



RRPG91030029 (43 .P)

計畫編號：DOH 91-DC-1041

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

生物可分解性口服卡介苗之研發

研究報告

執行機構：中國醫藥學院

計畫主持人：侯庭鏞

研究人員：項千芸、吳世祿、賴羿如

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

計畫編號：DOH 91-DC-1041

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

生物可分解性口服卡介苗之研發

研究報告

執行機構：中國醫藥學院

計畫主持人：侯庭鏞

研究人員：項千芸、吳世祿、賴羿如

執行期間：91年1月1日至91年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

	頁碼
封面	
目錄	
一、摘要	(1)
二、本文	
(一) 前言	(3)
(二) 材料與方法	(8)
(三) 結果	(14)
(四) 討論	(19)
(五) 結論與建議	(24)
(六) 參考文獻	(26)
(七) 圖表	(32)

摘要

本計畫利用生物可分解性基材—poly-DL-(lactide-co-glycolide)(PLG)—為基礎，併合基因工程技術生產生物性黏膜佐劑，進行口服卡介苗原型產品之開發。本計畫已完成下列四部分研究：(一) 卡介苗菌株的製備及品管的建立。卡介苗菌株以 Middlebrook 7H9 為基質，在接種後第 14 天可收集到活性最佳的菌株，進一步利用抗酸染色進行雜菌檢測，利用聚合酶連鎖反應進行卡介苗菌株的分子鑑定，並利用西方雜合反應偵測卡介苗菌株抗原性的變化；(二) 生物性黏膜佐劑的產製及品管的建立。我們選定大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質為生物性黏膜佐劑，利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的表現及純化，並由 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析進行品管控制，偵測每一批號忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質功能上的差異；(三) 口服卡介苗原型產品的製備及特性分析。本計畫完成卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗、包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑之微球體等兩項原型產品的製備，包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑的微球體以 lactide-glycolide 比例為 85:15、分子量為 89,015 的 PLG 呈現最佳的包裝量及包裝率，也呈現控制釋放的特性；(四) 口服卡介苗原型產品免疫有效性的測定：我們利用卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗，進入免疫的前趨試驗，結果顯示，忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質確實可以增強免疫效果，而且在 1 週歲及 6 週齡的老鼠都呈現相似的結果。以第二年計畫所完成的卡介苗菌株及生物性黏膜佐劑的產製及品管的建立，可以穩定每一批號材料的一致，而本計畫所製備的原型產品已證實其免疫有效性，未來應可順利完成生物可分解性口服卡介苗之研發。

關鍵詞：卡介苗、大腸桿菌忌熱性腸毒素、微球體、口服疫苗

Abstract

Over the past several years, there has been a concerted effort to develop a new vaccine against tuberculosis. The existing vaccine, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG), has been used for many decades, but meta-analysis of controlled clinical trials has revealed a lack of effectiveness in adults. In order to develop the oral vaccine that could be stable during oral administration and be targeted to M cells, we prepared the poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres containing BCG by a water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. The BCG strain was inoculated in Middlebrook 7H9 broth and qualified by acid-fast staining, polymerase chain reaction, and Western blotting. The bioadjuvant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunit B (LTB) was expressed from prokaryotic expression system and qualified by GM1-enzyme-linked immunosorbent assay. Two prototypes of oral BCG were constructed. One was the BCG-LTB conjugate, the other was PLG microspheres entrapped BCG-LTB. The microsphere showed a 41.7% entrapment ratio and a slow release manner. The immunogenicity of BCG-LTB conjugate was further investigated and the results showed that LTB indeed enhanced the humoral response of BCG in young and old mice. Taken together, our data suggested that PLG-based microspheres could serve as a formulation for controlled-release oral vaccine.

Keywords: Bacillus Calmette-Guerin, *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, microsphere, oral vaccine

前言

結核病 (tuberculosis) 是目前全球各種傳染病中造成最多死亡的疾病。根據世界衛生組織的統計，全球大約已有 1/3 人口感染結核桿菌，每年約有 800 萬個新發病的結核案例，約有 300 萬人死於結核病，到了公元 2000 年，預計每年死亡人數會達到 350 萬人，而這種情況也隨著抗藥性菌株的產生，及與愛滋病共同感染而更顯嚴重 (CDC, 1993; Kaufmann, 2000; Kochi, 1991; Lagranderie et al., 2000; WHO, 1999)。全球各地區結核病流行情形大不相同，其中以東南亞及非洲流行情況最為嚴重，至於台灣地區，結核病為 2001 年死因之第 12 名，約有 1,299 人死於結核病，死亡率為 1.03%。結核防治計畫不完善、愛滋病盛行及全球人口快速流動等原因，都加速了結核病的傳播。

目前使用的結核病疫苗，即卡介苗 (Bacille Calmette-Guerin; BCG)，是由法國科學家 Calmette 及 Guerin 於 1920 年代左右開發的牛結核桿菌 (*Mycobacterium bovis*) 馴化株。卡介苗已經使用至少 70 年，每年約有一億個新生兒接種卡介苗，使得卡介苗成為世界上使用最廣泛的疫苗之一。卡介苗的副作用很少，可以預防年輕人發生粟粒性結核及腦膜性結核，但是卻無法預防成年人肺結核的發生 (Colditz et al., 1994)。由臨床試驗的結果也顯示，卡介苗對成年人的保護性差異相當大，其效價可自印度的 0% 至英國的 80% (Fine, 1995)。因此本計畫首要目標為研發並探討生物可分解性口服卡介苗對成年人的免疫效能。藉由口服方式，探討口服卡介苗是否可以誘發良好的黏膜性及細胞性免疫反應，進一步再經實驗探討是否可取代舊型幼童肌肉注射型卡介苗，以開發出一具實用價值且可在肺結核的防疫上扮演重要角色的口服卡介苗。

早期 Calmette 設計卡介苗的接種方式為直接口服，研究證明在新生動

物及新生兒口服卡介苗後，卡介苗可以通過小腸上皮，而誘發特異性抗結核桿菌的免疫反應 (Calmette et al., 1933)。之後的研究也顯示，卡介苗直接口服後，可由 M 細胞通過小腸障壁進入 Peyer's patches，而誘發黏膜性免疫反應 (Fujimura, 1986; Lagraderie et al., 1997)。雖然卡介苗以直接口服的方式進行免疫，除了可以刺激良好的黏膜性免疫反應，對抗結核桿菌的感染外，也可以降低預防注射的成本。然而，直接口服卡介苗會產生許多缺點，如造成頸部淋巴腺炎、耳炎、咽後膿瘍、及微弱的結核素反應的發生等 (Lotte et al., 1984)，因此，開發卡介苗的微包覆技術，除了可以經口投與外，也可以降低卡介苗的劑量，同時可以避免卡介苗吸附於口咽喉上皮，造成菌血症的發生。

本計畫所選用的生物可分解性包覆材質為 poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG)。PLG 具有粘著力特性，且具有以下幾個優點，是一個非常好的口服疫苗微球體包覆材質 (Cox and Coulter, 1997; Morris et al., 1994)。第一，具有生物相容性 (biocompatibility) 且其安全性高 (Hsieh, 1988)。第二，具有生物可分解性 (biodegradation): PLG 的酯鍵結可被水解成為 lactic acid 及 glycolic acid，而這兩種成份可經由動物體內的 Krebs cycle 代謝排除。酯鍵結的水解速率取決於分子量、分子表面積、分子立體空間規律性及 lactide/glycolide 比例等因素 (Lewis, 1990)。第三，具有控制釋放 (pulse release-controlled release) 之效果: 控制釋放的特性對於疫苗 (尤其是 one shot vaccine) 中抗原的釋放而言，是很重要的。在疫苗投與之後，抗原經過控制性的釋放，可達到類似初次免疫及補強免疫的效果。而控制釋放的特性，除了應用在疫苗上，降低疫苗補強的消耗外，也應用於抗腫瘤藥物、抗生素及抗發炎藥物的劑型上，有效地降低藥物的毒性。以 PLG 為基質的微粒體可以藉著擴散、基質分解、或基質崩解等方式，使內容物釋放出來 (McGee

et al., 1995)。第四，具有增強免疫的效果 (immunopotential)：PLG 可做為一個抗原的運輸系統，增強黏膜性及全身性免疫反應。PLG 增強免疫的能力，是由大小及厭水性兩個因素決定，當微粒體小於 10 μm 時，可成功地被送到 Peyer's patches，進而輸送到富含 T 細胞及 B 細胞的區域；當微粒體小於 5 μm 時，可被位於 Peyer's patches 的巨噬細胞吞噬，輸送到腸繫膜淋巴結，而刺激全身性免疫反應；當微粒體大於 5 μm 時，可被 Peyer's patches 抓住而誘發黏膜性免疫反應，至於厭水性的材質可有效地被 Peyer's patches 吸收 (Eldridge et al., 1989a；Eldridge et al., 1989b；Eldridge et al., 1991)。目前 PLG 作為包覆材質已被應用於長效型皮下注射型避孕藥，例如 Nutropin DepotTM 及 ELIGARDTM，其安全性已經美國食品及藥物檢驗局核可。

口服疫苗除了考慮適當的抗原及材質外，尚須搭配適當的佐劑，方為一完整疫苗開發的考量。大部份的抗原在以黏膜途徑投與時，其免疫原性都相當差，並且會造成免疫耐受性的產生，此時黏膜佐劑就可克服這個缺點，輔助抗原被 M 細胞吸收，誘導黏膜性免疫反應的產生。細菌毒素，包括霍亂毒素及大腸桿菌忌熱性腸毒素 (heat-labile enterotoxin) 等，都具有作為黏膜佐劑的潛能 (Komase et al., 1998)。腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *E. coli*) 可藉著特定的致病因子，在小腸上皮增殖，並導致下痢的發生。大部份腸毒性大腸桿菌可以產生一到數種的線毛，這些線毛可吸附在小腸的上皮細胞，使大腸桿菌在小腸內增殖。腸毒性大腸桿菌在吸附到小腸黏膜上皮後，可產生腸毒素，導致小腸上皮細胞內水份及電解質的流失，最後造成下痢。腸毒性大腸桿菌所產生的腸毒素主要為忌熱性腸毒素 (heat-labile enterotoxin；LT)，忌熱性腸毒素是一個高分子量的複合物，由一個 A 次單位及五個 B 次單位以非共價鍵結的方式組成 (Spangler, 1992)，其中 B 次單位對存在於細胞表面的 ganglioside receptor 具有高親合性，而 A 次單位為產

生毒素效用的單位。忌熱性腸毒素作為黏膜免疫性佐劑的效用與 A 次單位的 ADP ribosyltransferase 活性有關 (de Haan et al., 1996)，而 B 次單位則可產生 immunological carrier 的效用 (Truitt et al., 1998)。忌熱性腸毒素具有調節免疫的功能，可增加抗原被 M 細胞吸收的機會、增強巨噬細胞及上皮細胞的抗原呈現能力、增加 antigen presenting cell 釋放 interleukin 1 及 interleukin 6、增加 T 細胞反應的分化 (誘發產生 Th1、Th2 的反應)、刺激 B 細胞 isotype switching 等功能 (Takahashi et al., 1996)。這些特性，可以輔佐微球體在經黏膜途徑投與時有效地增加被 M 細胞攝入的機會，且可作為良好的黏膜性佐劑，產生良好的黏膜性免疫反應。忌熱性腸毒素作為佐劑的使用方式已進入臨床前試驗 (pre-clinical test) 證實其有效性及安全性 (NIAID/NIH Conference, Bethesda, MD, July 9, 2001)。

目前結核病疫苗的研究除了以牛結核桿菌馴化株為主外，許多實驗室也積極朝向次單位疫苗方向研發。例如在結核桿菌生長時所分泌的蛋白質，已被證實相當具有抗原性，這群蛋白質統稱為 culture filtrate proteins (CFP) (Orme et al., 1993; Sonnenberg and Belisle, 1997)。CFP 免疫小白鼠後，可以產生與卡介苗相當的保護性 (Bosio and Orme, 1998)，而保護性的產生主要是藉由引發 Th1 細胞性免疫反應 (Wilkinson et al., 2000)，其中，Th1 細胞所產生的 γ 干擾素對保護人類免於受到結核桿菌的感染是非常重要的細胞素 (Dorman and Holland, 1998)。

對於結核桿菌疫苗有效性的評估方面，Hussey 等 (2002) 針對新生兒進行不同卡介苗菌株、不同接種途徑、不同接種年齡等變因的測試，以評估對卡介苗引發免疫反應的影響。他們的結果顯示，只有誘發 Th1 細胞反應才能產生良好的保護性，因此疫苗的效力最好是針對是否可以造成特異性的淋巴球增殖反應、是否可以誘發 γ 干擾素的產生等方向進行評估。此

外，Doherty 等 (2002) 利用細菌內毒素 lipid A 作為黏膜性佐劑，比較肺結核桿菌次單位疫苗在口服及肌肉注射的保護力，發現實驗動物在口服肺結核桿菌次單位疫苗後，可以在肺部的黏膜面產生高量的 IgA，而耐過肺結核桿菌的攻擊。因此，本計畫在口服卡介苗免疫有效性的評估上，以 IgA 為分析的首要準則，進一步分析淋巴球增殖反應及 γ 干擾素，最後再以結核菌素試驗確認。而本計畫的執行，是希望能以研發成人補強型之口服卡介苗為首要開發目標，進一步再分析是否具有取代幼童肌肉注射型卡介苗之可能。

為了改善卡介苗的免疫保護性，本計畫結合高分子及蛋白質工程之實驗策略，利用生物可分解性基材為基礎，併合基因工程技術生產生物性黏膜佐劑，完成生物可分解性口服卡介苗之開發，以使傳統卡介苗經改變此疫苗劑型後，可直接口服以增加疫苗使用之方便性，並藉由添加黏膜佐劑以加強此疫苗在呼吸道之保護性。未來經由小白鼠、天竺鼠或牛之保護性試驗及人體試驗，應可開發出一具實用價值且可在肺結核的防疫上扮演重要角色的口服卡介苗。

材料與方法

一、卡介苗菌株及生物性黏膜佐劑實驗室製程及品管模式之建立

(一) 卡介苗菌株的製備

卡介苗疫苗株分讓自行政院衛生署疾病管制局。菌株先培養於 Middlebrook 7H11 agar (Difco) 進行單株化後，保存於-80°C。為了製備疫苗抗原，我們將菌株接種於添加 10% albumin-dextrose-catalase 及 0.05% Tween 80 的 Middlebrook 7H9 培養液中，於 37°C 震盪培養 14 天，再收集菌體作為疫苗的來源。

(二) 卡介苗菌株品管模式的建立

1、抗酸染色

卡介苗菌株的抗酸染色是利用 TB stain kit K (Difco) 套組進行。方法為將細菌塗抹於玻片上，利用火固定後，加入 TB Carbofuchsin KF 染色 4 分鐘，之後水洗，利用 TB Decolorizer 脫色 3 至 5 秒，最後以 TB Brilliant Green K 對比染色 30 秒，再利用油鏡觀察。

2、卡介苗菌株的分子鑑定

為了避免因不斷培養，造成卡介苗菌株發生突變，我們利用聚合酶連鎖反應進行品管控制。將 10^7 colony-forming unit (CFU) 的菌體收集後，以 100 μ l 水混懸，直接取 5 μ l 進入聚合酶連鎖反應 (Bedwell et al., 2001)。RD1 的偵測，是以 ET1 (5'-AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC-3')、ET2 (5'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCCGG-3')、ET3 (5'-GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG-3') 為引子進行反應 (Talbot et al., 1997)。Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) 的偵測，是以 C5 (5'-GCGCGAGAGCCCGAACTGC-3')、C3

(5'-GCGCAGCAGAAACGTCAGC-3')為引子進行反應(Magdalenal et al., 1998)。聚合酶連鎖反應之後的產物，以3% agarose 電泳進行分析。

3、卡介苗菌株抗原性的偵測

為了偵測每一批卡介苗菌株的抗原性是否發生變化，我們利用西方雜合法進行品管控制。將抗原利用蛋白質電泳分析，再利用肺結核病人的血清為抗體，進行偵測。由上年度的結果顯示，病人血清的抗體會偵測到分子量約105 kDa及45 kDa的抗原，因此這兩條特異性的抗原可用來作為疫苗抗原品管監控的標準。

(三) 生物性黏膜佐劑的製備

為了取得大量而且純度很高的生物性黏膜佐劑——忌熱性腸毒素B次單位蛋白質，我們利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的大量產製。將構築好的表現質體送入大腸桿菌BL21(DE3)pLysS中，這一株大腸桿菌內帶有一個嵌在染色體上的T7 RNA聚合酶基因，其表現受*lacUV5*啟動子控制，因此可以用異丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; IPTG)誘導T7 RNA聚合酶的表現，進而大量轉錄pET質體上所帶的基因，產生RNA及進一步製造蛋白質。此外，菌體內帶有一個T7溶解酶基因的質體，T7溶解酶可抑制T7 RNA聚合酶的活性，防止少量的T7 RNA聚合酶在IPTG誘導前提早表現外來的蛋白質，而對細菌產生毒性或抑制其生長。在上年度的計畫中，發現於IPTG濃度0.5 mM、細菌濃度為OD₆₀₀=0.7的條件下，可以產生最大量的蛋白質，此外，在IPTG的刺激下，雖然可誘導多量的蛋白質產生，但都以可溶性的狀態存在，因此在純化時只需將細菌打破，即可利用immobilized D-galactose resin，進入純化步驟。

(四) 生物性黏膜佐劑品管的建立

為了瞭解每一批重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的功能是否一致，我們進行 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)。因忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質對細胞表面的糖脂 GM1 具有極高的親合性 (Spangler, 1992)，因此我們利用 GM1—ELISA 測定並比較每一批重組型忌熱性腸毒素結合 GM1 的能力。

二、口服卡介苗製程之設定及特性分析

(一) 卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗之製作及分析

將忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質與卡介苗菌株混合後，緩慢地加入 10.6 M 之交聯劑戊二醛 (glutaraldehyde) 至最終濃度為 4 mM，再放置於室溫中搖晃 3 小時。於作用結束後，加入 1 M glycine 至最終濃度為 60 mM，再利用磷酸緩衝液進行透析 (Tamura et al., 1997)。為了評估結合反應的效果，我們將結合後之蛋白質利用蛋白質電泳及 GM1—ELISA 分析。

(二) 生物可分解性微球體製程之設定

我們利用溶劑蒸發法製備微球體，方法為：將卡介苗接合生物性黏膜佐劑為抗原，取 0.25 mg 溶於 50 μ l 磷酸鹽緩衝液中，將 PLG 50 mg 溶於 500 μ l dichloromethane 中，之後將兩者混合，利用均質機在 8500 rpm 的轉速下，混合 2.5 分鐘，以製成 water-in-oil 的微球體。進一步加入 10 ml 之 8% polyvinyl alcohol，利用均質機在 8500 rpm 的轉速下，混合 2.5 分鐘，以製成 water-in-oil-in-water 的微球體。最後將混懸物置於室溫下，利用磁石攪拌器攪拌 16 小時，使溶劑 polyvinyl alcohol 蒸發。微球體經離心收集，再以水清洗後，以冷凍乾燥機乾燥，置於乾燥箱中保存 (Blanco-Prieto et al., 1997)。PLG 分讓自工研院生物醫學工程中心，lactide 及 glycolide 的比例

為 100:0、85:15、82:18、75:25、50:50，分子量介於 40,000 至 197,996 之間。

(三) 生物可分解性微球體物化特性的分析

1、微球體回收率及蛋白質包裝率分析

微球體的回收量是藉量測微球體乾燥後的重量所評估出來的，回收率為微球體乾燥後的重量除以原始重量的百分率。蛋白質包裝量，可用以下方法計算。將 1 mg 微球體懸浮於 200 μ l 之 0.2 N NaOH/0.1% SDS 溶液中，於 37°C 震盪作用 16 小時，使所有蛋白質自微球體中釋放出來，之後離心 10 分鐘，上清中的蛋白質以 Bradford 的方法，測定濃度。包裝量指的是每 mg 微球體所釋放的蛋白質總量，包裝率為實際包裝的蛋白質總量除以原始蛋白質總量的百分率。

2、微球體體外釋放試驗

將 1 mg 微球體置於 100 μ l 磷酸鹽緩衝液中，於 37°C 震盪作用，每 1~3 天吸取 50 μ l 上清液，再加入 50 μ l 新鮮的磷酸鹽緩衝液，繼續震盪作用。所收集的上清液一方面以 Bradford 的方式測蛋白質濃度，一方面進行蛋白質電泳分析，觀察在不同時間下抗原釋放的情形。

三、口服卡介苗免疫有效性之測定

本項實驗主要是利用卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗，初步測定口服卡介苗的免疫有效性，藉由收集血清、腸洗液、肺洗液，分析黏膜免疫反應的強度。進行方法如下：

(一) 免疫計畫

以幼年動物免疫試驗為例，實驗動物為 6 週齡及 1 週歲的小白鼠，分

成七組。每組共免疫兩次，間隔為 2 週，在最後一次免疫後 2 週，將動物犧牲，進行樣品的收集。組別如下：卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組、肌肉注射組及腹腔注射組；卡介苗口服組、肌肉注射組及腹腔注射組；陰性對照組。每隻小白鼠分別給予 50 μg 卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗或 25 μg 卡介苗。

(二) 樣品的收集及處理 (Tochikubo et al., 1998)

血清樣品是將由心臟或血管採血所收集到的血液先平放在 37°C、30 分鐘後，再置於 4°C 的冰箱中 18 小時，使血液充分凝固收縮後，在 4°C 下以 3,000 g 離心 20 分鐘後收集血清，保存在 -20°C 備用。

肺洗液部份，採到的肺臟馬上以清水沖洗外部後，以剪刀將心臟及食道小心剪去，再次以清水沖洗後立刻用紙巾擦乾。之後將滅菌好的磷酸緩衝液經氣管小心灌入肺臟內，並以手輕捏肺臟各部位，使倒入的緩衝液能與肺臟各部組織接觸，但避免用力以免傷及實質組織。將已沖洗完全的溶液倒出至離心管中，以超音波振盪 30 分鐘後，初步離心 1,000 rpm、10 分鐘後，取上清液再以 25,000 g 離心 30 分鐘，最後上清液再保存於 -20°C 備用。

腸洗液部分，將採得的小腸馬上以清水沖洗外部擦乾後，自一端灌入已滅菌好的 Solution III (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ soybean trypsin inhibitor、50 mM EDTA、100 mM PMSF、0.5 % gelatin、0.05 % NaN_3 、1x PBS)，用手將溶液擠到小腸的末端後將腸洗液倒出至離心管中，其餘操作步驟與肺洗液相同。

(三) 體液性免疫反應的測定

1、酵素連結免疫吸附試驗 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)

體液性免疫反應的測定採 ELISA 的方法。先將卡介苗的可溶性蛋白質（經超音波打碎後之卡介苗上清液）吸附於 96 孔的平盤上，再加入上述所收集到之血清、肺洗液及腸洗液，之後加入標示酵素的二次抗體及受質加以呈色。為了區分血清及黏膜洗液中的抗體種類，我們在二次抗體部份分別加入抗 IgG 及 IgA 的抗體，以評估疫苗經免疫後誘發 IgG 及 IgA 的效果。

2、黏膜性免疫反應強度判讀的方法

先將固定稀釋倍數的肺洗液、腸洗液及血清進行 ELISA，以測定 IgG 及 IgA 抗體的相對強度。之後再將肺洗液、腸洗液及血清經過連續稀釋，以 ELISA 測量其連續稀釋之吸光度，以計算抗體的力價（titer）。由不同實驗組別動物肺洗液、腸洗液及血清中的抗體力價進行比較，便可得出其黏膜免疫反應之強度。

結果

一、卡介苗菌株及生物性黏膜佐劑實驗室製程及品管模式之建立

為了獲得大量且具抗原性的卡介苗菌株，我們於上年度計畫中測定卡介苗在 3 種不同培養基的生長狀況，其中兩種為培養結核桿菌常用的 Middlebrook 7H9 broth 及 Dubos broth，另一種為 GAS (Sonnenberg and Belisle, 1997)。結果顯示以 Middlebrook 7H9 為基質所培養出來的細菌數及活性最佳，在接種後第 3 至 15 天之間，細菌呈現對數生長，在培養 15 天後，細菌會進入到 stationary phase (圖一)。因此我們採取卡介苗菌株接種於 Middlebrook 7H9 培養液中，於 37°C 震盪培養 14 天，以作為菌株來源。

卡介苗菌株經過培養後，可能會因為變異的發生，而造成抗原性不一致的現象。為了確保每一批菌株的品質，我們利用三種方法進行品質管控。

(一) 利用抗酸染色進行雜菌檢測。因為卡介苗菌株細胞壁上含有豐富的油脂，在染色後利用酸性酒精進行清洗，並不會將染劑洗去，因此呈現紅色，反之，其他細菌會被對比染劑孔雀綠染上色，因此呈現綠色。圖二 (A) 顯示在實驗室的操作下，卡介苗菌株培養液中並沒有雜菌污染的現象，而且菌株呈現一致的粉紅色。(二) 卡介苗菌株的分子鑑定。因為卡介苗菌株的出現，為牛型結核桿菌經不斷接種繁殖後，造成突變所馴化出來的疫苗株。因此，為了偵測每一批菌株在基因型上的變異性，我們利用聚合酶連鎖反應，進行分子鑑定。我們將不同批號的卡介苗菌株，利用 ET1、ET2、ET3 為引子，偵測 RD1 的區域。因為 RD1 存在於牛型結核桿菌及結核桿菌的染色體中，但卡介苗菌株並不含有 RD1，因此毒力株可以增殖出 150 bp 的片段，而疫苗株可以增殖出 200 bp 的片段，藉由此片段的長度差異，可區別毒力株及疫苗株。圖二 (B) 顯示，兩種菌株皆可如預期般，增殖出長約 200 bp 的產物，因此也確定這兩種不同批號的卡介苗菌株失去 RD1 區

域。進一步，我們利用偵測 MIRUs 片段的長度，推論菌株的來源。MIRUs 含有數段 77-bp repeat region 及數段 53-bp repeat region，可藉由 repeat region 出現的數量，進行類似人類親子鑑定的分子鑑定。圖二 (B) 顯示，兩種菌株皆可增殖出長約 353 bp 的產物，相當於含有 3 段 77-bp repeat region，而不含 53-bp repeat region。比對 Magdalena 等 (1998) 的報告，卡介苗菌株 1173P2、Glaxo、Russian、Moreau、Danish 的 MIRUs 長度約為 276 bp，而日本株為 353 bp，因此由基因型判斷，這兩株不同批號的卡介苗菌株是源自於日本株，且不會因為繼代而改變 MIRUs 的長度。(三) 卡介苗菌株的抗原性分析。為了了解每一批號的卡介苗菌株是否會發生抗原性變化的現象，我們利用肺結核病人的血清為抗體，以西方雜合反應加以偵測。圖二 (C) 顯示，每一批號卡介苗菌株的培養上清液及菌體皆呈現相似的圖譜，在上清液中，可額外發現分子量約 105 kDa 及 45 kDa 的抗原被偵測出來。這個結果顯示，卡介苗菌株生長時會分泌蛋白質，而這些分布在上清液中的蛋白質可與野外菌株交叉反應，此外，每一批號的卡介苗菌株皆出現相同的抗原性。

除了卡介苗菌株外，我們尚需大量製備生物性黏膜佐劑，以提高黏膜免疫時的免疫效能。我們選定大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位為生物性黏膜佐劑的材料，並以原核表現系統進行蛋白質的產製。在 IPTG 濃度 0.5 mM、細菌濃度為 OD₆₀₀=0.7 的條件下，可以產生大量的蛋白質，此外，在 IPTG 刺激的狀況下，雖然可誘導多量的蛋白質產生，但都以可溶性的狀態存在，因此我們利用親和性樹脂 immobilized D-galactose resin 進行純化。在三小時的操作時間內，可自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，其純度至少 99% (圖三 (A))。

因為忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質可作為黏膜佐劑的原因之一可能是因

為忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質可以與腸上皮的 GM1 結合，而誘發腸上皮細胞的攝入，引發免疫反應(Lencer et al., 1995)，因此，我們利用 GM1—ELISA 分析進行每一批號忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質的品質管制。結果發現隨著蛋白質濃度的增加，吸光值也隨之增加，顯示野外型與重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質都具備與 GM1 結合的能力，而且結合的動力學也非常相似（圖三（B））。因此，利用大腸桿菌大量產製的重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質具備與野外型忌熱性腸毒素相同的特性，並具備有容易生產、容易純化的特性，可以應用於產業界的大量生產用。

二、口服卡介苗製程之設定及特性分析

在本年度計畫中，我們製備兩項原型產品進行特性分析，並進入免疫試驗評估免疫效能。第一項原型產品為卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗。早期 Calmette 設計卡介苗的接種方式為直接口服，因此為了了解是否卡介苗直接口服後，可引發黏膜免疫反應，我們將卡介苗與忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質進行接合，希望藉由忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質與腸上皮細胞進行特異性的結合，而增加卡介苗被腸上皮攝入的機率。我們利用交聯劑戊二醛將兩種材料接合後，利用透析方式，去除戊二醛，再利用電泳分析，並利用 GM1—ELISA 分析經結合作用後的忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質是否保持其功能。圖四（A）顯示卡介苗—忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質接合疫苗經電泳分析後，可以看見卡介苗菌株的抗原在接合後（lane 4）與結合前（lane 2）並無分子量及數量上的變化，但是在電泳膠片上卻沒有看見忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質，這可能是因為忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質只佔蛋白質總量 10% 的原因。另外，以 GM1—ELISA 進行分析發現，忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質不管是接合前或接合後，都可以與 GM1 結合，而且其動力學及劑量反應，也都相當一致（圖四（B）），顯示接合作用並不會破壞蛋

白質的結構。

第二項原型產品為包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑的生物可分解性微球體。為了避免卡介苗在口服的過程中，會遭到消化道酵素的分解作用，我們利用生物可分解材質 PLG 進行包覆。我們利用不同 lactide-glycolide 比例及不同分子量的 PLG，將卡介苗接合生物性黏膜佐劑包覆成為微球體，再測定其物化特性。表一顯示，lactide-glycolide 比例為 82:18、分子量為 197,996 的 PLG 有最高的回收率 (30.7%)，但在包裝量及包裝率部分，則以 lactide-glycolide 比例為 85:15、分子量為 89,015 的 PLG 最佳，可達到 40 $\mu\text{g/ml}$ 的包裝量及 41.7% 的包裝率。在釋放速率方面，PLA (即 lactide-glycolide 比例為 100:0) 釋放最快，於第一天可釋放將近 40%，而在第 9 天即釋放完畢 (圖五)。至於 lactide-glycolide 比例為 85:15、分子量為 89,015 的 PLG，在第一天可釋放約 45%，之後持續釋放至第 20 天時到達 70%，顯示以 PLG 為包覆材質所製成之微球體具有控制釋放的能力，而且可持續釋放至少 20 天以上。

三、口服卡介苗免疫有效性之測定

我們利用第一項原型產品，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗，進入免疫的前趨試驗。因為卡介苗對成年人的保護性差異相當大，其效價可自印度的 0% 至英國的 80% (Fine, 1995)。因此本計畫主要為研發口服卡介苗對成年人的免疫效能，並經由黏膜性抗體的測定，偵測疫苗引發黏膜性免疫反應的效果。我們利用 6 週齡及 1 週歲的老鼠為對象，進行卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服、肌肉注射及腹腔注射的疫苗接種，並於免疫兩次後，收集樣品，測定抗體力價。其中 6 週齡及 1 週歲的老鼠分別代表小孩及老年人的族群。首先我們進行抗體的連續稀釋，再利用 ELISA 進行偵測。當隨著樣品稀釋倍數增加時，OD405 的數值也隨之下降，且呈現劑量反應 (圖六)，

顯示樣品中抗體反應是具特異性的。進一步將所有樣品以連續稀釋的動作進行反應，再以 $OD_{405}=0.2$ 為標準，換算抗體力價。圖七及圖八分別呈現卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及卡介苗引起 6 週齡及 1 週歲老鼠的抗體力價。在免疫途徑方面，口服未經包覆的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗並無法引起可偵測到的抗體濃度。在抗體力價方面，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗所引起的免疫反應皆優於卡介苗，而且在 1 週歲的老鼠更為明顯。在抗體種類方面，兩種疫苗皆可以誘發 IgG 的反應，而引發 IgA 的能力較差。至於血清、肺洗液及腸洗液方面，血清中存在高量的 IgA 及 IgG，肺洗液中可偵測到高量的 IgG，但腸洗液中並未偵測到抗體。這些結果顯示，生物性黏膜佐劑—忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質確實可以增強免疫效果，而且在 1 週歲及 6 週齡的老鼠都呈現相似的結果。此外，未經包覆的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及卡介苗在口服的過程中，似乎已被消化殆盡，因此在口服的組別中，無法偵測到抗體反應。另外，因為肌肉注射及腹腔注射並非黏膜接種的途徑，因此也無法在黏膜層引起較佳的 IgA 反應。

討論

卡介苗是世界上使用最廣泛的疫苗之一。卡介苗可以預防年輕人發生粟粒性結核及腦膜性結核，但是卻無法預防成年人肺結核的發生 (Colditz et al., 1994)。因此本計畫首要目標為研發並探討生物可分解性口服卡介苗對成年人的免疫效能。藉由口服方式，探討口服卡介苗是否可以誘發良好的黏膜性及細胞性免疫反應，進一步再經實驗探討是否可取代舊型幼童肌肉注射型卡介苗，以開發出一具實用價值且可在肺結核的防疫上扮演重要角色的口服卡介苗。

許多結核桿菌的抗原已被證實可以活化 Th1 細胞的反應，並引發保護性免疫反應。例如，結核桿菌生長時分泌的抗原（可被人類淋巴球辨認）、細胞壁（可誘發 T 細胞反應）及熱休克蛋白質（在緊迫或氧化傷害時分泌的蛋白質）等，都具有良好的抗原性 (Anderson and Brennan, 1994; Weldingh and Andersen, 1999)。此外，因為分子生物學的進步，結核桿菌重組株也陸續被構築。例如，可以表現肺結核桿菌 30-kDa、85A、85B 或 85C 抗原的卡介苗重組株，被證實具有較傳統卡介苗誘發更佳的保護性免疫反應 (Dhar et al., 2000; Horwitz et al., 2000)。但因為卡介苗於 1920 年代左右開發後，沿用至今，都可誘發小孩良好的免疫反應，因此本計畫還是以卡介苗為主要的抗原材料，再利用不同的修飾作用，組裝成最具免疫效能的疫苗型式。

在上年度計畫中，我們測試卡介苗菌株的最佳生長環境，發現卡介苗菌株在 Middlebrook 7H9 中的活性最佳，因此我們採取卡介苗菌株接種於 Middlebrook 7H9 培養液中，於 37°C 震盪培養 14 天，以作為菌株來源。但疫苗的製作最重要的就是疫苗品質的一致性，因此，我們利用抗酸染色進行雜菌檢測、利用聚合酶連鎖反應進行卡介苗菌株的分子鑑定、並利用西方雜合反應偵測抗原性的變化。世界衛生組織建議對卡介苗的品管項目為

活菌數檢測、顯微鏡觀察及抗酸染色等 (Donikian et al., 1987)，但利用這些方法並不能區別卡介苗菌株之間及區別卡介苗菌株與其他具致病性的結核桿菌。卡介苗是源自於牛型結核桿菌，利用不同繼代及保存方式所產生的馴化株，其與牛型結核桿菌在基因型及表現型上都具有歧異性 (Zhang et al., 1995)。在 1926 年之前的卡介苗菌株具有分泌 MPB70 抗原、產生 methoxymycolates 的能力，且在染色體上含有兩段 IS986 序列 (Bedwell et al., 2001)，但在 1926 年之後的菌株已失去上述能力。Mahairas 等 (1996) 發現染色體上有一段區域，命名為 RD1，不存在於 6 種卡介苗菌株中，但存在於 1 株牛型結核桿菌及 62 株肺結核桿菌中，顯示 RD1 區域可以作為區別疫苗株及野外株的標的。因此，我們利用 Talbot 等 (1997) 的方法，使用三種引子 ET1、ET2、ET3 進行 multiplex 聚合酶連鎖反應，其中 ET2 埋設在 RD1 序列內。當染色體來自於野外株時，這三個引子都會與染色體黏合，而產生出 9650 bp 及 150 bp 的片段，其中 9650 bp 片段過長，無法在聚合酶連鎖反應中成功增殖出來，因此只會出現 150 bp 的片段。若是染色體來自於疫苗株，只有 ET1、ET3 會與染色體黏合，因此只會產生 200 bp 的片段。在我們的結果中也呈現疫苗株確實可以增殖出長約 200 bp 的片度，顯示 RD1 可以用來作為區別疫苗株及野生株。

至於卡介苗菌株之間的區別，Magdalena 等 (1998) 證實結核桿菌染色體上有一段區域，*senX3-regX3* intergenic region (IR)，含有 77 bp 及 53 bp mycobacterial interspersed repetitive unit (MIRUs)，所有野生株皆含有 53 bp MIRUs，疫苗株沒有，此外不同疫苗株含有數量不等的 77 bp MIRUs，例如卡介苗菌株 1173P2 及 Glaxo 含有兩段 77 bp MIRUs、日本株含有 3 段 77 bp MIRUs、Prague 及 Montreal 含有 1 段 77 bp MIRUs，顯示這段區域可以用來區別疫苗株的來源，同時可以用來作為每一批卡介苗的基因型管制。藉

由 C5 及 C3 兩個引子，我們發現卡介苗菌株可增殖出長約 353 bp 的片段，相當於含有 3 段 77 bp MIRUs，因此由基因型層次上，可以推論我們所使用的疫苗株是起源於日本株。

為了增加卡介苗的黏膜免疫原性，我們利用大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質作為黏膜性佐劑，以增加口服疫苗的效力。我們選擇 pET 系統進行蛋白質的產製，是因為它有兩個重要的特性。一是具有嚴謹的系統以誘導目標基因表現蛋白質。在 pET 表現系統中，IPTG 必須先誘導宿主表現 T7 RNA 聚合酶後，再藉 T7 RNA 聚合酶結合到 T7 啟動子上，才能進一步進行基因的轉錄及轉譯，以表現出目標基因，同時 pET 系統會分解少量 T7 RNA 聚合酶，以避免在無 IPTG 誘導的狀態下，因為少量 T7 RNA 聚合酶的產生，造成少量目標基因的表現。另一個特性是，pET 載體可以誘導 N 端或 C 端融合 6 到 10 個連續 histidine 的融合蛋白質表現，這種一連串的 histidine 對含鎳金屬鉗合樹脂具有親和性，因此可以利用親和性層析的方法，將蛋白質純化的步驟單純化。

在純化蛋白質的步驟方面，因為重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質為 N 端含有 6 個 histidine 的融合蛋白質，另外因為忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質具有與糖基 galactose 結合的能力，因此我們利用含鎳金屬鉗合樹脂及 galactose resin 兩種樹脂進行親合性色層分析法。經由一連串的純化步驟後，我們發現只有利用 galactose resin 才能純化出忌熱性腸毒素。Sixma 等 (1991) 利用 X-ray 繞射分析忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的結果顯示，在蛋白質立體結構中，N 端被折疊在內部，而 C 端暴露在外，位於 N 端的 histidine 因為無法暴露，所以不能順利與鎳結合，因此經由其他學者的立體結構分析，與我們進行純化的分析，得到相同的結論。

在本年度計畫中，我們製備兩項原型產品進行特性分析，一項原型產

品為卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗，另一項為包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑的生物可分解性微球體。Lagranderie 等 (2000) 曾利用分子生物學的技術，將忌熱性腸毒素 B 次單位基因放入卡介苗菌株中，使卡介苗持續表現忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質。但這種重組株是否在操作的過程中也損失其他抗原，或是忌熱性腸毒素 B 次單位基因是否在繼代幾次之後就會遺失，仍不可知，因此我們主要還是利用戊二醛為交聯劑，將卡介苗菌株與忌熱性腸毒素 B 次單位基因進行化學性的接合，並利用電泳及 GM1-ELISA 測定蛋白質是否保有原來的特性。

至於包覆材質及包覆方法的選擇是取決於蛋白質的溶解度。本計畫所用的 water-in-oil-water 包覆方法已被用來包覆親水性藥物 (Pradhan and Vasavada, 1994)，在包覆疫苗上，也呈現可以減低發炎反應的副作用而增加疫苗的效力 (Blanco-Prieto et al., 1994)。而利用 PLG 為包覆材質，已被證實可以包裝白蛋白、結核桿菌抗原、霍亂毒素或破傷風毒素，引發良好的免疫反應 (Dhiman and Khuller, 1998; O'Hagan et al., 1993; Thomasin et al., 1996)。此外，PLG 具有極佳的生物相容性，在體內可分解成 lactic acid 及 glycolic acid，毒性低，因此可以有效地用於皮下包埋劑、縫線、骨頭替代物及藥物運輸系統 (Lewis, 1990)。PLG 也具有控制釋放 (control release) 的效果，藉由調整 lactide 及 glycolide 的比例，可以使得抗原持續釋放長達數週或是數年 (Alonso et al., 1993)。在我們的試驗中，發現 lactide-glycolide 比例為 85:15、分子量為 89,015 的 PLG，在第一天可釋放約 45%，之後持續釋放至第 20 天時到達 70%。因為抗原持續的釋放有助於增強免疫反應 (Eldridge et al., 1991b)，因此，利用 PLG 為包覆材質，應該非常適合應用於疫苗的包裝上。

為了證實免疫的有效性，我們利用第一項原型產品，卡介苗—生物性黏

膜佐劑接合疫苗，進入免疫的前趨試驗。因為卡介苗對成年人的保護性差異相當大，其效價可自印度的 0% 至英國的 80% (Fine, 1995)。因此本計畫主要為研發口服卡介苗對成年人的免疫效能，並經由黏膜性抗體的測定，偵測疫苗引發黏膜性免疫反應的效果。結果顯示，生物性黏膜佐劑—忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質確實可以增強免疫效果，而且在 1 週歲及 6 週齡的老鼠都呈現相似的結果。忌熱性腸毒素具有佐劑的潛能在許多年前就已證實，但為何會刺激免疫反應的機制仍舊不明，有些學者認為是因為 A 次單位 ADP ribosyltransferase 的活性 (Cheng et al., 1999)，但有些學者認為是 B 次單位單獨的作用 (Takahashi et al., 1996a)。在我們的實驗中，發現 B 次單位就具有佐劑的功能，可以刺激免疫反應。但未經包覆的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及卡介苗在口服的過程中，似乎已被消化殆盡，因此在口服的組別中，無法偵測到抗體反應。而由本試驗可以樂觀的預估，利用 PLG 包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑可能具有良好的免疫效能。至於動物體的反應，仍待下一年度計畫中證實。

結論與建議

本計畫利用生物可分解性基材—poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG)—為基礎，併合基因工程技術生產生物性黏膜佐劑，進行卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗、包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑之生物可分解性微球體等兩項原型產品之開發。由本計畫的執行，得到以下結論與建議：

- 一、卡介苗菌株的製備及品管的建立：卡介苗菌株以 Middlebrook 7H9 為基質，在接種後第 14 天可收集到活性最佳的菌株。進一步利用三種方法建立品管流程：(一) 抗酸染色進行雜菌檢測：為世界衛生組織建議之卡介苗檢測；(二) 利用聚合酶連鎖反應進行卡介苗菌株的分子鑑定：可提供卡介苗的來源及每一批號卡介苗菌株基因體的變異；(三) 利用西方雜合反應偵測卡介苗菌株抗原性的變化：以病人血清為抗體，可偵測每一批號卡介苗菌株抗原性的變化。
- 二、生物性黏膜佐劑的產製及品管的建立：將大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因利用大腸桿菌表現系統進行蛋白質的表現及純化，可以自 1 公升細菌液中，純化出約 1.3 公克之忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質，而由 GM1—ELISA 分析進行品管控制，可以偵測每一批號忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質功能上的差異。
- 三、口服卡介苗原型產品的製備及特性分析：本計畫完成兩項原型產品的製備及基本特性分析。在卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗方面，經過交聯劑的作用，生物性黏膜佐劑仍保有其功能。在包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑的生物可分解性微球體方面，以 lactide-glycolide 比例為 85:15、分子量為 89,015 的 PLG 呈現最佳的包裝量及包裝率，此外，也呈現控制釋放的特性，在第一天可釋放約 45%，之後持續釋放至第

20 天時到達 70%。

四、口服卡介苗原型產品免疫有效性的測定：我們利用卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗，進入免疫的前趨試驗。結果顯示，忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質確實可以增強免疫效果，而且在 1 週歲及 6 週齡的老鼠都呈現相似的結果。此外，未經包覆的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及卡介苗在口服的過程中，似乎已被消化殆盡，因此在口服的組別中，無法偵測到抗體反應。另外，因為肌肉注射及腹腔注射並非黏膜接種的途徑，因此也無法在黏膜層引起較佳的 IgA 反應。

由本計畫的免疫前趨試驗中，已證實忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質作為生物性佐劑的可行性，可以刺激免疫反應。但未經包覆的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及卡介苗在口服的過程中，似乎已被消化殆盡，因此在口服的組別中，無法偵測到抗體反應。而由本計畫可以樂觀的預估，利用 PLG 包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑可能具有良好的免疫效能。至於動物體的反應，仍待下一年度計畫中證實。

参考文献

- Alonso MJ, Cohen S, Park TG, Gupta RK, Siber GR, Langer R: Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharmacol Res* 1993; 10: 945-953.
- Anderson AB, Brennan P: In: Bloom BR, ed. Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994; 307-330.
- Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA: Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001; 19: 2146-2151.
- Blanco-Prieto MJ, Delie F, Fattal E, Tartar A, Puisieux F, Gulik A, Couvreur P: Characterization of V3 BRU peptide-loaded small PLGA microspheres prepared by a (W₁/O)W₂ emulsion solvent evaporation method. *Int J Pharm* 1994; 111: 137-45.
- Blanco-Prieto MJ, Fattal E, Gulik A, Dedieu JC, Roques BP, Couvreur P: Characterization and morphological analysis of a cholecystokinin derivative peptide-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. *J Control Rel* 1997; 43: 81-87.
- Bosio CM, Orme IM: Effective, nonsensitizing vaccination with culture filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* infections in mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5048-5051.
- Calmette A, Weill-Halle B, Saenz A, Costil L: Demonstration experimentale du passage des bacilles-vaccins BCG a travers la muqueuse de l'intestin chez l'enfant et chez le singe. *Bull Acad Med* 1993; 110: 203-212.
- Centers for Disease Control: Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality. *Morbidity Mortal Weekly Rep* 1993; 42: 961-964.
- Cheng E, Cardenas-Freytag L, Clements JD: The role of cAMP in mucosal adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT). *Vaccine* 1999;

- 18: 38-49.
- Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F: Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis—meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994; 271: 698-702.
- Cox JC, Coulter AR: Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997; 15: 248-256.
- de Haan L, Holtrop M, Verweij WR, Agsteribbe E, Wilschut J: Mucosal immunogenicity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: role of the A subunit. *Vaccine* 1996; 25: 260-266.
- Dhar N, Rao V, Tyagi AK: Recombinant BCG approach for development of vaccines: cloning and expression of immunodominant antigens of *M. tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 190: 309-316.
- Dhiman N, Khuller GK: Protective efficacy of microbacterial 71-kDa cell wall associated protein using poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles as carrier vehicles. *FEMS Immuno Med Microbiol* 1998; 21: 19-28.
- Doherty TM, Olsen AW, van Pinxteren L, Andersen P: Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2002; 70: 3111-3121.
- Donikian R, Gheorghiu M, Jablokova TB: Requirements for dried BCG vaccine. *WHO Technical Report Series* 1987; 745: 60-92.
- Dorman SE, Holland SM: Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 1998; 101: 2364-2369.
- Eldridge JH, Gilley RM, Staas JK, Moldoneanu Z, Meulbroek JA, Tice TR: Biodegradable microspheres: vaccine delivery system for oral administration. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989a; 146: 59-66
- Eldridge JH, Meulbrowk JA, Staas JK, Tice TR, Gilley RM: Vaccine-containing

- biodegradable microsphere specifically enter the gut-associated lymphoid tissue following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. *Adv Exp Med Biol* 1989b; 251: 192-202.
- Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM: Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol* 1991a; 28: 287-294.
- Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, Tice TR, Gilley RM: Biodegradable and biocompatible poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1991b; 59: 2978.
- Fine PEM: Variation in protection by BCG-implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995; 346: 1339-1345.
- Fujimura Y: Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's Patches-phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn* 1986; 21: 325-335.
- Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S: Recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDs major secretory protein induced greater protective immunity against tuberculosis the conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13853-13858.
- Hsieh DST: Control Release Systems: Fabrication Technology, Vol. 2. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- Hussey GD, Watkins MLV, Goddard EA, Gottschalk S, Hughes EJ, Iloni K, Kibel MA, Ress SR: Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. *Immunology* 2002; 105: 314-324.
- Kaufmann SHE: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000; 6: 955-960.

- Kochi A: The global tuberculosis infections and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72: 1-6.
- Komase K, Tamura SI, Matsuo K, Watanabe K, Hattori N, Odaka A, Suzuki Y, Kurata T, Aizawa C: Mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* 1998; 16: 248-254.
- Lagranderie M, Balazuc AM, Gicquel B, Gheorghiu M: *Mycobacterium bovis* BCG simian immunodeficiency virus nef induces local and systemic cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. *J Virol* 1997; 71: 2303-2309.
- Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G: Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. *Vaccine* 2000; 18: 1186-1195.
- Lencer WI, Constable C, Moe S, Jobling MG, Webb HM, Ruston S, Madara JL, Hirst TR, Holmes RK: Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelial: role of COOH-terminal KDEL. *J Cell Biol* 1995; 131: 951-962.
- Lewis DH: Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chaisin H, Langer R, eds. Biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: Marcel Dekker, 1990: 1-41.
- Lotte A, Wasz-Hockert O, Poisson N, Dimitrescu N, Vernon M, Couvet E: BCG complications: estimates of the risks among vaccinated subjects and statistical analysis of their main characteristics. *Adv Tuberc Res* 1984; 21: 107-193.
- Magdalena J, Supply P, Locht C: Specific differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2471-6.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK: Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996; 178: 1274-1282.

- McGee JP, Stanley SD, O'Hagan DT: Zero order release of protein from poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles prepared using a modified phase separation technique. *J Control Rel* 1995; 34: 77-86.
- Morris W, Steinhoff MC, Russell PK: Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. *Vaccine* 1994; 12: 5-11.
- O'Hagan DT, McGee JP, Holmsgren J: Biodegradable microparticles for oral immunization. *Vaccine* 1993; 11: 149-154.
- Orme IM, Andersen P, Boom WH: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993; 167: 1481-1497.
- Pradhan RS, Vasavada RC: Formulation and *in vitro* release study on poly(DL-lactide) microspheres containing hydrophilic compounds: glycine homopeptides. *J Control Rel* 1994; 30: 143-54.
- Sixma TK, Pronk SE, Kalk KH, Wartna ES, van Zanten BAM, Witholy B, Hol WGJ: Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature* 1991; 351: 371-7.
- Sonnenberg MG, Belisle JT: Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 1997; 65: 4515-4524.
- Spangler BD: Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992; 56: 622-647.
- Takahashi I, Kiyono H, Jackson RJ, Fujihashi K, Staats HF, Hamada S, Clements JD, Bost KL, McGhee JR: Epitope maps of *Escherichia coli* heat labile toxin B subunit for development of a synthetic oral vaccine. *Infect Immun* 1996; 64: 1290-1299.
- Takahashi I, Marinaro M, Kiyono H, Jackson RJ, Nakagawa I, Fujihashi K, Hamada S, Clements JD, Bost KL, McGhee JR: Mechanisms for mucosal immunogenicity and adjuvancy of *Escherichia coli* labile enterotoxin. *J*

- Infect Dis* 1996; 173: 627-635.
- Talbot EA, Williams DL, Frothingham R: PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 566-9.
- Tamura S, Hatori E, Tsuruhara T, Aizawa C, Kurata T: Suppression of delayed-type hypersensitivity and IgE antibody responses to ovalbumin by intranasal administration of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit-conjugated ovalbumin. *Vaccine* 1997; 15: 225-229.
- Thomasin C, Corradin G, Men Y, Mercle HP, Hander B: Tetanus toxoid and synthetic malarial antigen containing poly (Lactide), poly (lactide-co-glycolide) microspheres: importance of polymer degradation and antigen release for immune response. *J Control Rel* 1996; 41: 131-146.
- Tochikubo K, Isaka M, Yasuda Y, Kozuka S, Matano K, Miura Y, Taniguchi T: Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine* 1998; 16: 150-155.
- Truitt RL, Hanke C, Radke J, Mueller R, Barbieri JT: Glycosphingolipids as novel targets for T-cell suppression by the B subunit of recombinant heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 1998; 66: 1299-1308.
- Weldingh K, Andersen: Immunological evaluation of novel *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23: 159-164.
- Wilkinson KA, Belisle JT, Mincek M, Wilkinson RJ, Toossi Z: Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres. *J Immunol Methods* 2000; 235: 1-9.
- World Health Organization. The world health report 1999: making a difference. Geneva: World Health Organization.
- Zhang Y, Wallace RJ, Mazurek GH: Genetic differences between BCG substrains. *Tuberc Lung Dis* 1995; 76: 43-50.

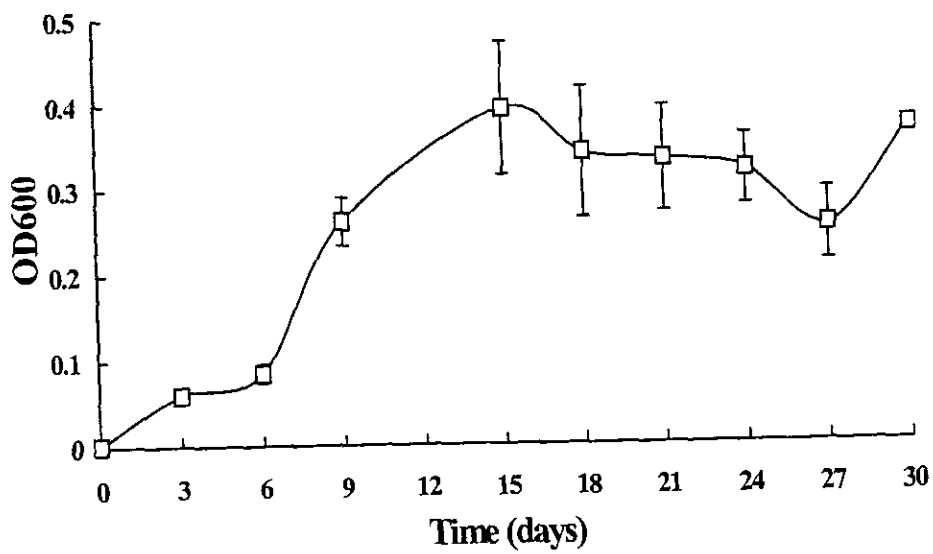
表一 卡介苗接合生物性黏膜佐劑微球體的回收率及包裝量

編號	Lactide/ glycolide	PLGA 分子量	回收率 (%) ^a	包裝量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 微球體) ^b	包裝率 (%) ^c
PLA	100/0		15.9	10	15.8
85:15	85/15	89,015	22.9	40	41.7
82:18	82/18	197,996	30.7	18	25.1
75:25	75/25	85,915	23.7	18	42.4
50:50	50/50	40,000~ 75,000	29.6	12	35.3

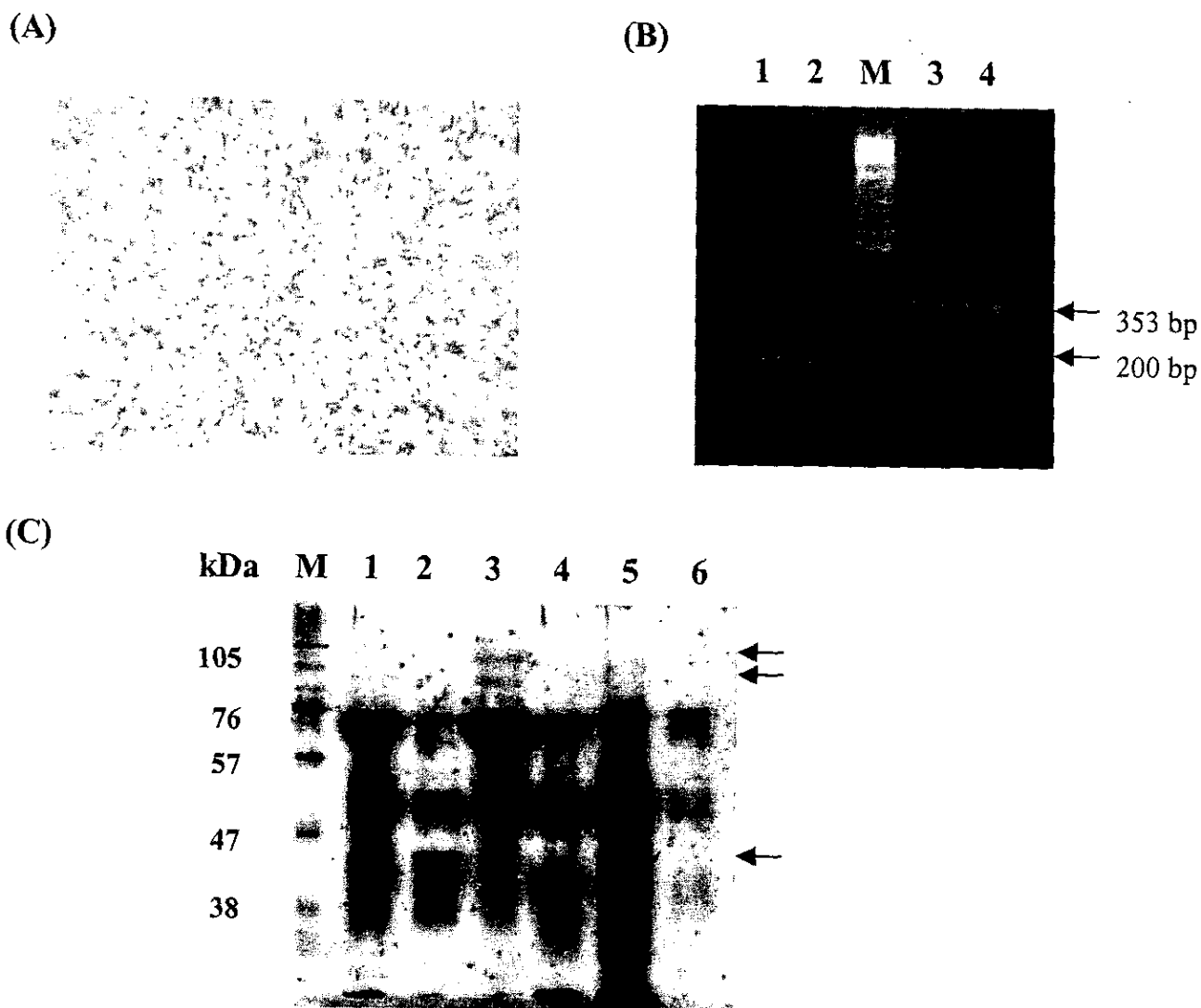
^a 回收率為微球體乾燥後的重量除以原始重量的百分率。

^b 包裝量為每 mg 微球體中的蛋白質重量差。

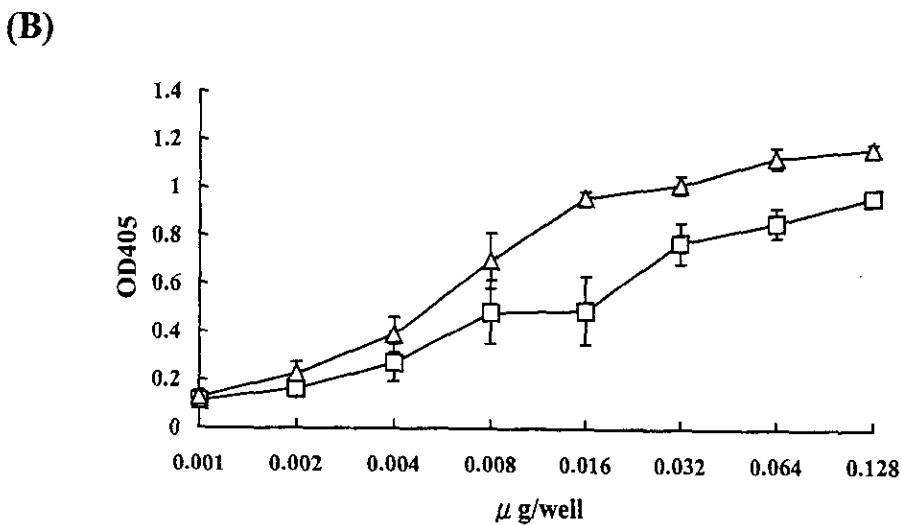
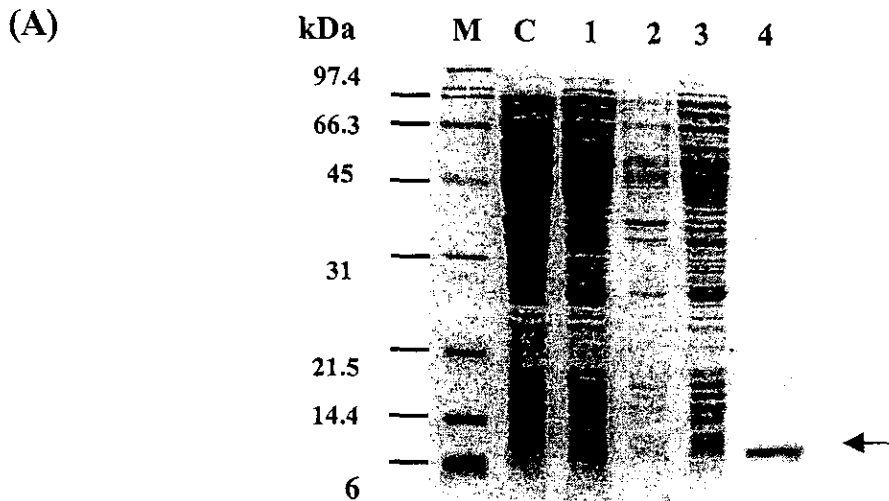
^c 包裝率為實際包裝的蛋白質總量除以原始蛋白質總量的百分率。



圖一 卡介苗菌株的生長曲線。將細菌接種於 Middlebrook 7H9 中，每三天吸取菌液，再利用 600 nm 波長測定生長曲線。所有數值為三次實驗的結果，結果以平均值±標準差表示。

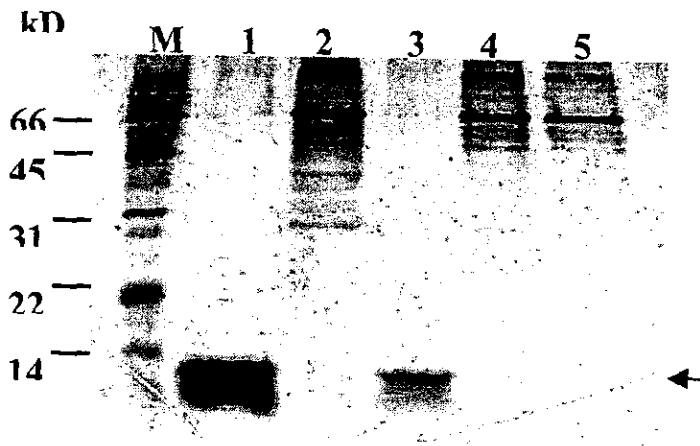


圖二 卡介苗菌株的品管模式。(A) 抗酸染色。將卡介苗菌株塗抹於玻片上，利用抗酸染色加以確認。(B) 卡介苗菌株的分子鑑定。將不同代數的卡介苗菌株收集後，直接加入聚合酶連鎖反應中，以 ET1/2/3 為引子，偵測 RD1 片段(lanes 1、2)，或是以 C5/C3 為引子，偵測 MIRUs 片段的長度(lanes 3、4)。(C) 卡介苗菌株的抗原性分析。將不同代數的卡介苗菌株接種於 Middlebrook 7H9 中，於 37°C 培養 14 天後，分別收集上清液 (lanes 1~3) 及菌體 (lanes 4~6)。將蛋白質利用蛋白質電泳分析，轉印到濾紙後，以肺結核病人的血清為抗體，進行西方雜合反應。箭頭所指為在上清液中可被偵測到的抗原。

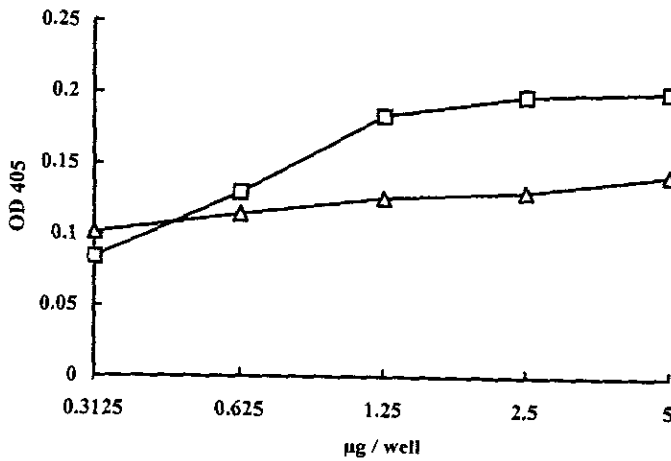


圖三 大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的品管模式。(A) 蛋白質電泳分析。將細菌誘導後，收集可溶性 (lane 1) 及不可溶性 (lane 2) 蛋白質，再取可溶性蛋白質，利用親合性樹脂加以純化。未與樹脂結合之非特異性蛋白質 (lane 3) 及純化後之蛋白質 (lane 4) 分別用蛋白質電泳分析。Lane C 為不加 IPTG 之對照組。箭頭表示大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的位置。(B) GM1—ELISA。酵素連結免疫吸附平盤上先吸附不同濃度的 GM1，再分別加入野生型 (Δ) 及重組型 (\square) 大腸桿菌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質進行結合，最後加入受質，於 405 nm 波長下測定吸光值。所列之數值為三次實驗所得之平均值 \pm 標準偏差。

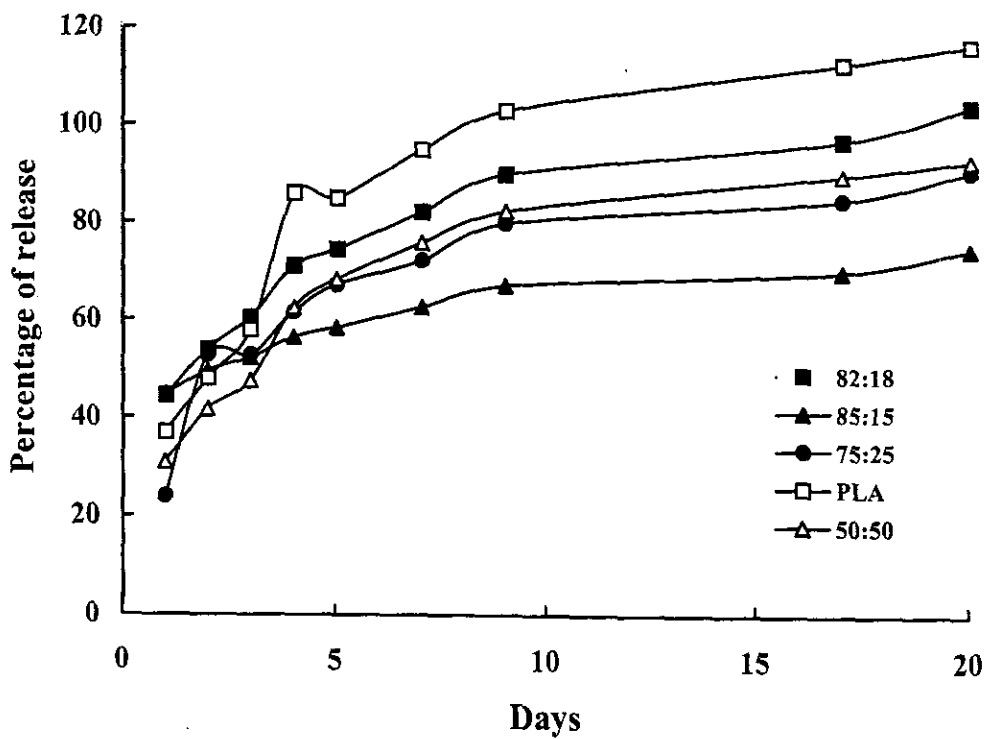
(A)



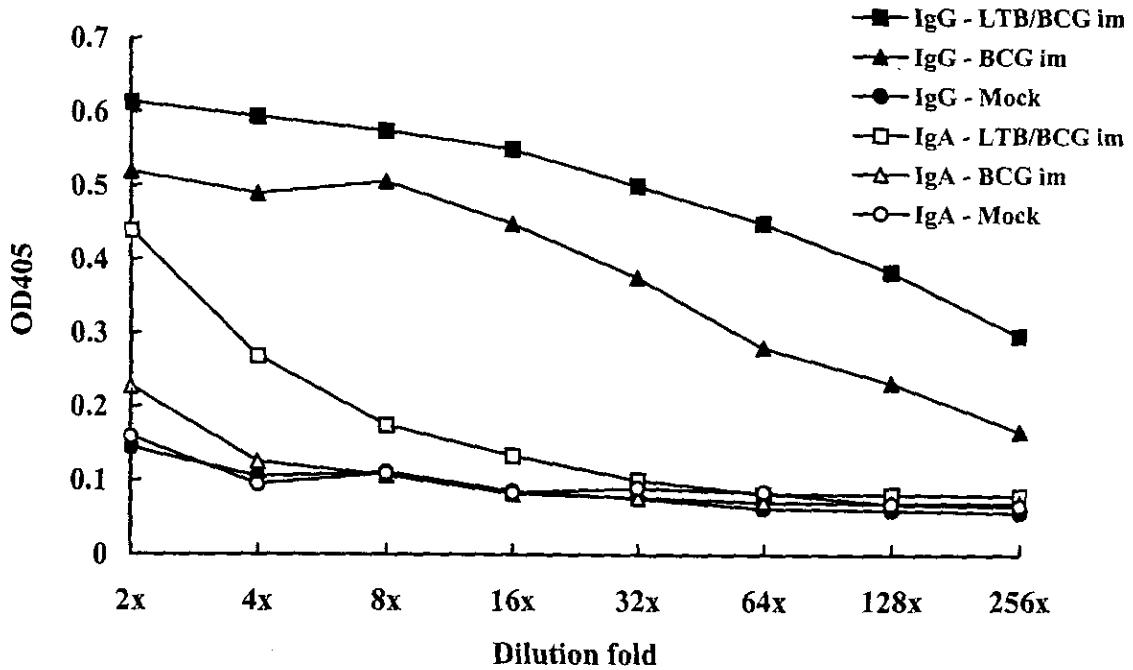
(B)



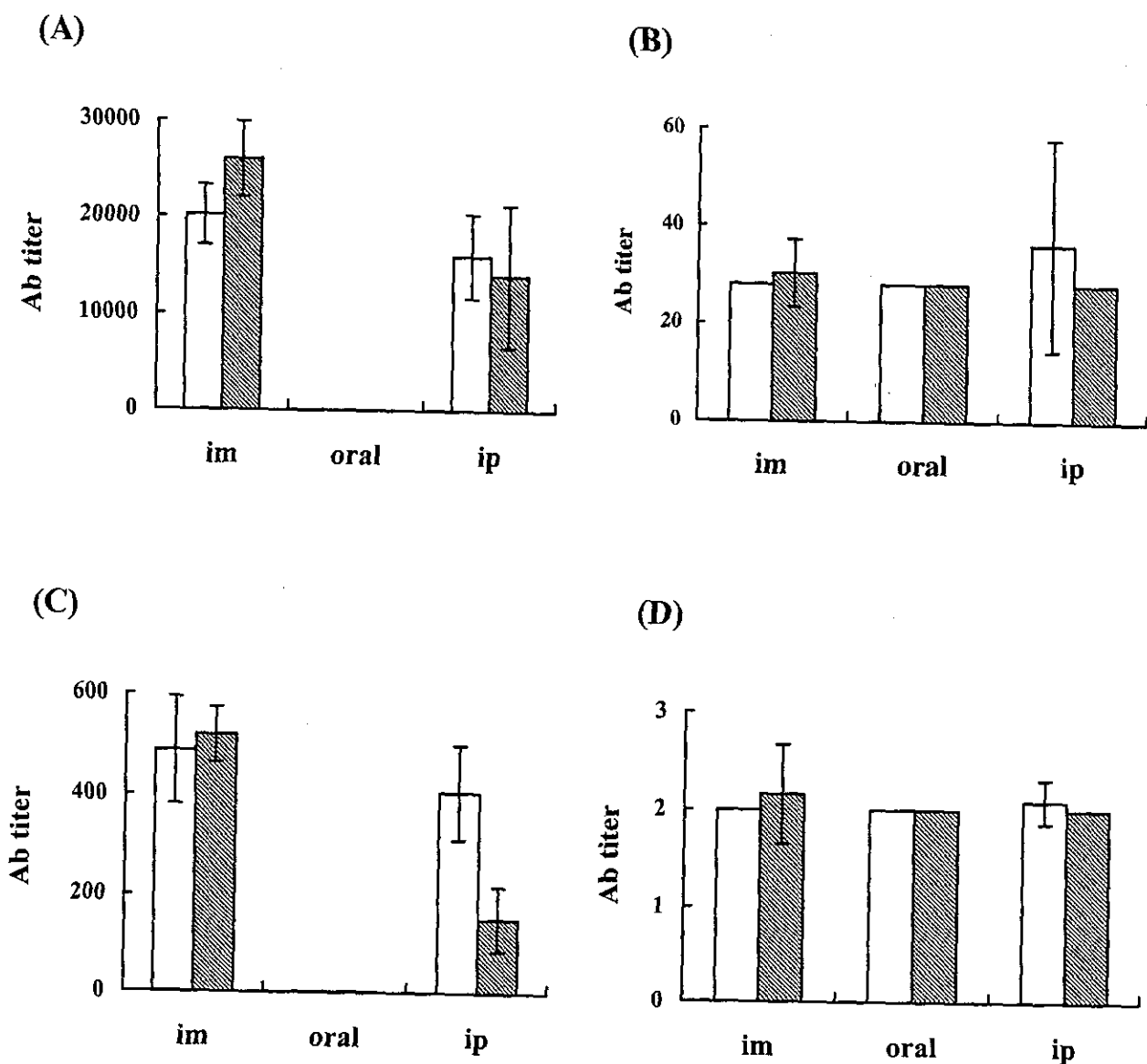
圖四 卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及微球體的分析。(A) 蛋白質電泳分析。取大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質 (lanes 1 and 3)、卡介苗菌株 (lane 2)、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (lane 4) 及包覆卡介苗接合生物性黏膜佐劑的微球體 (lane 5) 利用 15% 蛋白質電泳進行分析，最後以銀染呈色。Lane M 表示蛋白質標誌，分子量標示在左。箭頭表示大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的位置。(B) GM1—ELISA。酵素連結免疫吸附平盤上先吸附 GM1，再分別加入不同濃度的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (□) 及卡介苗 (△) 進行結合，最後加入受質，於 405 nm 波長下測定吸光值。



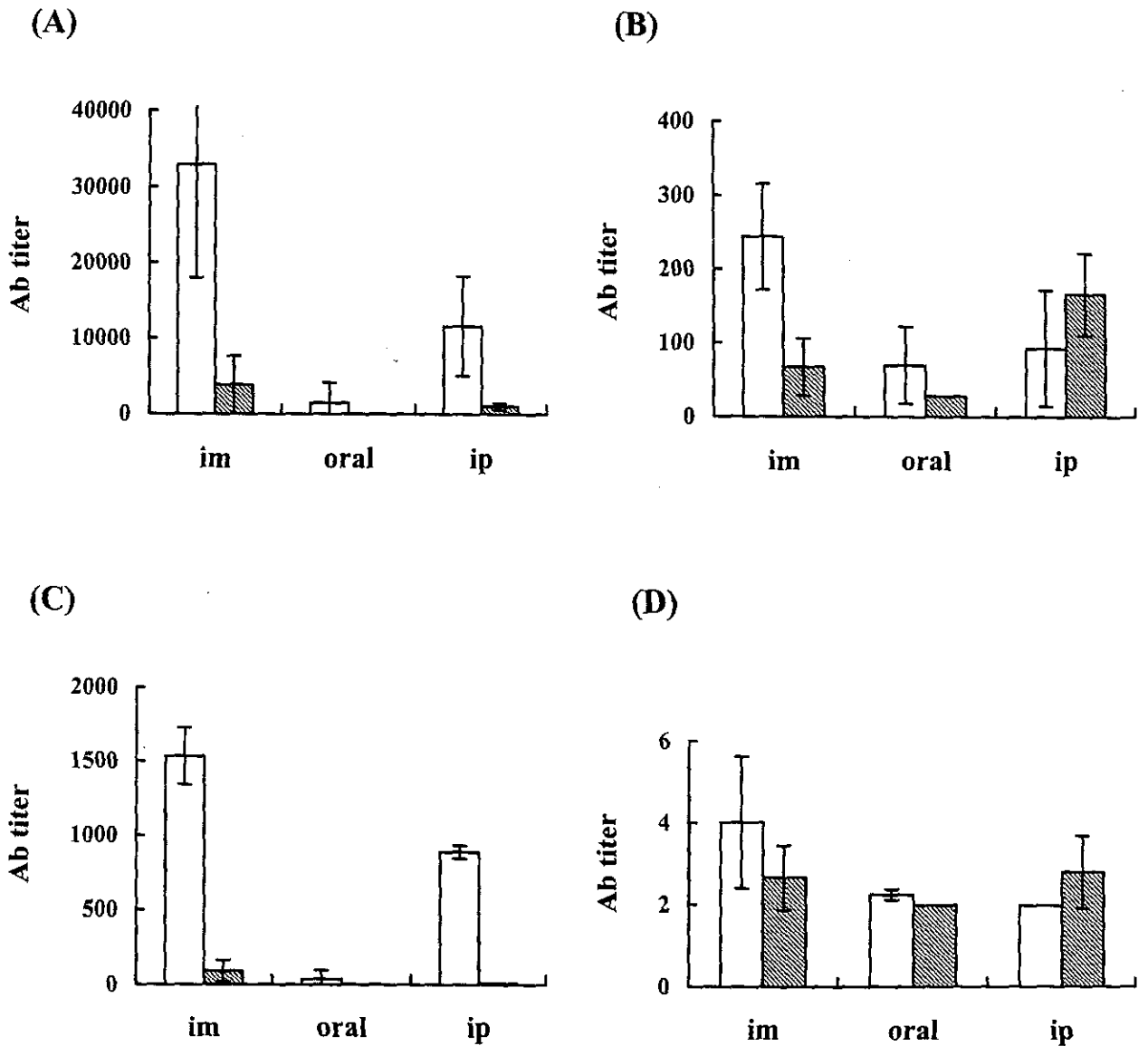
圖五 卡介苗接合生物性黏膜佐劑微球體的釋放速率。將 1 mg 微球體混懸於 100 μ l 磷酸鹽緩衝液中，每 1~3 天收集上清液，測定蛋白質的累積量，再計算釋放率。組別與表一相同。



圖六 肺洗液的抗體濃度。一歲的老鼠利用卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (LTB/BCG) 或卡介苗 (BCG) 肌肉注射免疫兩次後，將動物犧牲，收集肺洗液，再利用 ELISA 偵測肺洗液中的 IgG 及 IgA 抗體的濃度。當 OD405 數值為 0.2 時之肺洗液稀釋倍數，即為抗體力價。Mock 表示陰性對照組。



圖七 卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗引起 6 週齡老鼠的抗體力價。將老鼠分別利用肌肉注射 (im)、口服 (oral) 或腹腔注射 (ip) 等免疫途徑，接種卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (open bar) 或卡介苗 (hatched bar)。在免疫兩週後，將老鼠犧牲，收集血清 (A) (B) 及肺洗液 (C) (D)，再分別測定 IgG (A) (C) 及 IgA (B) (D)。所列之數值為 10 隻老鼠抗體力價之平均值±標準偏差。



圖八 卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗引起 1 週歲老鼠的抗體力價。將老鼠分別利用肌肉注射 (im)、口服 (oral) 或腹腔注射 (ip) 等免疫途徑，接種卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (open bar) 或卡介苗 (hatched bar)。在免疫兩週後，將老鼠犧牲，收集血清 (A) (B) 及肺洗液 (C) (D)，再分別測定 IgG (A) (C) 及 IgA (B) (D)。所列之數值為 5 隻老鼠抗體力價之平均值±標準偏差。