

本計畫執行機關識別碼：050107B400

行政院農業委員會動植物防疫檢疫局補助研究期末報告書

計畫主管機關 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

計畫執行機關 私立嘉南藥理科技大學

計畫名稱 家禽霍亂菌苗用多殺性巴斯德桿菌之大量生產條件最適化及培養產物之抗原性評估(第1年/全程2年)

國科會
審議編號

9421011700050107B425

農委會
計畫編號

94農科-5.1.7-檢-B4



九十四年度行政院農業委員會動植物防疫檢疫局科技計畫期末摘要報告

家禽霍亂菌苗用多殺性巴斯德桿菌之大量生產條件最適化及培養產物之抗原性評估

審議編號：9421011700050107B425

農委會計畫編號：94農科-5.1.7-檢-B4

主管機關：行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

執行單位：私立嘉南藥理科技大學

計畫主持人：邱淑媛

聯絡人：邱淑媛

電話號碼：(0933)703-684

傳真號碼：(06)266-7327

期程：94年5月5日

至95年12月31日

經費：全程 2,160 仟元

94年度 810 仟元

執行情形：

執行進度：	預定%	實際%	比較
當年	100.0	100.0	0.0
全程	50.0	50.0	0.0
經費支用：	預定(仟元)	實際(仟元)	支用率%
當年	810	810	100.0
全程	2,160	810	37.5

報告頁數：0

使用語言：中文

全文處理方式：二年後可對外提供參考

中文關鍵詞：家禽霍亂；多殺性巴斯德桿菌；液態培養；醱酵槽；高密度培養

英文關鍵詞：Fowl Cholera；Pasteurella multocida；Submerged Culture；Fermentor；High-density Culture

研究人員：

中文姓名	英文姓名
王櫻娟	Yin-Chuan Wang

中文摘要：

本研究擬以兩年時間完成三項主要工作：(1) 將93年度科技計畫中完成的多殺性巴斯德桿菌高密度液態培養平台放大製產業化層級，(2) 降低培養基成本，(3) 建立醱酵槽



連續培養技術或高密度培養的技術。期能藉由提高菌液濃度、降低物料成本與引進醱酵程序自動控制的技術節約人力成本三方面，協助過內業者產製優質疫苗，提高疫苗產業的國際競爭力。

本年度（第一年度）已完成工作如下：(1)將培養基物料成本降低至每公升約新台幣30元；(2)將93年度科技計畫完成之培養平台以搖瓶方式放大至產業化規模，菌體濃度達到預期目標 1.0×10^{10} CFU/mL，並完成動物實驗，確認試製疫苗之保護力達到60%，符合國家標準；(3)完成桌上型醱酵槽之40代連續培養，菌體濃度介於 $1.1 \sim 2.1 \times 10^{10}$ CFU/mL之間，達到預定濃度 1.0×10^{10} CFU/mL以上，(4)醱酵槽培養產物試製疫苗進行動物試驗，得知在連續培養第23與31代之產物試製疫苗通過60%保護力之標準。

英文摘要：

There are three aims of this study to be achieved in two years. (1) To scale up the high-density culture technique from the laboratory scale (which was developed for *Pasteurella multocida* with the financial supports from the Council of Agriculture, ROC in 2004) to a commercial scale, for better cell recovery than the commercially culture system being in use in vaccine production. (2) Lower the cost of culture medium by substituting certain of the components with fermentation-grade substrates. (3) To setup a continuous culture technique or a high-density culture technique in the fermenter with automatically feedback control by signals from the cultivation, to save the cost of manpower.

In the first year, four targets were achieved. (1) The costs of culture media were decreased to about US\$1.0 to meet the commercial requirement. (2) The high-density culture technique was successfully scaled up to a commercial level. The recovered cell density from shake flask reach 1.0×10^{10} CFU/mL. The culture broth obtained thereafter was formulated and tested in mice. Both safety and efficacy passed tests. (3) Continuous culture of *Pasteurella multocida* in bench-top fermentor for more than 40 generations were achieved, with cell density around $1.1 \sim 2.1 \times 10^{10}$ CFU/mL. (4) Prototype vaccine produced with culture broth from continuous fermentation passed safety test. Products from 23 and 31 generations of continuous culture pass efficacy tests.

成果產出表：



科技論文篇數			技術移轉			研究報告 0 篇		
發表地點 ----- 類 型	國 內	國 外	類 型	項 數	經 費	技術創新 0 項		
期 刊 論 文	0 篇	0 篇	國 外 引 進	0 項	0 千元	技術服務 0 項		
研 討 會 論 文	0 篇	0 篇	移 轉 國 外	0 項	0 千元	專利權 (核准)	國 內	0 項
							國 外	0 項
專 著	0 篇	0 篇	移 轉 企 業	0 項	0 千元	著作權 (核准)	國 內	0 項
							國 外	0 項

檢討與建議：

1.本年度如期完成四項目標 (1)降低培養基物料成本至新台幣30元左右 (2)將93年度科技計劃成果之培養平台放大製產業界搖瓶層級，並且菌體濃度可達 1.0×10^{10} CFU/mL，培養產物試製疫苗可通過安全試驗及效力試驗 (3)完成桌上型發酵槽40代以上的連續培養，菌體濃度達 1.0×10^{10} CFU/mL以上 (4)連續培養不同批次產物之抗原性試驗顯示培養第31代之保護力仍可達70%，抗原性相當優良。以上結果顯示本計劃研發之家禽霍亂菌苗用巴斯德桿菌之液態培養系統具有應用潛力。惟連續培養產物之抗原性在低代數時反而較低，此點無法有合理的解釋，推測有三種可能性(1)製劑化或動物實驗過程有問題 (2)抗原濃度過高誘使免疫系統中的抗原呈現細胞不反應 (3)第23與第31代產物之動物實驗結果均為錯誤的。目前此動物實驗正在以(a)降低抗原濃度 (b)重新製劑化 兩個途徑重複確認中，預期兩週內可有確定結果。

在發酵槽培養中浮現幾個問題 (1)因培養規模加大，使得培養基加熱滅菌時間增長，造成熱破壞使得菌體生長情形變差 (2)連續培養雖然可減低接種人力並增加設備使用效率，但因需要大量培養基進行置換，殺菌人力需求仍相當高，因為需要大量的水(至少以實驗室中的設備進行時有如此現象)。有鑒於此二問題浮現，前者在本研究中已予以解決，開發出相較之下不易受熱破壞，適用於較長加熱時間的TSB-4培養基。至於第二個問題則凸顯出高密度培養的重要性，概因高密度培養需饋以高濃度培養基，可望減輕因大量用水而產生的人力需求。

主辦單位意見：

本年度家禽霍亂菌苗用多殺性巴斯德桿菌大量生產條件最適化評估具成果，惟應加強確認生產之細菌與原搖瓶方式生產者，其安全效力是否一致。

研究成果建議處理情形：

說明：

審查日期：

主辦專家簽章

技正邱垂章

單位主管簽章

劉雅玲代
1/20

純輝
1/20

純輝
1/20

農委會動植物防疫檢疫局補助研究期末報告書

計畫主管機關 農委會動植物防疫檢疫局

計畫執行機關 私立嘉南藥理科技大學

計畫名稱 家禽霍亂菌苗用多殺性巴斯德桿菌之大量生產條件最適化及培養產物之抗原性評估(第1年/全程2年)

國科會
審議編號

9421011700050107B425

農委會
計畫編號

94農科-5.1.7-檢-B4



九十四年度農委會動植物防疫檢疫局科技計畫期末摘要報告
 家禽霍亂菌苗用多殺性巴斯德桿菌之大量生產條件最適化及培養產物
 之抗原性評估

審議編號：9421011700050107B425

農委會計畫編號：94農科-5.1.7-檢-B4

主管機關：農委會動植物防疫檢疫局

計畫主持人：邱淑媛

電話號碼：(0933)703-684

期程：94年5月5日

經費：全程 810 仟元

執行單位：私立嘉南藥理科技大學

聯絡人：邱淑媛

傳真號碼：(06)266-7327

至 95年12月31日

94年度 810 仟元

執行情形：

執行進度：	預定%	實際%	比較
當年	100.0	100.0	0.0
全程	50.0	50.0	0.0
經費支用：	預定(仟元)	實際(仟元)	支用率%
當年	810	810	100.0
全程	2,160	810	37.5

報告頁數：0

使用語言：中文

全文處理方式：二年後可對外提供參考

中文關鍵詞：家禽霍亂；多殺性巴斯德桿菌；液態培養；醱酵槽；高密度培養

英文關鍵詞：Fowl Cholera；Pasteurella multocida；Submerged Culture；Fermentor；High-density Culture

研究人員：

中文姓名	英文姓名
王櫻娟	Yin-Chuan Wang

中文摘要：

本研究擬以兩年時間完成三項主要工作：(1) 將93年度科技計畫中完成的多殺性巴斯德桿菌高密度液態培養平台放大製產業化層級，(2) 降低培養基成本，(3) 建立醱酵槽連續培養技術或高密度培養的技術。期能藉由提高菌液濃度、降低物料成本與引進醱酵程序自動控制的技術節約人力成本三方面，協助過內業者產製優質疫苗，提高疫苗



產業的國際競爭力。

本年度（第一年度）已完成工作如下：(1)將培養基物料成本降低至每公升約新台幣30元；(2)將93年度科技計畫完成之培養平台以搖瓶方式放大至產業化規模，菌體濃度達到預期目標 1.0×10^{10} CFU/mL，並完成動物實驗，確認試製疫苗之保護力達到60%，符合國家標準；(3)完成桌上型醱酵槽之40代連續培養，菌體濃度介於 $1.1 \sim 2.1 \times 10^{10}$ CFU/mL之間，達到預定濃度 1.0×10^{10} CFU/mL以上，(4)醱酵槽培養產物試製疫苗進行動物試驗，得知在連續培養第23與31代之產物試製疫苗通過60%保護力之標準。

英文摘要：

There are three aims of this study to be achieved in two years. (1) To scale up the high-density culture technique from the laboratory scale (which was developed for *Pasteurella multocida* with the financial supports from the Council of Agriculture, ROC in 2004) to a commercial scale, for better cell recovery than the commercially culture system being in use in vaccine production. (2) Lower the cost of culture medium by substituting certain of the components with fermentation-grade substrates. (3) To setup a continuous culture technique or a high-density culture technique in the fermenter with automatically feedback control by signals from the cultivation, to save the cost of manpower.

In the first year, four targets were achieved. (1) The costs of culture media were decreased to about US\$1.0 to meet the commercial requirement. (2) The high-density culture technique was successfully scaled up to a commercial level. The recovered cell density from shake flask reach 1.0×10^{10} CFU/mL. The culture broth obtained thereafter was formulated and tested in mice. Both safety and efficacy passed tests. (3) Continuous culture of *Pasteurella multocida* in bench-top fermentor for more than 40 generations were achieved, with cell density around $1.1 \sim 2.1 \times 10^{10}$ CFU/mL. (4) Prototype vaccine produced with culture broth from continuous fermentation passed safety test. Products from 23 and 31 generations of continuous culture pass efficacy tests.

成果產出表：

科技論文篇數			技術移轉			研究報告 0 篇		
發表地點	國內	國外	類型	項數	經費	技術創新 0 項		
----- 類型						技術服務 0 項		
期刊 論文	0 篇	0 篇	國外 引進	0 項	0 千元			
研討會 論文	0 篇	0 篇	移轉 國外	0 項	0 千元	專利權 (核准)	國內	0 項
							國外	0 項
專著	0 篇	0 篇	移轉 企業	0 項	0 千元	著作權 (核准)	國內	0 項
							國外	0 項



檢討與建議：

1.本年度如期完成四項目標 (1)降低培養基物料成本至新台幣30元左右 (2)將93年度科技計劃成果之培養平台放大製產業界搖瓶層級，並且菌體濃度可達 1.0×10^{10} CFU/mL，培養產物試製疫苗可通過安全試驗及效力試驗 (3)完成桌上型醱酵槽40代以上的連續培養，菌體濃度達 1.0×10^{10} CFU/mL以上 (4)連續培養不同批次產物之抗原性試驗顯示培養第31代之保護力仍可達70%，抗原性相當優良。以上結果顯示本計劃研發之家禽霍亂菌苗用巴斯德桿菌之液態培養系統具有應用潛力。惟連續培養產物之抗原性在低代數時反而較低，此點無法有合理的解釋，推測有三種可能性(1)製劑化或動物實驗過程有問題 (2)抗原濃度過高誘使免疫系統中的抗原呈現細胞不反應 (3)第23與第31代產物之動物實驗結果均為錯誤的。目前此動物實驗正在以(a)降低抗原濃度 (b)重新製劑化 兩個途徑重複確認中，預期兩週內可有確定結果。

在醱酵槽培養中浮現幾個問題 (1)因培養規模加大，使得培養基加熱滅菌時間增長，造成熱破壞使得菌體生長情形變差 (2)連續培養雖然可減低接種人力並增加設備使用效率，但因需要大量培養基進行置換，殺菌人力需求仍相當高，因為需要大量的水(至少以實驗室中的設備進行時有如此現象)。有鑒於此二問題浮現，前者在本研究中已予以解決，開發出相較之下不易受熱破壞，適用於較長加熱時間的TSB-4培養基。至於第二個問題則凸顯出高密度培養的重要性，概因高密度培養需饋以高濃度培養基，可望減輕因大量用水而產生的人力需求。

主辦專家簽章

單位主管簽章

家禽霍亂菌苗多殺性巴斯德桿菌之液態生產條件最適化

及培養產物之抗原性評估 (計畫編號：94 農科-5.1.7-檢-B4)

摘要

本研究擬以兩年時間完成三項主要工作：(1) 將 93 年度科技計畫中完成的多殺性巴斯德桿菌高密度液態培養平台放大至產業層級，(2) 降低培養基成本，(3) 建立醱酵槽連續培養技術或高密度培養的技術並放大至產業層級。期能藉由提高菌液濃度、降低物料成本與引進醱酵程序自動控制的技術節約人力成本三方面，協助國內業者產製優質疫苗，提高疫苗產業的國際競爭力。

本年度(第一年度)已完成工作如下：(1)將培養基物料成本降低至每公升約新台幣 30 元；(2)將 93 年度科技計畫完成之培養平台以搖瓶方式放大至產業化規模，菌體濃度達到預期目標 1.0×10^{10} CFU/mL 以上，並完成動物實驗，確認試製疫苗之保護力達到 60%，符合國家標準；(3)完成桌上型醱酵槽之 40 代以上連續培養，菌體濃度介於 $1.1-2.1 \times 10^{10}$ CFU/mL 之間，達到預定濃度 1.0×10^{10} CFU/mL 以上，(4)醱酵槽培養產物試製疫苗進行動物試驗，得知在連續培養第 23 與 31 代之產物試製疫苗保護力高於 60%。

前言

家禽霍亂 (fowl cholera) 等多種家禽與家畜的疾病，可由革蘭氏陰性細菌 *Pasteurella multocida* (簡稱 Pm) 之 A 血清型 (serotype) 中的 A:1, A:3 與 A:4 血清群 (serogroup) 菌株所引起 [Rhoades and Rimler, 1987]。禽類受到感染之後引發出血性敗血症，死亡率很高，常導致嚴重的經濟損失，可使用活菌減毒疫苗 (live-attenuated vaccine) [Scott et al., 1999] 或死菌疫苗 (bacteroids) [Rebers and Heddleston, 1977] 進行防治。以死菌疫苗進行預防接種時，雖不會有疫苗株毒性回復突變而造成接種動物因而罹病的問題，但會有保護力不完全；亦即保護力難以達 100%，且對不同血清群的病原菌缺乏交叉保護功效等問題，因此需要重複進行疫苗接種的工作。目前除了北美洲有活菌減毒疫苗的使用之外，全球各地 (包含國內) 均採用死菌疫苗。

產製優質疫苗的關鍵之一，在於改進細菌培養程序，以得到足夠濃度的菌苗。目前家禽霍亂菌苗產品之保護效力，依照 OIE 或國際檢定標準只要達到 60% 保護力即可通過檢驗，重要因素之一是製備抗原量不足或製備抗原過程中有效抗原流失，致所生產菌苗品質不佳。液態培養雖然已經是國內廠商產製家禽霍亂菌苗普遍採用的培養方法，然而瓶頸是無法得到濃厚菌液，菌體產量約僅為

3×10^9 /mL，除了產量無法提升之外，也間接限制了含有家禽霍亂的多價疫苗發展空間。因此，疫苗產製仍須部份配合固態培養，以提高產品中的抗原量。

本研究室過去在農委會的計畫經費補助下(計畫編號:93 農科-1.8.1-檢-BC；動物疫病病原之監控調查與疫苗生產之研究--子計劃：液態高密度細胞培養生產動物用疫苗方法之建立)，針對 Pm 菌液態培養無法得到濃厚菌液之缺點，改進培養基組成及培養條件，已建立一適用於 Pm 菌液態培養之小型技術平台，此平台可有效提高菌體產量：以家禽來源 Pm 菌進行培養，於 12 小時之內菌體濃度可達到 1.2×10^{10} /mL 以上 (4 株試驗株，4 株適用)。除了家禽來源之 Pm 菌之外，本平台亦適用於大部分自豬分離之 PmA 與 PmD 之菌體培養，可得菌體濃度為 1.2×10^{10} /mL 以上(11 株試驗株，10 株適用)。家禽霍亂疫苗生產用菌株 FCN 在本平台小規模培養，未饋料時菌體產量可達 1.9×10^{10} /mL，饋料時菌體產量可達 3.6×10^{10} /mL。試製疫苗安全試驗及效力試驗均通過，顯示本培養基暨培養條件深具應用價值。若能將培養規模放大，有助於國內動物疫苗業者穩定疫苗品質及多價疫苗產品之開發。

因此，本計畫預計以兩年時間將既有之液態培養基及培養條件放大至產業界應用，建立適用於產業界的高效率及經濟性的家禽霍亂菌苗培養程序。本(第一)年度已完成下列工作：(1)產業規模搖瓶培養菌體濃度達 1×10^{10} CFU/mL 以上，試製疫苗的安全試驗和效力試驗均通過檢定；(2)建立桌上型醱酵槽的基礎資料及連續培養製程，菌體濃度達 1×10^{10} CFU/mL 以上；(3)桌上型醱酵槽連續培養 51 代的 Prototype 產品試製及效力評估(試製疫苗的安全試驗通過，效力試驗進行中)；(4)降低培養基成本至每公升約為 30 元。承第一年度的研究結果，第二年度(下年度)需要繼續進行的工作則有(1)建立桌上型醱酵槽的高密度培養製程；(2)將連續培養或高密度培養製程擇優放大至產業規模(例如 500 公升)進行試量產；(3)試量產菌苗之產品試製、效力評估及田間試驗；(4)進行成本效益評估。

材料與方法

菌株：*Pasteurella multocida* 家禽霍亂菌苗生產用菌株 FCN，本菌株由高生製藥股份有限公司提供。

培養基：以胰水解大豆培養液(tryptic soy broth, TSB)為基礎培養基，每公升含有酪蛋白水解液(tryptone) 17g，大豆蛋白水解液(soytone) 3g，葡萄糖(glucose) 2.5 g，氯化鈉(NaCl) 5g，磷酸氫二鉀(K_2HPO_4) 2.5 g。計算菌數用之固態培養基 TSA 為 TSB 外加 1.2% 洋菜固化而成。另外，本研究在進行過程中，依照培養的需求由 TSB 基礎培養基進行修改，得到四種商業培養基分別稱之為 TSB-1, TSB-2, TSB-3 與 TSB-4 (表一)。

培養條件：種菌培養係於 50 mL 三角瓶中置入 10 mL TSB。於 37°C 下 120 rpm 振盪培養，固態培養係於 37°C 恆溫培養箱中進行。產業界搖瓶培養係於 10 公升體積玻璃瓶中置入 2~8 公升 TSB-1 培養基，接種量 1%，於 37°C 下進行振盪培

養。小型桌上型醱酵槽係於槽中置入 75%槽體體積之 TSB-1, TSB-2, TSB-3 或 TSB-4 培養基，溫度設定為 37°C，改變攪拌速率、通氣量、pH 值等環境參數進行培養。

菌體產量：液態培養之菌液直接以蒸餾水適當稀釋後，測定 600nm 波長吸光值 (OD 600)，並以無菌水進行系列稀釋後塗抹於 TSA 瓶板上，測定菌落生成數 (colony forming units。CFU/mL)。

Prototype 產品試製：於完成培養之培養液中添加 0.2%體積濃度為 25%的甲醛溶液，置於室溫下去活性 4 天，以平板計數法確認菌液中所有的菌體均死亡後，添加 30%體積氫氧化鋁膠，以 NaOH 或 HCl 調整 pH 值至 7.0 製成製劑。

安全試驗暨效力試驗：安全試驗及效力試驗遵照國家標準，以體重 13-15g 小白鼠為材料進行。安全試驗以 5 隻小鼠以皮下注射 0.5 mL 疫苗，連續飼養 14 天觀察，應全數無不良反應並增重健存。效力試驗以 12 隻小白鼠進行，其中 10 隻小白鼠皮下注射 0.2 mL 疫苗 14 天後，12 隻小白鼠均以 10MLD 病源菌進行攻毒試驗，連續觀察 14 天記錄存活率。不注射疫苗者全數動物均應發病斃死，注射疫苗組如有 60%以上動物耐過攻毒試驗，則稱為通過效力試驗。

結 果

替代性培養基降低成本

在計畫執行中，前後共開發出四種替代性培養基 TSB-1、TSB-2、TSB-3 與 TSB-4，這些替代性培養基在本研究室進行小規模搖瓶培養之菌體產量：TSB-1 為 1.43×10^{10} CFU/mL (培養 6 小時)，TSB-2 為 1.70×10^{10} CFU/mL (培養 6 小時)，TSB-3 為 2.12×10^{10} CFU/mL (培養 6.5 小時)。TSB-4 係專用於醱酵槽培養，有顯著較高的菌體產量，達 2.7×10^{10} 。四種替代性培養基的物料成本分別為每公升：TSB-1=29.3 元，TSB-2=33.6 元，TSB-3=31.5 元，TSB-4=32.5 元 (表一)，與業界購買商品培養基之最低價格，目前每公升 48 元相較，價格已減低至為商品售價之三分之二。

放大搖瓶培養至產業規模

本實驗於丙方進行。以總體積為 10 公升玻璃瓶，每瓶分別裝入 2, 4, 6 或 8 公升 TSB-1 培養基進行搖瓶放大培養，培養 8 小時後，前述裝液量之菌體數依序分別為 1.28×10^{10} 、 0.81×10^{10} 、 0.67×10^{10} 、 0.63×10^{10} CFU/mL (表二)。結果顯示裝液量為 20%之搖瓶菌體濃度可達到目標濃度 1.0×10^{10} CFU/mL 以上。裝液量提高則菌體濃度降低，此趨勢不僅表現在菌數上，吸光值亦呈現相同的現象。但是在菌體濃度最低的 [80%裝液量之培養] 中，菌體濃度已符合業者需求，足夠直接進行製劑化而不需要配合固態培養。雖然在低的裝液量之下，單位體積培養液中菌體濃度較高，但就設備產量而言，裝液量高之菌苗產量較高 (表二)。因此，建議產業化時如有較高的菌體濃度需求 (例如製作多價疫苗) 時，可使用

低裝液量的培養產物加調和，得到穩定且足夠的菌體濃度。

產業規模搖瓶菌苗之安全試驗及效力試驗

本實驗於丙方進行。將裝液量 80%之產業規模液態培養菌苗製成製劑後，以小鼠進行安全試驗結果通過。進行效力試驗，三批培養產物均通過安全試驗，效力試驗顯示保護力亦均為 60%。

實驗室規模醱酵槽之基本參數建立

本研究主要利用 TSB-2 培養基進行，未以 TSB-1 進行的主要因為搖瓶放大之 TSB-1 培養基在醱酵槽中表現不佳（表一），推測因為醱酵槽之規模較搖瓶大，滅菌時間需較久，導致培養基中熱敏感性生長因子破壞較多。以 TSB-2 培養基進行醱酵槽基本操作參數：攪拌速率（圖一）、通氣量（圖二）及溶氧恆定控制（圖三）對菌體濃度之影響，已找出最適合操作之條件，菌體密度達 2.05×10^{10} CFU/mL，高於預期目標 1.0×10^{10} CFU/mL，成效良好。培養時間需要 8~12 小時。培養過程中的溶氧值、攪拌速率、pH 值與菌體濃度之變化示如圖四。

實驗室規模醱酵槽之連續培養

連續培養因為需使用大量培養基及較大型的饋料裝置，TSB-2 培養基在操作中表現不如在單槽中培養，因此改用 TSB-3 培養基為原料進行連續培養。培養過程中菌體濃度變化示如表三。培養的【代數】定義為菌體量加倍，亦即微生物學中的細菌世代數目，經過 1 代（一個世代時間，generation time）之後菌體數目增加為 2 倍(2^1)，2 代則增加為 4 倍(2^2)，3 代增加為 8 倍(2^3)。連續培養進行至第 51 代時尚能保持無菌狀態，在第 61 代時則因發現污染而停止培養。培養過程中菌體濃度均維持於 1.0×10^{10} CFU/mL 以上。

醱酵槽菌苗連續培養之安全試驗及效力試驗

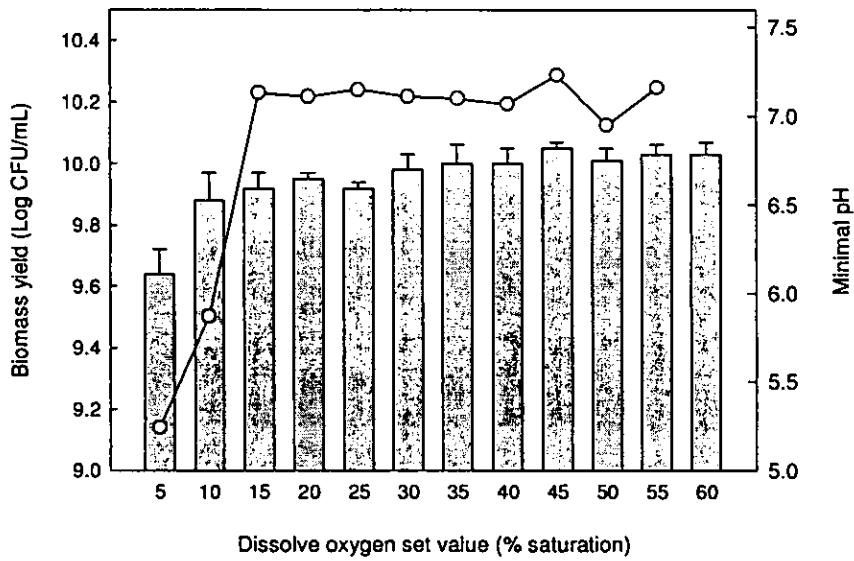
本實驗於丙方進行。將 TSB-3 培養基連續培養第 7, 23, 31, 41, 51 代產物試製成疫苗後以小鼠進行安全性試驗及效價評估。安全性試驗全數通過，效力試驗結果示如表四。第 23 代與第 31 代製劑中菌體濃度分別為 1.09×10^{10} CFU/mL 與 0.81×10^{10} CFU/mL，效力試驗不但通過，且保護力較一般家禽霍亂菌苗國家標準 60% 高。第 7、41、51 代則疑因抗原濃度過高誘發免疫細胞不反應，或因製劑化或免疫動物之操作過程有誤，目前正在重複確認中。依據巴斯德桿菌之培養規模推算，本連續培養中之第 23 代相當於批次培養之 160 噸醱酵槽（160,000 公升），已遠超過目前可用之醱酵槽規模，而業界一公噸以下之培養，其抗原相當於本連續培養中之 14 代以前。本研究結果顯示在 TSB-3 培養基中連續培養，若有抗原性衰退亦發生在第 31 代之後，換言之，TSB-3 培養基適用於長期連續培養。

供不同血清群 (serogroup) 間之交叉保護，均顯示死菌疫苗中免疫原 (immunogen) 的構形 (conformation) 極可能與菌株具感染能力狀態下應受抗體結合或中和之抗原構形有差異，亦即保護力不佳不是由於抗原濃度不足，而是抗體的專一性不足。此點在 poliovirus 死菌疫苗中曾發現 [Ferguson et al., 1993]，值得深入探討。

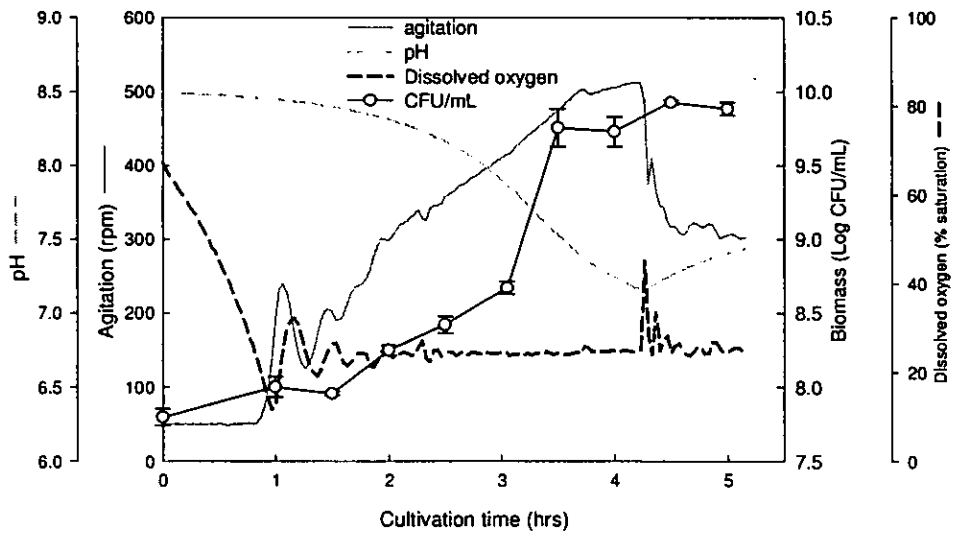
過去對多殺性巴斯德桿菌的認識為：具有莢膜之菌株方具有致病力，但研究顯示蛋白質極可能才是有效的抗原。莢膜在多殺性巴斯德桿菌感染力上之貢獻為遮蔽菌體上補體 (complement) 結合位置，降低補體的調理作用使菌體逃脫宿主免疫細胞的吞噬作用 [Boyce and Adler, 2000]。Kodama 等指出多殺性巴斯德桿菌 A 血清型莢膜的化學組成為玻璃醣醛酸 (hyaluronic acid)，但玻璃醣醛酸為家禽結締組織中含量很豐富的自體成分，應不具有誘導免疫反應的能力 [Kodama et al., 1981]。Chung 等則破壞 A 血清型多殺性巴斯德桿菌的莢膜生成基因或得一株無莢膜菌株，成功地以活菌狀態誘發免疫反應，顯示莢膜多醣 (玻璃醣醛酸) 本身並非誘發免疫的必要因子 [Chung et al., 2001]。相對地，菌株上的蛋白質分子，特別是分子量小於 20 kDa 的蛋白質，可能才是真正有效的抗原 [Chung et al., 2005]，此點值得作為未來在評估抗原產量之參考。

參考文獻

- Boyce JD, Adler B. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* 68(6):3463-3468.
- Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Townsend KM, Frost AJ, Ghoddusi M, Adler B. 2001. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* 69(4):2487-2492.
- Chung JY, Wilkie I, Boyce JD, Adler B. 2005. Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. *Vaccine* 23:2751-2755.
- Ferguson M, Wood DJ, Minor PD. 1993. Antigenic structure of poliovirus in inactivated vaccine. *J Gen Virol* 74:685-690.
- Kodama H, Matsumoto M, Snow LM. 1981. Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am J Vet Res* 42(10):1838-1841.
- Rebers PA, Heddleston KL. 1977. Fowl cholera: induction of cross-protection in turkeys with bacterins prepared from host-passaged *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 21(1):50-56.
- Rhoades KR, Rimler RB. 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis* 31(4):895-898.
- Scott PC, Markham JF, Whithear KG. 1999. Safety and efficacy of two live *Pasteurella multocida* aro-A mutant vaccines in chickens. *Avian Dis* 43(1):83-88.



圖三 溶氧恆定控制對 *Pasteurella multocida* FCN 菌體濃度之影響



圖四 *Pasteurella multocida* FCN 溶氧恆定控制培養中各項參數之變化

Abstract

There are three aims in this study to be achieved in two years. (1) To scale up the high-density culture technique from the laboratory scale (which was developed for *Pasteurella multocida* with the financial supports from the Council of Agriculture, ROC in 2004) to a commercial scale, for better cell recovery than the commercially culture system being in use in vaccine production. (2) Lower the cost of culture medium by substituting certain of the components with fermentation-grade substrates. (3) To setup a continuous culture technique or a high-density culture technique in the fermentor with automatically feedback control by signals from the cultivation, to save the cost of manpower.

In the first year, four targets were achieved. (1) The costs of culture media were decreased to about US\$1.0 to meet the commercial requirement. (2) The high-density culture technique was successfully scaled up to a commercial level. The recovered cell density from shake flask reach 1.0×10^{10} CFU/mL. The culture broth obtained thereof was formulated and tested in mice. Both safety and efficacy passed tests. (3) Continuous culture of *Pasteurella multocida* in bench-top fermentor for more than 40 generations were achieved, with cell density around $1.1 \sim 2.1 \times 10^{10}$ CFU/mL. (4) Prototype vaccine produced with culture broth from continuous fermentation passed safety test. Products from 23 and 31 generations of continuous culture pass efficacy tests.