

## 動物用活毒、活菌苗之保存試驗

黃文徹 劉義雄 劉敏主  
周懋森 蘇杰夫 陳忠松

### 台灣省家畜衛生試驗所

測定動物用生物藥品活毒及活菌疫苗的安定性，結果顯示目前在本省市售的該類藥品中，大部份疫苗的保存性良好，其中以犬瘟熱疫苗最為穩定。乾燥兔化豬痘疫苗則在有效期間內有  $\frac{1}{4}$  的產品在一劑量稀釋為  $\frac{1}{100}$  劑量之後仍能有效耐過 10,000 MLD 豬痘毒 ALD 株的攻擊。而豬丹毒活菌苗在保存一段時間後，其菌數下降率甚大，顯示該菌苗媒劑配方的改良甚為重要。

任何品質優良的疫苗不但在製造完成時具有好的效力，而且在保存有效期間內其力價仍能維持某一水準之上。許多疫苗在開發後都極為注重安定性試驗，一般安定性試驗常包括所謂耐熱性試驗（37℃ 存放一段時間）和 4℃ 冰箱內保存（1, 3）。這一類安定性試驗常和疫苗選用媒劑有著密切的關連（2, 4），如果媒劑選用不當，極容易造成疫苗品質的降低。當然容器的品質或其他因素也可能使疫苗效力劇降（如真空度不易保持）。

由於本省疫苗有進口或本國自製者，而幾乎各廠所用的保護媒劑也不一樣，因此各品牌在製造之初雖送國家檢定合格，但在存放一段時間後力價可能有變動。

至於何種廠牌或何種疫苗在安定試驗中變動最大，實有做一比較測定，並做為政府在監督市售疫苗品質的角色中，所能容許的最低標準規定的參考。

### 試驗材料與方法

#### 1. 供試疫苗種類：

包括兔化豬痘疫苗（LPC）、新城雞痘活毒疫苗（ND）、豬日本腦炎活毒疫苗（JE）、豬傳染性胃腸炎活毒疫苗（TGE）、犬瘟熱活毒疫苗（CD）、雞痘活毒疫苗（

POX）及豬丹毒活菌苗。

2. 細胞：初代的 Hamster Kidney 細胞及初代豬睪丸細胞（ST Cells）。

3. 雞胚胎：選用 SPF 或無新城雞痘抗體的雞胚胎（9 日齡）。

#### 4. 試驗雞和試驗豬：

選用 1~1.5 公斤重無新城雞痘抗體的雞及 15~18 公斤重無豬痘抗體的健康豬。

#### 5. 攻擊用毒株：

包括豬痘 ALD 強毒株和 ND 佐藤，前者攻毒力為 10,000 MLD/劑量，後者毒力分別為 1,000, 10,000 或 100,000 MLD/劑量。

6. 豬丹毒菌培養基及稀釋液：取 4 克 Tryptic Soyagar 溶于 100 ml 蒸餾水之比例，先加熱至 100℃ 使完全溶解後，再經高壓滅菌，滅菌後不使凝固，放置 45~50℃ 保持定溫後，加入無菌馬血清 10%，並置于 45~50℃ 保溫備用。稀釋液則以 3g Tryptic Soy Broth 加 100 ml 水之比例，經高壓滅菌後，放 4~10℃ 備用。

#### 7. 試驗方法：

(1) LPC 疫苗安定性測定：

任選 8 種存放於 4℃ 之不同廠牌的 LPC 初檢合格疫苗，並就其存放不同月份後，

取出稀釋（5%葡萄糖稀釋液）為1/20，1/50及1/100劑量。各稀釋階分別接種於無豬瘟抗體的豬隻，每頭接種2cc（IM），並於接種後10天，連同陰性對照者，各以每劑（2cc）含ALD強毒10,000MLD之毒力，攻擊（IM）。攻擊後觀察14天，斃死者剖檢有無豬瘟病變，存活者須無中度以上之臨床反應（41℃以上體溫）。如1/50劑量組的豬無中度臨床反應或斃死，而1/100劑量組的豬斃死或中度反應以上，則該批疫苗判為1/50劑量以上，若1/100劑量組的豬健存則判為1/100劑量以上，並類推之。

(2) 新城雞瘟活毒疫苗安定性測定：

① 病毒含量的測定：疫苗存放4℃及37℃一段時間後，再以PBS為稀釋液將疫苗先稀釋為一劑量後，然後以十進法自 $10^{-1}$ 稀釋至 $10^{-8}$ ，各階稀釋液分別接種於9日齡雞胚胎，每枚接種0.2ml于尿囊腔內，繼續孵化，觀察7日，中止蛋即抽存置放4℃保存，觀察日止時，各抽取尿囊液作血球凝集反應，呈凝集者為陽性，並計算其 $EID_{50}$ /劑量。

② ND疫苗效力的測定：數種不同廠牌疫苗存放4℃於不同保存期間後取出，並稀釋成1劑量，分別接種於無ND抗體雞（口服或點鼻，依各廠使用法），經14天後，再以 $10^3$ MLD的ND強毒（佐藤）攻毒（IM），在14天觀察中，記錄ND斃死雞，並計算其耐過率。

(3) JE和TGE疫苗力價的安定性測定：

利用初代HK及ST細胞於長成單層細胞時，再將JE和TGE病毒以MEM為稀釋液，分別稀釋成 $10^{-1}$ 至 $10^{-8}$ 後接種於細胞上。每天觀察CPE至7天，並分別計算其 $TCID_{50}$ /劑量。

(4) CD疫苗力價的安定性測定：

將數種不同廠牌的疫苗，於存放4℃不同時間後，分別取出稀釋成 $10^{-1}$ 至 $10^{-8}$ ，並將各稀釋階各取0.1ml接種於9日齡

雞胚胎的尿膜上，並繼續孵化5天，然後敲開蛋殼，取出尿膜，檢查有無CD所引起的浮腫性黃色樣斑狀病變，有病變者表示感染病毒，並計算其 $EID_{50}$ /劑量。

(5) 雞痘活毒疫苗的安定性測定：

將數種不同廠牌的疫苗，於存放4℃不同時間後，依法測定，並於接種後5天檢查Pock的病變，以計算 $EID_{50}$ /劑量。

(6) 豬丹毒活菌苗之菌數測定：

取不同廠牌於保存不同時間後的該類菌苗，先以Tryptic Soy Broth稀釋為1劑量/ml，再以十進法稀釋成 $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ ，各稀釋階取1ml分注於直徑約10公分的培養皿，再注入12~15ml含馬血清之Tryptic Soy Agar培養基，經充分混合均勻後先置室溫凝固，再倒置培養皿放37℃培養18~24小時，然後計算每劑菌苗中所含之菌數。

## 試驗結果

1. LPC疫苗安定性測定：

由於國家檢定標準要求LPC疫苗檢定合格標準須為具有1/100劑量以上的豬隻保護效力，因此選用8種達1/100劑量以上之疫苗，而後在不同保存月數之後，分別測定其尚存力價，結果如圖1所示。如以1/100劑量為標準，則約1/4的疫苗可維持其效力，而3/4的疫苗則不能達到。如以1/50劑量為標準則約1/2的疫苗可達到效果，另1/2則不能維持此標準。

2. ND活毒疫苗安定性測定：

將ND活毒疫苗經4℃及37℃保存一段時間後，分別測定其每劑量 $EID_{50}$ 力價的變化及攻毒後效力的變化，結果如圖2及表1所示。存放4℃一年者，力價仍能維持在 $10^{6.0}$  $EID_{50}$ /劑量以上，而其保護雞隻耐過1000MLD強毒攻擊的比率亦在75%以上。而放置在37℃，一週至三週，除了有二批在第三週低於 $10^6$  $EID_{50}$ /劑量外，其餘各批都能耐過37℃的耐熱試驗。

3. JE和TGE疫苗安定性測定：

利用HK及TS細胞來測定該二類疫苗

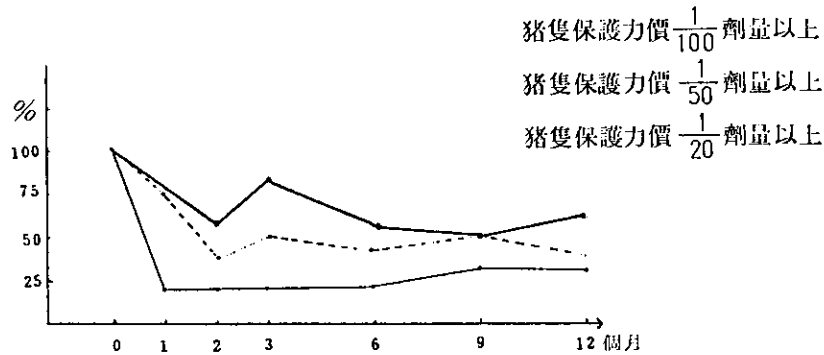


圖1 LPC 4 °C 保存下力價變化

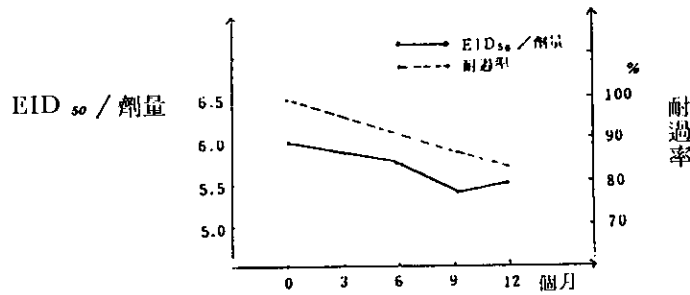


圖2 ND活毒疫苗保存於4 °C之病毒力價及強毒攻擊後耐過率之變化

表1 乾燥新城雞瘟活毒存放37 °C之安定性試驗比較

疫苗別	原定有效保存期間	37 °C 存放期間後之病毒力價 (EID <sub>50</sub> / 劑量)			
		0 週	1 週	2 週	3 週
A	一年	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>5.3</sup>	10 <sup>5.2</sup>	10 <sup>5.0</sup>
B	一年	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>5.5</sup>	10 <sup>5.3</sup>	< 10 <sup>5.0</sup>
C	一年半	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>5.8</sup>	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>5.5</sup>
D	一年半	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>5.6</sup>	10 <sup>5.8</sup>
E	二年半	10 <sup>6.5</sup>	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>5.8</sup>	10 <sup>5.5</sup>
F	二年半	10 <sup>6.3</sup>	10 <sup>5.5</sup>	10 <sup>5.0</sup>	< 10 <sup>5.0</sup>

置放 4 °C 不同月數後，其病毒含量的變化如圖 3 所示，結果顯示該二種疫苗中的 JE 疫苗比較接近  $10^5$  TCID<sub>50</sub> / 劑量的初檢規定，因之 JE 疫苗可從提高疫苗的原有病毒含量（如 ND 疫苗之大於  $10^{6.0}$  以上為多），

或再改進媒劑的配方，使力價變化更小（如 4. CD 類疫苗的穩定性）。而 TGE 疫苗因初檢規定為  $10^4$  TCID<sub>50</sub> / 劑量以上，故現有劑量力價並無問題。

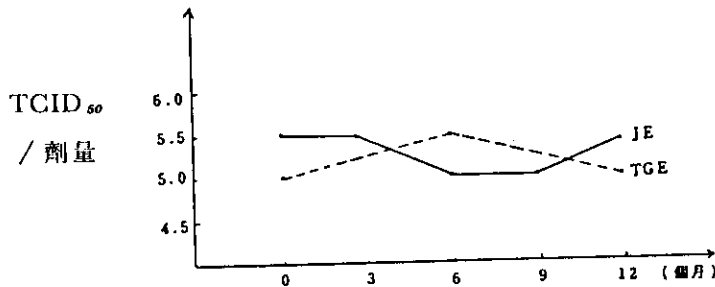


圖 3 豬日本腦炎 (JE) 及傳染性胃腸炎 (TGE) 疫苗存放 4 °C 保存之力價變化

#### 4. CD 疫苗安定性測定：

犬瘟熱疫苗病毒含有量依據檢定標準之規定，規定為  $10^{3.6}$  EID<sub>50</sub> / 劑量以上，該試驗中結果，如圖 4 所示，雖然各批的平均

力價皆不高（略低於  $10^{4.0}$ ），但可能是媒劑本身或其他因素的配合良好，使得保存至 24 個月，各廠牌的平均病毒含量並無異動。

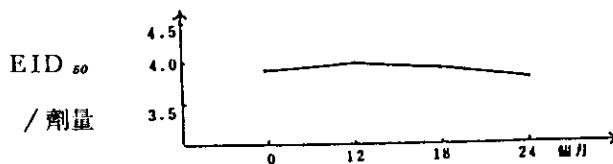


圖 4 犬瘟熱乾燥疫苗存放 4 °C 保存之力價變化

#### 5. 雞痘活毒疫苗安定性測定：

雞痘活毒疫苗依據檢定標準之規定。須達  $10^{3.0}$  EID<sub>50</sub> / 劑量以上，而經查不同廠牌該類疫苗於保存不同月數後，一般而言該疫苗安定性甚良好（圖 5），僅在第 12

個月失效期時略低於  $10^{3.0}$  力價，因此該類疫苗若不願改變媒劑配方，只要稍為提高病毒含有量即可。

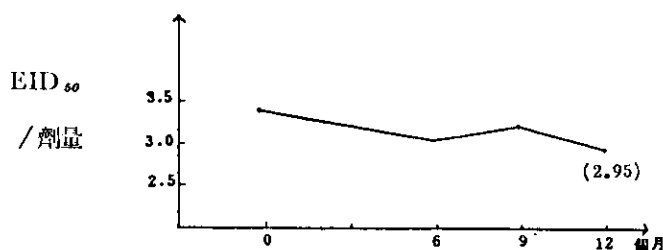


圖5 雞痘乾燥疫苗存放4℃保存之力價變化

## 6. 豬丹毒活菌苗安定性測定：

該活菌苗曾經比較數家8批的保存性，其結果如表3所示，雖然依據檢定標準之規定，菌數須達 $1 \times 10^8$ 個菌數/劑量以上，

而該表所顯示似乎僅2批在保存第12個月(即失效的最後一個月)低於該標準，但由於菌數滑落比率甚大，顯示該類菌苗應從媒劑配方加以改進，才能穩定其安定性。

表3 豬丹毒活菌於4℃保存下菌數的變化

疫苗別及批號別		4℃保存月數			菌數存活比率
		0	6	12	
A	1	$3.5 \times 10^8$ *	$3.3 \times 10^8$	—	94.2 %
	2	$4.6 \times 10^8$	—	$6 \times 10^6$	1.3 %
B	1	$> 5.0 \times 10^8$	$> 5.0 \times 10^8$	—	100 %
	2	$3.0 \times 10^8$	—	$1.4 \times 10^8$	46.7 %
C	1	$> 5.0 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	—	24 %
	2	$3.1 \times 10^8$	—	$3.3 \times 10^8$	1.1 %
D	1	$4.3 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$	—	100 %
	2	$2.0 \times 10^8$	—	$2.6 \times 10^8$	100 %

\* 單位為個/ml

## 討 論

動物疫苗，尤以活化疫苗類在一般狀態(4℃)保存下，常會隨著時間增長而使其疫苗力價下降，如果下降速度快，則生產廠商應自行縮短藥品有效期，當然有效期太短的疫苗在市場上的競爭力會減弱。

自從政府推行GMP制度後，各廠商已漸漸在建立自家的品管作業。但政府檢驗機關和各級主管機關亦須瞭解市場上藥品品質狀態。因此此次分析不同廠牌的疫苗，可以發現到有些疫苗穩定性十分良好，少數的疫苗應從媒劑配方力加改進，尤其是豬丹毒活菌苗。豬瘟兔化疫苗嚴格而言，其力價下降應屬正常，但若

能維持 1 / 100 單位劑量即有效的初檢標準更好，而努力之方向不外是提升原有的力價，或改良更穩定的媒劑使保存性更佳。

### 參考文獻

1. Lin M.Y., Preparation and Evaluation of Mycoplasma Gallisepticum Bacterin and Live Vaccines. Journal of The Chinese Society of Veterinary Science Vol. 12 No. 4 311-321 1986.
2. Liou, p.p., Huang, T.S.: Studies on the Lyophilization of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV): Taiwan PRIAH Exp. Rep., 13:37-43, 1976.
3. Yang, Y.H. Lin T.F., Studies on Living Tissue Culture New Castle Disease Virus Vaccine II. Preservation Immunity Period and Contact Control Test. Taiwan PRIAH Exp. Rep., 12: 73-78, 1975.
4. Yang, Y.H., Liu, Y.S., Chen, Y.C. Hwang W.C., Lin C.F., Lin C.Y., Lin T.C., Kiang, L.S., Chan, I.P. and Chen, S. S. Improvement Studies on the Media for the Lapinized Hog Cholera Vaccine; Taiwan PRIAH Exp. Rep., 10, 15-30, 1973.

## Stability Tests on Animal Live Vaccines

W.C. Hwang, Y.S. Liu, M.C. Liu, M.S. Chow,  
J.F. Su., C.S. Chen

Taiwan Provincial Research Institute for animal Health.

### Summary

The stability tests were applied on animal live virus and bacterial vaccines. The results showed that most of live vaccines could keep quite a good stability when stored in good condition, especially Canine distemper vaccine. But only one-fourth of LPC vaccines could maintain 1/100 effective dose before expire date and Swine Erysipelas bacterin due to live bacterial number decreased rather rapidly. These suggest vaccines' preservative media prescription might need be improved urgently.