

法國 B 型肝炎疫苗對照標準品效價檢測

陳 金 榮

摘 要

法國 B 型肝炎疫苗對照標準品分別以等比稀釋，免疫天竺鼠，四週後採血，以放射性免疫測定法測定 Anti-HBs 抗體價。免疫劑量與產生的抗體價，其直線相關性低。同劑量內個體間抗體價差異大。

鍵語：放射性免疫測定 (Radioimmunoassay)。

前 言

行政院衛生署為應防疫需要，自 73 年 6 月進口法國巴斯德藥廠 (Institut Pasteur Production, IPP) 製造 B 型肝炎疫苗 (Vaccin HEVAC B Pasteur) 供預防接種。本局以該廠製備之對照標準品一批，依世界衛生組織公布的效價測定法¹ 測定 Anti-HBs 抗體價，以為評估法國 B 型肝炎疫苗效價之基礎。

材料與方法

一、B 型肝炎疫苗對照標準品

由 IPP 提供每針 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的對照標準品一批，免疫動物時，以生理氯化鈉溶液中含氫氧化鋁 0.5mg/ml 為稀釋液，等比稀釋成 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的疫苗稀釋液。

二、動物免疫與血清分離¹

向臺灣大學動物中心購入 Bartley 系約 300 g 天竺鼠，經飼養至 300 ~ 350 g 後，隨意分為五組，每組 10 隻。每組分別由皮下注射一種上述疫苗稀釋液 1ml，最後一組注射稀釋液 1ml 以為對照。

免疫過之天竺鼠經四週後，由心臟採血，以 Kokusan centrifuge H100 B 3000 r.p.m. 10 分鐘分離每隻天竺鼠血清。

三、Anti-HBs 抗體價檢測²

使用 AUSAB 試劑 (美國 Abbott Lab.)，每珠粒加入 200 μl 血清，每隻天竺鼠血清做三重複，於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 反應 18 小時，以含 0.25 M 蔗糖，1 mM 氯化鎂之 50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane 緩衝液 (pH = 7.0) 沖洗四次，加入 ^{125}I -HBs Ag 液 200 μl ，於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 反應四小時，再沖洗四次後，每珠粒於 Kontron MR 480 伽瑪計數器測 ^{125}I 之 CPM (Count per minute) 1 分鐘。另取該使用批次試劑之 ^{125}I -HBs Ag 液 200 μl ，做三重複測 CPM。

四、計算

每珠粒 CPM 扣除計數器之空白 CPM 為其 CPM 值。

($\rightarrow$) 50 % 免疫性劑量 (Immunogenicity doses 50, ImD_{50})。

與對照組免疫血清反應之珠粒，其 CPM 平均值之 2.1 倍當為截值 (Cutoff Value)，疫苗各稀釋液組之每隻天竺鼠血清，其三重複 CPM 之平均值如果大於截值，則認為 Anti-HBs 抗體陽性之有效免疫，記錄各組天竺鼠抗體陰、陽性隻數，再以 Reed-Muench 法³ 計算 ImD_{50} 。

($\rightarrow$) 直線迴歸及相關係數⁴

疫苗各稀釋液組之每隻天竺鼠血清，其三重複 CPM 之平均值除以 ^{125}I -HBs Ag 液三重複 CPM 之平均值，再取常用對數值當為縱軸 Y，以各稀釋液劑量之常用對數值為橫軸 X，求 Y 與 X 間之直線迴歸 $y = \bar{Y} + bx$ 及相關係數 r 值，並求疫苗各稀

法國B型肝炎對照標準品效價檢測

表一 B型肝炎疫苗對照標準品免疫天竺鼠之Anti-HBs抗體反應

免疫劑量	免疫反應	抗體陽性(隻)	抗體陰性(隻)	I _m D ₅₀
5 μg / ml / 隻		10	0	0.832 μg / ml / 隻
2.5 μg / ml / 隻		9	1	
1.25 μg / ml / 隻		9	1	
0.625 μg / ml / 隻		3	7	

結果

一、I_mD₅₀

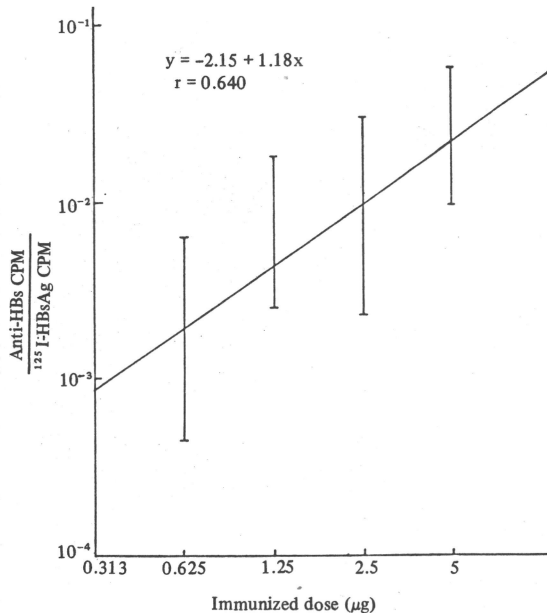
B型肝炎疫苗對天竺鼠免疫之Anti-HBs抗體反應如表一所示。

天竺鼠對B型肝炎疫苗產生Anti-HBs CPM / ¹²⁵I-HBs Ag CPM 與免疫劑量之雙對數之直線迴歸、相關係數及C.V.值如圖一所示。

討論

世界衛生組織公布之B型肝炎疫苗效價測定¹可使用天竺鼠為試驗動物。本實驗天竺鼠之I_mD₅₀ = 0.832 μg / ml / 隻與法國IPP提供之參考數據⁵接近。但I_mD₅₀無法顯示對同劑量免疫之個體間產生Anti-HBs抗體價之差異，且I_mD₅₀易隨截值之不同而改變。因此，世界衛生組織已要求計算I_mD₅₀之截值應為相當於50 RIA單位以上，以取代以前採用之8 RIA單位。由公式：(樣品CPM - 試劑Anti-HBs陰性CPM) / (試劑Anti-HBs陽性CPM - 試劑Anti-HBs陰性CPM) 比值與RIA單位間的換算關係，如以8 RIA單位為依據，則天竺鼠之有效Anti-HBs抗體CPM截值約為250，如採用50 RIA單位為依據，則截值約為1000。

由於天竺鼠之Anti-HBs抗體CPM / ¹²⁵I-HBs Ag CPM 與免疫劑量之直線迴歸為 $y = -2.15 + 1.18x$ ($r = 0.640$)，直線相關性很差，各免疫劑量所產生Anti-HBs抗體價之C.V.值介於19.3%~26.1%之間，顯示個體間對同



圖一 天竺鼠對B型肝炎疫苗產生Anti-HBs CPM / ¹²⁵I-HBs Ag CPM 與免疫劑量之雙對數之直線迴歸及相關。
各免疫劑量之C.V.值為21.5%，19.3%，26.1%，及24.1%。

釋液之Y軸上各點之標準偏差 (Standard deviation) 及變異係數 (Coefficient of Variance, C.V.)。

劑量免疫產生之 Anti-HBs 抗體價有差異性。此與 IPP 所提供的數據相似⁵。Takahashi 等以 PHA (Passive Hemagglutination) 法檢測 B 型肝炎疫苗免疫天竺鼠之 Anti-HBs 抗體價，也顯示免疫動物個體間產生抗體價相差約 2 ~ 16 倍。亦即各國使用之試驗動物產生之 Anti-HBs 抗體價具有分散性。因此 B 型肝炎疫苗之效價測定與其他疫苗相似，免疫動物產生的抗體價具有差異性存在。

誌 謝

本實驗承行政院衛生署預防醫學研究所惠予配合使用 AUSAB 試劑，謹致謝忱。

參考文獻

1. WHO. 1983. Proposed requirements for hepatitis B vaccine prepared from plasma. WHO/BS/83. 1391 Rev. 2.
2. Abbott Laboratories. 1984. Hepatitis B surface antigen ¹²⁵I (Human) AUSAB. North Chicago Illinois.
3. Reed, L. J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493.
4. Snedecor, G. W. and W. G. Cochran. 1967. *Statistical Methods*, 6th ed., 135-172. Iowa State University, Iowa.
5. Mazert, M. C., L. Rabier, M. Girard and A. Goudeau. 1984. Immunogenicity of the hepatitis B vaccine in guinea pig mouse and man. Institut Pasteur Production, Marne-la-Coquette, France.
6. Takahashi, T., H. Saito, M. Kurokawa, J. Yasuda and T. Hashimoto. 1982. Studies on the potency test of HB vaccine by the parallel line assay method in guinea pig. *Jap. J. of Medical Science and Biology*, 35, 53-62.

POTENCY TEST ON THE FRENCH HEPATITIS B VACCINE REFERENCE PREPARATION

CHIN-JUNG CHEN

ABSTRACT

Guinea pigs were immunized by the French hepatitis B vaccine reference preparation diluted to different concentrations. Their antibody titers

were determined by the radioimmunoassay (RIA) four weeks later. Poor correlation between immunization dosages and antibody titers was found.