

出國報告（出國類別：研習）

生物性國際標準品製備與檢驗技術及 減毒疫苗品質管制檢驗技術研習

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、張弘技士

派赴國家：英國

出國期間：中華民國 107 年 05 月 20 日至 06 月 02 日

報告日期：中華民國 107 年 07 月 31 日

摘要

英國國家生物標準品暨管制研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)為世界衛生組織(WHO)合作之實驗室，長期以來為 WHO 建立國際標準品，亦是官方藥品管制實驗室網絡(Official Medicine Control Laboratory, OMCL)成員，負責英國境內與歐盟之生物藥品逐批放行工作及生物藥品相關檢驗研究工作。為提升本署研究檢驗組生物藥品管理與生物性標準品製備能力，本組於 107 年 5 月 21 日至 6 月 1 日赴 NIBSC 研習生物性國際標準品製備與檢驗技術及減毒疫苗品質管制檢驗技術，學習國際生物性標準品製備、國際標準品共同標定研究與試驗方法設計及減毒疫苗之基因序列監測技術等品質管制檢測技術，有助於提升國家實驗室製備生物性國家標準品之能力，並持續精進我國檢驗能力，完善我國品質管制評估體系。

目次

| | | |
|----|-------------------------|----|
| 壹、 | 前言與目的..... | 4 |
| 貳、 | 行程及工作紀要..... | 6 |
| 參、 | 研習內容重要摘錄..... | 9 |
| | 一.生物性國際標準品製備..... | 9 |
| | 二.國際標準品共同標定研究與試驗方法..... | 21 |
| | 三.減毒疫苗品質管制檢驗..... | 30 |
| | 四.肉毒桿菌毒素製劑效價試驗..... | 33 |
| 肆、 | 心得與建議..... | 34 |
| 伍、 | 附錄..... | 36 |

壹、 前言與目的

英國國家生物標準品暨管制研究所(NIBSC)為世界衛生組織(WHO)合作之實驗室，長期以來為 WHO 建立國際標準品，為目前全世界國際標準品及參考物質最主要的生產者及供應者，供應全球 90%至 95%之生物性國際標準品。NIBSC 亦是官方藥品管制實驗室網絡(OMCL)成員，負責英國境內與歐盟之生物藥品逐批放行工作及生物藥品相關檢驗研究工作。此外，NIBSC 協助歐洲藥品品質與衛生保健衛生局(EDQM)進行 centrally authorized products (CAP)檢驗，及協助 WHO 執行疫苗預審(prequalification)程序，確保聯合國採購之疫苗品質安全。另於 2004 年成立英國幹細胞庫，該細胞庫為英國和世界各地研究單位及臨床實驗室提供品質良好之人來源幹細胞，應用於治療多種疾病，如青少年糖尿病、阿茲海默氏症及帕金森氏症等疾病。

為提升本組生物藥品品質管理與生物性標準品質製備能力，透過 NIBSC 病毒部門 Dr. Javier Martin 及 Dr. Alison Tedcastle 聯繫及安排，於 107 年 5 月 21 日至 107 年 6 月 1 日赴 NIBSC 研習生物性國際標準品製備與檢驗技術及減毒疫苗品質管制檢驗技術，學習國際生物性標準品製備(包含候選材料之準備、品質預試驗、填充及冷凍乾燥等作業程序)、共同標定研究設計(包含試驗材料準備、檢驗方法之建立)、數據收集統計分析及報告撰寫原則，及學習腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗及抗原含量試驗(ELISA)，以因應腸病毒 71 型疫苗抗原國際標準品共同標定研究。另學習減毒疫苗之基因序列監測技術，瞭解如何運用次世代定序(Next generation sequencing, NGS)技術對活性減毒口服小兒麻痺疫苗(OPV)進行品質管制檢驗，監測病原體基因體穩定性，以確保相關產品品質安全。除此之外，本次研習期間亦安排與細菌部門肉毒桿菌毒素製劑檢驗實驗室專家進行交流討論，瞭解如何建立以 cell-based 的肉毒桿菌毒素製劑效價分析檢驗平台，來因應國際實驗動物 3R 原則(替代、減量、精緻化)發展趨勢。藉由本次研習，期能達成以下目的，

- 一、學習生物性國際標準品製備，精進本署製備國家標準品之能力，以提升我國生物性國家標準品製備之水準。

- 二、學習生物性國際標準品共同標定研究設計，包含設計問卷、試驗材料準備、試驗方法選用等關鍵因素，作為本署未來舉辦共同標定研究之參考，提升共同標定研究計畫之執行，有助於提升國家標準品之公信力。
- 三、學習國際上針對減毒疫苗基因序列監測之檢驗技術，汲取相關實務經驗，提升國家實驗室檢驗能力與國際接軌。
- 四、持續與各國官方藥品管制實驗室、世界衛生組織合作實驗室或其他具先進設備之實驗室進行研習交流，精進我國檢驗能力，完善我國品質管制評估體系，並建立與國際級實驗室之聯絡管道，以爭取相關合作機會。

貳、 行程及工作紀要

| 日期 | 行程及工作紀要 |
|-------------------------|---|
| 107 年 5 月 20 日 (星期日) | 啟程(台北-倫敦) |
| 107 年 5 月 21 日 (星期一) | <ol style="list-style-type: none"> 1 地點:英國 NIBSC 2 會晤人員: 病毒研究部門 Dr. Javier Martin 及 Dr. Alison Tedcastle，就雙方業務進行交流，並討論本次研習課程重點 3 研習內容: <ol style="list-style-type: none"> (1) NIBSC 環境介紹(包括標準品製備部門、病毒性疫苗研究實驗室、細菌性疫苗研究實驗室、肉毒桿菌製劑研究實驗室及血液相關病毒研究實驗室) (2) 腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗材料準備 <ul style="list-style-type: none"> ➤ 試驗用培養基配置 |
| 107 年 5 月 22 日 (星期二) | <ol style="list-style-type: none"> 1 地點:英國 NIBSC 2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Elaine Pegg 3 研習內容:Dr. Elaine Pegg 示範及講解腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗 <ul style="list-style-type: none"> ➤ 病毒感染液之稀釋 ➤ 免疫用標準血清稀釋配置 ➤ RD 細胞計數及病毒中和試驗 |
| 107 年 5 月 23 日 (星期三) | <ol style="list-style-type: none"> 1 地點:英國 NIBSC 2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Manasi Majumdar 及 Dr. Alison Tedcastle 3 研習內容: |

| | |
|---------------------------------|---|
| | <p>(1) Dr. Manasi Majumdar 講解次世代定序技術運用於活性減毒口服小兒麻痺疫苗(OPV)基因體監測試驗</p> <p>(2) Dr. Alison Tedcastle 講解腸病毒 71 型疫苗抗原共同標定研究問卷設計、試驗設計及試驗 protocol 撰寫等作業內容</p> |
| <p>107 年 5 月 24 日 (星期四)</p> | <p>1 地點:英國 NIBSC</p> <p>2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Alison Tedcastle 及肉毒桿菌毒素製劑研究實驗室主管 Dr. Paul Stickings</p> <p>3 研習內容:</p> <p>(1) Dr. Alison Tedcastle 示範及講解腸病毒 71 型疫苗抗原含量試驗(ELISA)及 combistat 軟體分析操作</p> <p>(2) 與 Dr. Paul Stickings 討論肉毒桿菌毒素製劑 cell-based 效價分析方法</p> |
| <p>107 年 5 月 25 日 (星期五)</p> | <p>1 地點:英國 NIBSC</p> <p>2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Gillian Cooper</p> <p>3 研習內容:</p> <p>Dr. Gillian Cooper 講解不活化小兒麻痺疫苗(IPV)品質管制檢驗技術及方法標準化建立</p> |
| <p>107 年 5 月 29 日 (星期二)</p> | <p>1 地點:英國 NIBSC</p> <p>2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Alison Tedcastle 及統計部門主管 Dr. Peter Rigsby</p> <p>3 研習內容:</p> <p>(1) Dr. Alison Tedcastle 示範及講解腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗染色步驟及討論腸病毒 71 型疫苗抗原共同標定研究</p> <p>(2) Dr. Peter Rigsby 講解統計分析</p> |

| | |
|---------------------------------|---|
| <p>107 年 5 月 30 日 (星期三)</p> | <p>1 地點:英國 NIBSC</p> <p>2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Alison Tedcastle 及標準品製備部門 Dr. Paul Matejschuk</p> <p>3 研習內容: (1) 腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗 plaque 計數及判讀 (2) Dr. Paul Matejschuk 講解生物性國際標準品充填、冷凍乾燥及品質測試(包含乾重、殘餘水分、氧含量等試驗)</p> |
| <p>107 年 5 月 31 日 (星期四)</p> | <p>1 地點:英國 NIBSC</p> <p>2 會晤人員:標準品製備部門 Dr. Paul Matejschuk 及病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Bethany Charlton</p> <p>3 研習內容: (1) 實地參觀標準品製備作業流程(包含充填、冷凍乾燥、包裝及儲存等作業流程) (2) Dr. Bethany Charlton 講解次世代定序數據生物資訊分析及結果判讀</p> |
| <p>107 年 6 月 1 日 (星期五)</p> | <p>1 地點:英國 NIBSC</p> <p>2 會晤人員:病毒性疫苗研究實驗室 Dr. Edward Mee、Dr. Javier Martin</p> <p>3 研習內容: (1) 與 Dr. Edward Mee 討論次世代定序應用於生物製劑外來病原檢測 (2) 與 Dr. Javier Martin 討論腸病毒 71 型疫苗抗原共同標定研究及總結研討會</p> |
| <p>107 年 6 月 2 日 (星期六)</p> | <p>返程(倫敦-台北)</p> |

參、研習內容重點摘要

本次研習由 NIBSC 病毒部門 Dr. Javier Martin 及 Dr. Alison Tedcastle 聯繫及安排，研習為期兩週，內容涵蓋國際生物性標準品製備(包含候選材料之準備、品質預試驗、填充及冷凍乾燥等作業程序)、共同標定研究設計(包含試驗材料準備、檢驗方法之建立)、數據收集統計分析及報告撰寫原則、腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗及抗原含量試驗(ELISA)及減毒疫苗之基因序列監測技術。

一、生物性國際標準品製備

隨著新興生物技術不斷發展及藥物市場的需求，生物藥品開始蓬勃發展，成為近年來藥品市場的主要需求，然生物藥品不同於傳統化學合成藥品，其藥品本身分子結構及製程等皆比化學合成藥品來得複雜，若僅進行物化特性分析是不足以確保該類產品品質安全，必須進一步運用生物試驗法(biological assay)進行品質評估，生物試驗法因運用動物組織或細胞等生物性來源材料進行試驗，試驗結果容易受個體間差異而影響，使得結果變異性較大。為降低方法間差異性及方法標準化的建立，因此建立國際標準品有其必要性。

生物性國際標準品係提供跨實驗室、材料、方法與時間之量測比較用工具，可用於檢驗分析之驗證及對照參考用，確保生物製劑效能活性之一致性。根據 WHO 指引，生物性國際標準品因以下原因有建立之必要，

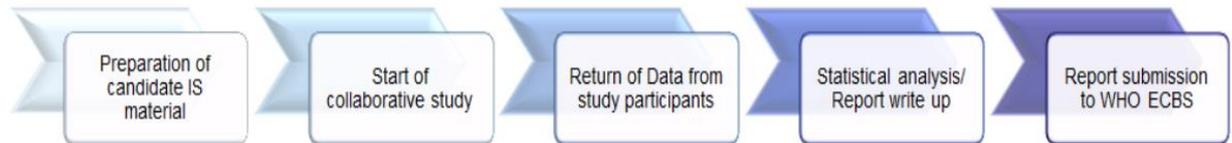
- (1) 作為已核准或即將上市之生物性產品鑑別或試驗對照參考標準
- (2) 作為生物試驗方法標準化之建立參考標準
- (3) 可作為二級標準品及工作標準品追溯之標準

目前 NIBSC 供應全球 90% 至 95% 之生物性國際標準品，種類包括核酸、蛋白質、疫苗抗原、血清等不同種類之生物性國際標準品。除此之外，依 WHO 發展趨勢及生物試驗需求，持續建置新興生物性國際標準品。

生物性國際標準品製備流程繁複，大致上可分為五個步驟(圖一)，

- (1) 生物性候選標準品製備

- (2) 共同標定研究
- (3) 參與標定實驗室之實驗結果收集
- (4) 統計分析及報告撰寫
- (5) 報告送生物製劑標準化專家委員(ECBS)審查



圖一、生物性國際標準品製備流程圖(資料來源:NIBSC 官方網頁)

(一) 生物性候選標準品製備

生物性候選標準品製備必須考量材料之選擇、材料填充、冷凍乾燥等重要因素。材料填充及冷凍乾燥等作業是由標準品製備部門所負責，該部門為 NIBSC 人力最少的部門，因為大部分設施包含無菌充填設備、冷凍乾燥設備及儲存設備均高度自動化，符合製造廠之等級。此部分由病毒部門 Dr. Javier Martin 說明候選材料之選擇及標準品部門 Dr. Paul Matejtschuk 說明生物性國際標準品充填及冷凍乾燥等內容。

1. 候選材料選擇

生物性參考物質之特性應盡可能類似於測定系統中的測試樣品，以反映出分析物之特性。候選之材料應具有高度的穩定性(stability)及專一活性(specific activity)。雖然候選材料對於純度無特別要求，但材料中其他之成分應以不干擾主要成分為原則。主成分之濃度需足夠到可達測試之目的，以腸病毒 71 型疫苗抗原為例，材料濃度需要達臨床劑量之 5 至 10 倍。一般而言，材料大多源自於製造廠之提供，可能由單一批次生產或多批次混和而成，若屬於匯集多批次混和製成，則必須要徹底混合均勻，以確保材料呈現均質(homogeneous)狀態。若材料屬於蛋白質類成分，在混和的過程中應避免蛋白質變性而影響標準物質之品質。提供者需要提供該批次之分析證明書(certificate of analysis, COA)，以確保該材料

之品質是否符合要求。在材料的儲存方面，Dr. Javier Martin 建議依照原製造廠之儲存條件保存。一般而言，若材料之物化特性及生物活性不受冷凍乾燥影響，則會將候選材料進行冷凍乾燥，以便標準品之永久保存。

候選材料之預試驗(preliminary testing)是不可或缺的，其目的是要評估該材料品質是否符合要求。評估的方法因標準品之種類有所不同，如疫苗類抗原的標準品建立，則會運用酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)測量抗原含量，或藉由量測免疫反應產生之中和性抗體來評估疫苗抗原之免疫性。另外，亦須評估預試驗所需之濃度及體積，如疫苗類的抗原至少需要 5 至 10 倍的濃縮液 100 mL 來進行預試驗。

2. 材料填充

為確保同批次生產的標準品之組成、含量及效價保有一致性，填充之材料應來自於相同的均質體，且填充作業應一次性完成，填充過程應於低生物負載環境中進行，降低材料遭受汙染之機會，除此之外，應採取適當的安全預防措施來保護操作人員的安全。一般而言，散裝材料(bulk material)通常以液體形式進行填充分裝，常見填充注意事項如下，

- (1) 確保填充過程中無外來物質之汙染
- (2) 填充過程中，有時會添加一些物質以避免活性成分附著於容器管壁上。

因此，要確認添加之物質不影響活性成分的特性

然而，有些材料特性不適合溶於水，必須以粉末型態進行填充，在這種情況下，需利用特殊的混和器及樣品注入裝置進行填充，來確保填充之生物性材料保有均質性。

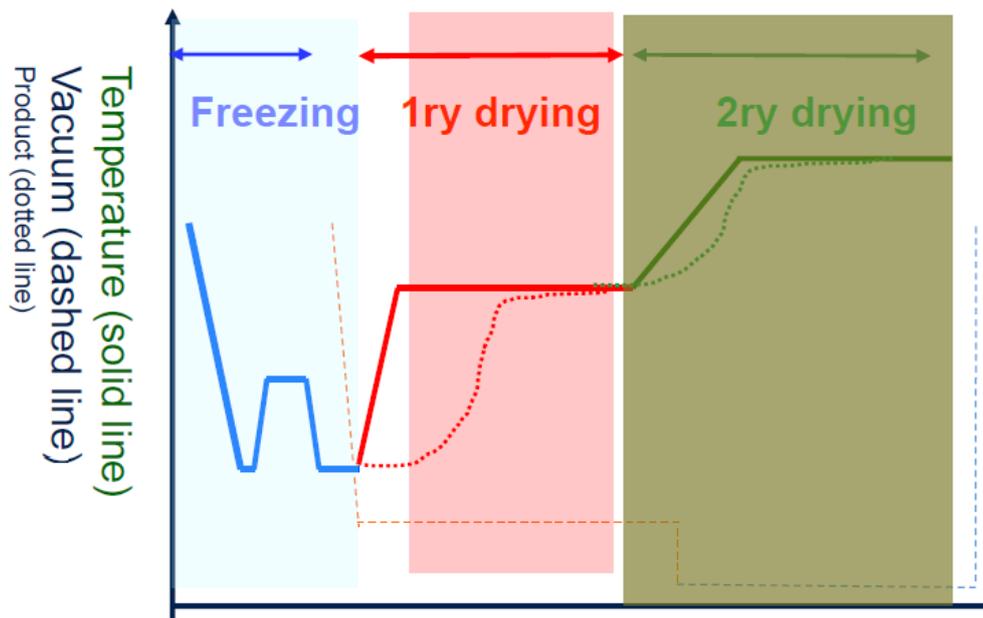
填充的容器應符合當前藥典要求之材質，並且能承受高溫及高壓而不變質的特性，常見使用容器為安瓿瓶(ampouls)，密封的安瓿瓶可阻絕大氣中之空氣及水氣，使瓶內的標準品在適當的條件長期保存下仍保有穩定性。考量某些類型的生物材料特殊性，則會選用帶有橡皮或橡膠塞子之填充容器進行填充。容器之形狀

及大小應以方便填充為考量，而填充的體積依照容器大小有所不同，如一般常用的 5 mL 的容器最多只能填充 1 mL。

3. 冷凍乾燥

鑒於大部分生物性國際標準品於水溶液狀態較不安定，因此會將標準品以粉末乾燥形式來保存，以提高穩定性及增長保存年限。由於冷凍乾燥相較於高溫加熱方式，不易破壞標準品分子本身結構，以利維持標準品之品質，所以冷凍乾燥為常見用於生物性標準品脫水乾燥之技術。

冷凍乾燥是一種連續性的過程，在製程中將標準品內水分先進行凍結至一個適當低溫後，並在低溫、低壓及真空環境下，將標準品內之水份由固體狀態不經液體狀態而直接昇華成氣體後排除。冷凍乾燥過程是由三個分開、獨立進行但有相互關連之程序所組成，包含冷凍(freezing)、一級乾燥及二級乾燥三個過程(圖二)



圖二、冷凍乾燥過程圖(資料來源: 來自 Dr. Paul Matejtschuk 簡報)

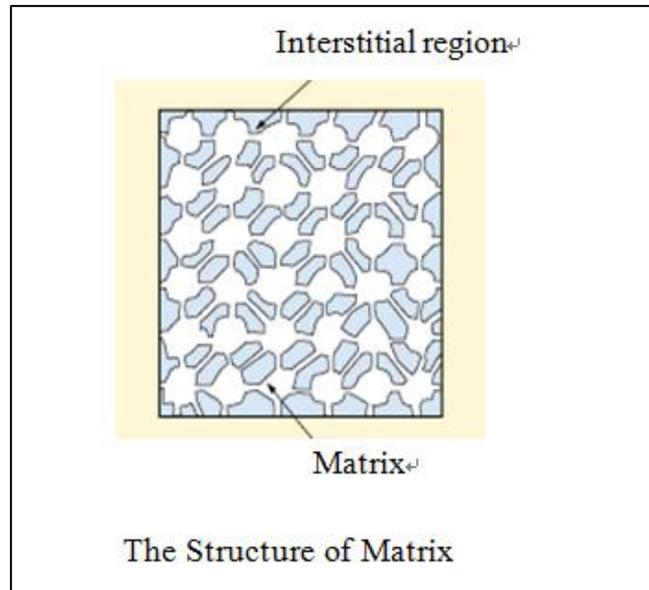
(1) 冷凍

冷凍為標準品經無菌充填後第一處理步驟，功能包括以下：

- a. 使水份形成冰晶(圖三)，將溶質與溶劑分離。
- b. 提供一個適當之條件使水之流動性在冰晶格之間質區(interstitial region)趨近於零。若水之流動性仍存在於間質區，則不能視為溶液

完全結凍。

- c. 產生均質之冰晶格，使得有足夠之空間，以在乾燥過程中使水蒸氣排出。



圖三、冰晶結構示意圖(資料來源: 來自 Dr. Paul Matejtschuk 簡報)

(2) 一級乾燥

此步驟將標準品內之水份由固體狀態不經液體狀態而直接昇華成氣體之重要步驟。當經過冷凍後完全凝結成固態狀態之標準品，需要以下三個條件才能昇華：

- a. 在固定溫度及高度真空環境下，固態冰的飽和蒸氣壓需大於環境中水蒸氣分壓時，才會進行昇華。
- b. 冷凝器的溫度需要低於固態狀態的溫度，才能使昇華出來的水蒸氣冷凝成冰霜。
- c. 熱量之供給應適時適量，以控制冰之昇華過程在適當的速率下進行

(3) 二級乾燥

第二階段的升溫乾燥是去除標準品中殘餘的水分。殘餘的水分包括化合物結晶水、固體表面與毛細管吸附水等。而上升之溫度不能超過標準品可容受之溫度，否則標準品之穩定性、活性會因高溫而下降。當溫

度到達乾燥終點後，取出標準品並迅速封口。

(二) 共同標定研究(Collaborative study)

共同標定研究的目的是要證明候選材料成為標準品之適用性，並確認其均質性。一般而言，大部分研究計畫目的是對有效成分之含量或效價進行標定，但依標準品之種類及用途，其他特性之評估亦會納入計畫目的，如候選標準品若作為臨床診斷用，則需評估候選標準品之互通性(commutability)，以確認其適用性。而完善的共同標定研究決定於計畫擬定及試驗設計，此部分內容由病毒部門 Dr. Alison Tedcastle 及統計部門 Dr. Peter Rigsby 說明。

1. 共同標定計畫擬定

共同標定研究計畫首先要擬定研究計畫目的，並針對研究目的設計一份問卷，問卷的目的是要初步瞭解受邀實驗室的參與意願及實驗室現行使用的分析方法(in-house method)，以利後續標定計畫試驗設計。計畫擬定需要考量試驗方法選用、參與者數目、試驗樣品及試驗次數等重要考慮因素(圖四)。

Study design questions

- Which assay methods should be included?
- Which laboratories (and how many) should participate?
- What samples should be sent for testing?
- How many repeat tests should be performed?

圖四、共同標定計畫擬定考量因素(資料來源:來自 Dr. Peter Rigsby 簡報)

根據 WHO 之要求，標定研究需要 5 至 25 個實驗室參與。然而參與者的數量取決於標定研究的複雜度，如果該標定研究為第一次執行且測試方法較為複雜時，則需較多的參與者，如此才能收集較多的數據來進行後續的統計分析。相對

地，如果標定研究所用的測定方法簡單且已明確記載於藥典上，參與者數量只需達最低數量要求即可。

2. 試驗設計

試驗設計會參據各實驗室回傳的問卷來評估，藉由問卷內容瞭解各實驗室間使用之分析方法差異性，而針對差異性擬定共標計畫，大致可分為以下幾種情形，

- (1) **Organizer** 提供標定樣品、試驗方法、關鍵試劑及對照物質，而參與者必須依照提供之方法進行。假若分析方法複雜並且各實驗室間分析方法相距甚大，則傾向使用該進行。該試驗設計可降低不同實驗室方法間的變異性，且有助於後續數據分析，但 **organizer** 需要評估材料是否足以提供給所有的參與者。一般來說，會採用試劑較為充足的試驗方法來進行。
- (2) **Organizer** 提供標定樣品、關鍵試劑及對照物質，但利用各實驗室分析方法(**in-house method**)來進行。假若各家實驗室採用的分析方法相似，則適用此種共標試驗設計。該設計可以比較各方法間之差異性，所獲得之資訊有助於瞭解方法標準化的建立。
- (3) **Organizer** 只提供標定樣品，而實驗室利用 **in-house method** 來進行。假若分析方法簡單且已被廣泛使用，或先前共同標定研究已採用相同模式進行並且可行，則適用此種共標試驗設計。如病毒核酸標準品之標定研究大都採用此種共標試驗設計來進行。

另外，樣品的數量亦是試驗設計重要考量因素。樣品的數量因標定物質類型不同而有所不同，但樣品包含候選標準品、現有國際標準品、其他參考物質、編碼重複樣品(**coded duplicate samples**)等樣品(圖五)。在試驗設計中，**organizer** 通常會設計重複樣品，將其編碼安排在試驗中，並且分別獨立地進行試驗。該試驗設計是為了瞭解參與實驗室在方法操作上是否具一致性。除此之外，亦有助於統計分析者進行後續數據分析。

Number of samples



- The number of samples will vary, but can include
 - one or more candidate standards
 - the current International Standard
 - other available reference materials
 - other arbitrary calibrators (e.g. normal plasma)
 - typical “test” samples for which the standard will be used
 - coded duplicate samples
 - samples subjected to accelerated thermal degradation
 - a panel of clinical samples to assess commutability

圖五、共同標定計畫試驗樣品種類(資料來源:來自 Dr. Peter Rigsby 簡報)

(三) 共同標定研究數據收集

參與共同標定研究之實驗室於試驗執行完畢後，除回傳試驗結果外，還需提供以下資訊，

- (1) 若共標試驗是運用 in-house method 執行時，必須提供試驗方法，包含詳細的試驗設計及執行情形等重要資訊。
- (2) 稀釋樣品及標準品的稀釋液(dilution buffer)、稀釋倍數及步驟等影響結果分析重要資訊。
- (3) 試驗統計結果及原始數據(raw data)。若有排除任何原始數據進行統計分析時，必須提出解釋。

(四) 統計分析

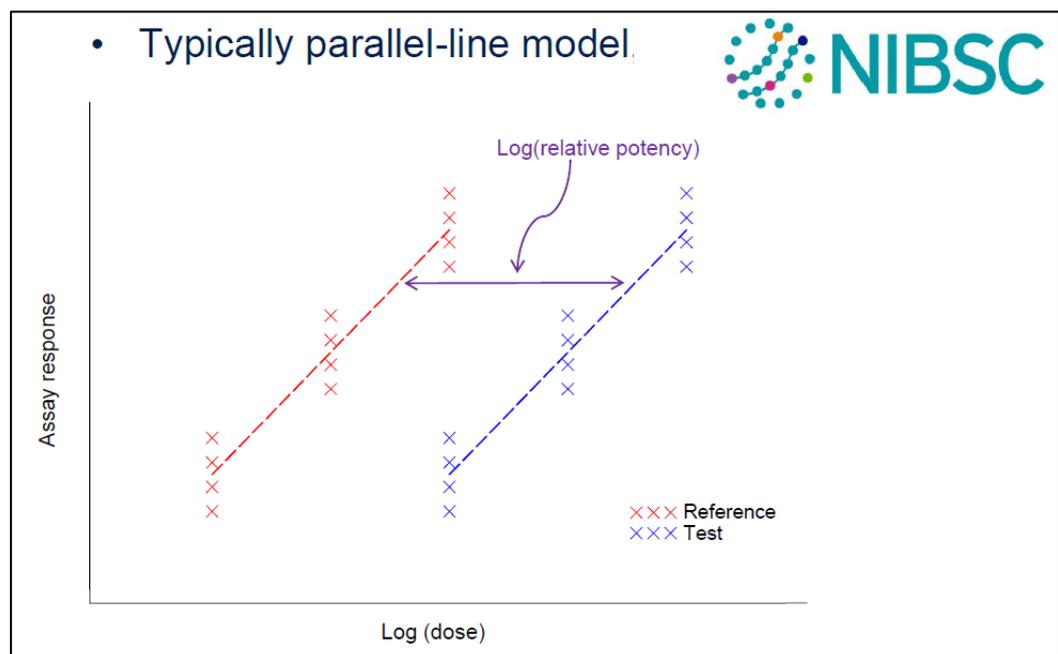
共標結果通常由具有統計經驗的生物計量專家運用適當統計模式來進行分析。每一試驗結果應獨立進行分析並計算該試驗之有效性(validity)、精確性(precision)及相對效價(relative potency)。統計分析建議由單一實驗室來進行，如

此可以確保運用相同統計模式(statistical model)及試驗標準(assay criteria)來進行分析，降低因統計模式不同而造成的結果變異。分析結果常以直方圖表示，可以清楚知道數據分布情形及離群值(outlier)。除此之外，各參與的實驗室亦可知道標定結果是否落於主要分布族群。此部分內容由統計部門 Dr. Peter Rigsby 說明幾個常見統計模式。

統計模式的選用因不同生物試驗法而不同，常見統計模式包括，

1. 平行線模式(parallel line model)

當生物試驗反應(assay response)與濃度有正比關係且符合線性模式，則適合用平行線模式來分析。當濃度反應線之間互相平行時，水平移動(horizontal shift)表示測定之生物活性差異。因此可藉由計算標準品與檢品的濃度反應線間水平差異來得知檢品之相對效價(圖六)。

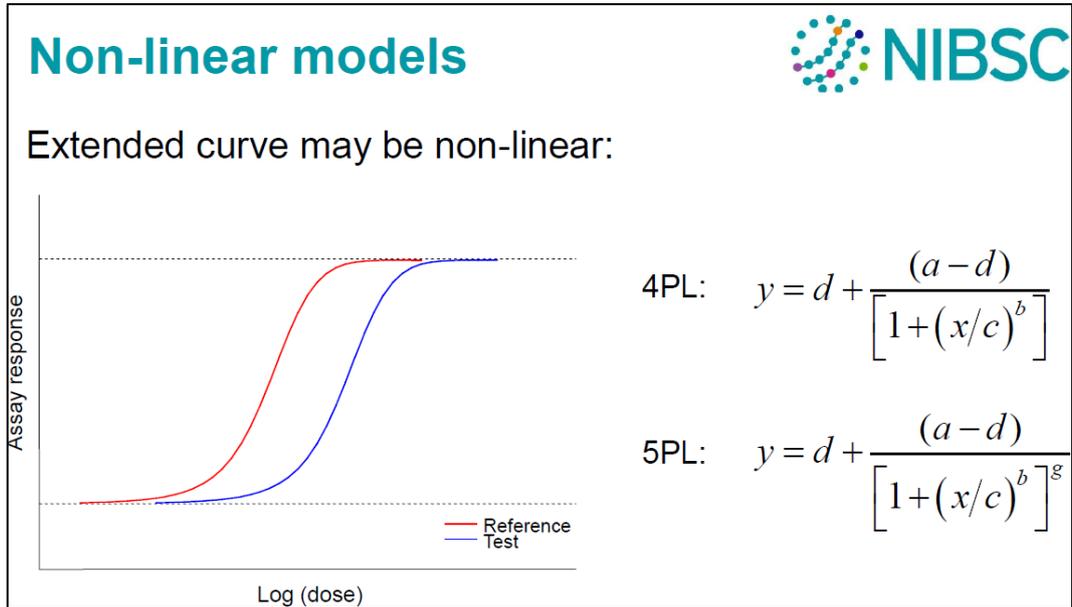


圖六、平行線統計模式(資料來源:來自 Dr. Peter Rigsby 簡報)

2. 非線性模式(non-linear model)

當試驗反應與濃度並非完全呈線性關係時，則利用非線性模式來進行統計分析。常見之非線性模式為典型 S 型曲線，濃度反應受高濃度或低濃度影響。平行的概念不侷限於線性模式，以非線性曲線而言，當其中一條曲線水

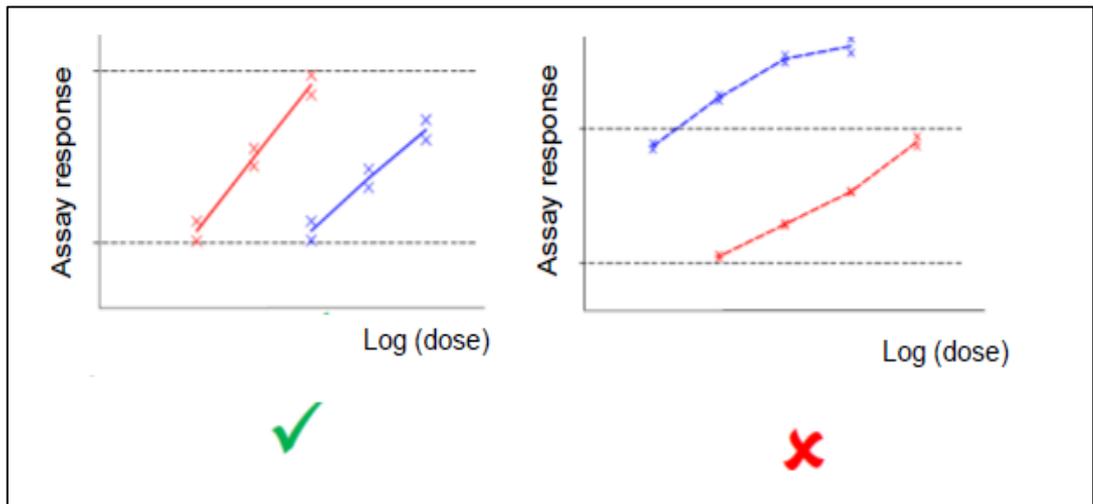
平位移能重疊於另一條曲線(圖七)，亦可運用平行的概念計算生物活性差異。



圖七、非線性統計模式(資料來源:來自 Dr. Peter Rigsby 簡報)

在非線性模式分析中，有關劑量選擇應考量如下，

- (1) 劑量範圍應盡可能大，但試驗反應仍落於線性區域內(圖八)
- (2) 每一試驗至少需要 3 種不同劑量，才足夠進行試驗有效性評估
- (3) 樣品與標準品濃度反應範圍應盡可能相似



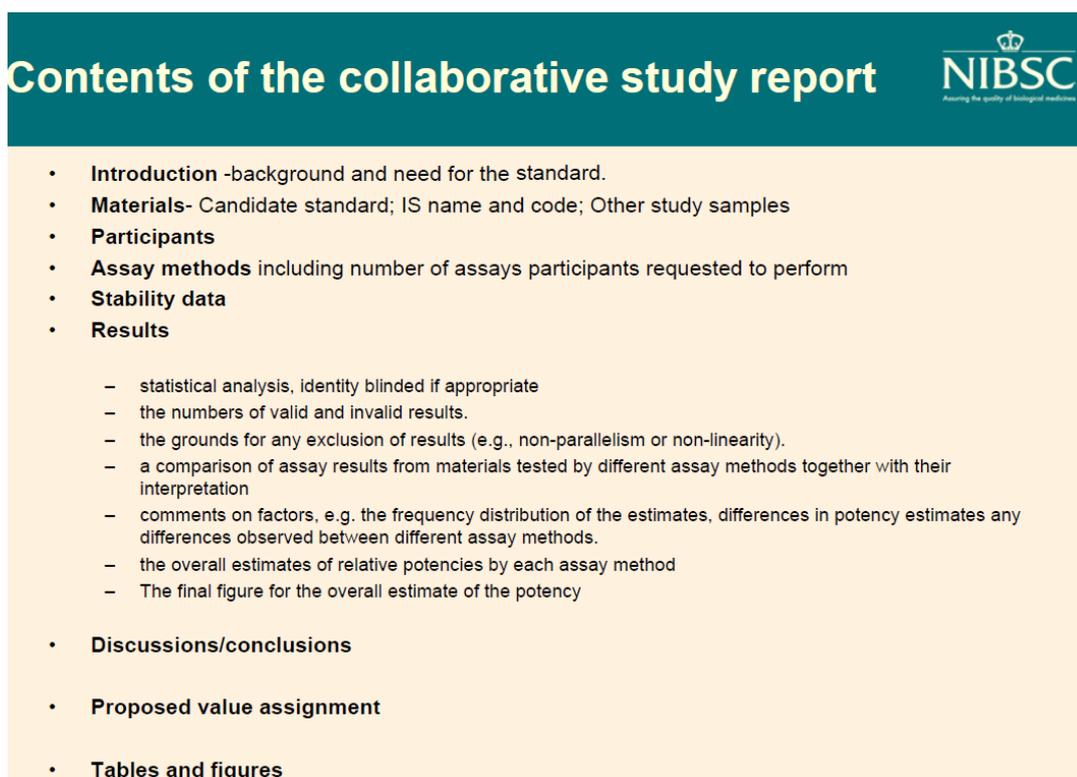
圖八、非線性統計模式(資料來源:來自 Dr. Peter Rigsby 簡報)

(五) 報告撰寫

完成統計分析後，organizer 需對該候選標準品製備、共標試驗設計、結果及統計分析及安定性試驗等內容撰寫一份報告，完成之報告將送 WHO 生物製劑標準化專家委員(ECBS)審查，經審查通過後，始成為國際標準品。有關報告內容撰寫由病毒部門 Dr. Alison Tedcastle 及 Dr. Gillian Cooper 說明。

共標試驗結果報告草稿必需送至各參與的實驗室，為保密各實驗室之數據結果，每一參與的實驗室有特定的識別代碼，參與實驗室利用該識別代碼檢查分析的數據是否與原始數據相同，及檢查是否有統計計算錯誤。若數據有被排除統計時，需針對分析者提出的解釋表示意見。

有關報告之撰寫，內容架構如圖九，包含簡介、材料、參與者、試驗方法、安定性試驗、結果、結論及討論、標定值(value assignment)及圖表。



Contents of the collaborative study report 

- **Introduction** -background and need for the standard.
- **Materials**- Candidate standard; IS name and code; Other study samples
- **Participants**
- **Assay methods** including number of assays participants requested to perform
- **Stability data**
- **Results**
 - statistical analysis, identity blinded if appropriate
 - the numbers of valid and invalid results.
 - the grounds for any exclusion of results (e.g., non-parallelism or non-linearity).
 - a comparison of assay results from materials tested by different assay methods together with their interpretation
 - comments on factors, e.g. the frequency distribution of the estimates, differences in potency estimates any differences observed between different assay methods.
 - the overall estimates of relative potencies by each assay method
 - The final figure for the overall estimate of the potency
- **Discussions/conclusions**
- **Proposed value assignment**
- **Tables and figures**

圖九、共標結果報告撰寫內容架構(資料來源:來自病毒部門對外簡報)

一份完整的共標試驗結果報告，報告內容一定要說明以下資訊，

- (1) 該項候選標準品背景資訊及建立之需求性
- (2) 共同標定研究計劃及試驗設計(包含試驗使用之材料)
- (3) 試驗方法及參與實驗室使用的方法
- (4) 對於每一個測定方法，參與者被要求執行的測定次數及實際測定次數
- (5) 統計分析之描述，包含統計模式、統計參數(如 linearity、parallelism)及任何問題
- (6) 統計分析結果，應包括：
 - a. 有效和無效結果的試驗數目
 - b. 排除任何結果之理由(如非線性(non-linearity)或非平行(non-parallelism))
 - c. 不同測試方法之結果比較及任何方法間差異之解釋，如次數分布(frequency distribution)、效價差異等任何差異
 - d. 若共標研究採用給定之試驗方法，應就結果說明該方法組內變異(within assay variation)及試驗間變異(between assay variation)
 - e. 相對效價估計值及 95%信賴區間
- (7) 安定性試驗結果
- (8) 該材料儲存條件

二、國際標準品共同標定研究與試驗方法

(一) 抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究

腸病毒 71 型(enterovirus type 71, EV71)屬小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)，此病毒於 1969 年在美國加州的一次流行中首次被分離出來，此後包括澳洲、日本、瑞典、保加利亞、匈牙利、法國、香港、馬來西亞、越南及台灣等地都有流行的報告。依據台灣歷年資料顯示，EV71 好發於五歲以下幼童且易發生神經系統併發症，重症致死率可達 3.8%-25.7%，因迄今尚無對 EV71 有效之治療方法，因此疫苗接種被視為最佳防疫策略。目前中國已核准 3 例 EV71 C4 基因亞型之疫苗上市，而台灣研發之 EV71 B4 基因亞型疫苗亦進展至臨床三期試驗階段。抗 EV71 血清中和試驗是評估腸病毒疫苗之品質及有效性的重要方法，NIBSC 為了確保該測定方法之準確性、敏感性、可重複性，因此於 2015 年 3 月發起「抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究」，有助於各實驗室利用國際標準品比對後，標準化所測得之血清中和力價。

1. 血清中和試驗法

由 Dr. Elaine Pegge 實際操作示範並說明，步驟如下(圖十)：

(1) 動物免疫

使用大鼠做為動物免疫模式，將 1 個人體劑量之疫苗進行 2 倍序列稀釋，每一劑量組需 10 隻大鼠，再將稀釋後之疫苗注射至大鼠後腿，待免疫後 21 天進行心臟採血。

(2) 血清分離

將抽取出之血液於 4 °C 放置 1 至 2 天讓血液凝集，之後再以 800 至 1000 g 離心 5 分鐘，離心後之上清液即為血清，將血清分裝並置於-80 °C 保存。

(3) 血清中和作用

- a. 將各血清組進行 2 倍序列稀釋，並以 50 μ L/well 加入 96 孔盤中，每一稀釋組 10 重複，另外並稀釋攻擊病毒(challenge virus)至 100 TCID₅₀/50 μ L，再將攻擊病毒以 50 μ L/well 加入至含有血清之 96 孔盤中，於 35°C 進行

中和作用 3 小時。

b. 病毒 back titration

將攻擊病毒跟細胞培養液 (不含血清) 1:1 混和，同樣於 35°C 進行中和作用 3 小時，之後測定其病毒力價必須介於 1.0 至 3.0 log TCID₅₀，本次試驗才算是有效試驗。

c. 加入 RD 細胞

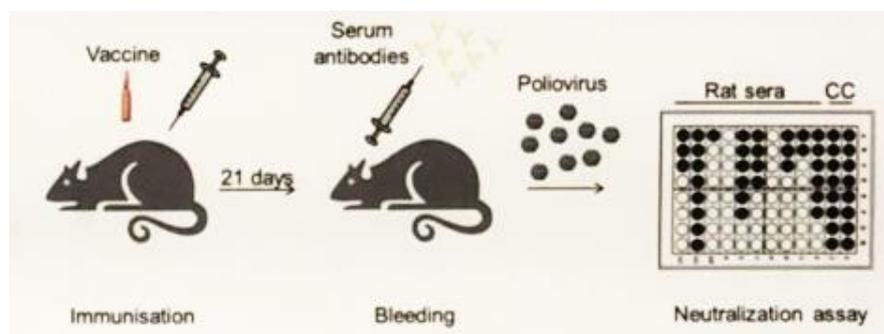
血清與病毒中和作用結束後，每 well 加入 1×10^4 至 2×10^4 之 RD 細胞，置於 35°C 培養 6 天後觀察病毒產生細胞病變(CPE)之情形。

d. 染色

倒掉 96 孔盤中之培養液，加入 naphthalene black 染劑 (配方: 6 % acetic acid (100 % glacial), 1.3 % sodium acetate, 1 % naphthalene black) 置於室溫作用隔夜，隔天再以自來水清洗染劑並風乾。

e. 結果判讀

貼附於 96 孔盤之單層細胞會被染成藍色，判讀為有血清中和，若病毒造成 CPE 則會破壞單層細胞而不被染色，判讀為無血清中和。實際觀察結果發現，少數孔內會只有部分單層細胞產生 CPE 而不被染色的現象，經詢問 Dr. Alison 此現象該如何判斷，她說明該現象並無統一的判讀標準，由各實驗室律定判讀標準(如孔內有 50% 以上細胞被染色即判讀為有血清中和)，之後每次判讀都用統一標準即可。



圖十、血清中和試驗方法示意圖(資料來源:病毒部門對外發表海報)

2. Dr. Alison Tedcastle 以「抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究」為範例，探討共同標定研究的核心觀念。

(1) 此共同標定研究，採用各實驗室 in-house 方法(表一)進行血清中和試驗共同標定，所使用之細胞株種類、細胞濃度、血清中和作用之溫度與時間、觀察 CPE 結果的培養溫度與天數雖然不完全相同，但經 Tukey's multiple comparison test 統計分析，顯示各方法所得之數據彼此間並無顯著差異，因此可將各實驗室之數據納入進行幾何平均數計算並訂定標準品的國際單位。

| Lab Code | Cell line used | Cell information | In-house Positive Serum Controls | In-house Negative Serum Controls | virus-serum incubation (hours & °C) | CPE Assay (Days & °C) |
|----------|----------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 1 | RD | 1.0-1.5E5 cells/well | 2 | 1 | 37°C for 2 hrs | 37°C for 7 days |
| 2 | RD | 1.5E5 cells/well | 1 | 1 | 37°C for 2 hrs | 37°C for 7 days |
| 3 | RD | 1.0E5 cells/well | --- | --- | No information | No information |
| 4 | RD | 1.6-1.8E5 cells/well | --- | --- | 37°C for 2 hrs | 37°C for 7 days |
| 5 | RD | 1.12-1.09E5 cells/well | 1 | 1 | 36°C for 2 hrs | 36°C for 7 days |
| 6 | RD | 1.5E5 cells/well | 1 | --- | 37°C for 2 hrs | 35°C for 7 days |
| 7 | RD | 1.5E5 cells/well | 1 | 1 | 36.5°C for 2 hrs | 35°C for 7 days |
| 8 | RD | 1.0E5 cells/well | 1 | 1 | 37°C for 2 hrs | 37°C for 7 days |
| 9 | RD | 1.5-2.0E5 cells/well | 1 | 1 | 37°C for 2 hrs | 35°C for 7 days |
| 10 | RD | 2.0E5 cells/well | 1 | --- | 37°C for 2 hrs | 35°C for 7 days |
| 11 | RD | 0.05E5 cells/well | 1 | --- | 37°C for 1 hrs | 37°C for 4 days |
| 12 | Vero | 0.4E5 cells/well | --- | --- | 37°C for 1 hrs | 37°C for 4 days |
| 13 | RD | 0.3E5 cells/well | 1 | --- | 37°C for 1 hrs | 37°C for 4 days |
| 14 | RD | 1E5 cells/well | 3 | --- | 35°C for 2 hrs | 35°C for 7 days |
| 15 | Vero | 1.5E5 cells/well | --- | --- | 37°C for 1 hrs | 37°C for 6 days |
| 16 | RD | 0.3E5 cells/well | 1 | --- | 37°C for 1 hrs | 37°C for 7 days |
| 17 | RD | 1.0E5 cells/well | 1 | --- | 37°C for 3 hrs | 37°C for 7 days |

表一、參與共同標定各實驗室之血清中和試驗 in-house 方法

(資料來源:抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究報告)

(2) 因各實驗室採用的 in-house 方法不盡相同，所以會造成各實驗室間數據的變異性很大(表二)，幾何變異係數(geometric coefficients of variation, GCV)範圍為 43%~94%，但將各實驗室之數據以 B&D(候選標準品 14/138)及 E&F(候選標準品 14/140)標準化後，其 GCV 範圍分別下降為 33%~85%及 29%~66%。在國際標準品建立前，各實驗室會自行建立 in-house 標準品並訂定單位，但因為各實驗室間的單位並不一致，所以會造成彼此數據之不可比較性，因此國際共同標

定研究的意義即為建立統一的國際單位來標準化各實驗室間之數據，以建立數據間的可比對性並降低其變異性。

| sample ^o | A ^o | B ^o | D ^o | E ^o | F ^o | G ^o | H ^o | I ^o | T ^o | W ^o | X ^o | Y ^o | Z ^o |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| GCV ^o | 74% ^o | 70% ^o | 61% ^o | 60% ^o | 78% ^o | 74% ^o | 76% ^o | 76% ^o | 43% ^o | 75% ^o | 70% ^o | 94% ^o | 82% ^o |
| GCV (relative to B&D) ^o | 49% ^o | → | → | 33% ^o | 46% ^o | 36% ^o | 36% ^o | 43% ^o | 39% ^o | 57% ^o | 34% ^o | 46% ^o | 85% ^o |
| GCV (relative to E&F) ^o | 41% ^o | 44% ^o | 30% ^o | → | → | 30% ^o | 41% ^o | 29% ^o | 45% ^o | 35% ^o | 36% ^o | 35% ^o | 66% ^o |

表二、參與共同標定各實驗室間之變異性統計

(資料來源:抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究報告)

(3) 安定性試驗

本共同標定研究之安定性試驗設計，將候選標準品儲存於-20°C、+4°C 及+20°C，並於 1 個月及 6 個月後測定血清中和力價(表三)，數據顯示，+4°C 及+20°C 儲存條件下所測定之結果與-20°C 儲存條件下之結果並無顯著差異。同時亦設計先將候選標準回溶後再儲存於-20°C、+4°C 及+20°C，並於 4 週內測定血清中和力價之安定性試驗(表四)，數據顯示，相對於儲存於-20°C 臨用時再新鮮回溶之測定結果，回溶後儲存於-20°C 經過 4 週之後再次解凍之測定結果並無顯著差異，而回溶後儲存於+4°C 及+20°C 分別經過 4 週及 2 週之後再次測定之結果則在某些候選標準品中開始有些微下降。此外，置於-20°C、+4°C 儲存之安定性試驗將定期且持續進行，以監控標準品之品質穩定性。

| Temp | Time (months) | Assay 1 | Assay 2 | Assay 3 | GM (Overall) | LCL | UCL |
|-------|---------------|---------|---------|---------|--------------|-----|-----|
| -20°C | 1 | 100 | 100 | 100 | 100 | - | - |
| -20°C | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 | - | - |
| +4°C | 1 | 100 | 50 | 71 | 71 | 30 | 167 |
| +4°C | 6 | 53 | 71 | 141 | 81 | 23 | 283 |
| +20°C | 1 | 141 | 141 | 100 | 126 | 77 | 207 |
| +20°C | 6 | 100 | 71 | 71 | 79 | 48 | 130 |

表三、候選標準品儲存於-20°C、+4°C 及+20°C 之安定性試驗

(資料來源:抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究報告)

| Temp | Time (weeks) | 13/238 | 14/138 | 14/140 |
|-------|--------------|--------|--------|--------|
| -20°C | 4 | 178 | 112 | 141 |
| +4°C | 1 | 112 | 89 | 126 |
| +4°C | 4 | 71 | 79 | 71 |
| +20°C | 1 | 102 | 100 | 79 |
| +20°C | 2 | 126 | 63 | 79 |
| +20°C | 4 | 126 | 79 | 71 |

表四、候選標準品回溶後儲存於-20°C、+4°C 及+20°C 之安定性試驗

(資料來源:抗腸病毒 71 型血清國際標準品共同標定研究報告)

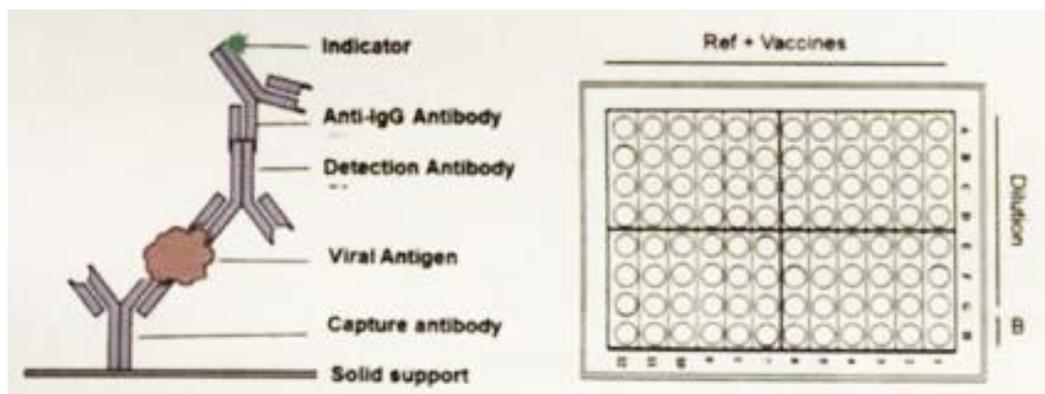
(二) ELISA 抗原含量試驗

1. EV71 抗原含量試驗

由 Dr. Alison Tedcastle 實際操作並說明 NIBSC 所使用之 EV71 抗原含量試驗法。步驟如下(圖十一)：

- (1) capture antibody 吸附：將 capture antibody(anti-EV71 polyclonal antibody)以 coating buffer (pH 9.6)進行適當比例稀釋，之後加入 96 孔盤中並置於 4°C 吸附 16 小時。
- (2) 清洗：以 wash buffer(含 2% milk 及 0.5% tween-20 之 PBS)清洗 3 次。
- (3) Blocking：加入 blocking buffer (含 2% milk 之 PBS)置於室溫作用 1 小時。
- (4) 加入待測抗原：將待測抗原以 blocking buffer 進行 2 倍序列稀釋，之後加入 96 孔盤中並置於 37°C 作用 2 小時。
- (5) 清洗：以 wash buffer 清洗 3 次。
- (6) detection antibody 作用：將 detection antibody (anti-EV71 monoclonal antibody) 以 blocking buffer 進行適當稀釋，之後加入 96 孔盤中並置於 37°C 作用 1 小時。
- (7) 清洗：以 wash buffer 清洗 3 次。
- (8) conjugated antibody 作用：將 HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody 以 blocking buffer 進行適當稀釋，之後加入 96 孔盤中並置於 37°C 作用 1 小時。
- (9) 清洗：先以 wash buffer 清洗 2 次，再用 PBS 清洗 2 次。

- (10) OPD 呈色：加入 substrate solution (OPD) 至 96 孔盤中，之後置於室溫避光作用 30 分鐘。
- (11) 終止反應：加入 stop solution (1M 硫酸溶液) 以終止反應。
- (12) 讀取吸光值：以多重酵素鏈結免疫分析儀讀取波長 492 nm 吸光值。



圖十一、EV71 抗原含量試驗示意圖

2. 因 EV71 與小兒麻痺病毒同屬微小 RNA 病毒科，其疫苗製程也相當類似（皆為不活化病毒性疫苗），而不活化小兒麻痺疫苗已建立完整的 D 抗原含量 ELISA 測定方法及相關國際標準品，因此 Dr. Gillian Cooper 以「不活化小兒麻痺疫苗第三代國際標準品共同標定研究」為範例，說明將來進行 EV71 抗原國際標準品共同標定研究之參考方向。

- (1) 此共同標定研究，採用各實驗室 in-house 方法 (表五) 進行 D 抗原含量共同標定，所使用之 capture antibody, detection antibody, conjugated antibody 及 substrate 並不完全相同，為避免因各實驗室測定方法之差異性而造成各實驗室間數據的變異性過大，所以在設計共同標定研究時，將先前建立之國際標準品納入待測檢體，以增加數據間之可比較性並降低了變異性。結果顯示各實驗室之數據的 GCV 皆小於 10% (表六)。
- (2) ELISA 測定抗原含量為一種定量試驗，需要先將已建立之標準品與待測檢品進行序列稀釋後測定抗原含量，再將數據進行 parallel-line 統計分析，試驗的有

效性規範為 non-parallelism 及 non-linearity 此 2 項必須無顯著差異，若不符合此規範則數據不會被納入國際標準品 D 抗原含量之計算。

| Lab. | Coating antibody | Detection antibody | Conjugated antibody | No. of replicas/dilutions | Substrate |
|------|--|--------------------------------------|---|---------------------------|-----------|
| 1 | Bovine polyclonal serum | Rabbit polyclonal serum | Goat anti-rabbit IgG-HPRO | 2 | ABTS |
| 2 | Bovine polyclonal serum | Mouse MAb | Sheep anti-mouse IgG-HRPO | 2/5 | TMB |
| 3 | Bovine polyclonal serum | Mouse MAb | Sheep anti-mouse IgG-HRPO | 2/7 | TMB |
| 4 | Rabbit PserI | Mouse MAb | Sheep anti-mouse serum-HRPO | 2 / 7 | TMB |
| 5 | Mouse MAb | Rabbit polyclonal serum | Anti-rabbit IgG-HRPO | 3/5 | OPD |
| 6 | Rabbit polyclonal serum - IgG fraction | - | Rabbit polyclonal anti-polio serum-HRPO | 2/5 | OPD |
| 8 | Manufacturer antibody | Manufacturer antibody | Goat anti-rabbit IgG-HRPO | 2/5 | PNPP |
| 9 | Rabbit polyclonal serum | - | Polyclonal anti-IPV serum- HRPO | 3/4 | TMB |
| 10 | Rabbit polyclonal serum | - | Rabbit polyclonal anti-polio serum-HRPO | 2/5 | TMB |
| 11 | Bovine polyclonal serum | Rabbit polyclonal serum | Goat anti-rabbit serum-HRPO | 3 | ABTS |
| 12 | Bovine polyclonal serum | Rabbit polyclonal serum | Anti-rabbit IgG-HRPO | 2/6 | ABTS |
| 13 | Bovine polyclonal serum | Mouse MAb | Anti-mouse IgG-HRPO | Duplicate | TMB |
| 14 | Bovine polyclonal serum | - | Sheep anti-mouse IgG-HRPO | 2/8 | TMB |
| 15 | Bovine polyclonal serum | Rabbit polyclonal antibodies | Goat anti-rabbit IgG-HPRO | 3/6 | ABTS |
| 16 | Mouse MAb | Rabbit polyclonal antibodies | Anti Rabbit IgG-HRPO | 3/5 | OPD |
| 17 | Biacore Technology (see method below)* | | | | |
| 18 | Rabbit polyclonal serum - IgG fraction | Rabbit biotinilated polyclonal serum | Streptavidin-peroxidase | 2/7-8 | TMB |
| 19 | Sheep/Rabbit polyclonal serum | Mouse MAb | Anti-mouse Ig-HPRO | 4/4 | OPD |

表五、參與共同標定各實驗室之 D 抗原含量測定 in-house 方法
(資料來源:不活化小兒麻痺疫苗第三代國際標準品共同標定研究報告)

| Lab | Sample | | | | | | |
|------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| 1 | 353 | 346 | 214 | 221 | 263 | 259 | 31 |
| 2 | 425 | 426 | 240 | 249 | 319 | 331 | 36 |
| 3 | 442 | 432 | 209 | 209 | 263 | 186 (249) | 31 |
| 4 | 349 | 345 | 228 | 227 | 294 | 303 | - |
| 5 | 362 | 364 | 220 | 220 | 288 | 292 | 35 |
| 6 | 415 | 394 | 227 | 229 | 309 | 310 | 37 |
| 8 | 382 | 413 | 239 | 233 | 289 | 290 | 34 |
| 9 | 323 | 326 | 227 | 231 | 246 | 250 | 28 |
| 11 | 383 | 376 | 224 | 224 | 287 | 280 | 35 |
| 12 | 362 | 349 | 218 | 211 | 269 | 273 | 21 |
| 13 | 452 | 503 | 220 | 228 | 266 | 274 | 31 |
| 14 | 424 | 390 | 219 | 221 | 255 | 246 | 33 |
| 15 | 326 | 350 | 195 | 205 | 235 | 248 | 19 |
| 16 | 419 | 448 | 250 | 233 | 285 | 335 | 40 |
| 18 | 376 | 372 | 218 | 217 | 287 | 295 | 37 |
| 19 | 297 | 343 | 242 | 228 | 253 | 255 | - |
| | | | | | | | |
| Overall GM | 378 | 383 | 224 | 224 | 275 | 274 (279) | 31 |
| %GCV | 5.4 | 5.3 | 2.7 | 2.1 | 3.7 | 6.4 | 9.5 |

表六、各實驗室 D 抗原含量標定數據

(資料來源:不活化小兒麻痺疫苗第三代國際標準品共同標定研究報告)

(3) 安定性試驗

本共同標定研究之安定性試驗設計，將候選標準品儲存於-150°C、-70°C、-20°C、+4°C、+20°C、+37°C，並於 12 個月後測定 D 抗原含量，另外亦儲存於+45°C，並於 24 小時後測定 D 抗原含量 (表七)，數據顯示，儲存於-70°C、-20°C、+4°C 及+20°C 之條件下相當安定，所測定之結果與-150°C 儲存條件下之結果並無顯著差異，而儲存於+37°C 及+45°C 條件下則會造成 D 抗原含量大幅降低。此外，置於-70°C、-20°C 及+4°C 儲存之安定性試驗仍將定期且持續進行，以監控標準品之品質穩定性。

| Temperature | Type 1 | Type 2 | Type 3 |
|-------------|--------|--------|--------|
| -70°C | 100.8 | 101.9 | 108.7 |
| -20°C | 101.1 | 99.1 | 95.6 |
| +4°C | 102.4 | 104.5 | 105.2 |
| +20°C | 103.7 | 113.9 | 114.6 |
| +37°C | 8.1 | 11.7 | 9.6 |
| +45°C | 24.8 | 84.1 | 60.4 |

表七、相對於-150°C 儲存條件下之 D 抗原含量
(資料來源:不活化小兒麻痺疫苗第三代國際標準品共同標定研究報告)

三、減毒疫苗品質管制檢驗

自 1988 年起，WHO 推動全球根除小兒麻痺計畫，多年來在各國之努力下，已獲得顯著之成果，2001 年全球病例數已降至 500 人以下，更於 2015 年 9 月宣布全球根除第二型小兒麻痺病毒。我國為配合全球根除小兒麻痺計畫，減少使用口服活性減毒小兒麻痺疫苗(oral polio vaccine, OPV)，降低疫苗衍生株(vaccine derived poliovirus, VDPV)引起之小兒麻痺，自 2011 年 9 月起已全面改用不活化小兒麻痺疫苗(inactivated polio vaccine, IPV)。

NIBSC 為配合 WHO 小兒麻痺根除計畫之推動，參與新型態小兒麻痺疫苗之研發，以基因工程方式製造小兒麻痺病毒之類病毒顆粒(virus-like particles, VLPs)，作為疫苗抗原之可能性。運用基因工程製造之病毒顆粒，其抗原性不亞於活病毒，再加上抗原穩定且不需大量增殖病毒，更適合作為小兒麻痺根除後之新型態疫苗。

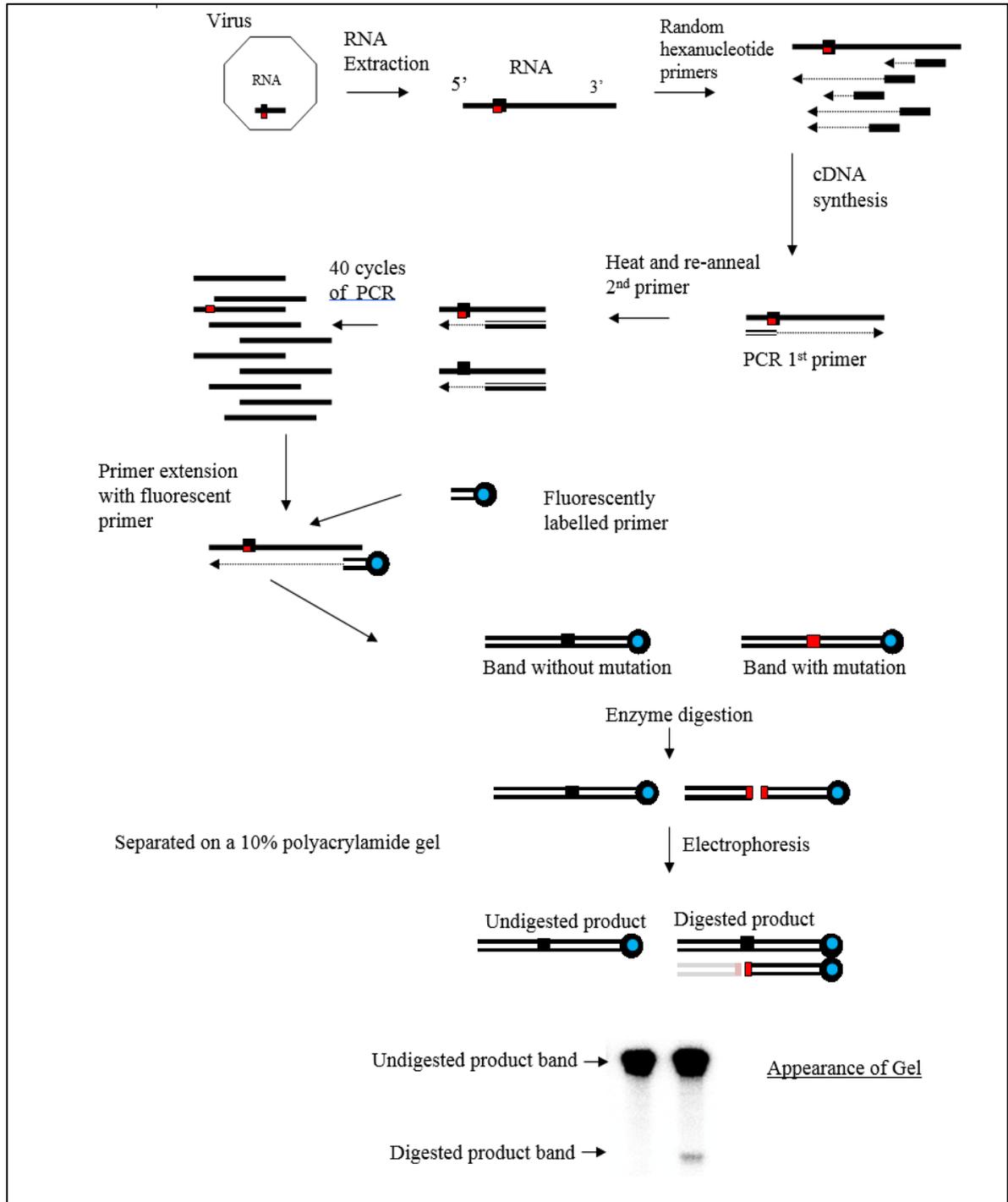
許多文獻指出口服活性減毒小兒麻痺疫苗(又稱沙賓疫苗)病毒株之毒力決定區域若發生基因變異，有毒力回復之情形，如第一型沙賓疫苗病毒株第 480 個基因位點、第二型沙賓疫苗病毒株第 481 個基因位點及第三型沙賓疫苗病毒株第 472 個基因位點發生點突變時(圖十二)，將影響病毒結構構型改變，而導致病毒毒力回復。

| | Sabin type 3 C472U ↓ | Sabin type 1 A480G ↓ | Sabin type 2 G481A ↓ | |
|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| Poliovirus | ATCCCAACCT | CGGAGCAGGT | GGTCACAAAC | |
| PV_Sabin1 | ATCCCAACCT | CGGGGCAGGT | GGTCACAAAC | |
| PV_Sabin2 | ATCCTAACCA | CGGACAGGC | GGTCGCGAAC | |
| PV_Sabin3 | ATTCTAACCA | TGGAGCAGGC | AGCTGCAACC | |

圖十二、影響口服活性減毒小兒麻痺疫苗(沙賓疫苗)病毒衍生株毒力回復之位點
(資料來源:來自病毒部門對外簡報)

為確保該類產品品質安全，目前國際上利用 MAPREC (Mutational analysis by PCR and restriction enzyme cleavage) assay 對疫苗衍生株進行基因體監測，來得知其毒力決定位點是否發生點突變，實驗步驟流程如圖十三所示，首先設計特定之引子(primer)，利用 PCR 技術將毒力決定位點區域核酸片段進行放大，接著再搭配限制酶(restriction

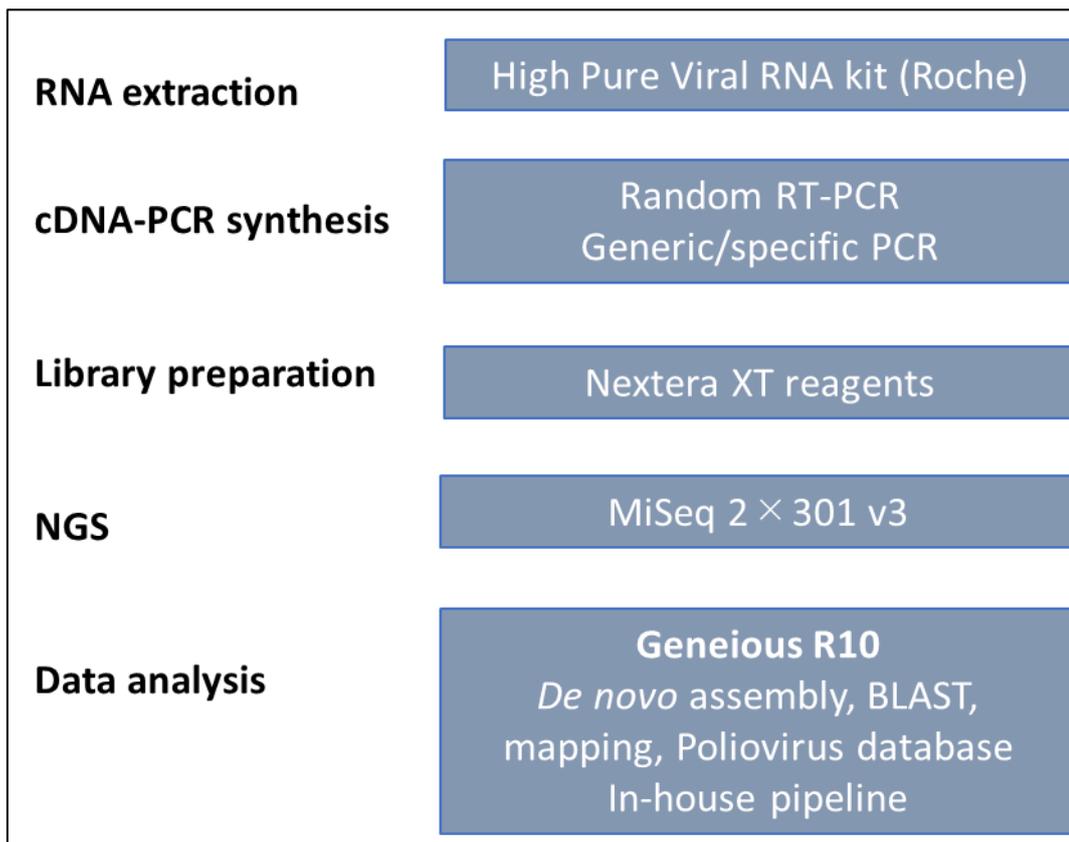
enzyme) 裁切及電泳跑膠來得知特定位點是否發生點突變。假若位點發生點突變，限制酶就會進行裁切，電泳膠圖結果就會出現大小兩個片段，並與標準品進行比對來得知點突變發生率。然而該實驗繁瑣複雜、實驗定量結果變異性大及實驗耗時長，因此該試驗普及率不高。



圖十三、MAPREC assay 實驗流程簡圖(資料來源:病毒部門對外簡報)

基於次世代定序技術蓬勃發展，NIBSC 小兒麻痺病毒研究實驗室近年著手研究運用次世代定序技術對該疫苗衍生株之基因體進行監測，希冀能取代傳統 MAPREC assay。該部分內容由病毒部門小兒麻痺病毒研究實驗室 Dr. Manasi Majumdar 及 Dr. Bethany Charlton 來說明。

次世代定序又稱為高通量基因定序法，建構在第一代定序方法基礎上所開發的定序方法。近年來，次世代定序技術廣泛地運用於臨床檢測，加速精準醫療之實現。次世代定序平台之基本原理及操作流程，主要可細分為樣本庫製備(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。藉由次世代定序高通量特性，對沙賓疫苗病毒株快速進行全基因體定序，定序結果再與小兒麻痺病毒序列資料庫進行比對，並可計算該位點點突變發生比率，來監測基因體穩定性，確保產品品質之安全。

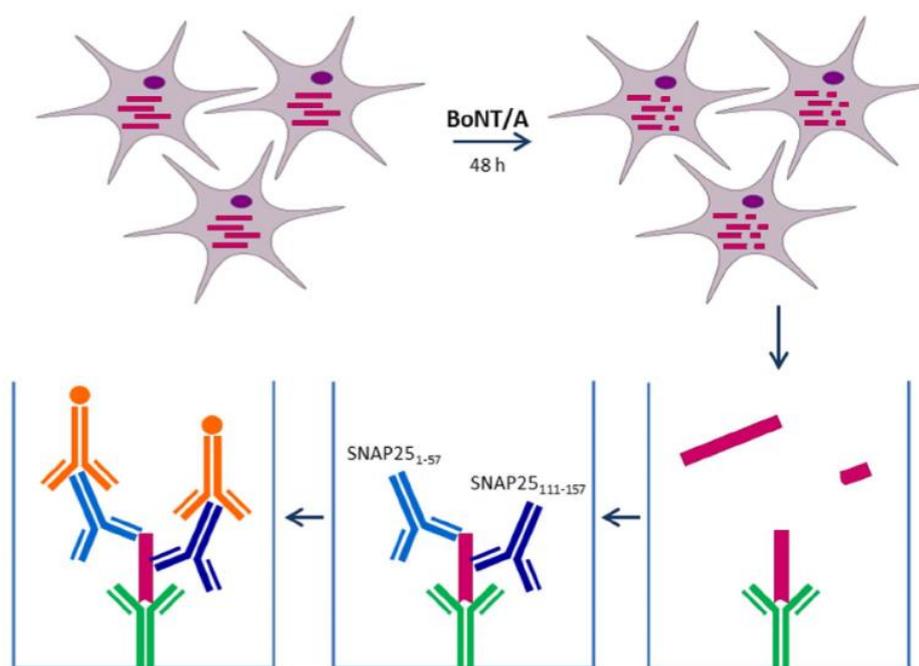


圖十四、次世代定序技術對沙賓疫苗基因穩定性監測實驗流程
(資料來源:病毒部門對外簡報)

四、肉毒桿菌毒素製劑效價試驗

鑒於國際強調實驗動物 3R(替代、減量、精緻化)原則，一般肉毒桿菌毒素製劑 LD₅₀ 效價試驗需要使用大量實驗動物，不符合國際發展趨勢，為能與國際發展接軌，本署亦積極致力於利用細胞培養結合免疫酵素分析方法開發以 cell-based 效價試驗平台。為利於本署即早建立相關檢驗平台，應用於未來封緘放行檢驗，本次研習安排與細菌部門肉毒桿菌毒素製劑研究實驗室主管 Dr. Paul Stickings 交流討論。

雖然肉毒桿菌毒素製劑於歐盟並無強制性規定逐批放行，但基於部分國家進口該製劑仍要求檢附出廠國檢驗證明書，會配合業者之需求，執行肉毒桿菌製劑逐批放行工作。NIBSC 基於實驗動物 3R 原則，以 cell-based 效價分析平台來進行品質管制檢驗，實驗流程簡圖如下。



圖十五、Cell-based 效價試驗流程簡圖

(資料來源: *J Immunol Methods*. 2017 Dec; 451:90-99)

肆、心得與建議

1. 生物性國際標準品製備相關

國際生物性標準品製備流程繁瑣複雜，包含生物性候選材料之準備、候選材料品質預試驗、填充及冷凍乾燥等作業程序。雖然過程錯綜複雜，但 NIBSC 標準品製備部門只有 10 餘個人員，因為 NIBSC 係以專精訓練為主，人員充分展現專業分工，流程操作順暢，達事半功倍之效。除此之外，參訪標準品製備部門亦觀察到標準品製備設備持續與時俱進，展現出高度自動化，深深體會到「工欲善其事，必先利其器」之道理，以上運作模式及自動化設備導入規劃值得學習，可供未來國家實驗室建立之參考規劃，以提升我國生物性國家標準品製備之水準。

2. 國際共同標定研究相關

為因應腸病毒 71 型抗原國際標準品之共同標定研究，本次受 NIBSC 相關部門安排研習腸病毒 71 型疫苗血清中和試驗及抗原含量試驗(ELISA)。透過與專家當面討論交流共同標定研究前置作業(試驗材料準備)、計畫撰擬、試驗設計、數據收集統計分析及報告撰寫等重要步驟，更能掌握共同標定計畫應注意的重要環節，作為本署未來舉辦共同標定研究計畫之參考，提升共同標定研究計畫之執行，並且有助於提升國家標準品之公信力。本署亦持續參與相關共同標定計畫，提升我國相關檢驗技術水準國際能見度，對促進國際合作與交流有極大助益。

3. 減毒疫苗品質檢驗相關

為配合 WHO 根除小兒麻痺病毒發展計畫，及避免口服活性小兒麻痺疫苗發生變異而導致疫苗衍生株引起小兒麻痺，NIBSC 運用次世代定序技術來監測口服活性小兒麻痺病毒疫苗病毒株基因序列之穩定性，藉由次世代定序高通量特性，對小兒麻痺病毒株基因序列快速定序，針對病毒株毒力決定位點進行基因監測，監測位點突變發生率，以確保疫苗病毒株之穩定性。雖然次世代定序技術快速分析特性取代傳統複雜耗時之 PCR 檢測技術，但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解決為 NIBSC 未來努力之目標。我國亦將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。

4. 肉毒桿菌毒素製劑效價試驗

鑒於國際強調實驗動物 3R(替代、減量、精緻化)原則，因為現行肉毒桿菌毒素製劑 LD₅₀ 效價試驗需要使用大量實驗動物，已不符合國際趨勢，目前致力於利用細胞培養結合免疫酵素分析方法之 cell-based 效價試驗方法，藉由本次研習與相關部門討論方法建立關鍵步驟注意事項，並且建立溝通管道，汲取相關實務經驗，有助於我國即早建立檢驗平台，確保檢驗技術與國際接軌。

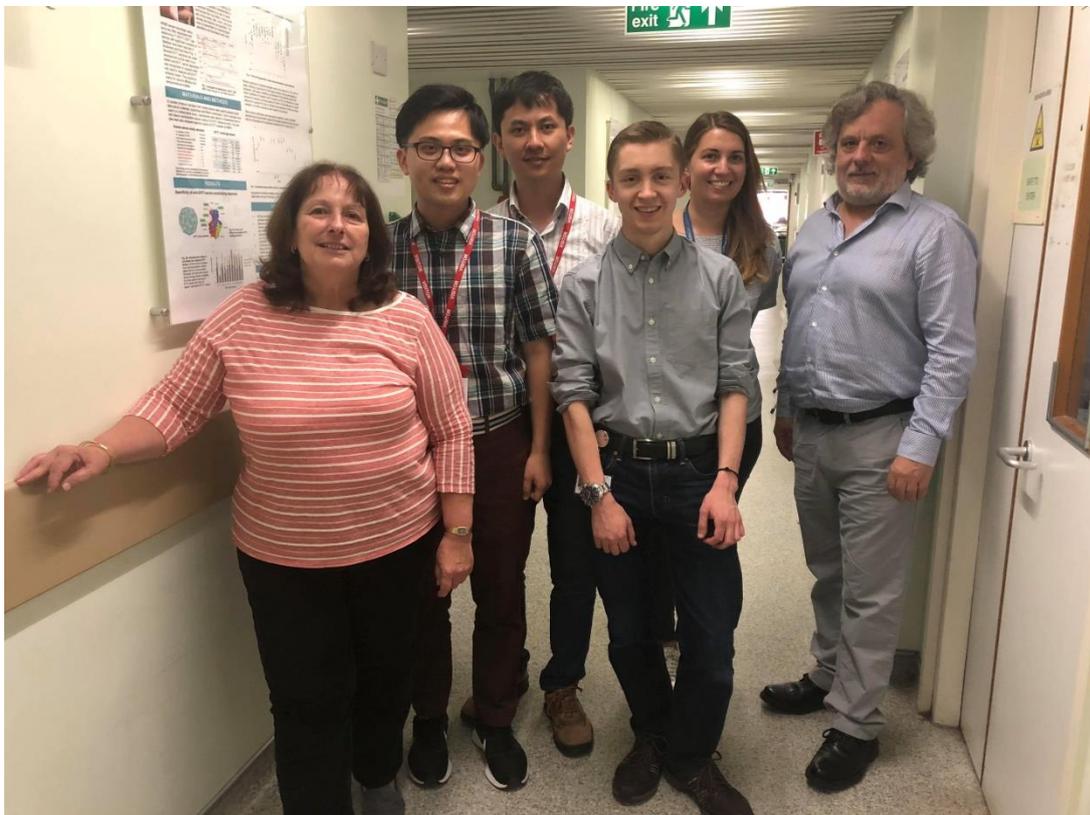
5. 國際關係建立

藉由本次赴 NIBSC 研習生物性國際標準品製備與檢驗技術及減毒疫苗品質管制檢測技術，順道會晤病毒部門代理組長 Dr. Nicola Rose，就病毒性疫苗檢驗技術發展、研究結果及管理業務等相關議題進行廣泛交流，瞭解現行國際技術發展趨勢及品質管制策略。另外，本署生物藥品實驗室於今年度 3 月正式加入歐盟官方藥品管制實驗室網絡(OMCL)，成為網絡之一員。而 Dr. Nicola Rose 正巧為 NIBSC 參與歐盟官方藥品管制實驗室網絡(OMCL)年會之代表，藉機交流網絡內相關活動資訊，並從中得知明年度 OMCL 年會於英國倫敦舉辦。若時間上允許，Dr. Nicola Rose 非常歡迎明年度參與年會時，再次參訪 NIBSC。本署應持續派員赴各國官方藥品管制實驗室、世界衛生組織合作實驗室或其他具先進設備之實驗室進行研習交流，持續精進我國檢驗能力，以完善我國品質管制評估體系，並建立與國際級實驗室專家之聯絡管道，以便即時獲取國際新知，並爭取相關合作機會。

伍、附錄



NIBSC 主建築物入口處



與病毒學部門實驗室成員合影



與病毒學部門代理組長合影



與病毒學部門實驗室成員合影