

## 家蠶量產動物疫苗平台之建置

林育如 本所製劑研究組

### 動物疫苗簡介

本所現階段開發的動物用疫苗種類繁多，主要是以經濟動物之疫苗為主，包括豬、牛、羊、家禽、水禽及魚等。而若以疫苗抗原生產方式，又可區分成傳統死毒（菌）疫苗或活毒（菌）苗、類毒素疫苗、多價疫苗、次單位疫苗及其他基因工程產製之疫苗等。

筆者的實驗室主要是以桿狀病毒系統表現之重組蛋白開發為次單位疫苗，傳統上此一表現系統是將重組桿狀病毒感染昆蟲細胞後，收取表現的重組蛋白。以細胞表現方式的好處在於較易純化蛋白質，缺點則是所有過程都必須以無菌操作，若需大量生產，必須購買貴重的發酵槽。近年來得利於生物技術之快速進展，可以依各種目的進行基因轉殖工作；因此利用經過重組的家蠶核多角體病毒，以家蠶幼蟲（silkworm larvae）（圖 1）或蠶蛹（pupae）（圖 2）做為生物反應器直接生產蛋白質，可以大量表現所需的重組蛋白，進而降低抗原的生產成本。

### 家蠶生產平台簡介

桿狀病毒為昆蟲的病原體，主要感染鱗翅目昆蟲。目前最常被使用作為桿狀病毒載體的核多角體病毒為加州苜蓿夜蛾核多角體病毒（*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcMNPV）及家蠶核多角體病毒（*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*, BmMNPV），近年來已成為生產和研究各種蛋白的有力工具，且已有許多醫療上所需求外源蛋白成功的利用 AcMNPV 及 BmMNPV 表現載體表現。

由於家蠶生活史短，容易大量飼養、成本低廉，為理想的活體昆蟲宿主，在藉由許多生物技術的更新改良，家蠶已經成為大量生產異源蛋白的有效工具。日本前田進等人

在 1985 年將人類  $\alpha$  干擾素基因嵌入家蠶核多角體病毒，並以家蠶生產人類  $\alpha$  干擾素，是第一個成功應用家蠶幼蟲作為生物反應器表現的報導。而後日本 Toray 公司也應用家蠶核多角體病毒感染於家蠶，成功表現出二種動物用重組干擾素蛋白並且商品化，分別是 Intercat® 及 Interdog®。Intercat® 是用來治療貓卡里西病毒 (Feline Calicivirus, FCV，俗稱貓流行性感冒) 感染的貓源干擾素，1994 年在日本上市。而 Interdog® 在 2005 年上市，是用來治療狗的異位性皮膚炎 (atopic dermatitis) 的狗源  $\gamma$  干擾素 (canine interferon- $\gamma$ )。而中央研究院分生所趙裕展博士實驗室在 1996 年亦將綠螢光蛋白基因引入家蠶核多角體病毒後，成功以桿狀病毒創造出螢光家蠶，可以更清楚地得知蛋白質生產量的高低。

家蠶量產動物疫苗平台係由本所、中央研究院趙裕展博士團隊及農委會苗栗區農業改良場三個研究單位共同研發。首先由本所提供有效的疫苗標的基因，轉由趙博士團隊負責完成重組家蠶核多角體病毒選殖及蛋白質表現測試。而家蠶飼養及攻毒則在苗栗區農業改良場進行，該場擁有豐富的品種資源與經驗，可培養及選育對桿狀病毒最具感受性且高表現量的蠶種進行量產，並協助病毒接種與抗原採集。最後再回到本所執行疫苗免疫效力及安全試驗，並負責田間試驗與產品許可證申請，完成疫苗之商品化。

## 目前開發中之商品

本所先以桿狀病毒感染昆蟲細胞表現豬瘟 E2 重組蛋白，並試製成次單位疫苗於豬隻進行免疫效力試驗及攻毒試驗，結果顯示豬瘟 E2 重組蛋白具有良好的免疫原性且能夠抵抗豬瘟病毒的攻擊。因此自 2005 年開始，經由中央研究院趙裕展博士將豬瘟病毒 E2 醣蛋白基因轉殖至家蠶核多角體病毒基因體中，篩選出帶有豬瘟 E2 醣蛋白基因的重組家蠶核多角體病毒後，由苗栗區農業改良場將重組病毒以注射方式感染家蠶，目前每隻蠶可產生 300-500 $\mu$ g 的抗原，大約可製成 5-10 劑量的疫苗，平均 1 劑量的抗原成本約新台幣 0.4 元。配合佐劑研發團隊，已研發出適合豬瘟 E2 次單位疫苗冷凍乾燥劑型 (圖 3)，具有高效價且高穩定性的乳液型 (Oil-in-Water, O/W) 油質佐劑稀釋液 (圖 3)。本所目前正向農委會動植物防疫檢疫局提出「豬瘟家蠶重組 E2 次單位疫苗」以田間試驗取代委託試驗申請案，待取得產品許可證後再技術轉移產業界。

另外，為擴展此一平台的利用性，目前也成功的應用蠶蛹表現禽流感 H5N1 病毒株

之血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 抗原，每顆蠶蛹可生產約 800  $\mu\text{g}$  之 HA 抗原，並依過去試驗結果估算，每個蠶蛹約可生產 200 劑量 HA 抗原。待完成各項動物實驗後，擬向動植物防疫檢疫局提出申請，未來希望以蠶蛹表現 HA 抗原做為我國禽流感疫苗之儲備抗原使用。

## 量產平台的建置瓶頸與突破

雖然家蠶生產動物疫苗平台擁有高表現量及低生產成本的優勢，但仍然有許多產業化的問題尚待克服。

首先，第 1 個困難點是整個生產過程需符合動物用疫苗生產規範 GMP 製程，才能製成產品上市。目前在農委會的支持下，本所已經建置完成一間規模較小，符合 GMP 動物用疫苗廠規範之家蠶攻毒室，其環境控制在恆溫、恆濕、正壓，並且具有獨立的空調處理單元，可用來生產符合 GMP 規範之抗原材料，並做為家蠶生產動物疫苗平台的先導示範工廠。

第 2 個困難點在於如何讓整個疫苗生產的流程提高自動化，減少人力，克服量產的問題。原先在實驗室中小規模表現系統，是以注射方式完成病毒接種，但此一方法極為耗費人力及時間。現階段苗栗區農業改良場已經建立新式之病毒大量接種方法，並分別於美國、臺灣及中國完成專利申請，也成功地以新式感染方式於本所之家蠶攻毒室進行 3 次之雛形量產測試。而在家蠶體液收集部分，本所與台大生物產業自動化教學及研究中心合作開發家蠶體液收集自動化相關設施，目前初步完成雛形機的製作、安裝及測試，預計每日可達到 1 萬隻的採集速率，達成節省人力達十分之一及提高 10 倍工作效能。

## 家蠶量產動物疫苗平台的契機

台灣因為氣候原因，且過去保有豐富之家蠶品種及相關飼養技術，此一部分具有領先其他國家之競爭優勢。為配合產業化，未來將持續在大量生產的製程上，開發適量產機器或是省工模式之相關製程，期望以家蠶做為生物反應器能提供一個經濟有效的蛋白生產平台，開創出家蠶的生技新絲路 (Bioroad)。

# silkworm larvae



圖 1、第五齡家蠶幼蟲 (silkworm larvae)。

# pupae



圖 2、蠶蛹 (pupae)。



圖 3、豬瘟家蠶重組 E2 次單位疫苗凍乾燥劑型及油質佐劑稀釋液。