使用之檢測試

劑或系統分成兩種，一為實驗室自行研發之檢測試驗，另一種為經主管機關核准之體外檢測試劑。截至目前為止，美國 FDA 總計核准 2 項 NGS 儀器及 3 項搭配試劑，並且陸續核准 NGS 技術應用於癌症治療之伴同式診斷試劑，而核准之產品依預期用途及風險程度來分級，並依風險程度有不同的管制分級。以 Illumina MiSeqDx 儀器搭配診斷試劑為例，通用之定序試劑 MiSeqDx universal kit 1.0 因產品風險性低，屬第一等級，而用於檢測晚期卵巢癌 BRCA1 及 BRCA2 基因是否突變之 CDxBRCA 伴同式診斷試劑，因其準確性決定於臨床決策，其產品風險性較高，歸類為第三等級，需經上市前核准(premarket approval, PMA)審查，產品才能上市。

## 肆、心得與建議

### 一、持續派員參與各項國際會議，增加國際合作交流機會

本次為期兩天之研討會，透過製造廠、學術界代表、法規管理單位及政策制定者等專家之分享，了解國際上次世代定序檢測技術運用於生物製劑外來病原檢測之最新發展及待解決議題。本署為疫苗、血液製劑等生物製劑之國家檢驗機關，為確保國人用藥安全，應即時掌握國際上相關產品品質檢驗技術之發展及方法一致性之最新趨勢，以作為後續檢驗基準研擬，及產品放行檢驗規格制訂之參考。為提升業務同仁之知識技能與拓展其國際視野，建議持續派員參加相關研討會議，並與國際上相關領域之研究人員及衛生主管單位維持良好之互動交流，期能習得新興檢驗技術及瞭解產業發展之最新動態，並鼓勵同仁提升英文實力，增加與國際交流合作之能力。

### 二、持續瞭解次世代定序技術運用發展，並關注先進國家管理發展趨勢

次世代定序技術發展逐漸成熟，再加上其高通量特性及生物資訊學的蓬勃發展，促使次世代定序技術不再僅限於實驗室中使用。次世代定序技術目前已被運用於臨床分子診斷、藥物基因體學分析及生物製劑品質管制檢驗等。然而次世代定序技術因產出大量數據，其數據管理及結果分析與後續判定處理，及次世代定序技術方法標準化與確效之需求，相關對照標準品之建立等議題將是各國努力解決之目標，我國應持續關注相關技術發展，及瞭解先進國家對於該技術之管理發展趨勢，以便我國之相關產品檢驗管理發展與先進國家接軌。

### 三、持續與各國相關領域專家建立溝通管道，並積極爭取參與國際共同合作計畫

本次會議中，除透過各製造廠，國家實驗室及法規管理單位分享次世代定序技術發展概況，會議中亦開放專家聚集討論現階段該技術面臨的挑戰，透過各方專家之意見交流對話，讓衛生主管機關瞭解製造廠在產品研發生產時所面臨的難處，



同時也讓製造廠理解主管單位審查相關產品時所關注的重點，使相關規定之制定能更切合實務。追求次世代定序檢驗技術國際標準化時，亦會積極舉辦共同標定計畫。本署曾獲邀參與 EDQM 舉辦之生物藥品標準化計畫及 NIBSC 國際標準品共同標定計畫，未來如有機會，亦可積極參與相關共同標定計畫，以提升我國相關檢驗技術水準國際能見度。