

類病毒顆粒疫苗及快速檢測試劑平台建立

陳心儀¹、蔡欣憶¹、蔡信雄²、邱垂章³、簡基憲²、陳培中²、張聰洲²、吳弘毅²、沈忻穎¹
陳信翰¹、莊國賓¹

1.屏東科技大學動物疫苗科技研究所
2.屏東科技大學獸醫系
3.行政院農委會動植物防疫檢疫局

信箱：kpchuang@mail.npust.edu.tw
電話：(08)770-3202#5333

疾病快速診斷試劑和疫苗對動物的健康是非常重要的。在我們的研究中，為了動物健康我們建立快速診斷試劑和類病毒顆粒疫苗的平台。

接種疫苗被認為是最具成本效益的方式來控制病原體和預防疾病在人類和獸醫領域上皆然。目前，市面上主要批准使用的疫苗多為減毒或死毒，大多使用傳統技術開發。然而，新型次單位疫苗將在獸醫疫苗領域發展，其中，類病毒顆粒（VLPs）方法為最具吸引力的代表。VLP疫苗結合數種全病毒疫苗和重組次單位疫苗的優點，整合的關鍵特點在於安全性和保護潛力的免疫源性：

- (1)保存原始抗原的結構
- (2)安全，因為他們是絕對寄生於昆蟲但對於其他物種是非感染性和非複製的
- (3)在惡劣的環境條件下比其他抗原有較高的穩定性
- (4)本身具有自體佐劑作用

因此，我們建立VLP疫苗的開發平台。首先開發雞類病毒疫苗，傳染性華氏囊病在家禽業受到極大的關注，尤其是在過去的十年。傳染性華氏囊病毒最主要攻擊標的器官是華氏囊，這是在禽類物種中特化的B淋巴細胞組織。雞隻將病毒吸入口腔感染後，主要在腸相關的淋巴組織中的淋巴細胞和巨噬細胞複製。病毒經由血液系統到達華氏囊，在華氏囊中複製引起雞隻的免疫抑制。在經濟影響下雞傳染性法氏囊病的臨床和亞臨床疾病須要尋求高效疫苗。傳統死毒疫苗和次單位疫苗不能誘導較高且長期的抗體及T細胞免疫反應。另一方面，活毒疫苗有毒力回歸風險存在。因此，雞隻的傳染性華氏囊病毒感染以IBDV-VLP疫苗為最佳解決方案。

在電子顯微鏡顯示分析中具有重組蛋白存在，且形態為類病毒顆粒（圖1A和B）。這些結果表明，傳染性華氏囊病毒的衣殼次單位蛋白在昆蟲細胞中表達具有後轉譯修飾並可組裝形成VLPs。針對免疫接種研究，純化後IBDV-VLPs，其控制組為來自未感染的Sf9細胞。以i.p.注射方式給於出生第3天雞隻IBDV-VLPs疫苗劑量分別0.13和 0.27 μ g，接著偵測免疫原性。另一組的雞注入對照抗原其步驟相同。在ELISA分析表明，對照組血清對於重組傳染性

華氏囊病毒衣殼次單位蛋白（圖2）並沒有出現顯著的反應性；相反的，抗VLP血清則反應強烈對抗衣殼抗原（圖2）。之後雞隻攻毒施打致死劑量的傳染性華氏囊病毒。存活率分別為PBS接種組50%及VLP疫苗接種組100%（圖3）。相比之下，所有的VLP疫苗接種的雞在整個生存過程中保持健康。呈現的數據在結論中表明，重組傳染性華氏囊病毒類病毒顆粒可引起高力價抗體來保護雞隻

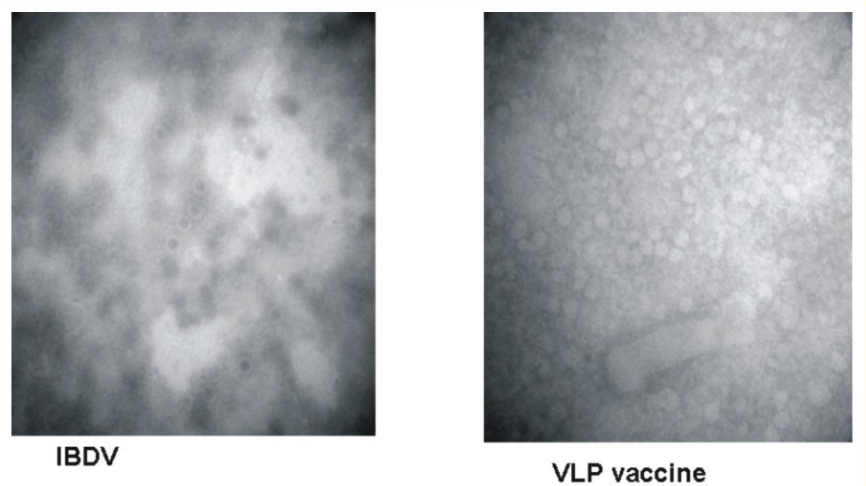


圖1 傳染性華氏囊病毒類病毒-顆粒的組成。電子顯微鏡下傳染性華氏囊病毒 (A)和電子顯微鏡下傳染性華氏囊病-類病毒顆粒(B)

免於致命的傳染性華氏囊病毒的攻毒，從這些結果顯示IBDV-VLPs是一個很有前途的IBDV疫苗的選擇。在本研究中，我們已經建立了VLP疫苗的開發生產平台。可用於安全和有效及便宜的動物疫苗開發技術平台。

另一方面，快速檢測在疫苗接種前是不可缺少技術，能迅速辨識病毒的感染。目前，我們正開發一種快速診斷病毒的檢測試劑。本試劑是根據試紙色層分析原理，並可以供技術人員在現場使用，只需短短幾分鐘便可由動物的血液或血清或其它臨床樣品中檢測出病毒抗原。膠體金免疫層析技術是一個新型的免疫層析技術，利用纖維素膜為載體，膠體金試片上標記的抗原或抗體被當作追蹤劑。此技術優於傳統的免疫測定法，程序簡單、操作快速、立即見效、成本低廉，不需要熟練的技術人員或昂貴的設備等。所以膠體金試片適合作抗體或抗原的現場檢測。在我們實驗室中已有特異性單株抗體和色層分析技術平台用於檢測病毒抗原。1×10⁶的病毒被連續稀釋，並將每稀釋倍數取50 μ l加入試紙條內。偵測條帶的位置在稀釋倍數低於10顆病毒量仍可顯現出條帶，但是病毒數為1或0則無法被偵測到，因而沒有條帶之顯現。

這些結果表明，快速檢測試劑盒平台和試紙條的製備在目前研究中可使用在特定疾病的診斷和流行病學調查。我們希望可以結合快速診斷及類病毒顆粒疫苗的生產平台，以提高動物的健康。

致謝

這些研究感謝行政院國家科學委員會（NSC）和農業委員會提供莊國賓計畫經費及感謝朱純燕、鍾文彬教授對這篇文章的編寫和出版之幫助。

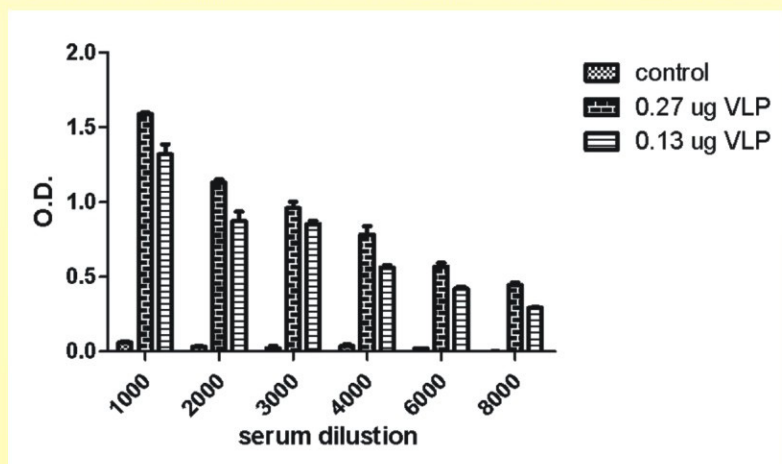


圖2 IBDV-VLP引起的免疫抗體反應。於第三天時進行雞腹腔注射(ip)：IBDV-VLP分別施打0.13和0.27 μ g的VLP，及控制組來自未感染的Sf9細胞裂解液。經免疫後的第6週將雞犧牲，收集血清和樣本進行分析。結果顯示為兩種獨立的實驗。死毒傳染性華氏囊病毒VLP的抗血清結合活性。抗血清稀釋倍率為1:1,000到1:8,000

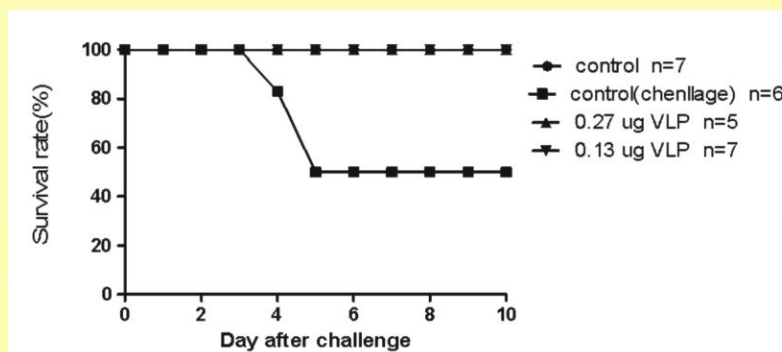


圖3 免疫IBDV-VLP疫苗賦予雞隻對抗致命傳染性華氏囊病毒的保護力

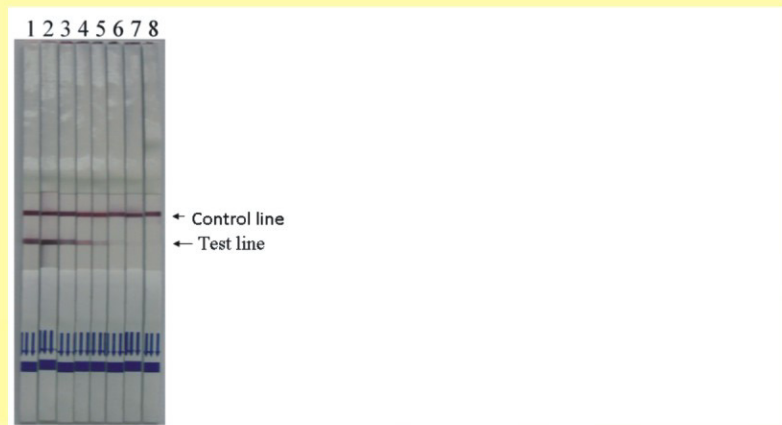


圖4 免疫膠體金試紙條的靈敏度。1x10⁶(line1), 1x10⁵(line 2), 1x10⁴(line 3), 1x10³(line 4), 1x10²(line 5), 10(line 6), 1(line 7) and 0(line8)病毒數的同時利用此測試條作測試