

高效能禽用疫苗之核酸佐劑及其生產技術

獸醫學系

莊秀琪 教授

電話：08-7703202 # 5150

E-mail：hcchaung@mail.npust.edu.tw

疫苗為控制所有疾病之最佳策略，1995年Krieg A.M.等人首次於自然 (Nature) 期刊中以小鼠為動物試驗模式，提出含有未甲基化之胞嘧啶嘧啶二核苷酸 (CpG) 模組的去氧核糖核酸序列，具有促進多種免疫細胞活化、誘導多種細胞因子產生、易被組織吸收等優點，並於1998年確認其有效性。其後其他學者研究顯示含有CpG 模組的寡核苷酸 (oligodeoxynucleotides；ODN) 亦可刺激多種大型家畜動物，包括牛、豬、羊等之淋巴細胞及抗原呈現細胞的活性，增加樹突狀細胞 (dendritic Cell；DC) 的抗原呈現活化及成熟作用，促進免疫系統對特定抗原趨向Th1細胞反應，對於家禽動物亦具有免疫促進之生物活性，具有疫苗佐劑效用。

核酸佐劑提昇免疫作用之機制包括：(1) 增加DC的活化、成熟及抗原呈現作用；(2) DC遷移作用的增加；(3) 顯著增加小鼠及人DC細胞表面抗原 (例如MHC-II、CD40、CD80、CD86 及IL-12) 的表現；(4) 增加前感處理的DC 對特定抗原的Th1細胞反應；(5) 增加CD8+ T 細胞的活性，可誘發對特定病毒或腫瘤的細胞毒殺作用；(6) 促進B細胞產生IgM及IgG2a等抗體；(7) 促進Th1細胞分泌干擾素- γ (interferon- γ ；IFN- γ)。因此，運用核酸佐劑，對先天免疫反應可產生具有保護性的免疫反應對抗病毒、細菌及胞外寄生蟲的感染，而與疫苗共同作用時，可活化B細胞產生抗體、活化抗原呈現細胞分泌細胞激素，例如IFN- γ ，以促進疫苗的免疫反應。

開發有效疫苗之關鍵技術包括佐劑，尤其近年來許多研究應用促進免疫活性之危險訊號因子，以開發作為具有輔助抗原激發動物細胞免疫系統功能之免疫佐劑。目前禽類用疫苗，主要使用的佐劑有鋁膠佐劑及油質佐劑，兩者缺點為歸屬於化學性佐劑，前者無法提升特異性Th1細胞的免疫反應；後者雖可引發較佳的免疫作用，但對組織刺激性強、有易殘留及副作用大等缺點。核酸佐劑應用於哺乳動物疫苗則兼具有輔助抗原激發體液性免疫反應及細胞性免疫反應的佐劑效用，但以化學方法合成的核酸佐劑片段，雖可以化學修飾核酸之間的磷酸二酯鍵，以降低DNAase的分解速率，但合成費時，無法大量合成且價格昂貴，再者核酸佐劑具有種別專一性，不同物種間具有較佳免疫促進作用的核酸佐劑結構有差異，目前已確知對人及小鼠有免疫調節作用的核酸佐劑序列並不相同，因此對不同物種之有效核酸佐劑序列仍須實驗證實。核酸佐劑運用在家禽產業的研究始於2002年，但多以化學合成之核酸佐劑進行生體外(*in vitro*)的評估，生體內(*in vivo*)評估也局限於針對抗體產生的體液性免疫方面，對於病毒感染細胞時真正有效的細胞性免疫反應，及應用於禽類疫苗的有效性與作用機制，目前尚無深入探討。因此，本實驗以雞隻免疫細胞為生體外篩選平台，評估含不同CpG模組之核酸佐劑序列，再以有效之核酸佐劑作為佐劑，分別搭配雞新城病之活毒/死毒疫苗、禽流感不活化疫苗、HA1次單位抗原或家禽霍亂不活化菌苗，評估其免疫佐劑功能，以期未來可運用於家禽疫苗產業，增加疫苗效力。

本技術之主要目的為開發禽類之核酸佐劑，依據文獻設計含GACGTT、GTCGTT及ATCGTT等3種不同CpG模組的核酸佐劑序列，於雞隻生體外之免疫細胞，篩選最具促進IFN- γ 基因表現活性的核酸佐劑序列，試驗結果顯示含CpG模組為GTCGTT的本技術開發之核酸佐劑，最具有促進免疫細胞IFN- γ 基因表現的能力；以此一之核酸佐劑，搭配雞新城病活毒疫苗及不活化疫苗，可刺激被免疫雞隻產生明顯的ND之HI特異性抗體、促進雞隻脾臟淋巴細胞增生以及脾臟淋巴細胞表面抗原CD4+、CD8+細胞百分率，且增加攻毒後雞隻存活率，顯示結果與過去文獻以核酸佐劑促進ND HI特異性抗體力價結果一致。且核酸佐劑應用於搭配禽流感不活化疫苗，可提升雞隻AIV HI抗體力價。過去文獻以不同核酸佐劑結構研究發現，該含有未甲基化之CpG模組核酸序列可以促進家禽免疫細胞對胎牛血清白蛋白抗原之免疫活性，以及對傳染性華氏囊病毒、禽流感病毒與ND病毒等病毒性疫苗之免疫效力，本技術篩選對禽類專一性核酸佐劑序列，亦可搭配禽類病毒性疫苗或次單位抗原之研究結果與過去文獻報導相似。核酸佐劑搭配家禽霍亂不活化菌苗，可有效提升市售菌苗之免疫效力，顯示核酸佐劑亦可有效搭配禽類細菌性菌苗，促進其免疫效力以及保護力。

細菌基因體DNA具有免疫效用在1984年經Tokunaga等學者證實，1995年Krieg等人更進一步證實具有特定序列的核酸片段，最具有促進小鼠B細胞的功能，稱之為CpG motif，目前經由人工合成含CpG motif之寡去氧核糖核苷酸稱之為核酸佐劑，具有與細菌DNA相似的免疫促進活性。過去文獻指出核酸佐劑具有種別專一性，不同物種間具有最佳免疫促進作用的CpG motif結構有差異，其中GACGTT之核酸佐劑對小鼠和兔子PBMC可誘發較高之增生反應；GTCGTT之核酸佐劑在雞、豬、牛、羊、馬、狗和貓等均具有促進免疫細胞活性的作用；而在豬隻生體外實驗結果以ATCGAT motif較GTCGTT motif可誘導更強的免疫細胞增生反應；人類生體外實驗發現以CpG motif為GTCGTT具有最佳免疫促進活性；而GACGTT和AACGTT也有良好的免疫促進活性，顯示不同物種最適合的CpG motif不盡相同。本技術篩選禽類專一性CpG motif為GTCGTT的核酸片段，於生體外及生體內實驗結果與文獻相似，同時成功建立以試管內評估禽類專一性核酸佐劑免疫活性之技術，可作為禽類免疫相關研究之細胞平台。

綜合實驗結果，本技術已成功篩選出一種適用於禽用疫苗之核酸佐劑，此禽用疫苗之核酸佐劑為一免疫刺激性寡核苷酸，5'端之複數個TCG重複體可促進細胞性免疫力，CpG模組鄰近兩側之禽類專一性序列具有種別專一性，CpG模組本身則為對家禽之免疫促進活性序列，而3'端4至6個鳥嘌呤序列形成之poly G結構，可增加細胞對此核酸佐劑之攝入作用，因此本實驗設計之DNA序列形成之DNA結構，具有禽類疫苗之佐劑功能。過去文獻研究顯示CpG motif之數目會影響核酸佐劑的免疫促進活性，具有多套數核酸片段之佐劑誘導PBMC增生的能力較單套數者為高；增加質體中CpG motif數目，對骨髓衍生樹狀突細胞之細胞表面抗原，如MHC II、CD40和CD86之百分比有增加之趨勢；作用於生體內可誘發較高之特異性IgG抗體力價；免疫含多套數CpG motif之疫苗可促進動物體產生高抗體、誘發細胞增生及促進免疫細胞分泌較高量的IFN- γ 和IL-4等細胞激素。而本技術所設計的核酸佐劑含特定限制酶序列，未來可建構為一含有多套數活性片段的質體，其結構穩定，不易被DNAase分解，利用大腸桿菌即可大量生產核酸佐劑，可解決目前以化學合成方法的缺點，同時降低未來運用於疫苗產業的生產成本，使其具備產業競爭力，且此質體DNA之結構特性可同時刺激雞隻產生體液性及細胞性的免疫反應，兼具加強不活化疫苗及活毒減毒疫苗的免疫特性，可彌補這兩類型疫苗的缺點，提昇疫苗之免疫效果。本技術所設計篩選出之專一性禽類核酸佐劑可為禽類疫苗新一代之候選佐劑。