

B 型肝炎疫苗效價試驗用標準品之製備

林嘉伯 陳作琳 楊若英 陳金榮 謝榮添

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本研究報告係敘述本實驗室—行政院衛生署藥物食品檢驗局—第一次標定出批號 028A 血漿 B 型肝炎疫苗效價試驗用國家標準品之結果。本項標定實驗主要是以世界衛生組織所提供之 WHO Lot 96932 血漿 B 型肝炎疫苗標準品為試驗對照標準品,分別以天竺鼠和小鼠為實驗動物,採用通常實施 B 型肝炎疫苗效價實驗之免疫方法,以平行線定量法計算 028A 血漿 B 型肝炎疫苗對 WHO Lot 96932 血漿 B 型肝炎疫苗標準品之相對效價。由天竺鼠組和小鼠組之結果顯示本 028A 批血漿 B 型肝炎疫苗對 WHO Lot 96932 標準品之相對效價分別為 1.04 ± 0.12 和 1.09 ± 0.39 ,亦即 028A 批 B 型肝炎疫苗對 WHO Lot 96932 B 型肝炎疫苗標準品之相對效價極為接近 1.00,而由各項統計學之結果更顯示了 028A 批 B 型肝炎疫苗足以當作本局今後進行各項 B 型肝炎疫苗封緘檢驗時之 B 型肝炎疫苗效價試驗用對照標準品。

前 言

B 型肝炎,是當今人類公共衛生上之一大重要課題⁽¹⁾。過去有許多的研究結果顯示各國被感染而罹患 B 型肝炎的人數正逐年增加,而在近年來隨著生物科技一天天的進步,我們對於 B 型肝炎病毒的了解也更加清楚⁽²⁾。對於此一疾病之防治,目前仍以接種 B 型肝炎疫苗為最有效的方法^(2,4)。而事實上,諸先進國家都幾乎各自訂有適用於自己國人的 B 型肝炎防疫政策,而在 1988 年所發表的國際間 B 型肝炎防疫事物要點(The International Task Force on Hepatitis B Immunization)⁽⁵⁾更提供了各國作為防範 B 型肝炎時制定政策的重要參考。在這些防疫政策中,施打 B 型肝炎疫苗即為最主要的一部份⁽⁶⁾。因此,B 型肝炎疫苗的供應即成為整個防疫政策中最重要的工作了。

我國是屬於世界上 B 型肝炎疫情較為嚴重的地區^(7,8),B 型肝炎的防治應是刻不容緩的重要課題。為了有效遏阻 B 型肝炎的猖獗,衛生單位每年都須準備大量的 B 型肝炎疫苗,以應民衆需要。另一方面,目前我國是世界上少數實施

疫苗需逐批通過封緘檢驗後始准予上市的國家,因此,身為負責疫苗封緘檢驗的衛生署藥物食品檢驗局,在配合國家施行中之任何一項防疫政策的同時,一定得作好疫苗銷售前的把關工作。而在執行疫苗之封緘檢驗時,最重要的工具,首推各該項疫苗的對照標準品,所以,製備 B 型肝炎疫苗效價試驗用標準品,在配合國家 B 型肝炎防疫政策之執行時,即成為本局非常重要的業務之一了。本研究報告係敘述我國第一次標定 B 型肝炎疫苗效價試驗用國家標準品之結果。

材料與方法

一、實驗動物之選擇及其分組

本實驗所需之實驗動物皆購自台大醫學院動物供應中心,並於攜回本局動物室觀察 3—5 天後,選擇健康者接受本項實驗。於試驗期間,皆提供充分之水及飼料(Purina Mills, Inc.)由試驗動物自由攝取。動物室之溫度控制在 22-25℃,濕度則約為 70%。每天光照及黑暗期各 12 小時。實驗期間各實驗組之動物每星期記錄體重 2—3 次。

本實驗共選用了天竺鼠(Hartley strain)及小鼠(Balb/c strain)等二種實驗動物。天竺鼠部份係選擇雌性體重在 300-350 克之間,分實驗組及標準品組兩部份,每部份再分為四組,每組十隻動物,並以不同濃度之疫苗免疫之;另外一組動物不予注射而為對照組,總共為九組。小鼠則選擇約五週齡之雌性,體重在 16-18 克之間,依同樣方式亦分為九組。

二、樣品之選擇及實驗設計

由於生物製劑之一般相關規定,稍有別於其他之藥品,尤其是疫苗,在保存方式及有效之保存期限方面規定較為嚴格,所以樣品的選擇比較嚴謹。來源方面因為國內僅有唯一的一家血漿 B 型肝炎疫苗製造廠,因而本次實驗在選擇適當之樣品時,即以當時本國生產之最新且製造過程各項品管資料齊全完整者為對象,而選定了保生製藥股份有限公司之 028A 批血漿 B 型肝炎疫苗為國家 B 型肝炎疫苗標準品之標定樣品。

所有實驗用化學藥品皆為試藥級、同時並選用世界衛生組織(WHO)所提供之批號 96932 血漿 B 型肝炎疫苗標準品作為本實驗之標準品。

(一)第一部份實驗

將批號 96932 B 型肝炎疫苗標準品與 028A 批 B 型肝炎疫苗以氫氧化鋁溶液(0.5 mg Al (OH)₃/ml normal saline)為稀釋液,依二倍稀釋法(2X serial dilutions)將所有之疫苗樣品稀釋成四種濃度:1.25 mcg/ml, 2.5 mcg/ml, 5 mcg/ml, 及 10 mcg/ml 後,分別注射入天竺鼠腹腔內,連同對照

組總共九組。實驗動物經 30 天之免疫期後,由心臟採血(Heart puncture),經離心取得血清(Serum),再以 Ausab-RIA(Abbott Lab)測試套組,依放射免疫分析法(Radio-immunoassay, RIA)重複三次測定其 B 型肝炎表面抗原(S antigen)之抗體價(Anti-HBs anti-body titer)^(9,10)。

(二)第二部份實驗

將批號 96932 B 型肝炎疫苗標準品與 028A 批 B 型肝炎疫苗以同第一部份實驗相同之稀釋液,依四倍稀釋法將所有之疫苗樣品稀釋成四種濃度:5 mcg/ml, 1.25 mcg/ml, 0.31 mcg/ml, 及 0.08 mcg/ml 後,分別注射入小鼠腹腔內,連同對照組總共九組實驗動物,經 30 天之免疫期後,由頸動脈採血,經離心取得血清後,先以等體積血清稀釋液(1% Bovine serum albumin in 10mM phosphate buffer, pH 6.8)加以稀釋,以後如同第一部份實驗測定其 B 型肝炎表面抗原之抗體價。

三、統計方法

經由 RIA 所測得之數據(cpm of ¹²⁵I),取其對數對疫苗之稀釋數作圖,並以平行線定量法(Parallel line assay method)或以 χ^2 值判定該次之分析結果(Assay result)是否有效^(11,12),並對有效之試驗計算其相對效價(Relative potency)。

結 果

本實驗係於一年中之不同季節總共進行 15 次試驗,其中包括天竺鼠組五次,小鼠組十次,所有實驗期間試驗動物皆未死亡。經由相對效價計

表一 028A 批血漿 B 型肝炎疫苗以天竺鼠為實驗動物時所標得之相對效價
Table 1. Relative potencies of 028A plasma-derived hepatitis B vaccine using Hartley strain guinea pigs as the test animals¹

Experiment	Relative potency	No. of test	95 % confidence limit
1	0.92	180	0.48 - 1.77
2	0.98	180	0.22 - 4.32
3	1.08	180	0.23 - 5.04
4	1.18	180	0.31 - 4.46
5	1.05	240	0.20 - 5.50
Average	1.04 ± 0.12	960	0.29 - 4.22

¹ The values of relative potency of 028A plasma-derived hepatitis B vaccine obtained from each experiment was calculated with the WHO Lot 96932 plasma-derived hepatitis B standard vaccine as the control showing no significant differences between any two experimental values.

表二 028A 批血漿 B 型肝炎疫苗以 Balb/c 小鼠為實驗動物時所標得之相對效價
Table 2. Relative potencies of 028A plasma-derived hepatitis B vaccine using Balb/c strain mice as the test animals^{1,2}

Experiment	Relative potency	No. of test	95 % confidence interval
1	0.87	79	0.20 – 3.69
2	0.92	73	0.32 – 2.63
3	0.80	80	0.16 – 3.85
4	1.57	75	0.55 – 4.45
5	0.94	80	0.27 – 3.30
6 ^a	1.64	86	0.59 – 4.58
7 ^b	1.61	77	0.51 – 5.08
8	0.96	77	0.28 – 3.35
9 ^{a, b}	0.79	60	0.23 – 2.67
10	0.84	80	0.25 – 2.82
Average	1.09 ± 0.39	767	0.34 – 3.64

¹ The values of relative potency of 028A plasma-derived hepatitis B vaccine obtained from each experiment was calculated with the WHO Lot 96932 plasma-derived hepatitis B standard vaccine as the control.
² Values in a row sharing the same superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

算法所得每次 028A 批 B 型肝炎疫苗對 WHO Lot 96932 批之相對效價結果分別列表於表一及表二。在天竺鼠組每次實驗所得諸相對效價數據，除了第三次試驗之一組數據外，皆落在各該次數數據之 95% 信賴區間 (confidence interval) (0.29 ~ 4.22) 內，若取有效數據計算，則 028A 批 B 型肝炎疫苗對 WHO Lot 96932 批標準品之相對效價平均值為 1.04 (表一)。至於小鼠組則每次實驗所得之諸相對效價數據，皆落在各該次之 95% 信賴區間 (0.34 ~ 3.64) 內，而對 WHO Lot 96932 批標準品之相對效價平均值為 1.09 (表二)。縱觀此次 B 型肝炎疫苗國家標準品之各次標定試驗結果所得之相對效價，差異雖稍許大些，但除了小鼠組之第六、七次實驗結果與第九次實驗結果間之差異，具統計學上之意義外 (表二)，其餘各組實驗結果間之差異都不具統計學上之意義。

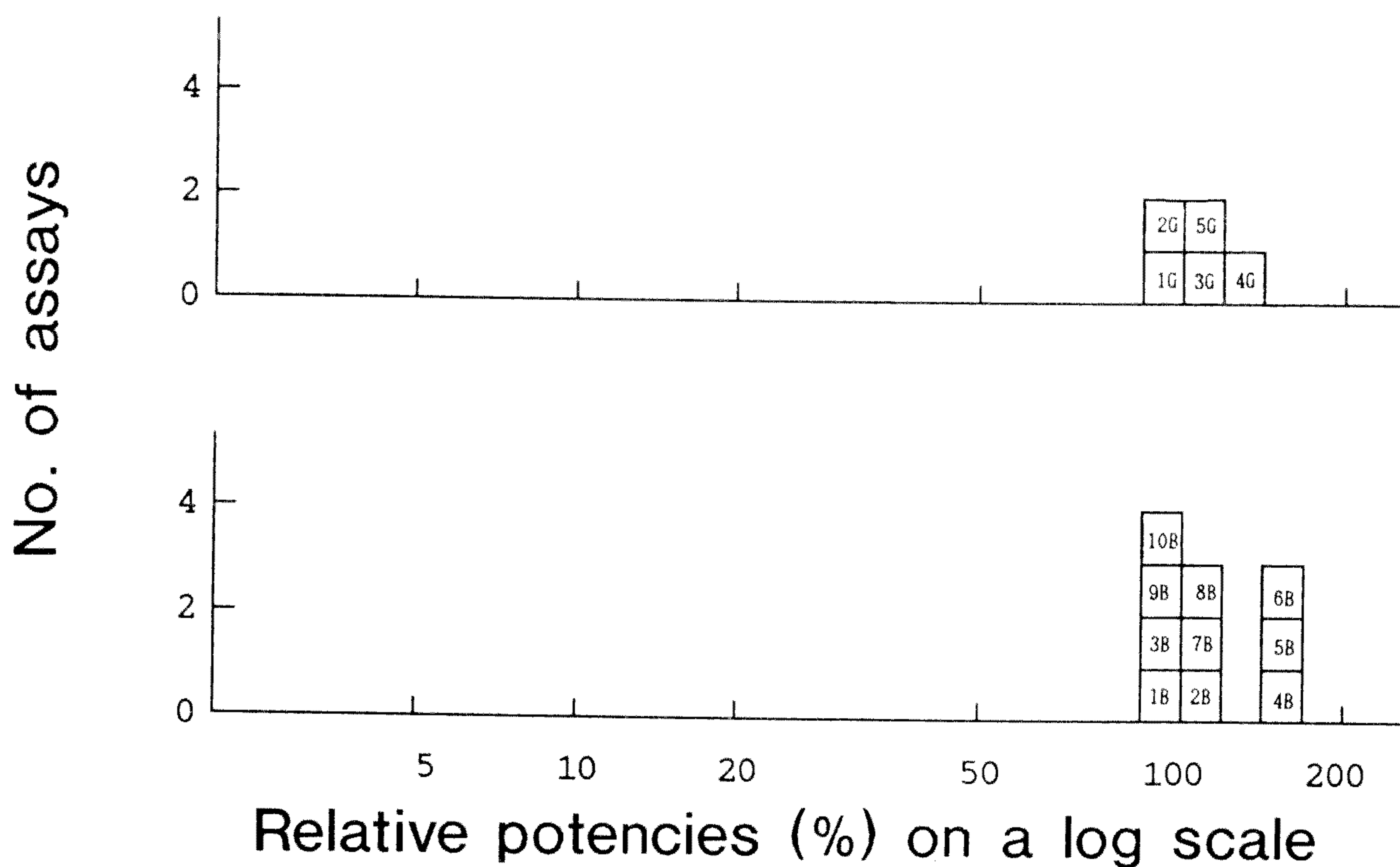
若將本次標定之 028A 批 B 型肝炎疫苗各次所得之效價結果以頻率分佈 (Frequency distribution) 作圖，可得圖一，並可清楚地顯示出此次實驗結果之變異性非常小。另外，天竺鼠組其 χ^2 與 t 值分別為 0.046 和 2.807，比理論值 3.48 和 3.128 為低；小鼠組之該兩項統計數字則分別為 1.17 和 0.950，也比理論值 3.84 和 2.447 為低，所以這些數據可認定為統計學上有效。總平均值天竺鼠組之相對效價為 1.04 ± 0.12 ，小鼠組則為 1.09 ± 0.39 ，亦即本 028A 批 B 型肝炎疫苗對

WHO Lot 96932 批標準品之相對效價極為接近 1.00。

討 論

Yuasa 和 Shimojo 在 1985 年的報告中⁽¹¹⁾，曾針對不同年齡、不同性別、不同品系 (Strain) 之實驗動物、不同注射途徑以及不同免疫期對於 B 型肝炎疫苗力價試驗之影響，作了深入的探討。本實驗中實驗動物之條件選擇，基本上即依據其結論而設計，因此各組實驗動物於實驗結束時血中 B 型肝炎表面抗原之抗體價皆堪稱理想。由於該報告並未論及不同季節或不同飼養環境之影響情形，而為因應日後實際上之需要，本次實驗即選擇在不同季節作實驗，以期由於季節之變化所可能對於實驗動物生理上之影響以致造成實驗結果之誤差亦能顯現出來，惟由目前初步之結果來看，本項因素似乎不具統計之意義。至於飼養環境，則盡量於每次實驗中使之一致。

一直負責供應世界衛生組織 (WHO) 多項生物製劑標準品的英國國家生物製劑標準暨管制局 (NIBSC, National Institute for Biological Standards and Control, UK)，於執行製備生物製劑標準品時，都選定足以代表世界各地之實驗室，一起對同一產品以相同之實驗程序進行效價之訂定。最近一次 B 型肝炎疫苗效價試驗用標準品之標定，亦



圖一 028 A 批血漿 B 型肝炎疫苗對 WHO 96932 批 B 型肝炎疫苗標準品相對效價之頻率分佈圖

Figure 1. Frequency distributions for the potency estimates of 028A plasma-derived hepatitis B vaccine expressed as percentages of the activity of the WHO Lot 96932 plasma-derived hepatitis B standard vaccine. Each square represents the estimate from one assay. The figures in the squares refer to the numbers of the test and the letters B and G denote assays done using Balb/c mice and guinea-pigs, respectively.

是以同樣方式進行⁽¹³⁾，而也由於是各種背景條件極為不同的實驗室在執行本身就有相當誤差的實驗，所以與我們此次之結果(圖一)比較，我們之數據的頻率分佈要理想得多^(13,14)。國內因為各種主客觀因素，於標定生物製劑標準品時，尤其是 B 型肝炎疫苗標準品，較難覓得相關之實驗室齊一執行，因而於執行本實驗時，即儘量讓不同的工作同仁各自獨立作自己的實驗，取代 NIBSC 方面以不同實驗室為代表的作法。

理想狀況下，一批疫苗其對於標準品之相對效價，最好不要低於 1.0，且以越接近 1.0 為佳。本次 028A 批血漿 B 型肝炎疫苗標準品之標定，諸實驗動物血漿中 B 型肝炎表面抗原之抗體價，範圍相當廣，顯示實驗動物本身之均一性(Homogeneity)以及實驗動物間之個體差異仍值得進一步再探討，惟接受本次標定實驗之每一隻實驗動物皆能產生有效的 B 型肝炎表面抗原抗體價，顯示本批 B 型肝炎疫苗每次使用都能有效地使實驗動物對疫苗產生免疫反應，堪稱為「有效的 B 型肝炎疫苗」。另外，由天竺鼠組與小老鼠組標定而得之 028A 批 B 型肝炎疫苗標準品對 WHO Lot 96932

B 型肝炎疫苗標準品相對效價結果平均值皆近乎 1.0，所以本批 028A 血漿 B 型肝炎疫苗當足以作為爾後我國進行 B 型肝炎疫苗封緘檢驗之對照標準品。

誌 謝

本實驗承美商美國新美公司台灣分公司提供 WHO Lot 96932 B 型肝炎疫苗標準品，而使本實驗得以順利進行，謹此誌謝。

參考文獻

1. Maynard, J.E., Kane, M.A., Alter, M.J. and Hadler, S.C. 1988. Control of hepatitis B by immunization: Global perspectives. *Viral Hepatitis and Liver Disease* p. 967-969.
2. Hollinger, F.B. 1991. Hepatitis B virus. IN "Viral Hepatitis", Hollinger, F.B., Robinson, W.S., Purcell, R.H., Gerin, J.L., and Ticehurst, J.,

- eds., 2nd ed., pp.73-138. Raven Press, New York.
3. Krugman, S. and Davidson, M. 1987. Discussion of hepatitis B vaccine: Prospects for duration of immunity. *J. Yale Biol. Med.* 60:333-338.
 4. Jilg, W., Schmidt, M. and Deinhardt, F. 1985. Immune responses to late booster doses of hepatitis B vaccine. *J. Med. Virol.* 17:249-254.
 5. The International Task Force on Hepatitis B Immunization. 1988. Field strategies for the control of hepatitis B in areas of intermediate and high prevalence. & Hepatitis B vaccines: History and specifications. IN "Notes on hepatitis B and its control." pp. 1-6, 7-17, The International Task Force on Hepatitis B Immunization, Seattle, Washington.
 6. Gavilanes, F., Gomez-Gutierrez, J., Aracil, M., Gonzalez-Ros, J.M., Ferragut, J.A., Guerrero, E. and Peterson, D.L. 1990. Hepatitis B surface antigen. *Biochem. J.* 265:857-864.
 7. Chen, D.S., Hsu, N.H.M., Sung, J.L., Hsu, T.C., Hsu, S.T., Kuo, Y.T., Lo, K.J. and Shih, Y.T. 1987. A mass vaccination program in Taiwan against hepatitis B virus infection in infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *J. Am. Med. Assoc.* 257:2597-2601.
 8. Hsieh, J.T., Chen, T.L., Yang, R.I., Huang, W.F., Horng, C.B., Lin, K.M., Su, S.C., Chen, C.J. and Lin, C.P. 1990. National control testing on plasma-derived hepatitis B vaccine in Taiwan. Present at the 7th International Congress on Viral Hepatitis and Liver Disease. Abstract 235.
 9. Ginsberg, A.L., Conrad, M.E., Bancroft, W.H., Ling, C.M. and Overby, L.R. 1973. Antibody to Australia antigen: Detection with a simple radioimmune assay, incidence in military populations and role in the prevention of hepatitis B with gamma globulin. *J. Lab. Clin. Med.* 82:317-325.
 10. Ling, C.M. and Overby, L.R. 1972. Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with ¹²⁵I-antibody. *J. Immunol.* 109:842-848.
 11. Yuasa, T. and Shimojo, H. 1985. Potency tests of hepatitis B vaccines by the parallel line assay method in mice. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 38:9-18.
 12. Finney, D.J. 1978. Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. Griffin and Co. Ltd., London.
 13. Ferguson, M., Seagroatt, V. and Schild, G.C. 1989. A collaborative study to establish the international reference reagent for hepatitis B vaccine containing plasma-derived hepatitis B surface antigen. *J. Biol. Standard.* 17:151-160.
 14. Ferguson, M., Heath, A. and Minor, P.D. 1990. Report of a collaborative study for assessing the potency of hepatitis B vaccines. *Biologicals.* 18:345-350.
- (Accepted for Publication: Nov. 26. 1992)

Preparation of Hepatitis B Vaccine Reference Standard for Potency Test

CHIA PO LIN, TSO-LING CHEN, RUOH-ING YANG, CHIN-JUNG CHEN AND JUNG-TIAN HSIEH

National Laboratories of Foods and Durgs, Department of Health, Executive Yuan

ABSTRACT

A well qualified plasma derived hepatitis B vaccine, coded 028A, was evaluated in the National Laboratories of Foods and Drugs for its potency to serve as the first national reference standard for hepatitis B vaccine for use in immunogenicity assays. This proposed national reference standard was assayed against the WHO plasma-derived hepatitis B reference standard, lot 96932. The relative potencies of lot 028A plasma-derived hepatitis B vaccine versus WHO

lot 96932 vaccine was evaluated in a series of immunization studies for both guinea pig and Balb/c mouse groups by the parallel line assay method. Results obtained indicated that the relative potencies for the guinea pig and mouse groups were 1.04 ± 0.12 and 1.09 ± 0.39 , respectively. This reference standard is intended for use in assays of hepatitis B vaccines in both mouse or guinea pig immunogenicity studies for the vaccine sealing tests in Taiwan.

Key words: Hepatitis B Vaccine, Reference Standard, Potency test.