



計畫編號：DOH92-DC-1058

行政院衛生署疾病管制局九十二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：中國醫藥大學

計畫主持人：侯庭鏞

研究人員：項千芸、吳世祿

執行期間：92年1月1日至92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
一、摘要	(1)
二、本文	
(一) 前言	(5)
(二) 材料與方法	(10)
(三) 結果	(20)
(四) 討論	(29)
(五) 結論與建議	(37)
(六) 參考文獻	(39)
(七) 圖表	(47)

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份的研究：第一部份為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、利用西方雜合反應偵測卡介苗菌株抗原性的變化，以偵測每一批號卡介苗菌株的一致性。第二部份為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。第三部份為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%。第四部份為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，進入幼年及成年小鼠的免疫試驗。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，而且在幼年及成年小鼠都呈現相似的結果。此外，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以誘發幼年及成年小鼠產生特異性的 IgG 及 IgA，不管在血清或肺洗液中都可以偵測到，而且卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗在幼年小鼠主

要以引起細胞性免疫反應為主，而在成年小鼠則是引起體液性免疫反應為主。未來再經由小白鼠、天竺鼠或牛之保護性試驗及人體試驗，進一步評估是否可取代舊式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肺結核疫苗。

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 is stable during oral administration and is targeted to M cells, we prepared the poly-DL-(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres containing BCG and LTB 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 in this project. One was the BCG-LTB conjugated vaccine, another was PLG-entrapped BCG-LTB microspheres. The microsphere showed a 41.7% entrapment ratio and a slow release manner. The immunogenicity of these prototype vaccines was further investigated by immunizing young and old mice. Our results showed that LTB indeed enhanced the humoral response of BCG in young and old mice. BCG-LTB conjugated vaccine induced specific IgG and IgA responses by oral route. The specific IgG and IgA were detectable in serum and lung wash. Furthermore, BCG-LTB conjugated vaccine induced the cellular-mediated immunity in young mice and induced the humoral-mediated immunity in old mice. The protective immunity of oral BCG vaccine remained to be proved in animal model. Taken together, our data suggested that oral BCG vaccine could be served as a formulation in the future for protecting human or animal from *Mycobacterium* infection.

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)。全球各區域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 2002 年死因之第 12 名，約有 1,277 人死於結核病，每千萬人口之死亡率為 5.68。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 為基質的微球體可以藉著擴散、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 Depot™ 及 ELIGARD™，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（圖一）。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。

本計畫主要分下列三部份執行。第一部份為建立卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑及生物可分解性材質包覆之最適當製程及品管模式，大量生產生物可分解性材質包覆生物性黏膜佐劑之卡介苗；第二部份為建立卡介苗活菌數檢定、物化特性分析（包括微球體大小及型態、微球體產率及包裝率、抗原體外釋放試驗、微球體穩定性試驗）及生物有效性分析（包括一般安全性測試、熱原測試、毒性測試），完成生物可分解性口服卡介苗劑型基礎特性之研究；第三部份為進行生物可分解性口服卡介苗免疫有效性之測定，分別進行幼年及成年動物的免疫，藉由收集血清、腸洗液、肺洗液，分析黏膜免疫反應的強度，並經由淋巴球增殖試驗、細胞素分析及結核菌素試驗，評估口服卡介苗引發細胞性免疫反應的效能。經上述實驗，預期完成具呼吸道免疫保護性的口服卡介苗。未來再經由小白鼠、天竺鼠或牛之保護性試驗及人體試驗，進一步評估是否可取代舊式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肺結核疫苗。

材料與方法

一、建立卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑及生物可分解性材質包覆之最適當製程及品管模式，大量生產生物可分解性材質包覆生物性黏膜佐劑之卡介苗

(一) 卡介苗菌株最佳培養條件之設定及抗原之製備

1、卡介苗菌株的培養及最佳生長條件的測試

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。為了測試最佳生長條件，將菌株分別接種於三種液體培養基中，一種為添加 10% albumin-dextrose-catalase 及 0.05% Tween 80 的 Middlebrook 7H9 broth，另一種為添加 10% Dubos medium albumin 的 Dubos broth (Difco)，第三種為 glycerol-alanine salts medium (GAS) (2% glycerol, 0.03% Bacto-Casitone, 0.005% ferric ammonium citrate, 23 mM K₂HPO₄, 10 mM citric acid, 0.1% L-alanine, 6 mM MgCl₂, 3.4 mM K₂SO₄, 37 mM NH₄Cl, 0.02% Tween 80, 0.005% anti-foam A)。細菌接種後，將培養基置於 37°C 震盪培養，每 3 天收集菌液，共收集 1 個月，以進行細菌濃度的測定。細菌濃度的測定採三種方式，一為利用分光光度計測定 600 nm 波長下的吸光值，另一種方法為將菌液塗抹於 Middlebrook 7H11 agar，測定菌落形成單位 (colony forming unit; CFU)，第三種為利用 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 為染劑，在 570 nm 波長下測定其吸光值。MTT 的測定方法如下：將 100 μ l 菌液與 20 μ l 之 5 mg/ml MTT 混合，於 37°C 下作用 48 小時，所產生不可溶的 formazan 再利用 100 μ l extraction buffer (50% dimethyl formamide, 10% SDS)，於 37°C 下溶解 48 小時，最後以 570 nm 波長

下測定其吸光值 (Kairo et al., 1999)。

2、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。

3、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偵測。首先製備菌株的染色體 DNA。將卡介苗菌株培養後，收集菌體，以 lysozyme 酵素在高張溶液下破壞細菌細胞壁，再利用蛋白質分解酵素 proteinase K 破壞細胞膜，以釋放細菌內的蛋白質及核酸。進一步以酚/氯仿溶液去除蛋白質，以 RNaseA 分解 RNA，再藉由酒精沉澱，萃取染色體 DNA (Magdalena et al., 1998)。另一種製備染色體的方法為，將 10^7 CFU 的菌體收集後，以 $100 \mu\text{l}$ 水混懸，直接取 $5 \mu\text{l}$ 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'-CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG-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 (Magdalena et al., 1998)。聚合酶連鎖反應之後的產物，以 3% agarose 電泳進行分析。

4、卡介苗菌株抗原之定性分析

將卡介苗菌株培養之後，於適當時間收集上清及菌體，利用蛋白質電泳分析，再利用西方雜合法，以肺結核病人的血清，偵測卡介苗的抗原性。定性結果擬同步用來分析每一批抗原的性質，以達到每批抗原均質化的目的。肺結核病人的血清分讓自台中慢性病防治所。

(二) 生物性黏膜佐劑產製之設定

1、大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因的選殖

取腸毒性大腸桿菌 (enterotoxigenic *E. coli*) 於 37°C 增殖培養後，萃取其質體 DNA，並以分別位於忌熱性腸毒素 B 次單位基因 5' 端及 3' 端的一對引子 (5'-TTCGGGATCCCGTATGAATAAAG-3' ; 5'-ATCGGAATTCCCTCCTCTACC-3')，進行聚合酶連鎖反應。經增殖後的片段，利用設計於引子上的酵素 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切割，選殖到原核表現載體 pET-28a(+) 中，成為 pET-LTB。最後經定序無誤後，進行蛋白質的產製。

2、大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位基因之表現及純化

為了取得大量而且純度很高的忌熱性腸毒素 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- 硫代半乳糖甘 (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。在經IPTG誘導的狀況下，我們可以進一步經親和性層析，將蛋白質純化出來。

3、大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質特性及功能分析

為了瞭解重組型忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的抗原性及功能方面是否與野外型相同，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糖蛋白 GM1—酵素連結免疫吸附試驗分析具有極高的親合性 (Spangler, 1992)，因此我們利用 GM1—ELISA 測定並比較野外型與重組型忌熱性腸毒素結合 GM1 的能力。

4、大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質大量表現條件之探討及純化製程之設定

為了設定產製忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的最佳條件，我們測定兩個變因。第一個為細菌的濃度，首先將細菌培養在新鮮的培養液中，於不同時間加入加入 0.5 mM IPTG 誘導，並同步收集少許菌液，進行濃度 (OD600) 的測定，最後在誘導後 2 小時，收集細菌，進行蛋白質電泳分析。第二個變因為 IPTG 的濃度，將細菌新鮮培養至上述最佳濃度後，分別加入不同濃度 (0.1、0.25、0.5、0.75、1 mM) 的 IPTG，於誘導後 2 小時，收集細菌，進行蛋白質電泳分析。

(三) 卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑及生物可分解性微球體之相互作用及其製程之設定

本實驗經兩方面加以探討，一是卡介苗菌株及生物性黏膜佐劑混合或化學接合反應最適條件之研究，另一為卡介苗菌株與生物性黏膜佐劑以生物可分解性材質進行包覆之最適當製程的設定。目前已完成兩種原型產品：1、卡介苗直接與大腸桿菌 LTB 進行接合，形成卡介苗—生物

性黏膜佐劑接合疫苗；2、卡介苗—LTB 經 PLG 包覆，PVA 修飾，形成 W/O/W 生物可分解性微球體。這兩種原型產品為以上述溶劑蒸發法為基礎進行製備，並以分析其抗原完整性決定最佳包覆製程。

1、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗劑型之製作及分析

將 LTB 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。

2、卡介苗—LTB 生物可分解性微球體劑型之製作

我們利用溶劑蒸發法製備微球體，方法為：以卡介苗接合 LTB 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。

3、口服疫苗劑型抗原完整性的分析

抗原完整性分析，是將口服疫苗劑型以磷酸緩衝液懸浮後，置於 37°C 作用 16 小時，讓蛋白質釋放。之後收集上清，利用蛋白質電泳

(SDS-PAGE) 及西方雜合法 (Western blotting) 分析，並與未經處理之卡介苗進行比較，以分析卡介苗經包覆或接合後，蛋白質圖譜及抗原性的變化。

二、生物可分解性口服卡介苗劑型基礎特性之研究

(一) 活菌數檢測

為了檢驗口服疫苗中的活菌數，我們擬將定量的口服疫苗溶於無菌的磷酸緩衝液中，再接種於 Middlebrook 7H11 培養基上，於 37°C 培養 2~3 周，以計算菌落數。結果以每毫克口服疫苗劑型的菌落數表示。

(二) 物理性質及化學性質之研究

1、微球體型態的分析

以掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察口服疫苗劑型之表面結構及其內孔隙之分佈狀態，探討不同的包覆條件對微球體表面結構的影響。

2、微球體產率及包裝率的分析

微球體的產率是藉計算微球體及 polymer 和模式抗原的重量而評估出來的。至於抗原的包裝量，可用以下方法計算。將微球體懸浮於 0.1 N NaOH/1% SDS 溶液中，置於沸水中 15 分鐘，緩慢冷卻後，離心 10 分鐘，此時上清中的模式抗原可以用 Bradford 的方法，測定蛋白質濃度。包覆效率指的是釋放出的蛋白質量除以蛋白質總量的百分率。

3、抗原體外釋放試驗

將微球體放置於模擬胃液 (0.08 M HCl + 0.2% NaCl, pH 1.2) 及模擬腸液 (PBS, pH 7.4) 中，並以 50 rpm、37°C 模仿腸之蠕動，一方面觀測微球體在酸中之安定性，另一方面觀察在模擬小腸液中微球體的崩解情形，此為定性試驗。定量方面為每 30 分鐘收集微球體溶於

模擬腸液的上清液，以 Bradford 的方式測蛋白質濃度，一方面取上清液進行 SDS-PAGE 分析，觀察在不同時間下抗原釋放的情形，另一方面與原蛋白質溶液比較觀察抗原包覆情形。

(三) 生物性分析

1、一般安全性測試 (general safety)

本試驗依照 USP XXII 1990 Monograph 91, "Safety Tests—General" 規範。將微球體以腹腔注射的方式，接種小白鼠，之後連續觀察 7 天，觀察小白鼠有無死亡或其他副作用的產生。

2、熱原測試 (pyrogenicity)

本試驗依照 USP XXII 1990 Monograph 151, "Pyrogen Tests" 規範。將微球體接種兔子，之後連續觀察 7 天，觀察兔子有無發熱現象產生。

3、毒性測試 (toxicology)

本試驗依照 Good Laboratory Practice Standards (Hazelton Washington Laboratories, Vienna, VA) 的方式進行。將微球體以口服的方式，分別於第 1 天、第 8 天及第 22 天接種小白鼠，之後在第 29 天時，將小白鼠犧牲，取各個消化道的器官，進行病理切片分析是否有組織病變現象產生。

三、生物可分解性口服卡介苗免疫有效性之測定

本項實驗主要分別進行幼年及成年動物的免疫，藉由收集血清、腸洗液、肺洗液，分析黏膜免疫反應的強度，並經由 IgG1 和 IgG2a 抗體的比例、細胞素分析及結核菌素試驗，評估口服卡介苗引發細胞性免疫反應的效能。

(一) 免疫計畫

本計畫主要為探討口服卡介苗是否可以誘發老年動物及幼年動物的

免疫反應，因此我們免疫的小鼠年齡分別為 2 月齡、3 月齡、7 月齡、12 月齡及 18 月齡。以幼年動物免疫試驗為例，實驗動物為 4~5 週齡的小白鼠，分成六組。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：實驗組為接合疫苗口服組、接合疫苗口服組皮下注射組、微球體口服組及微球體皮下注射組、陰性對照組為生理食鹽水口服組及生理食鹽水皮下注射組、陽性對照組為卡介苗口服組及卡介苗皮下注射組。接合疫苗或微球體口服組，每隻小白鼠分別給予 60 μg (約 50 μl) 的接合疫苗或微球體；接合疫苗或微球體皮下注射組，每隻小白鼠分別給予 10 μg (約 50 μl) 的接合疫苗或微球體；生理食鹽水口服組，每隻小白鼠分別給予約 50 μl 生理食鹽水；生理食鹽水皮下注射組，將 50 μl 生理食鹽水與等體積的油質佐劑混合，進行皮下注射；卡介苗口服組，每隻小白鼠分別給予 60 μg (約 50 μl) 的卡介苗；卡介苗皮下注射組，每隻小白鼠給予 10 μg 的卡介苗。

(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 3000 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 1000 rpm、10 分鐘後，取上清液再以 25,000 g 離心 30 分鐘。上清液再以過濾膜孔徑為 50 kDa 的濃縮離心管濃縮至原體積之 1/10，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 μ g/ml soybean trypsin inhibitor、50 mM EDTA、100 mM PMSF、0.5 % gelatin、0.05 % NaN₃、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酵素連結免疫吸附試驗。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，以評估疫苗經口服後誘發 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。

(四) 細胞性免疫反應的測定

1、細胞素的測定—反轉錄聚合酶連鎖反應

將實驗動物的淋巴結及脾臟取出後，利用 Trizol (BRL) 萃取出 RNA，再利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 偵測 IFN- γ 及 IL-4 mRNA 的含量 (Vandebriel

et al., 2000 ; Plitnick et al., 2002)。在反應過程中，同步加入 β -actin 的引子作為內在控制組，結果以經 β -actin 標準化後之 band 的密度表示。

2、結核菌素試驗

目前卡介苗效力的評估方式為結核菌素試驗，因此我們擬利用結核菌素試驗測試疫苗是否可以引起延遲型過敏反應 (delayed-type hypersensitivity)。實驗方法為：將免疫接種後的實驗動物以皮內接種的方式將含有 100 結核菌素單位的 0.1 ml PPD 或 0.1 ml 生理食鹽水注入左腳掌或右腳掌中，於 24 小時後以微量尺規度量腫脹的直徑，再將動物安樂死，固定組織後，進入顯微度量。

結果

一、建立卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑及生物可分解性材質包覆之最適當製程及品管模式，大量生產生物可分解性材質包覆生物性黏膜佐劑之卡介苗

(一) 卡介苗菌株最佳培養條件之設定及抗原之製備

為了獲得大量且具抗原性的卡介苗菌株，我們測定卡介苗在 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)。將細菌接種於培養液中後，於 37°C 培養，以 600 nm 波長、MTT 法及菌落數測定細菌的生長曲線。結果顯示，不管以哪一種方法測定細菌數，以 Middlebrook 7H9 為基質所培養出來的細菌數及活性最佳，其次為 GAS 及 Dubos。此外，在接種後第 3 至 15 天之間，細菌呈現對數生長，因此由 600 nm 可見曲線呈近乎直線上升，而由 MTT 的結果，也可見到細菌的活性非常旺盛。在培養 15 天後，細菌會進入到 stationary phase。因此以下的實驗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。結果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。結果顯示，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。結果顯示，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。結果顯示，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。

(二) 生物性黏膜佐劑產製之設定

將腸毒性大腸桿菌於 37°C 增殖培養後，萃取其質體 DNA，並以設計好的引子（分別位於忌熱性腸毒素 B 次單位基因 5'端及 3'端），進行聚合酶連鎖反應。利用特異性的引子進行反應，可以增殖出長約 483 bp 的忌熱性腸毒素 B 次單位基因。進一步利用設計於引子上的酵素 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切割，送入已利用 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切割後的載體 pET-28a(+) 中，成為表現質體 pET-LTB。經定序確定無誤後，進行大腸桿菌忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質的產製。

為了取得大量而且純度很高的忌熱性腸毒素 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。首先進行表現最佳條件之測試：在不同 IPTG 濃度（0.1、0.25、0.5、0.75、1 mM）及細菌濃度（OD₆₀₀=0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0）的變因調整下，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，蛋白質大小如同預估為 11.5 kDa。進一步為了設定純化的流程，我們分析利用原核表現系統產製的忌熱性腸毒素 B 次單位蛋白質是否如預期般，以不可溶的方式存在。由結果顯示，在 IPTG 誘導的狀況下，雖然可誘導多量的蛋白質產生，但都以可溶性的狀態存在，因此在純化時只需將細菌打破，即可進入純化步驟。

因為忌熱性腸毒 B 次單位蛋白質可以與 GM1 上的 galactose 結合，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%。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。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。

(三) 卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑及生物可分解性微球體之相互作用及其製程之設定

在本計畫中，我們製備兩項原型產品（卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及生物可分解性微球體）進行特性分析，並進入免疫試驗評估免疫效能。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。結果顯示卡介苗—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與結合前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，顯示接合作用並不會破壞蛋

白質的結構。

二、生物可分解性口服卡介苗劑型基礎特性之研究

(一) 活菌數檢測

為了了解經接合後的卡介苗菌株是否存活，我們將口服卡介苗劑型經磷酸緩衝液溶解後，塗抹於 Middlebrook 7H11 觀察菌落是否出現。結果顯示，經戊二醛處理後細菌已不具有活性，因此口服卡介苗劑型之效價測定主要以蛋白質濃度為基準，在進行後續實驗時也以蛋白質濃度為計算標準。

(二) 物理性質及化學性質之研究

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的包裝量及 41.7% 的包裝率。利用掃描式電子顯微鏡分析微球體的型態，發現微球體的形狀很均質，幾乎都呈現圓球體，微球體的表面也很光滑，並無明顯孔隙出現，大小皆在 5 μm 以下 (圖二)。依據 Eldridge 等 (1991) 的研究指出，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，因此預期微球體在進行動物試驗時可以引發適當的全身性免疫反應。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 (圖三)。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) 生物性分析

進一步我們將本計畫所完成的兩項原型產品接種到小白鼠及兔子體內，測定其安全性。在利用注射或口服的方式接種小白鼠後，連續觀察七天，並無死亡的現象，於接種後 29 天進行病理檢查，主要臟器（包括心臟、肺臟、肝臟、腎臟、脾臟）也沒有明顯之肉眼及顯微病變，顯示口服卡介苗劑型具安全性，但不具毒性。在利用注射或口服的方式接種兔子後，連續測量體溫 7 天，比空白組並無發熱的現象，顯示口服卡介苗劑型並不含有發熱原。因此本項分析證實口服卡介苗原型產品劑型符合 USP 及 Good Laboratory Practice Standards 所規範的生物安全性。

三、生物可分解性口服卡介苗免疫有效性之測定

為了測試口服卡介苗的免疫效能，我們進行動物的免疫試驗，以評估口服疫苗引發免疫反應的效果。我們主要評估三項參數，一為疫苗是否可以誘發黏膜性免疫反應，黏膜性免疫反應的評估為比較樣品中 IgA 的力價；二為疫苗主要是誘發體液性或細胞性免疫反應，評估的方法為測量血清中 IgG1 和 IgG2a 的比例及脾臟中 IL-4 和 γ -IFN 的比例；三為疫苗是否可以造成 delayed-type hypersensitivity，評估方法為足掌腫脹試驗。實驗動物為 2 月齡、3 月齡、7 月齡、12 月齡及 18 月齡的小白鼠，分別代表含跨人類幼年到成年組群，實驗組別為口服疫苗肌肉注射組、口服疫苗口服組，對照組為卡介苗肌肉注射組及卡介苗口服組。

在疫苗是否可以誘發黏膜性免疫反應方面，我們於免疫兩次後，收集血液、腸洗液及肺洗液，再利用酵素連結免疫吸附試驗分析 IgG 及 IgA 的濃度，以評估疫苗經誘發 IgG 及 IgA 的效果。圖四顯示，在老年族群，卡介苗肌肉注射組如同預期一般，可以誘發良好的抗體反應，在血清及肺洗

液中可以測得 IgG 的存在，至於卡介苗口服組所測得的抗體濃度明顯較肌肉注射組少。本計畫所產製的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗（LTB-BCG）不管是口服或是注射接種，與陽性對照組比較（BCG），於血清及肺洗液中都可以測得較高量的 IgG 及 IgA，顯示生物性黏膜佐劑 LTB 可以刺激免疫反應的發生。而皮下注射的接種方式所誘發的抗體濃度較口服或腹腔接種所誘發的抗體濃度高，顯示口服卡介苗劑型經口給予時，仍有大部份的抗原可能遭到消化酵素的分解。因此由老年小鼠的免疫結果，發現生物性黏膜佐劑 LTB 確實可以刺激免疫反應的發生，使卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗與傳統卡介苗相較下，可以誘發較高量的 IgG 及 IgA，而且不管在血清或肺洗液中皆呈現相同的效果。

在幼年族群方面，卡介苗活菌及死菌在誘發 IgG 及 IgA 的效果上沒有明顯差異，而本計畫所產製的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及生物可分解性微球體，則可以誘發高濃度的 IgG 及 IgA，與傳統卡介苗相比，呈現顯著差異（圖五），顯示 LTB 可以刺激免疫反應的發生。卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及生物可分解性微球體不僅可使動物產生高量的 IgG 及 IgA 於血清中，於肺洗液中也可測得高量的 IgG 及 IgA，顯示口服疫苗劑型確實如預期般可以誘發良好的黏膜性免疫反應。至於將卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗劑型與生物可分解性微球體劑型相比，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗較生物可分解性微球體可以誘發較明顯的抗體反應，顯示卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以不經 PLG 的包覆，經口服接種後，就可引起良好的抗體反應。因此由幼年小鼠的免疫結果，發現生物性黏膜佐劑 LTB 確實可以刺激免疫反應的發生，而卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以不經 PLG 的包覆，經口服接種後，與傳統卡介苗相較下，可以誘發較高量的 IgG 及 IgA，而且不管在血清或肺腸洗液中皆呈現相同的

效果。

在疫苗主要誘發體液性或細胞性免疫反應方面，我們評估的方法為測量血清中 IgG1 和 IgG2a 的比例及脾臟中 IL-4 與 γ -IFN 的比例。當免疫反應傾向以體液性免疫反應為主時，血清中 IgG1 及脾臟中 IL-4 的比例會增高，因此當 IgG1/IgG2a 及 IL-4/ γ -IFN 比例上升時，代表免疫反應主要以產生抗體為主。圖六為利用 IgG1/IgG2a 及 IL-4/ γ -IFN 比例評估口服卡介苗誘發免疫反應機轉的模式圖。IgG1/IgG2a 比例的計算為將小鼠免疫後，收集血清，再利用 ELISA 的方式，測定血清中 IgG1 及 IgG2a 的力價，計算 IgG1 及 IgG2a 的比例後，最後以平均值 \pm 標準差表示。IL-4/ γ -IFN 比例的計算為將小鼠免疫後，收集脾臟，萃取脾臟 RNA 後，利用反轉錄聚合酶連鎖反應增殖出 β -actin、IL-4 及 γ -IFN 片段，以電泳分析，再利用 densitometer 計算 band 的密度，再以 β -actin band 的密度校正每一隻老鼠的數值，最後計算經校正後 IL-4 及 γ -IFN 的比例，最後以平均值 \pm 標準差表示。

我們將口服卡介苗免疫幼年小鼠後，利用上述計算方式評估口服卡介苗誘發免疫反應的機轉。表二為抗體力價及反轉錄聚合酶連鎖反應的原始數據，圖七為統合後的結果。在 IgG1/IgG2a 比例方面，以陰性對照組(mock)為基準點，經戊二醛處理後的卡介苗 (BCG(GA)) 因為已成為死菌，因此經口服後如預期般 IgG1/IgG2a 比例上升，亦即以產生抗體為主。至於卡介苗口服組別 (BCG) IgG1/IgG2a 比例下降，代表以產生細胞性免疫反應為主，這個結果符合目前卡介苗引發的免疫機制。本計畫所產製的卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (BCG-LTB) 雖然所含的卡介苗菌株也為死菌，但是卻呈現 IgG1/IgG2a 比例下降的現象，代表與目前使用的卡介苗一般，以產生細胞性免疫反應為主。至於微球體劑型因為產生的抗體力價過低，

因此無法計算。在 IL-4/ γ -IFN 比例方面，結果與 IgG1/IgG2a 比例一致，以陰性對照組為基準點，經戊二醛處理後的卡介苗主要以產生體液性免疫反應為主，卡介苗、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗、甚至於生物可分解性微球體，皆是以引起細胞性免疫反應為主。因此由結果顯示，不管是 IgG1/IgG2a 比例或是 IL-4/ γ -IFN 比例，都呈現出卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗主要以引起細胞性免疫反應為主。

若是比較不同年齡口服疫苗後所誘發免疫反應的效果及機轉，表三顯示年輕族群小鼠引起的 IgG 及 IgA 濃度，不管在血清或肺部都較壯年及老年族群為高，甚至於連 IgG1/IgG2a 比例在兩個族群也有不同的結果，年輕族群傾向於產生細胞性免疫反應為主，壯年及老年族群則是以產生抗體反應為主。

在疫苗是否可以造成 delayed-type hypersensitivity 方面，評估方法為足掌腫脹試驗。圖八顯示，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗 (BCG-LTB) 在口服後，再於左右腳掌分別注射 PPD 及磷酸緩衝液，兩者相比並無明顯的腫脹現象。至於卡介苗口服組於足掌腫脹試驗中也無明顯的腫脹現象，主要原因為為了與接合疫苗進行併行性試驗，因此兩者所接種的蛋白質含量相同，但相較下，卡介苗所含有的活菌量為建議值的千分之一。因此本結果顯示目前現有的 tuberculin test 可能無法作為卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗免疫效價的監測方式。

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。

卡介苗是利用活的牛型結核桿菌經冷凍乾燥後所製成的弱毒疫苗，因此疫苗的效果與細菌的活性有關，而這項因素也成為每一批號卡介苗品質管制的監測項目。目前被世界衛生組織建議測定卡介苗中細菌活性的方法為計算菌落形成的數量，即計算 CFU (Donikian et al., 1987)，但因為結核桿菌複製一次的時間約需 24 小時，在細菌接種後到菌落形成，往往需要 3~4 週的時間。因此為了快速測定細菌數量，我們嘗試採用 MTT 的方式 (Kairo

et al., 1999)。MTT 已被用來測定抗生素對結核桿菌的最小抑菌濃度 (Franzblau et al., 1998)，此外也被用來測定細胞及細菌的活性 (Sladowski et al., 1993)。其原理是利用染劑被細菌代謝形成具有顏色的 formazan，而顏色的深淺與細菌數成正相關，因此可以在 4 天內藉由分光光度計在 570 nm 波長下，測定顏色的深淺，推論細菌的活性。由結果可見，在進入細菌對數生長期時(第 3 天起)，細菌的代謝活性非常旺盛，MTT 會大量的被代謝，因此吸光值顯著增加。但是，MTT 的測定與傳統測定細菌數的方法之間是否也呈現正相關，仍需進一步的實驗證實。在本計畫中，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。

除了菌種的活性外，疫苗的製作還必須考慮到疫苗品質的一致性，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。

在本計畫中，我們製備兩項原型產品進行特性分析，第一項原型產品為卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗，另一項為利用 PLG 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 測定蛋白質的特性。結果顯示經過戊二醛處理後，卡介苗菌株的抗原在接合後與結合前並無分子量及數量上的變化，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，顯示戊二醛接合作用並不會破壞蛋白質原有的特性及抗原性。

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%。利用掃描式電子顯微鏡分析微球體的型態，發現微球體的形狀很均質，幾乎都呈現圓球體，微球體的表面也很光滑，並無明顯孔隙出現，大小皆在 5 μm 以下。依據 Eldridge 等 (1991) 的研究指出，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。因此利用 PLG 為包覆材質製作的微球體大小在 5 μm 以下，且具有抗原持續釋放的特性，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，預期在進行動物試驗時也可以引發適當的全身性免疫反應。

本計畫設定口服卡介苗三項基礎原件 (卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑、

生物可分解性微球體的製作) 的生產條件及品管分析, 以成為未來計畫執行之材料及疫苗技術轉移之基礎。圖九為口服卡介苗基礎原件之生產及品管條件的建立。第一項原件為卡介苗菌株的品管分析, 卡介苗菌株接種於 Middlebrook 7H9 培養液中, 於 37°C 震盪培養 14 天後, 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, 檢測每一批卡介苗的一致性。第二項原件為生物性黏膜性佐劑 LTB 的品管分析, LTB 利用大腸桿菌表現純化後, 利用電泳及 GM1-ELISA 分析 LTB 的純度及功能。第三項原件為生物可分解性微球體的製作, 利用溶劑蒸發法以不同比例的 PLG 製作成的微球體, 藉由分析微球體的型態、產率、包裝率及微球體的抗原體外釋放試驗, 發現 lactide-glycolide 比例為 85:15、分子量為 89,015 的 PLG 為較佳的包覆材質, 可應用於口服疫苗的包覆。在確定這三項口服卡介苗基礎原件的產製及品管流程後, 我們將卡介苗菌株與生物性黏膜佐劑利用戊二醛進行接合, 形成第一項原型產品卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗, 進一步將卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗利用 PLG 包覆後、形成第二項原型產品生物可分解性微球體。這兩項原型產品進一步以免疫試驗證實其免疫有效性。

在疫苗有效性的分析方面, 我們主要評估三項參數, 一為疫苗是否可以誘發黏膜性免疫反應, 黏膜性免疫反應的評估為比較樣品中 IgA 的力價; 二為疫苗主要是誘發體液性或細胞性免疫反應, 評估的方法為測量血清中 IgG1 和 IgG2a 的比例及脾臟中 IL-4 和 γ -IFN 的比例; 三為疫苗是否可以造成 delayed-type hypersensitivity, 評估方法為足掌腫脹試驗。實驗動物為 2 月齡、3 月齡、7 月齡、12 月齡及 18 月齡的小白鼠, 分別代表含跨人類幼年到成年組群, 實驗組別為口服疫苗肌肉注射組、口服疫苗口服組, 對照組為卡介苗肌肉注射組及卡介苗口服組。

在幼年族群的實驗結果顯示，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗及生物可分解性微球體不僅可使動物產生高量的 IgG 及 IgA 於血清中，於肺洗液中也測得高量的 IgG 及 IgA，顯示口服疫苗劑型確實如預期般可以誘發良好的黏膜性免疫反應。至於將卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗與生物可分解性微球體相比，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗較生物可分解性微球體可以誘發較明顯的抗體反應，顯示卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以不經 PLG 的包覆，經口服接種後，就可引起良好的抗體反應。至於誘發的免疫機制方面，比較 IgG1/IgG2a 及 IL-4/ γ -IFN 的比例，發現卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗主要以引起細胞性免疫反應為主。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，亦即誘發細胞性免疫反應，才能產生良好的保護性。因此由幼年小鼠的免疫結果，發現生物性黏膜佐劑 LTB 確實可以刺激免疫反應的發生，而卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以不經 PLG 的包覆，經口服接種後，與傳統卡介苗相較下，可以誘發較高量的 IgG 及 IgA，而且不管在血清或肺腸洗液中皆呈現相同的效果，此外在免疫機制上，也傾向以細胞性免疫反應為主，因此我們預期卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可能可以使動物產生良好的保護性，不過這一點仍需要進一步以動物試驗證實其免疫保護性。

若是比較不同年齡口服疫苗後所誘發免疫反應的效果及機轉，年輕族群小鼠引起的 IgG 及 IgA 濃度，不管在血清或肺部都較壯年及老年族群為高，甚至於連 IgG1/IgG2a 比例在兩個族群也有不同的結果，年輕族群傾向於產生細胞性免疫反應為主，壯年及老年族群則是以產生抗體反應為主。目前卡介苗在臨床的使用上，已被證實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)。而本計畫也呈現出卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗對不同年齡小鼠確實引發不同的免疫機制，在年輕族群傾向於產生細胞性免疫反應為主，壯年及老年族群則是以產生抗體反應為主。因為細胞性免疫反應為動物體對抗肺結核桿菌很重要的一項免疫機制，因此本計畫的結果，似乎可以解釋臨床上卡介苗在小孩及成年人為何會出現不同的保護效果。

本計畫已完成卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑及生物可分解性材質包覆最適當製程及品管模式的建立、卡介苗活菌數檢定、物化特性分析及生物有效性的析、並進行幼年及成年動物的免疫，以分析口服卡介苗的免疫有效性。由結果顯示，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以誘發幼年及成年小鼠產生特異性的 IgG 及 IgA，不管在血清或肺洗液中都可以偵測到，而且卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗在幼年小鼠主要以引起細胞性免疫反應為主，而在成年小鼠則是引起體液性免疫反應為主。未來再經由小白鼠、天竺鼠或牛之保護性試驗及人體試驗，進一步評估是否可取代舊式幼童肌肉注射型卡介苗，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肺結核疫苗。

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，進入幼年及成年小鼠的免疫試驗。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，而且在幼年及成年小鼠都呈現相似的結果。此外，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗可以誘發幼年及成年小鼠產生特異性的 IgG 及 IgA，不管在血清或肺洗液中都可以偵測到，而且卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗在幼年小鼠主要以引起細胞性免疫反應為主，而在成年小鼠則是引起體液性免疫反應為主。

五、未來計畫的規劃：經由本計畫原型產品卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗的實驗結果，未來計畫擬先建立口服卡介苗劑型量產技術及標準操作程序，藉由建立標準操作程序，加速將技術轉移至疫苗工廠。其次為建立肺結核動物模式之建立，以探討口服卡介苗的免疫保護性。新劑型疫苗效價之評估系統是否能相容於目前的結合菌素試驗，是否要利用其他的效價評估系統取代，也是必須考量的。進一步，推動口服卡介苗量產劑型大型動物免疫模式，同時評估疫苗彼此的干擾，是否口服卡介苗在取代目前卡介苗後，會干擾目前 B 肝疫苗、白喉百日咳破傷風混合疫苗、麻疹腮腺炎德國麻疹混合疫苗等疫苗的效果，也是進一步必須考量的（圖九）。

由本計畫的免疫試驗中，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，此外，卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗在口服接種後，也可引起良好的免疫反應。未來再經由小白鼠、天竺鼠或牛之保護性試驗及人體試驗，進一步評估是否可取代舊式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肺結核疫苗。

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;10:945-53.
- Anderson AB, Brennan P: In: Bloom BR, ed. Tuberculosis Pathogenesis, Protection and Control. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994;307-30.
- Bedwell J, Kairo SK, Behr MA, Bygraves JA: Identification of substrains of BCG vaccine using multiplex PCR. *Vaccine* 2001;19:2146-51.
- 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;43:81-7.
- Bosio CM, Orme IM: Effective, nonsensitizing vaccination with culture filtrate proteins against virulent *Mycobacterium bovis* infections in mice. *Infect Immun* 1998;66:5048-51.
- 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* 1933;110:203-12.
- Centers for Disease Control: Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality. *Morbidity Mortal Weekly Rep* 1993;42:961-4.
- 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;15:248-56.
- 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;25:260-6.
- 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;190:309-16.
- 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;70:3111-21.
- 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;101:2364-9.
- 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;28:287-94.
- 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;346:1339-45.
- Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH: Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:362-6.
- 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;21:325-35.
- 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;97:13853-8.
- Hsieh DST: "Control Release Systems: Fabrication Technology", Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, 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;105:314-24.
- Kairo SK, Bedwell J, Tyler PC, Carter A, Corbel MJ: Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine* 1999;17:2423-8.
- Kaufmann SHE: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000;6:955-60.
- Kaufmann SHE: Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000;6:955-60.
- 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;16:248-54.
- 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;71:2303-9.
- 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;18:1186-95.
- 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;131:951-62.
- 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;21:107-93.
- 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.
- Magdalena J, Vachee A, Supply P, Locht C: Identification of a new DNA region specific for members of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1998;36:937-43.
- 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;178:1274-82.
- 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;11:149-54.
- Orme IM, Andersen P, Boom WH: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993;167:1481-97.
- Pavanetto F, Conti B, Genta I, Giunchedi P: Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *Inter J Pharma* 1992;84:151-9.
- Plitnick LM, Loveless SE, Ladics GS, Holsapple MP, Selgrade MJ, Sailstad DM, Smialowicz RJ: Cytokine profiling for chemical sensitizers: application of

- the ribonuclease protection assay and effect of dose. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;179:145-54.
- 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.
- Romagnani S: T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000;85:9-18.
- Schluger NW, Rom WN: The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;15:679-91.
- 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.
- Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M: An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 1993;157:203-7.
- 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;65:4515-24.
- Spangler BD: Structure and function of cholera toxin and related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* 1992;56:622-47.
- Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C: Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol Microbiol* 1997;26:991-1003.
- Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, Beagley KW, Eldridge JH, Takatsu K, Kiyono H: Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN- γ and IL5 using the enzyme linked immunospot (ELISSPOT) assay. *J Immunol Methods* 1990;128:65-73.
- 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;64:1290-9.
- 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;173:627-35.
- 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;15:225-9.
- 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;41:131-46.
- 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;16:150-5.
- 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;66:1299-308.
- Valensi JM, Carlson JR, Van Nest G: Systemic cytokine profiles in Balb/C mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J Immunol* 1994;153:4029-39.
- Vandebriel RJ, De Jong WH, Spiekstra SW, Van Dijk M, Fluitman A, Garssen J,

- Van Loveren H: Assessment of preferential T-helper 1 or T-helper 2 induction by low molecular weight compounds using the local lymph node assay in conjunction with RT-PCR and ELISA for interferon- γ and interleukin-4. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;162:77-85.
- Weldingh K, Andersen: Immunological evaluation of novel *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;23:159-64.
- 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	PLG 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。

表二 口服卡介苗誘發3月齡小鼠產生抗體反應及免疫機制的原始數據。

組別 ^a	β-actin ^b		IL-4 ^b		γ-IFN ^b		IL-4/β-actin ^c		γ-IFN/β-actin ^c		IL-4/γ-IFN ratio		IgG1/IgG2a ratio		IgA			IgG				
															Serum titer	Average ^d	Lung titer	Average ^d	Serum titer	Average ^d	Lung titer	Average ^d
BCG no.1	41,141.35	6,433.61	3,458.01	0.16	0.08	1.86	0.08	1.86	0.16	0.08	1.86	1	1	<28x	28	0	<2x	28	<28x	28	<2x	0
BCG(GA) no.1	32,590.77	7,866.00	1,449.63	0.24	0.04	5.43	0.04	5.43	0.24	0.04	5.43	1.93	1.93	<28x	28	0	<2x	28	<28x	28	<2x	0
BCG-LTB no.1	33,397.21	9,169.25	1,855.70	0.27	0.06	4.94	0.06	4.94	0.27	0.06	4.94			>3584x	2587.0475	68.416	>256x	>3584x	>3584	>256x	>256x	43.93
Microsphere no.1	32,040.92	6,538.83	2,546.44	0.20	0.08	2.57	0.08	2.57	0.20	0.08	2.57			1605.33	1157.3467	2.8987	30.237	2.8987	>3584	546.53	>256x	13.063
Mock no.1	33,737.42	8,471.44	2,863.76	0.25	0.08	2.96	0.08	2.96	0.25	0.08	2.96	1	1	<28x	28	0	<2x	28	<28x	67.85	<2x	0
BCG no.2	16,309.11	4,262.67	1,192.12	0.26	0.07	3.58	0.07	3.58	0.26	0.07	3.58			<28x	28	0	<2x	28	<28x	28	<2x	0
BCG(GA) no.2	10,718.25	3,016.28	153.75	0.28	0.01	19.6	0.01	19.6	0.28	0.01	19.6	1	1	<28x	28	0	<2x	28	<28x	28	<2x	0
BCG-LTB no.2	12,000.27	2,913.39	1,227.31	0.24	0.10	2.37	0.10	2.37	0.24	0.10	2.37			>3584x	2587.0475	68.416	150.187	>3584x	>3584	>256x	>256x	43.93
Microsphere no.2	12,465.35	3,039.53	550.67	0.24	0.04	5.52	0.04	5.52	0.24	0.04	5.52			1759.42	1157.3467	2.8987	26.024	>3584x	546.53	>256x	>256x	13.063
Mock no.2	10,117.78	4,045.00	145.5	0.40	0.01	27.8	0.01	27.8	0.40	0.01	27.8	1	1	<28x	28	0	<2x	<28x	67.85	<2x	<2x	0
BCG no.3	9,016.50	3,248.41	795.07	0.36	0.09	4.09	0.09	4.09	0.36	0.09	4.09			<28x	28	0	<2x	<28x	28	<2x	<2x	0
BCG(GA) no.3	8,482.50	2,182.06	560.64	0.26	0.07	3.89	0.07	3.89	0.26	0.07	3.89	1	1	<28x	28	0	<2x	<28x	28	<2x	<2x	0
BCG-LTB no.3	12,138.50	2,536.73	1,054.29	0.21	0.09	2.41	0.09	2.41	0.21	0.09	2.41			3200	2587.0475	68.416	107.313	>3584x	>3584	>256x	>256x	43.93
Microsphere no.3	9,166.08	2,392.44	281.79	0.26	0.03	8.49	0.03	8.49	0.26	0.03	8.49			107.29	1157.3467	2.8987	6.435	1292.13	546.53	30.8	>256x	13.063
Mock no.3	11,569.58	2,786.57	613	0.24	0.05	4.55	0.05	4.55	0.24	0.05	4.55	1	1	<28x	28	0	<2x	<28x	67.85	<2x	<2x	0

^a 免疫組別為卡介苗口服組 (BCG)、經戊二醛處理卡介苗口服組 (BCG(GA))、卡介苗-生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組 (BCG-LTB)、生物可分解性微球體口服組 (Microsphere) 及陰性對照組 (Mock)，本表只列出各免疫組中的前三隻老鼠的原始數據。

^b 數值為利用 densitymeter 計算基因片段 band 的密度。

^c 數值為以 β-actin 為基準校正後的結果。

^d 數值為該免疫組抗體力價的平均值。

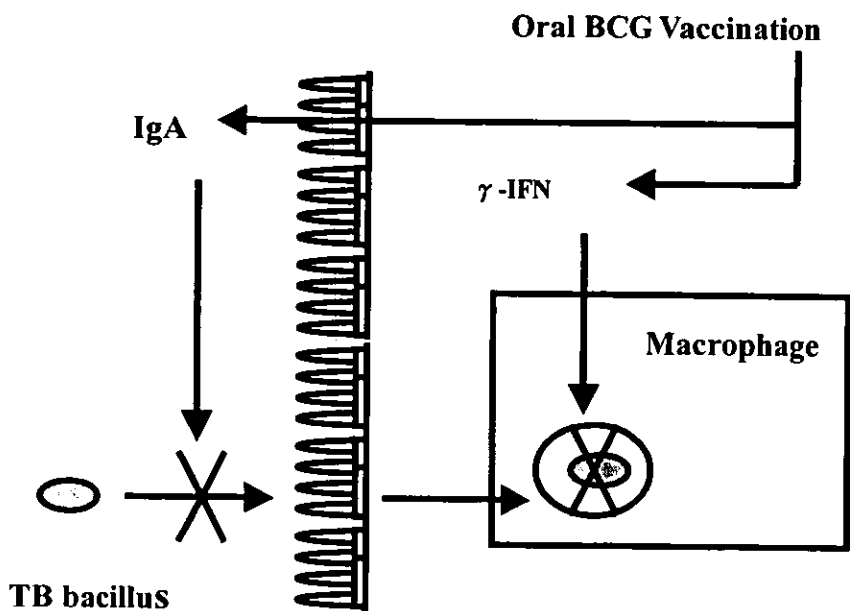
表三 卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗誘發不同年齡小鼠免疫反應的比較^a。

	2 月齡	3 月齡	7 月齡	12 月齡	18 月齡
Serum IgA ^b	14.22	151.9	1.21	2.5	1.22
Serum IgG ^b	22.71	404.06	202.72	41.4	5.13
Lung IgA ^b	143.53	28.8	5.03	1.47	1.01
Lung IgG ^b	244.88	507.47	126.27	34.81	2.31
IgG1/IgG2a ^c	0.34	2.3	1.74	3.23	5.7

^a 將卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗以口服方式分別接種 2、3、7、12 或 18 月齡的小鼠兩次後，收集血清及肺洗液，再利用 ELISA 測定 IgG、IgA、IgG1 及 IgG2a 的力價。

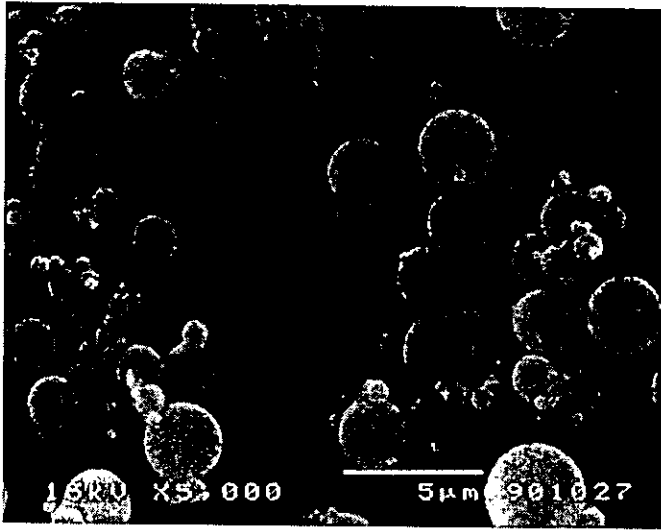
^b 其數值計算依據，為以卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組老鼠抗體力價的平均值除以卡介苗口服組抗體力價的平均值。結果為 10 隻小鼠的平均值。

^c 其數值計算依據，為以卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組老鼠 IgG1/IgG2a 的比例除以卡介苗口服組 IgG1/IgG2a 的比例。結果為 10 隻小鼠的平均值。

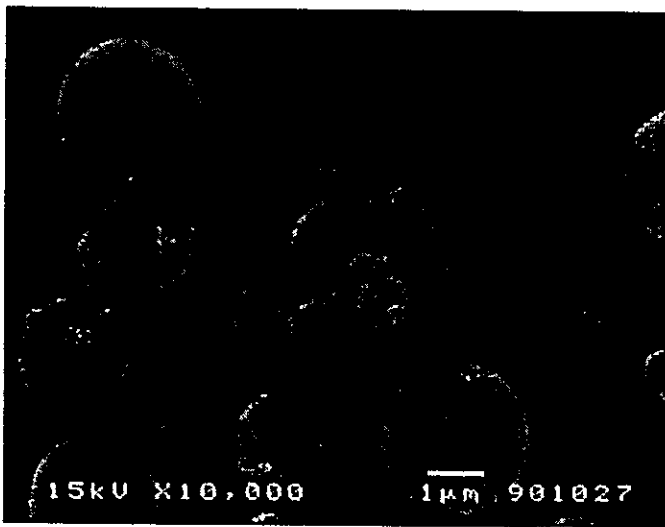


圖一 本計畫擬研發口服卡介苗的保護機制。當動物口服接種卡介苗口服劑型後，可藉由生物性黏膜佐劑的引導，使卡介苗與小腸上皮的 M 細胞接觸，進一步進入小腸的 Peyer's patch，活化淋巴球。其中 B 細胞可移行至黏膜層（包括呼吸道、消化道），產生分泌型的 IgA，以形成具保護性的第一道防線，防止肺結核桿菌與呼吸道接觸，而 T 細胞的活化可以產生 γ 干擾素，以形成第二道防線，抑制肺結核桿菌在細胞中的增殖。

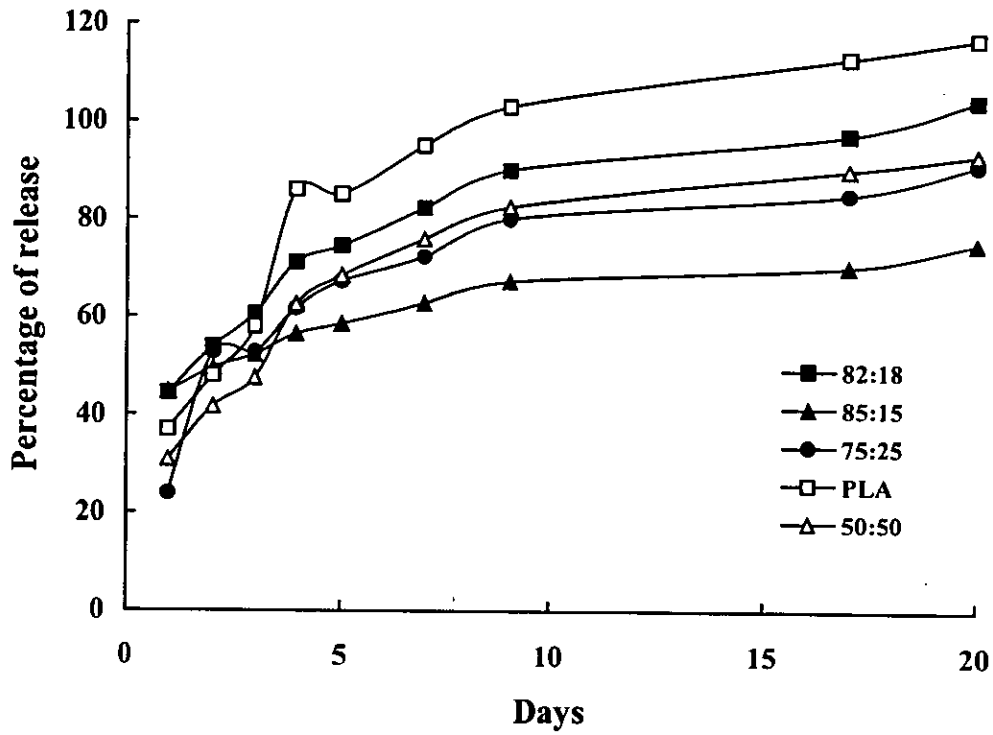
(A)



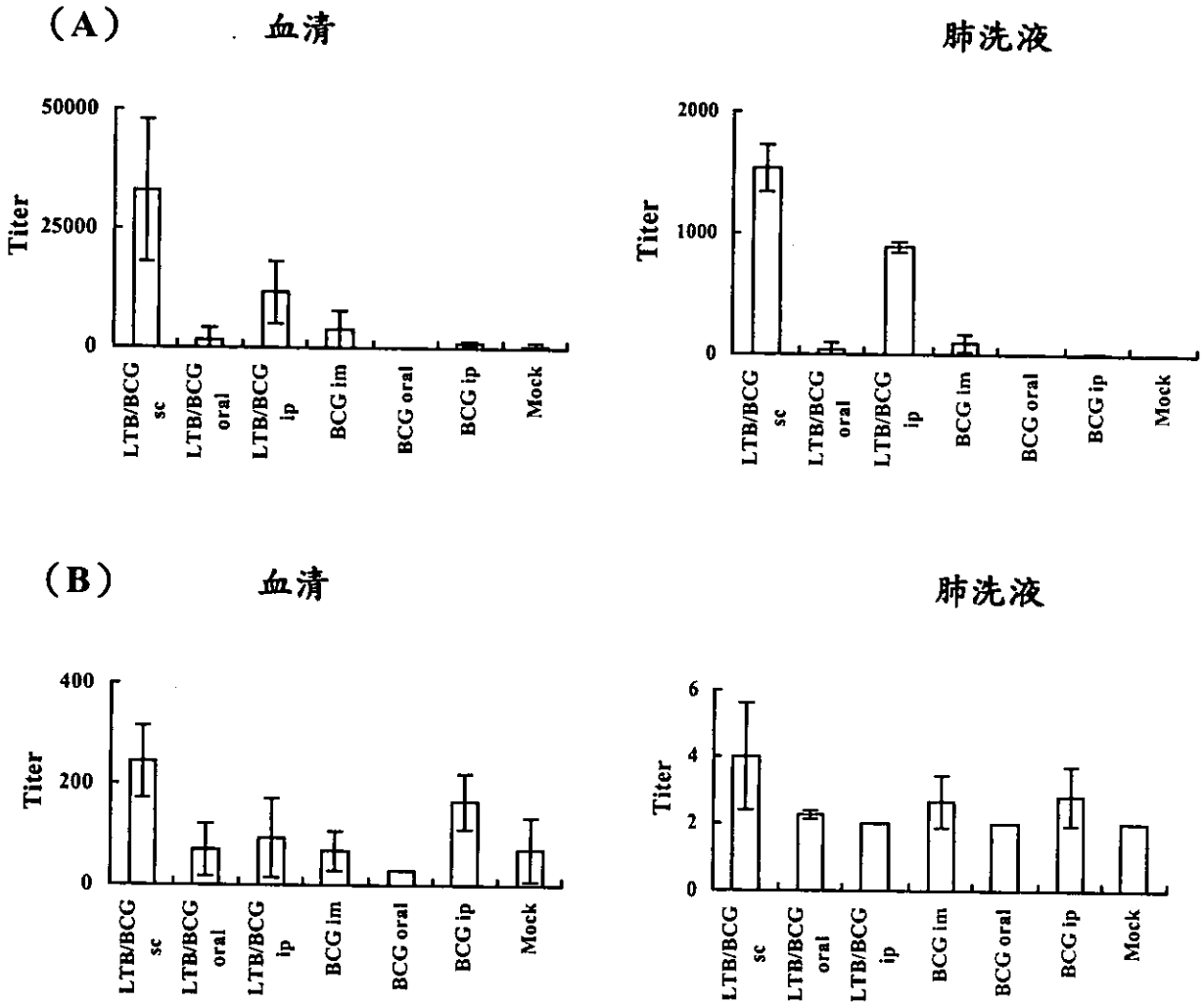
(B)



圖二 微球體的型態分析。將卡介苗接合生物性黏膜佐劑微球體利用掃描式電子顯微鏡放大 5000 倍 (A) 及 10000 倍 (B) 分析，圖中的 bar 分別代表 $5\ \mu\text{m}$ 及 $1\ \mu\text{m}$ 的大小。

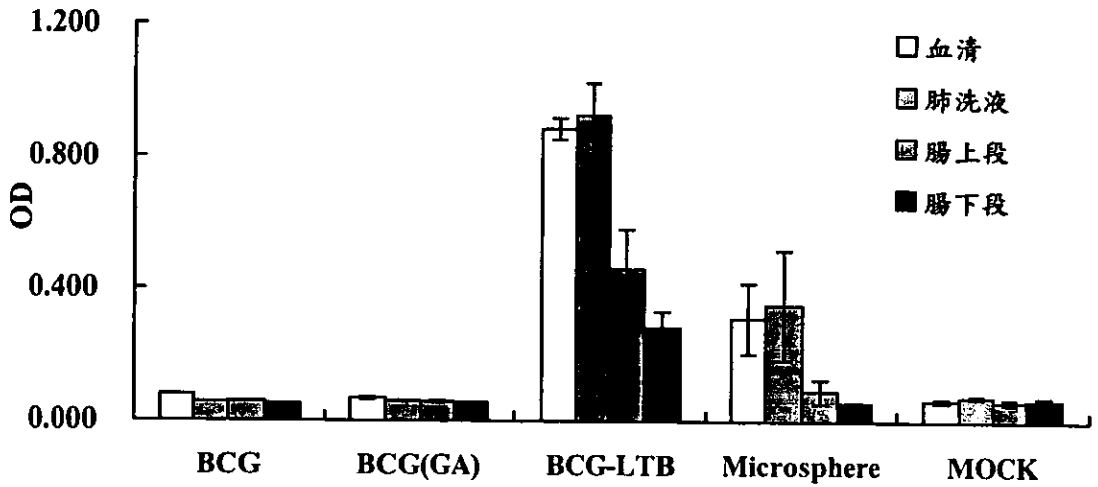


圖三 卡介苗接合生物性黏膜佐劑微球體的釋放速率。將 1 mg 微球體混懸於 100 μ l 磷酸鹽緩衝液中，每 1~3 天收集上清液，測定蛋白質的累積量，再計算釋放率。組別與表一相同。

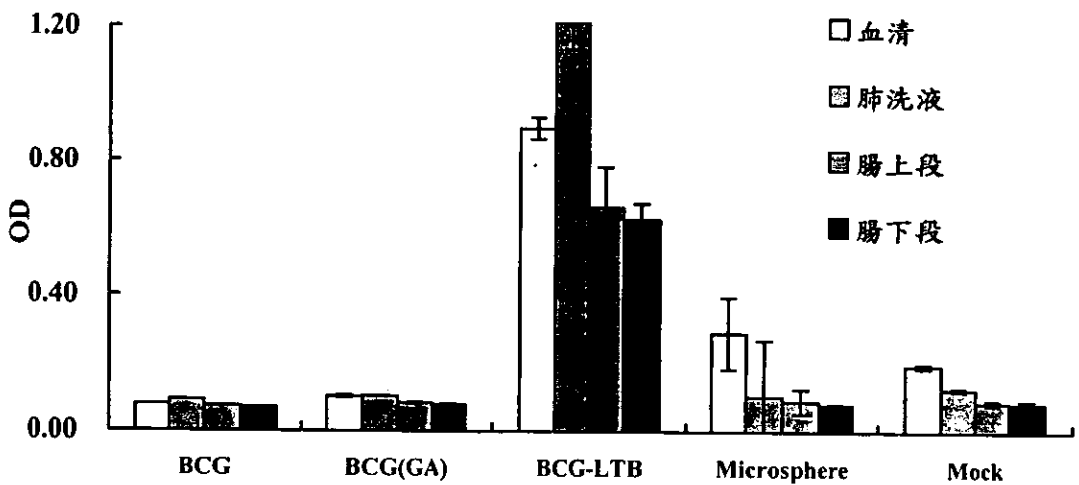


圖四 口服卡介苗誘發老年小鼠體液性免疫反應的效果。將 12 月齡的小鼠區分成 7 組進行免疫，免疫組別為卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗皮下注射組(LTB/BCG sc)、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組(LTB/BCG oral)、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗腹腔注射組 (LTB/BCG ip)、卡介苗皮下注射組 (BCG sc)、卡介苗口服組 (BCG oral)、卡介苗腹腔注射組 (BCG ip) 及陰性對照組 (Mock)。在進行兩次免疫後，取得血清及肺洗液，再利用 ELISA 測定特異性 IgG (A) 及 IgA (B) 的濃度。結果為 10 隻小鼠的平均值±標準差。

(A)



(B)



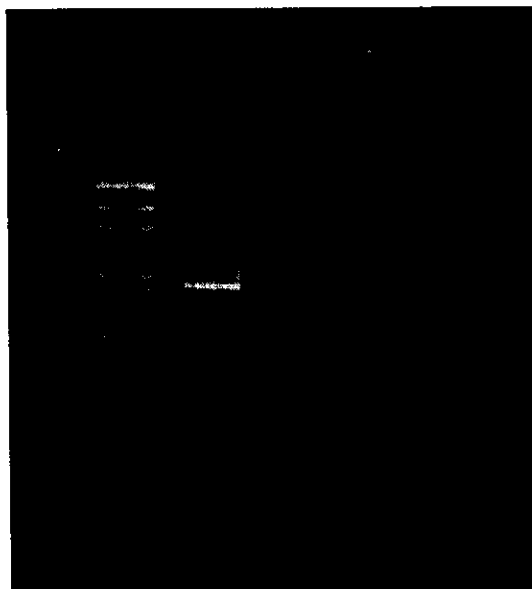
圖五 口服卡介苗誘發幼年小鼠體液性免疫反應的效果。將 3 月齡的小鼠區分成 5 組進行免疫，免疫組別為卡介苗口服組 (BCG)、經戊二醛處理卡介苗口服組 (BCG(GA))、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組 (BCG-LTB)、微球體劑型口服組 (Microsphere) 及陰性對照組 (Mock)。在進行兩次免疫後，取得血清、肺洗液、腸上段洗液及腸下段洗液，再利用 ELISA 測定特異性 IgG (A) 及 IgA (B) 的濃度。結果為 10 隻小鼠的平均值±標準差。

(A)

組別	IgG1 titer	IgG2a titer	IgG1/IgG2a
BCG-LTB oral no.1	27052.6	4571.8	5.92
BCG-LTB oral no.2	3894.15	3759.69	1.04
Average			3.48
S.D.			2.44

(B)

β -actin IL-4 γ -IFN

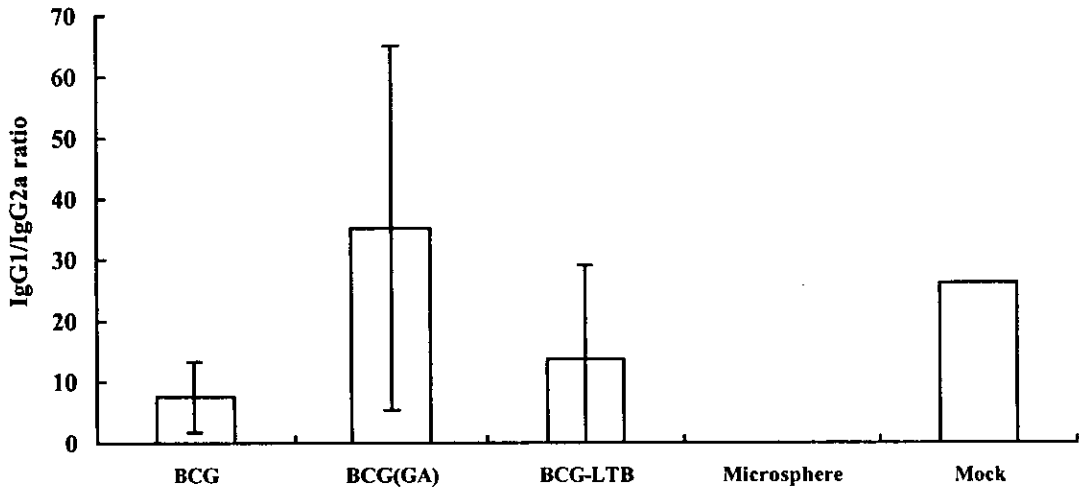


	IL-4 /IFN- γ
Mock	1.42
BCG sc	1.34
BCG oral	2.00
BCG-LTB	2.72

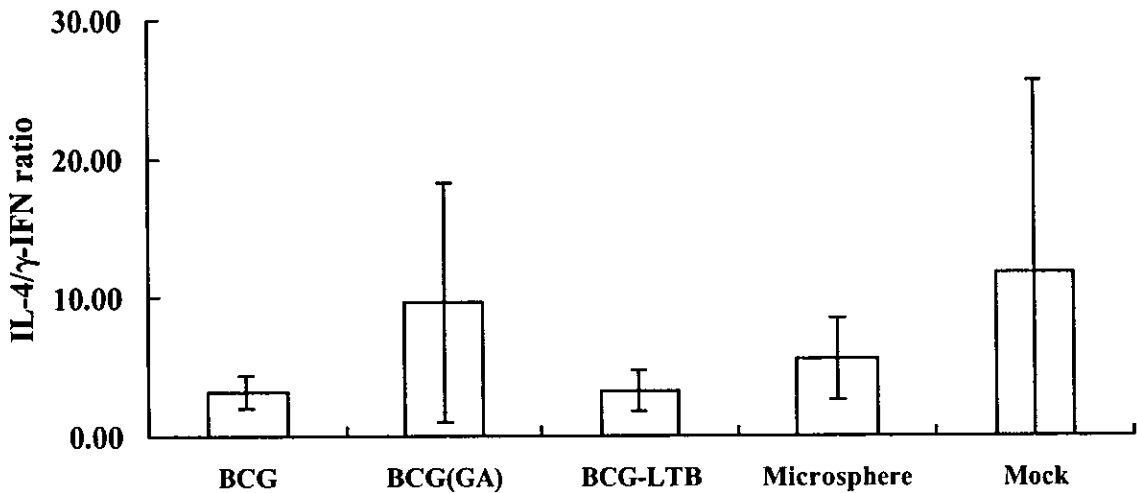
圖六 利用血清中 IgG1 和 IgG2a 的比例及脾臟中 IL-4 與 γ -IFN 的比例評估口服卡介苗引起免疫反應機轉的模式圖。(A) 將小鼠免疫後，收集血清，再利用 ELISA 的方式，測定血清中 IgG1 及 IgG2a 的力價，計算 IgG1 及 IgG2a 的比例後，最後以平均值 \pm 標準差表示。(B) 將小鼠免疫後，收集脾臟，萃取脾臟 RNA 後，利用反轉錄聚合酶連鎖反應

增殖出 β -actin、IL-4 及 γ -IFN 片段，以電泳分析，再利用 densitometer 計算 band 的密度，再以 β -actin band 的密度校正每一隻老鼠的數值，最後計算經校正後 IL-4 及 γ -IFN 的比例，最後以平均值 \pm 標準差表示。

(A)



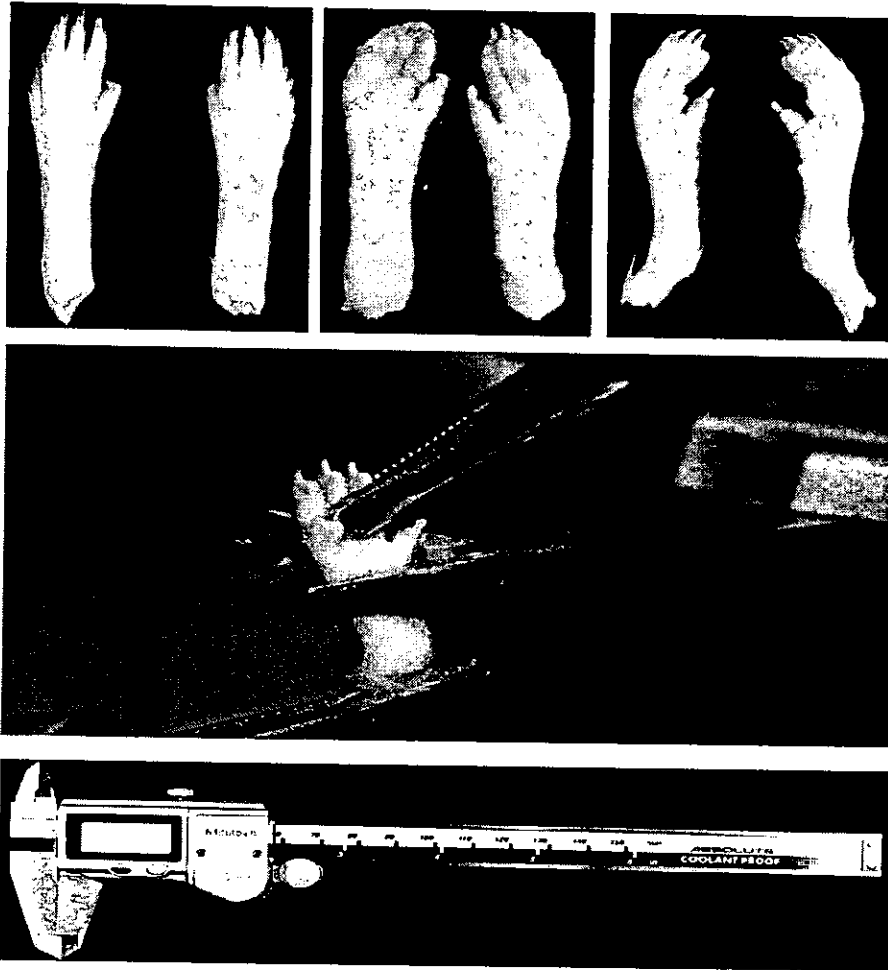
(B)



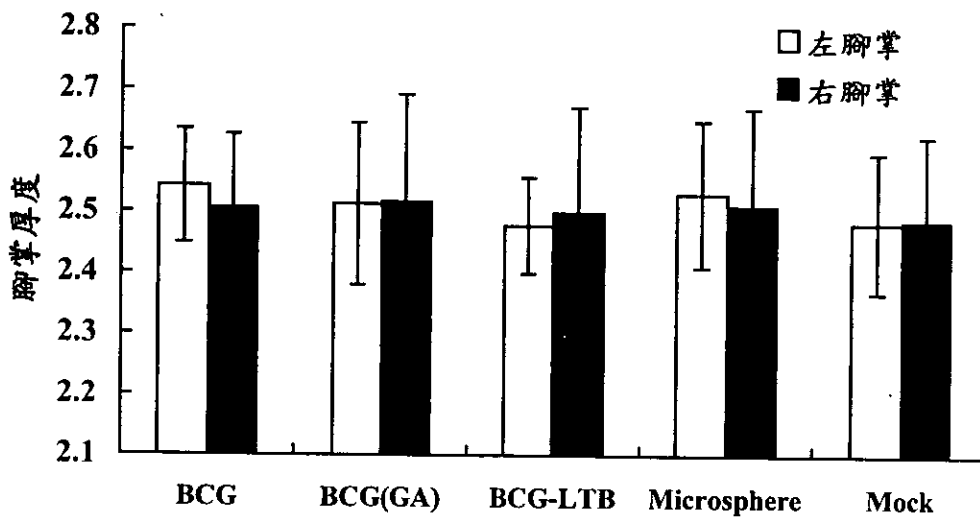
圖七 利用血清中 IgG1 和 IgG2a 的比例及脾臟中 IL-4 與 γ -IFN 的比例評估口服卡介苗引起免疫反應的機轉。將 3 月齡的小鼠區分成 5 組進行免疫，免疫組別為卡介苗口服組 (BCG)、經戊二醛處理卡介苗口服組 (BCG(GA))、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組 (BCG-LTB)、微球體劑型口服組 (Microsphere) 及陰性對照組 (Mock)。在進行兩次免疫後，取得血清，利用 ELISA 測定特異性 IgG1 及 IgG2a 的濃度，再計算比例(A)。

或是取得脾臟，利用反轉錄聚合酶連鎖反應增殖 IL-4 及 γ -IFN，再計算比例 (B)。結果為 10 隻小鼠的平均值 \pm 標準差。

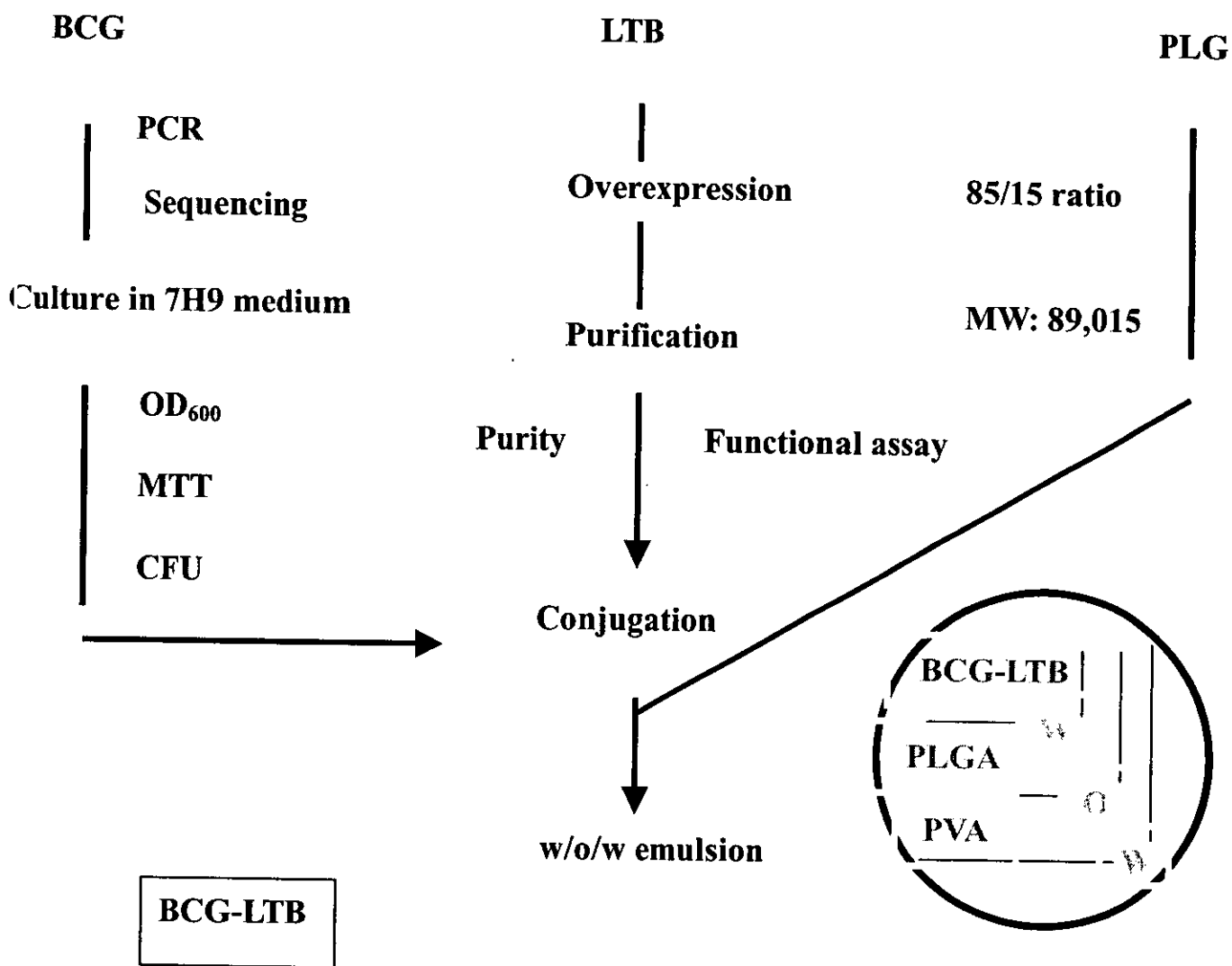
(A)



(B)



圖八 足掌腫脹試驗。將 3 月齡的小鼠區分成 5 組進行免疫，免疫組別為卡介苗口服組 (BCG)、經戊二醛處理卡介苗口服組 (BCG(GA))、卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗口服組 (BCG-LTB)、微球體劑型口服組 (Microsphere) 及陰性對照組 (Mock)。在進行兩次免疫後，將 PPD 及磷酸緩衝液分別注入左右腳掌中，於 24 小時後測量腳掌厚度。(A) 為測量腳掌的游標尺及測量的方法。(B) 為足掌腫脹試驗的結果，數值為 10 隻小鼠的平均值±標準差。



卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗

生物可分解性微球體

圖九 口服卡介苗基礎原件之生產及品管條件的建立。本計畫設定口服卡介苗三項基礎原件（卡介苗菌株、生物性黏膜佐劑、生物可分解性微球體的製作）的生產條件及品管分析，以成為未來計畫執行之材料及疫苗技術轉移之基礎。

原型產品—卡介苗接合口服疫苗

第一部份

口服卡介苗劑型量產技術及標準操作程序之建立

建立標準操作程序

於各步驟操作時，進行材料品質管控，制定標準操作手冊，以簡化程序及再現為最高考量

第二部份

肺結核動物模式之建立及口服卡介苗量產劑型保護性效果之探討

第三部份

新劑型疫苗效價之評估

利用口服卡介苗量產劑型經免疫後之體液性及細胞性免疫反應的強度與肺結核動物模式疫苗保護性之相關性，選擇相關性較高且易於臨床執行的技術，作為未來新劑型疫苗效價之評估

推動口服卡介苗量產劑型大型動物免疫模式

評估疫苗的干擾—口服卡介苗與B肝疫苗、白喉百日咳破傷風混合疫苗、麻疹腮腺炎德國麻疹混合疫苗以不同免疫時序性及不同組合探討其免疫效能及干擾性

圖十 未來的規劃。經由本計畫原型產品卡介苗—生物性黏膜佐劑接合疫苗的實驗結果，未來計畫擬先建立口服卡介苗劑型量產技術及標準操作程序，藉由建立標準操作程序，加速將技術轉移至疫苗工廠。其次為建立肺結核動物模式之建立，以探討口服卡介苗的免疫保護性。新劑型疫苗效價之評估系統是否能共容於目前的結合菌素試驗，是否要利用其他的效價評估系統取代，也是必須考量的。進一步，推動口服卡介苗量產劑型大型動

物免疫模式，同時評估疫苗彼此的干擾，是否口服卡介苗在取代目前卡介苗後，會干擾目前 B 肝疫苗、白喉百日咳破傷風混合疫苗、麻疹腮腺炎德國麻疹混合疫苗等疫苗的效果，也是進一步必須考量的。