

利用益生菌重組研發豬瘟疫苗

謝政橘^{*}、邱淑君、陳瑞祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 豬瘟是由豬瘟病毒 (classical swine fever virus) 所引起豬隻一種急性、亞急性、慢性、典型及非典型的疾病過程，病毒經口、鼻等黏膜感染是其主要的感染途徑。由於豬瘟的高傳染性和高致死性，嚴重威脅著產業發展，並造成養豬戶巨大的經濟損失。本計畫利用益生菌所具有的免疫佐劑、吸附黏膜、抗膽汁酸等能力，而又具備低免疫抗原性，在動物腸道有一定增殖等特點，作為表達和傳遞病毒抗原之載體 (vector)，設計將豬瘟病毒特異性 T 細胞之抗原決定位 E290 基因送入益生菌分泌表達型載體，研發益生菌口服型疫苗。本計畫之主要目的，冀望藉由疫苗的研發，降低該疾病所造成之經濟損失，本計畫已完成益生菌載體模式之建立，惟應就抗體之提升再進一步研究。

關鍵詞：豬瘟病毒、疫苗、益生菌。

緒言

豬瘟以出血和發熱為主要特徵，呈急性或慢性經過，是一種對豬危害性極大的傳染病。在世界許多國家和地區，傳統疫苗接種是控制豬瘟的主要方式。目前使用的傳統疫苗主要是免化豬瘟疫苗，屬於一種弱毒疫苗。1970年代後期，豬瘟的流行形式發生了很大變化，地區散發性流行及非典型豬瘟症狀的發生，使得豬瘟免疫屢屢失敗，因此研究和開發新型豬瘟疫苗是非常重要的。目前，在豬瘟的免疫防治中，可利用其結構蛋白E^{ms}和E2 [11]。之前研究人員研究豬瘟病毒多肽時發現豬瘟病毒非結構基因NS2-3編碼的一段多肽E290，能誘導interferon- γ (IFN- γ) 的產生[1]。在細胞毒性實驗中，CSFV特異性T細胞能溶解含有該多肽的靶細胞，該多肽含有CSFV特異的毒殺型T細胞和輔助型T細胞的抗原決定位，是研發豬瘟抗原疫苗的首選。另外口服免疫的優點是可有效刺激黏膜免疫細胞產生分泌型IgA並引起全身免疫，但口服免疫需要克服免疫保護性抗原在到達腸道黏膜之前，在胃和腸道中被降解的可能，滿足這一要求的必須是活的載體系統來傳遞完整無損的抗原成分[2,6]。而在益生菌疫苗的應用發展上，陸續已有文獻發表。例如：

研發使用於C型肝炎的治療。C型肝炎患者對C型肝炎病毒的免疫反應微弱，為誘導產生細胞免疫反應，Takei 等人[10]選定non-structural protein 3 (NS3) 蛋白質的CD4及CD8之抗原決定基，製作能表現galacto-N-biose/lacto-N-biose I-binding protein (GLBP) 及NS3的融合蛋白質之載體，移植入比菲德氏菌 (*Bifidobacterium*)，製成能表現C型肝炎病毒的部分NS3蛋白質之基改比菲德氏菌。後經由小鼠動物實驗，證實細胞免疫反應指標，如IFN- γ 或 interleukin-12 (IL-12)，有顯著意義的增加。故可利用細菌、病毒為活載體達到細胞免疫之目的，而益生菌係屬安全無毒之菌種，且能在腸道黏膜間生存增值，故為一最適的載體系統[3,5]。

材料與方法

益生菌菌株之選擇及建立

參考先前文獻[7,12]，選擇*Lactobacillus casei* 及*Lactobacillus plantarum*，及由豬隻篩選之菌株*Lactobacillus johnsonii*此三株菌株進行實驗。將菌株接種於5 mL MRS液體培養基或培養皿中，於37°C厭氧環境下培養16-24小時觀察。並利用API 50 CHL

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

Kit進行菌種的鑑定確認。

質體的選擇及建立

參考Xu等人研究[12]，選擇pPG612.1為表現載體。此載體為分泌型表現載體，含有ssUSP分泌氨基酸序列；具有Nco I和BamH I限制酶切位。

益生菌載體的架構

參考Armengol 等人研究[1]得知豬瘟病毒的E290氨基酸能誘導IFN- γ 的產生，該氨基酸含有豬瘟病毒特異的毒殺性T細胞抗原決定位和輔助性T細胞的抗原決定位。因此設計豬瘟病毒T細胞抗原決定位E290氨基酸序列插入表現載體。

(1)

5'-ATACCATGGATGAAACACAAAGTGAGGAATGAAGTAATGGTC-3' (upstream)

(2)

5'-TATGGTACCCTAGTCATCAAACAGTGGACCA TTA CTTTCATTCCT-3' (downstream)

利用yT & A選殖載體試劑組進行序列片段的複製，再利用Plasmid DNA Purification Kit進行載體的萃取，以Nco1和BamH I限制酶將E290標的基因自yT & A選殖載體切下之後次選殖至pPG612.1表現。

利用電穿孔轉形法 (electroporation) 將載體送入選擇之 *Lactobacillus casei*、*Lactobacillus plantarum*及*Lactobacillus johnsonii*菌株中。

重組益生菌表現重組蛋白之確認

將重組益生菌接種於MRS液體培養基中，37°C厭氧培養36小時。將菌液以12,000 rpm離心5分鐘，將培養液上清液利用8 kDa濾膜孔徑的透析袋透析濃縮；離心後沈澱之菌體則用500 μ L 10 mg/mL溶菌酶37°C水浴作用40分鐘，12,000 rpm離心5分鐘，棄上清液；透析濃縮物與菌體分別加入SDS-PAGE樣品緩衝液，在10% SDS-PAGE凝膠中進行電泳分析。

實驗動物模式之建立及分組

選用6-8週齡BALB/c小鼠，將小鼠分成3組，每組15隻：實驗I組每隻小鼠口服接種100 μ L 1×10^{10} CFU/mL 已重組完成之益生菌 (*Lactobacillus*)，

實驗II組口服同等劑量未重組之益生菌；實驗III組口服100 μ L PBS溶液。

選用健康、體重相近的9隻紐西蘭兔分成3組：實驗I組攻毒免化豬瘟疫苗弱毒株（每劑量含免化豬瘟病毒 $10^{2.5}$ RID₅₀以上）；實驗II組口服接種100 mL 1×10^{11} CFU/mL 重組之益生菌後，攻毒免化豬瘟疫苗弱毒株；實驗III組為正常對照組（未進行免疫和攻毒組）。免疫期程：免疫3次，每次免疫時間間隔為2週。

實驗動物血清中抗E290特異性IgG抗體之測定

採集初次免疫後第0天、4天、18天、32天、46天小鼠血液，同時採集初次免疫後第0天、4天、18天、32天、46天兔血液。以合成的E290多肽作為抗原批覆96孔ELISA反應盤，4°C反應過夜，用含有5%脫脂奶粉的PBS液37°C反應2小時，分別加入免疫小鼠及兔血清作為一抗（以未經免疫的陰性血清作為對照組），37°C反應1小時，加入1:2,000稀釋的HRP標記羊抗鼠IgG和羊抗兔IgG，37°C反應1小時。加入OPD-H₂O₂顯色劑，37°C避光顯色10分鐘，加入終止液後使用波長490 nm測定每孔之吸光值。

實驗動物腸道分泌型IgA抗體之測定

採集初次免疫後第0天、4天、18天、32天、46天小鼠之腸道，將小鼠犧牲，取幽門至盲腸部全部小腸，置於3mL PBS的培養皿中，利用PBS反覆沖洗腸腔，收集小腸沖洗液。沖洗液以2,000rpm，離心10分鐘，收集上清液，存置-20°C保存，再利用分泌型IgA檢測套組進行檢測。

實驗動物施打免化免化豬瘟疫苗弱毒之測定

實驗II組口服免疫重組益生菌兔於第三次口服免疫後第14天與實驗I組家兔一起攻豬瘟免化弱毒疫苗，每隻兔經耳靜脈注射2 mL 免化豬瘟疫苗。攻毒後，三組兔同步每12小時測量體溫一次，連續測四天，所得數據進行比較分析。

特異性毒殺型細胞活性之測定

3次免疫後第8天的小鼠，無菌條件下取下脾臟，分離脾細胞製備單細胞懸液。將T細胞表位多肽

KHKVRNEVMVHWFDD作為體外刺激原，與正常小鼠的脾細胞培養於37°C，5%二氧化碳培養箱中2小時。加入Mitomycin至濃度為40 mg/L，培養2小時後用無菌PBS清洗細胞四次。重新加入含10%血清的RPMI 1640培養液中，調整細胞濃度為 1×10^7 cell/mL。免疫小鼠的脾細胞和刺激細胞各1 mL加入六孔培養盤，再加入2 mL RPMI 1640培養液。加入Recombinant Human Interleukin-2 (rhIL-2)至濃度為100 u/mL，繼續培養五天。收集細胞，調整細胞濃度至 1×10^7 cell/mL，即為效應細胞。將培養的老鼠細胞大細胞株815細胞加入25 ug/mL E290多肽培養於37°C，5%二氧化碳培養箱中2小時。以乳酸脫氫酶 (LDH) 檢測毒殺型細胞的毒殺活性。

實驗數據處理和統計方法

數據全部以「平均值±標準差」(Mean±SEM, standard error of mean) 的形式來表示。以魏克森符號等級檢定法 (Wilcoxon signed-rank test) 比較兩組平均數值間是否有差異； $P < 0.05$ 表示在統計學上有顯著意義。

結果

重組益生菌之確認

將菌株接種於5 mL MRS液體培養基或培養皿中，於37°C下厭氧環境下培養16-24小時觀察。將菌株以接種環塗抹固定於載玻片上進行革蘭氏染色，可發現為呈現藍紫色的桿菌（革蘭氏陽性）。利用API 50 CHL Kit進行菌種的鑑定確認。取單一純菌落，在MRS培養基上37°C厭氧環境下培養24小時。將套組培養盒中加入約10 mL的無菌水，使盒中保持濕度，將API 50 CH strip放入盒中。進一步調配細菌懸浮液及接種。在需氧環境下37°C培養48小時。在24小時及48小時各作一次判讀。分別鑑定為*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus plantarum*及*Lactobacillus johnsonii*菌種。

利用電穿孔轉形法將載體送入選擇之*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus plantarum*及*Lactobacillus johnsonii*菌株中。僅挑選出*Lactobacillus casei*重組益生菌單一菌落。而重組益

生菌之確認結果顯示約有70 kDa蛋白質產生 (data not shown)，分子大小與理論值相符合。

實驗動物血清中抗E290特異性IgG抗體之測定

分別於初次免疫後第0天、4天、18天、32天、46天採集小鼠血液，進而分析血清中抗E290特異性IgG抗體，由實驗結果發現18天、32天、46天後有較高的IgG抗體表現，但沒有呈現統計上的顯著差異 (圖1)。

分別於初次免疫後第0天、4天、18天、32天、46天採集兔血液，進而分析血清中抗E290特異性IgG抗體，由實驗結果發現18天、32天、46天後有較高的IgG抗體表現，但沒有呈現統計上的顯著差異 (圖2)。

實驗動物腸道sIgA抗體之測定

另外收集初次免疫後第0天、4天、18天、32天、46天小鼠之腸道沖洗液，保存於-70°C，由實驗結果發現18天、32天、46天後有較高的sIgA抗體表現，但沒有呈現統計上的顯著差異 (圖3)。

實驗動物施打兔化豬瘟疫苗弱毒之測定

對照組 (實驗III組) 兔的體溫保持恆定；(實驗I組) 攻毒兔化豬瘟疫苗弱毒株兔的體溫上升比較明顯，平均最高值接近41.5°C，體溫漲幅較對照組大；口服免疫重組益生菌 (實驗II組) 兔的體溫也有上升，平均最高值接近41.3°C，與攻毒兔化豬瘟疫苗弱毒株組未有統計上顯著的差異 (圖4)。

特異性毒殺型細胞活性之測定

以乳酸脫氫酶檢測毒殺型細胞的毒殺活性。分別利用不同的效應細胞/靶細胞比12.5:1~50:1時，誘導小鼠產生針對豬瘟病毒T細胞抗原決定位的P815細胞為靶細胞的特異性毒殺型細胞的毒殺活性，其結果顯示未有顯著的差異 (圖5)。顯示出本實驗重組益生菌免疫未能有效誘發小鼠產生針對豬瘟病毒毒殺型細胞抗原決定位的特異性毒殺效應。

討論

本次選擇之三株益生菌菌株分別為*Lactobacillus*

*casei*及*Lactobacillus plantarum*，及由豬隻篩選之菌株*Lactobacillus johnsonii*。僅有*Lactobacillus casei*有挑選出重組之菌株。若考慮益生菌效果，應由豬隻篩選之*Lactobacillus johnsonii*菌株效果可能會較佳，唯本次實驗未能從中順利挑選出重組菌株，可能需再嘗試不同之轉形條件或方法。本實驗已建立益生菌載體重組織模式，未來實驗中可選擇不同之益生菌株或選擇更有效表現蛋白質片段之載體系統，俾利於抗體之表現。

乳酸菌是被公認為安全的菌種 (generally regard as safe, GRAS) 菌，其自身及其代謝產物對動物體有營養和免疫功能，再加上其攜帶的目的蛋白的專一性作用，集多種功能於一體，這就是目前提出多功能製劑之研發，因此乳酸菌食品級載體的研究與開發具有相當大的潛力和意義。

乳酸菌亦是一種良好的疫苗載體，用乳酸菌作為疫苗載體不僅可使口服的乳酸菌刺激產生粘膜及全身免疫反應，可提高細胞激素IL-12、IFN- γ 、TNF- α 分泌[4]，而且可將特異性抗原分子攜帶並分泌到腸道，同時也可穿過腸壁進入粘膜下層，進而引起細胞免疫和體液免疫 [8, 9]。且隨著研究水準的提高，通過對益生菌進一步改造、表達調控的不斷深入和對免疫學，尤其是粘膜免疫機制的研究，將會得到更優良的益生菌基因工程菌。

益生菌重組疫苗係屬基因改造之範疇，於未來之開發研究中，應考量更多安全性及風險之評估。透過載體表現系統改良之益生菌，將會面臨基因改造食品的問題，由於基因改造 (genetic modification) 一詞在不同國家有不同之定義，因此各國家對於基因改造食品之規範亦不盡相同，這將使同一個基因改造產品，在不同國家中卻有不同的命運。例如美國食品與藥物管理局 (FDA) 所核可的發酵菌株MCO10，是由*L. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*所篩選出的突變株，其相關發酵產品在美國已成功上市，但是依歐盟規範則禁止此商品在歐洲地區販售。且目前國內對於基因改造藥品需依基因改造動物用生物藥品新藥試驗之嚴格規範，需經中央主管機關同意後，始得進行；而相關試驗，應於基改生物藥品試驗機構及基改生物藥品田間試驗機構進行。因此，國際上對於基因改造生物管理規範之調和，也是未來各國之間重要之議題。

謝誌

本研究承蒙行政院農業委員會家畜衛生試驗所計畫補助 (計畫編號：103農科-10.1.3-衛H3)，特此致謝

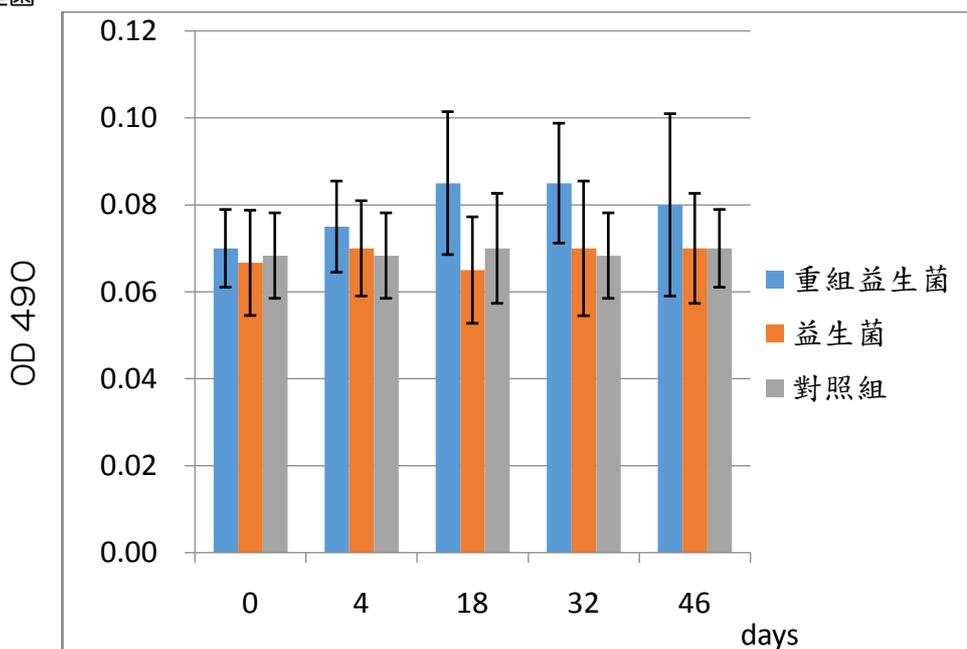


圖1、Anti-E290 IgG level in the serum of mice orally immunized by recombinant *Lactobacillus*.

利用益生菌重組研發豬瘟疫苗

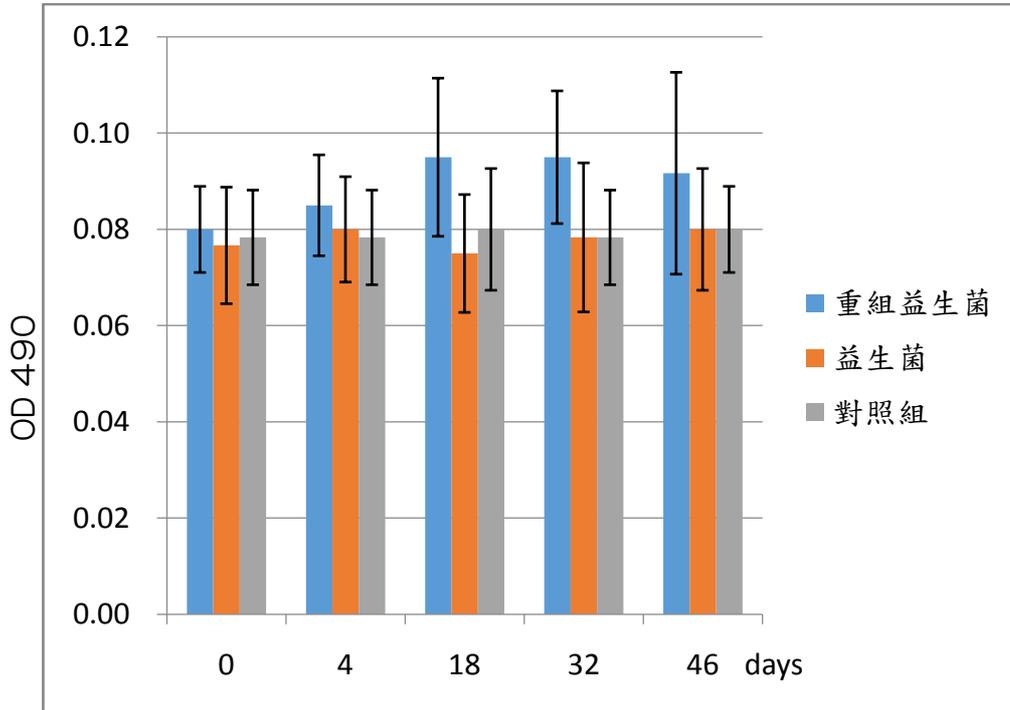


圖2、Anti-E290 IgG level in the serum of rabbits orally immunized by recombinant *Lactobacillus*.

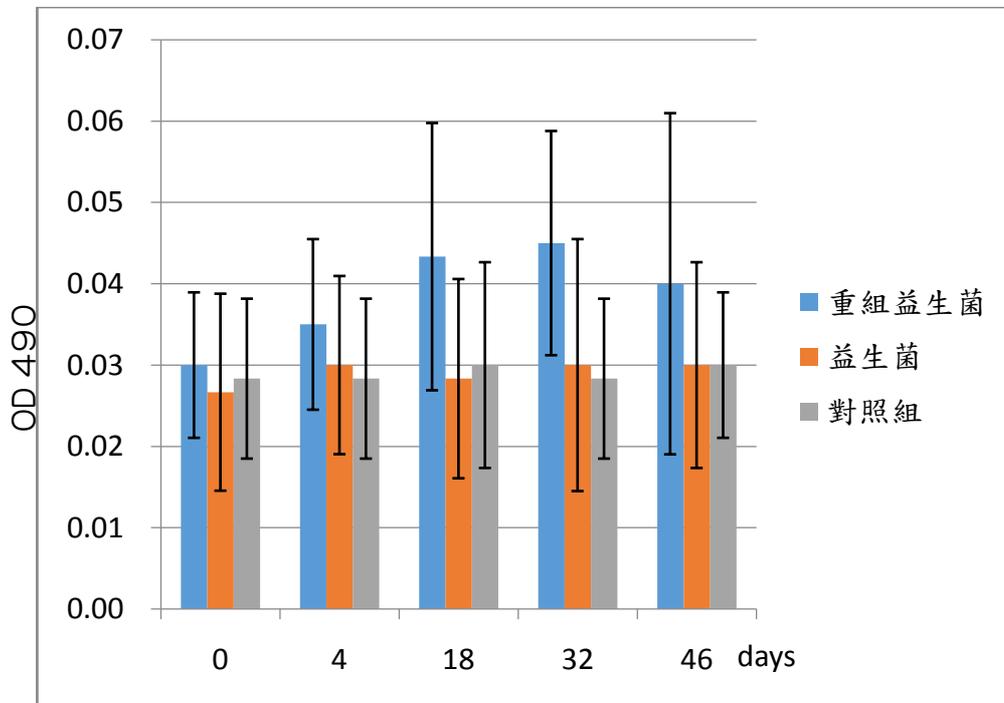


圖3、Anti-E290 specific sIgA level in the intestine of immunized mice.

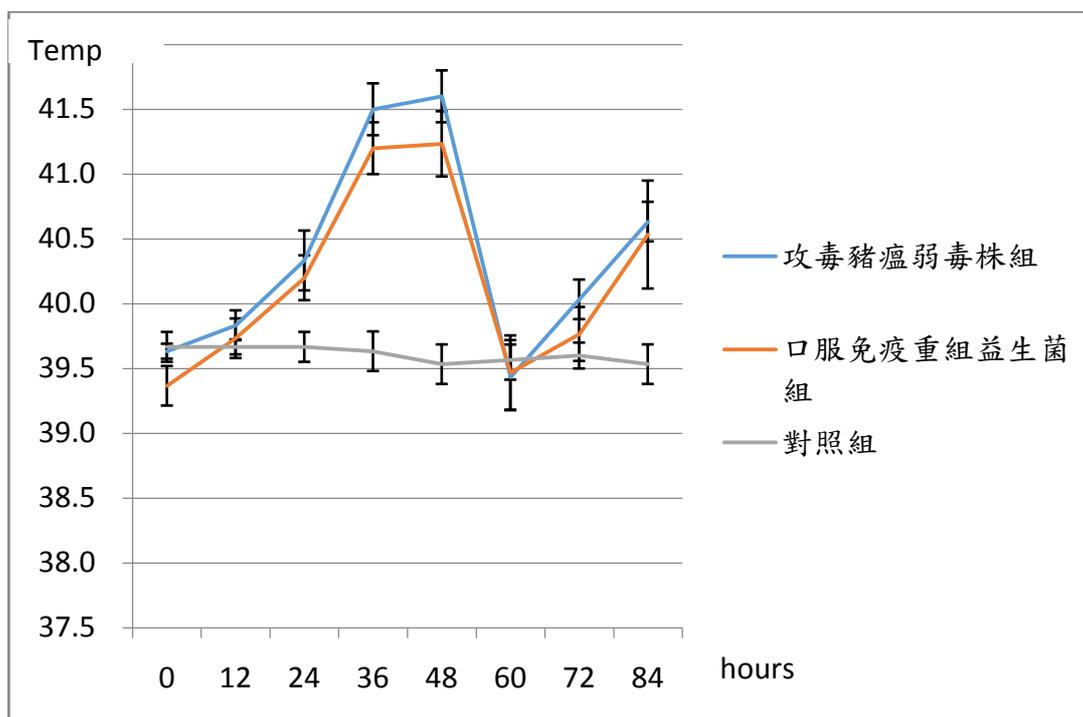


圖4、The change of body temperature of rabbits attacked with CSFV.

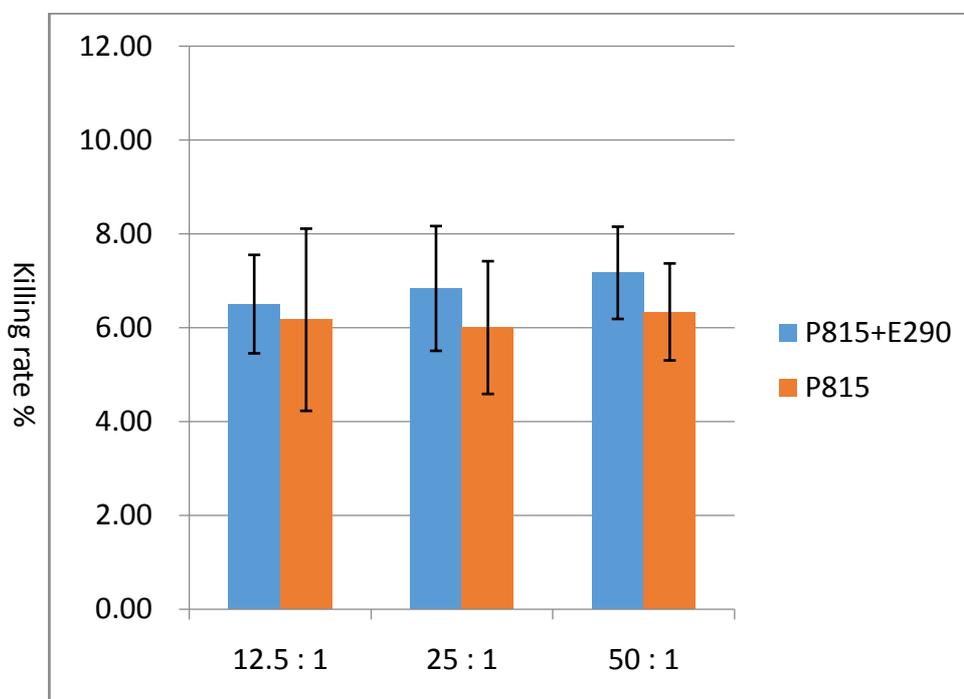


圖5、The killing rate of CLT on P815 cells detected by LDH assay.

參考文獻

1. Armengol E, Wiesmüller KH, Wienhold D, Büttner M, Pfaff E, Jung G, Saalmüller A. Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol* 83: 551-60, 2002.
2. Bemark M, Boysen P, Lycke NY. Induction of gut IgA production through T cell-dependent and T cell-independent pathways. *Ann N Y Acad Sci* 1247: 97-116, 2012.
3. Bermudez-Humaran LG, Aubry C, Motta JP, Deraison C, Steidler L, Vergnolle N, Chatel JM, Langella P. Engineering lactococci and lactobacilli for human health. *Curr Opin Microbiol* 16: 278-83, 2013.
4. Dotan I, Rachmilewitz D. Probiotics in inflammatory bowel disease: possible mechanisms of action. *Curr Opin Gastroenterol* 21: 426-30, 2005.
5. LeBlanc JG, Aubry C, Cortes-Perez NG, de Moreno de LeBlanc A, Vergnolle N, Langella P, Azevedo V, Chatel JM, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG. Mucosal targeting of therapeutic molecules using genetically modified lactic acid bacteria: an update. *FEMS Microbiol Lett* 344: 1-9, 2013.
6. Lycke NY, Bemark M. The role of Peyer's patches in synchronizing gut IgA responses. *Front Immunol* 3: 329, 2012.
7. Mathiesen G, Sveen A, Piard JC, Axelsson L, Eijsink VG. Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides. *J Appl Microbiol* 105: 215-26, 2008.
8. Mohamadzadeh M. Induction of protective immunity against microbial challenge by targeting antigens expressed by probiotic bacteria to mucosal dendritic cells. *Curr HIV Res* 2010. 8: 323-9, 2010.
9. Nikoopour E, Singh B. Reciprocity in microbiome and immune system interactions and its implications in disease and health. *Inflamm Allergy Drug Targets* 13: 94-104, 2014.
10. Takei S, Omoto C, Kitagawa K, Morishita N, Katayama T, Shigemura K, Fujisawa M, Kawabata M, Hotta H, Shirakawa T. Oral administration of genetically modified *Bifidobacterium* displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. *Vaccine* 32: 3066-74, 2014.
11. van Gennip HG, Bouma A, van Rijn PA, Widjoatmodjo MN, Moormann RJ. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of E(rns) or E2 of CSFV. *Vaccine* 20: 1544-56, 2002.
12. Xu Y, Li Y. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. *Immunology* 124: 68-75, 2008.

Efficacy testing of Recombinant Probiotics Expressing Subunit Vaccine against Classical Swine Fever Virus

CC Hsieh^{*}, SJ Chiu, RS Chen

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Classical swine fever virus (CSFV), a member of the genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae*, is a small, enveloped, single- stranded RNA virus. Under the natural conditions, pigs are the only susceptible species, and the virus can cause acute, subacute, or chronic disease. Enormous economic losses to pig industries have been caused by CSFV. Therefore, the development of an efficient vaccine against CSFV is of practical significance. Probiotics possess many properties that make them attractive candidates as antigens carriers when applied in conjunction with compounds with pharmaceutical interest, to the mucosae of host animals; in particular, this includes immunomodulators and vaccines. Probiotic organisms are well known for having beneficial effects on the health of humans and animals. In particular, lactobacilli can survive and colonize the intestinal tract and, furthermore, induce nonspecific immune adjuvant effects. The potential of live recombinant probiotics to deliver heterologous antigens to the immune system has been investigated, suggesting the feasibility of using probiotics as a low risk delivery system for oral vaccines. The purpose of the study is to develop a recombinant probiotics carrying CSFV antigens to induce protective immune responses to CSFV infection. We have developed an effective vaccine delivery system for this disease; further studies are in progress aimed at refining and improving our probiotic delivery system for vaccinating swine against CSFV.

Keywords: *Classical swine fever virus, vaccine, probiotics.*