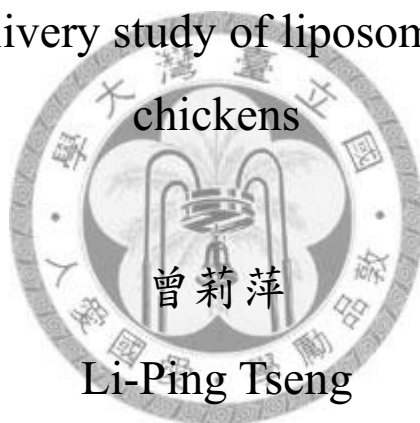


國立台灣大學 工學院暨醫學院 醫學工程學研究所  
博士論文

Graduate Institute of Biomedical Engineering  
College of Medicine and College of Engineering  
National Taiwan University  
Doctoral Dissertation

微脂粒佐劑應用於雞點鼻免疫之研究

The intranasal delivery study of liposomal-vaccine to SPF  
chickens



Li-Ping Tseng

指導教授：黃義侑 博士

Advisor: Yi-You Huang, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

# 總目錄

口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
中文摘要 .....	iii
英文摘要 .....	iv
表目錄 .....	vi
圖目錄 .....	vii
第一章 緒言及文獻回顧 .....	1
1.1 黏膜免疫之介紹 .....	1
1.2 動物用黏膜接種之疫苗.....	2
1.3 佐劑之介紹 .....	3
1.4 顆粒性疫苗傳輸系統 .....	6
1.5 微脂粒佐劑 .....	6
1.6 脂多醣體與黏著性多醣體.....	10
1.7 雞隻黏膜感染病毒 .....	11
第二章 論文研究目的 .....	13
第三章 材料與方法 .....	14
3.1 實驗動物 .....	14
3.2 病毒 .....	14
3.3 實驗試藥及分析試劑 .....	14
3.3.1 試劑藥品.....	14
3.3.2 抗體 .....	15
3.3.3 塑膠、玻璃製品 .....	16
3.4 微脂粒包覆病毒抗原 .....	16
3.4.1 微脂粒配方.....	16



3.4.2 製備流程 .....	17
3.4.3 粒徑、界面電位與包覆率 .....	17
3.4.4 相轉移溫度.....	18
3.4.5 螢光微脂粒 .....	18
3.4.6 雙佐劑微脂粒 .....	19
3.4.7 銀耳多醣微脂粒和三仙膠微脂粒 .....	19
3.5 免疫接種、採血和鼻與氣管沖洗液 .....	20
3.6 血球凝集抑制試驗與酵素免疫連結分析法 .....	21
3.7 攻毒實驗 .....	22
3.8 雞脾臟細胞分離 .....	22
3.9 共軛焦顯微鏡 .....	22
3.10 RT-PCR偵測病毒 .....	23
3.11 材料對細胞之毒性偵測 .....	24
3.12 偵測細胞培養液中NO .....	24
3.13 西方點墨法偵測蛋白質表現 .....	25
第四章 結果 .....	27
第五章 討論 .....	40
第六章 結論 .....	48
參考文獻 .....	49
表 .....	64
圖 .....	72
發表論文列表 .....	93



國立臺灣大學博士學位論文  
口試委員會審定書

微脂粒佐劑應用於雞點鼻免疫之研究

The intranasal delivery study of liposomal-vaccine to SPF  
chickens

本論文係曾莉萍君 (D93548009) 在國立臺灣大學醫學工程學研究所完成之博士學位論文，於民國 98 年 6 月 27 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

黃義倫

李龍明 (指導教授)

賴文文

鄭明中

劉得帆

所長：

柯台生

## 誌謝

這本論文的完成首要感謝指導老師的指導以及供應充足的經費，讓我對於研究經費的使用能無憂無慮。再者要感謝口試委員們對於論文的指正並提供許多寶貴的意見，使本論文更臻完美。另外，要感謝將近二千隻的雞的犧牲，使我的論文有足夠的數據，可以發表 paper。此外，要感謝實驗室雞組的伙伴們有：美秀、國銘、展志、尚禮、珮蓉、筱雯和助理秉倫，以及常常支援我的學弟妹：智翔、子聖、銘宗、佳雯、芝宇和怡君，我永遠不會忘記我們一同努力研究的過程。

謝謝我的家人始終全力支持我，使我無後顧之憂地完成博士學位，感謝我心目中的鐵人，藉由攀岩使我領悟到研究的精神就如同攀岩的精神。



## 中文摘要

利用微脂粒包覆活的(living)或去活的(killing)新城病毒(NDV)，以點鼻(intranasal)方式接種雞隻，發現在雞隻鼻腔/氣管沖洗液與血清中都有產生特異性 NDV 抗體。給予雞隻接種三種不同成份的巨型多層微胞微脂粒，其中使用磷脂醯膽鹼(PC)或磷脂醯絲胺酸(PS)組成的微脂粒，在動物實驗中黏膜分泌型抗體(s-IgA)與血清抗體(IgG)及功能性抗體力價(HI titer)表現量在兩次接種後抗體均提升，攻毒後保護率也達 80-90%。在微脂粒加入脂多醣體(LPS)佐劑，接種於雞隻後，在利用 PC 微脂粒組會增加黏膜抗體與 PS 微脂粒組增加會血清中抗體力價。更進一步，添加銀耳多醣(tremella)以增加微脂粒的黏度，延長微脂粒在黏膜時間，點鼻接種後黏膜分泌型抗體與血清中抗體均顯著提升，攻毒後有 100%的保護率。微脂粒佐劑對於免疫細胞之機轉由共軛焦顯微鏡觀察到，PC 組成份微脂粒被雞脾臟巨噬細胞吞量較多。PC 微脂粒與 PS 微脂粒均活化雞脾臟巨噬細胞產生 NO 釋放，其中 PC 微脂粒 NO 的釋放可被 Bay 11-7085 抑制與 U0126 抑制，表示 PC 微脂粒在早期活化雞脾臟巨噬細胞是以 NF- $\kappa$ B 磷酸化與 ERK 上游的 MEK 磷酸化的路徑。最後我們利用獲得免疫接種微脂粒或銀耳多醣微脂粒的雞隻，發現下游的 p-ERK 磷酸化的現象存在，其中微脂粒 p-ERK 磷酸化量較多而銀耳多醣微脂粒 p-ERK 磷酸化量較少，p-ERK 的磷酸化主要促進免疫反應走向體液免疫的 Th2 路徑，因此，銀耳多醣微脂粒組造成的免疫反應是完整的細胞免疫的 Th1 與體液免疫的 Th2 路徑的生成。

關鍵字：微脂粒、佐劑、黏膜、新城病毒、一氧化氮、黏膜黏著、銀耳多醣

## Abstract

Liposomal-NDV vaccine intranasal administration to chicken can induce specific-NDV antibody at mucosal and serum. The adjuvant effect of multi-lamellar vehicles (MLVs) liposomes formulated with three phospholipids including phosphatidylcholine-liposomes (PC-Lip), phosphatidylserine-liposomes (PS-Lip), and stearylamine-liposomes (SA-Lip) was compared with that for virus alone using the inactivated Newcastle disease virus (NDV) as model antigen. PC-Lip and PS-Lip induced more NDV antibody titer after secondary immunizations. In response to virulent viral challenge, all control animals died, whereas 80~90% of animals which still survived. Added LPS with liposomal-NDV vaccine which enhanced chickens produced antibody in serum and nasal/tracheal lavages. Furthermore, we combined tremella with liposomal-NDV vaccine to enhance the muco-adhesive property and prolong liposomes on the mucosal surface. Chickens received T-PC-Lip resulted in a significant increase in HI titer also elicited a significant mucosal secretory immunoglobulin A (s-IgA) response in tracheal lavages and a serum IgG response. After virulent virus challenge, the protection rate of T-PC-Lip vaccine showed 100% survival rate. The molecular mechanism of liposomal-adjuvant was study both *in vitro* and *in vivo*. Confocal laser scan microscopy showed that PC-Lip were uptaken into chicken spleen macrophages. PC-Lip and PS-Lip stimulated chickens spleen

macrophages produce NO. In response to PC-Lip stimulated, Bay 11-7085 and U0126 inhibited macrophages produced NO. PC-Lip was shown to be involved in both activation of NF- $\kappa$ B and upstream ERK of MEK pathway. Moreover, PC-Lip and T-PC-Lip were shown to be activated ERK pathway *in vivo*. In conclusion, T-PC-Lip is an active adjuvant for chickens resulting in trigger Th1 pathway of cellular immunity and Th2 pathway of humoral immunity.

Keyword: liposome, adjuvant, mucosal, NDV, nitric oxide, mucoadhesive, Tremella



## 表目錄

表一

The particle size, zeta potential, phase transition temperature, and encapsulation efficiency of various compositions of liposomal-vaccine .....64

表二

Serum hemagglutination-inhibition (HAI) antibody titers against NDV after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> vaccinations.....65

表三

Nasal hemagglutination-inhibition (HAI) antibody titers against NDV after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> vaccinations.....66

表四

Chickens against virulent NDV Sato strain challenge survival rate after the 1<sup>st</sup> vaccination with different dose of vaccine.....67

表五

Chickens against virulent NDV Sato strain challenge survival rate after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> vaccinations.....68

表六

Viscosity of bioadhesive polysaccharide gels.....69

表七

Serum hemagglutination-inhibition (HAI) antibody titers against NDV and survival rate after the 2<sup>nd</sup> vaccinations .....70

表八

Shedding of NDV challenge virus .....71

## 圖目錄

圖一 Antibody response.....	72
圖二 Nasal specific-NDV antibody.....	73
圖三 Serum specific-NDV antibody .....	74
圖四 Antibody producing time .....	75
圖五 Liposomal-NDV vaccine dose.....	76
圖六 Anti-NDV s-IgA levels in tracheal lavages and sera .....	77
圖七 LPS and Antibody producing .....	79
圖八 Specific-NDV nasal antibody between primary and secondary immunization .....	80
圖九 Specific-NDV serum antibody between primary and secondary immunization .....	81
圖十 Nasal challenge virus dose .....	82
圖十一 Nasal secreted antibody from immunized bioadhesive liposomal-vaccine. ....	83
圖十二 Serum antibody from immunized bioadhesive liposomal-vaccine.....	84
圖十三 CLSM of chicken macrophages.....	85
圖十四 Cell toxicity .....	86
圖十五 NO production from adjuvant stimulated .....	87
圖十六 NO production from liposomes stimulated .....	88
圖十七 NO production after treated with U0126 inhibitor.....	89
圖十八 NO production after treated with SB-203580 inhibitor.....	90
圖十九 NO production after treated with Bay 11-7085 inhibitor.....	91
圖二十 Western blot .....	92

# 第一章 緒言及文獻回顧

## 1.1 黏膜免疫之介紹

致病型微生物多由宿主黏膜部位入侵，例如：上呼吸道、消化道或生殖道[1]。其中以感染上呼吸道之病毒如高原性禽類流行性感冒病毒(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)和新城病毒(Newcastle disease virus, NDV)，易使得禽類引起高致病率甚至高死亡率[2,3]，因此黏膜部位的免疫反應更為免疫學家所關注。

禽類有類似哺乳類的黏膜免疫系統，在黏膜部位具有抵禦微生物入侵的黏膜相關淋巴組織(Mucosal-associated lymphatic tissue, MALT)，此黏膜相關淋巴組織包括呼吸道系統：鼻咽喉相關淋巴組織(Nasopharynx-associated lymphatic tissue, NALT)[4]和支氣管相關淋巴組織(Bronchial-associated lymphatic tissue, BALT)[5,6]、腸胃道相關淋巴組織(Gut-associated lymphatic tissue, GALT)[7-9]和頭相關淋巴組織(Head-associated lymphoid tissue, HALT)[10]。在這些黏膜相關淋巴組織結構由上皮細胞覆蓋於聚集的淋巴細胞(Lymphoid cell)[11]、淋巴上皮細胞(Lymphoepithelium) [12]或濾泡相關上皮細胞(Follicle-associated epithelium, FAE) [13]，在管腔內的黏膜濾泡相關上皮細胞附近有一種細胞具有不規則的微絨毛特化的 M 細胞(Microfold cell)，M 細胞緊鄰於淋巴細胞，其主要功能為攝入抗原，並將抗原運送到淋巴組織。抗原經由 M 細胞往下遞送，進入培耶氏斑(Peyer's patches, PP)，它是特化的次級淋巴組織，聚集許多抗原呈現細胞(Antigen presenting cells, APCs)，如：巨噬細胞(Macrophages)、樹突狀細胞(Dendritic cells, DCs)，這些抗原呈現細胞將抗原攝入後會將其表現於細胞膜上，使 T 細胞能夠辨識抗原而與之結合，進而活化淋巴濾泡中的 B 細胞，被活化的 B 細胞快速地分化成漿細胞(Plasma cell)，離開濾泡後分泌 IgM 抗體，再經抗體類型轉換(class switch)成 IgA 和 IgG 等

抗體，這些抗體以分泌型式經上皮細胞運送到管腔中和抗原產生作用，以達到保護宿主抵禦外來病原微生物之危害[14-17]。

## 1.2 動物用黏膜接種之疫苗


動物接種疫苗是有效控制並預防疾病的方法，禽類使用黏膜接種的疫苗都是活病毒(live viral)型式之疫苗，目前雞隻使用的活毒疫苗接種計有新城病(Newcastle disease, ND)包括 Hichner type B、Hichner type LaSota strain、Hichner type Avinum strain 等，以飲水、點鼻、點眼或噴霧...等等方式接種[18]；傳染性支氣管炎(Infectious bronchitis, IB)活毒疫苗有 H120 和 ND 的 B1 或 LaSota 混合疫苗，以飲水、點鼻或點眼方式接種[19,20]；傳染性華氏囊病(Infectious bursal disease, IBD)，以飲水、點鼻或點眼方式接種[21]；傳染性喉頭氣管炎(infectious laryngotracheitis, ILT)，以飲水、點鼻或點眼方式接種[22,23]。黏膜接種活毒疫苗的優點為：1.免疫保護效率達 90%以上，2.能夠引起體液性免疫反應(humoral immunity)與細胞性免疫反應(cell-mediated immunity) [18]；雞隻接種活毒經數個月後，其體內免疫力會持續降低，仍需要再次以活毒或不活化病毒接種雞隻，做為免疫補強，才得以有完整的保護效力。唯使用活毒仍有其危險性如毒力迴歸，即使其所使用的抗原為高度稀釋的病毒或是減毒病毒，仍不能不考慮基因隔代遺傳逆轉的可能性。若病毒發生突變，使減毒病毒株轉回野生型，或和野生型病毒株發生基因重組，導致新毒株的產生，都有可能造成無法預期的危機[24]。新城病毒以福馬林或戊二醛不活化處理後即為死毒(killed virus)，經由點鼻和氣管接種方式引起的局部性免疫反應相對地比用活毒接種的弱[25]，由黏膜與血清中之抗體不足以達到保護力價。然而，優秀的疫苗應具備有下列特性：1.具有免疫保護作用之效率達 80%以上，2.高安全性，3. 接種使用性便利[26]，4. 便宜。為使具高度安全性但低免疫抗原性之死毒能夠由黏膜接種，使得雞隻產生優良之局部性與系統性免疫反應，並抵抗病毒之攻擊以達到有效地保護，則需要使用佐劑(adjutant)以

達成目的。

### 1.3 佐劑之介紹

#### 佐劑的歷史

死毒抗原、次單位抗原(subunit antigen)、胜肽抗原(peptide antigen)、多核苷抗原(polynucleotide antigen)，雖然其安全性(safety)大幅提升，但是相對地有效性(effective)與免疫力時效卻隨之降低，因此，早期疫苗研究發展過程就知道佐劑在疫苗之重要性，所以疫苗研究發展的過程中除選擇適當之抗原外，也發現有效的佐劑可做為增強疫苗效力之物質。



「佐劑」(Adjuvant)，源自於拉丁文“adjuvare”，是“幫助”及“加強”之意[27]。凡是在疫苗中設計用來增資免疫效果的物質或配方即為佐劑。早在西元1916年 Moignie和Pinoy即使用礦物油增強免疫反應[28]；西元1924至1926年間，Ramon發現在有細菌產生的白喉類毒素(diphtheria toxoid)使得局部地產生發炎現象，會伴隨著對應抗原物質的抗體大量地生成[28]；至西元1926年，距今80多年前，Glenny et al. [17]始在人用疫苗製劑中添加鋁膠(氫氧化鋁)做為佐劑，至今鋁膠是唯一被美國食品藥物管理局(US Food & Drug Administration)核准可用於人類之佐劑。在其他國家如歐盟等國，已經同意可用於人類佐劑有：MF59(含角鯊烯的水包油油質佐劑)配合流行性感冒疫苗之配方，產品名為Fluad；AS03(水包油油質佐劑)配合H5N1疫苗之配方，產品名為Prepandrix；AS04佐劑，結合MPL(monophosphoryl lipid A)和鋁膠，配合HBV或HPV疫苗配方，產品名分別為Fendrix和Cervarix [29]。動物用疫苗已核准之佐劑則為：禽類用之不活化病毒產品；油質佐劑如Specol和Montanide<sup>®</sup> ISA系列產品；魚用病毒次單位疫苗產品；油質佐劑如Norvax-IPNV產品；豬用之不活化次單位疫苗；油質佐劑如荷蘭英特威公司產品。

## 理想的佐劑

優良的疫苗取決於以下的因素：1.抗原，2.接種的動物物種，3.接種疫苗的途徑，4.佐劑，5.無副作用，6.便宜[30]；佐劑是疫苗品質之關鍵，佐劑配方的選擇能夠影響抗原的表現能力以上疫苗產品之有效性，但不良的佐劑加入疫苗也會增加疫苗之副作用，進而影響到體液性與細胞性免疫反應之表現。而理想的佐劑需符合以下幾個要點：1.安全無副作用之佐劑材料，2.具生物可降解性之材料，3.佐劑生產成本低廉，4.引起有效地細胞性與體液性的免疫反應，以達到完整地保障效力[31]。

## 佐劑與疫苗接種途徑

疫苗使用上分類非常多樣性，依病原種類、病原致病途徑、抗原型式、佐劑劑型或接種方式等來加以區分[31]。疫苗使用上主要分侵入式(invasion)跟非侵入式(non-invasion)兩種，侵入式疫苗又可分為：1.皮下注射(subcutaneous injection)，2.肌肉注射(intramuscular injection)，3.穿刺(puncture)；非侵入式疫苗可分為：1.口服(oral)，2.點眼(intraocular)，3.點鼻(intranasal)，4.皮膚塗抹，5.浸泡。影響疫苗效力最主要的因素即是佐劑，基於疫苗免疫接種路徑，選擇適合的佐劑使用，著名的 MF59 佐劑做為注射劑型在人體的抗體表現量都非常卓著，但將 MF59 配合 H5N3 流行性感冒病毒抗原經由黏膜接種於人類後，在血清以及黏膜的抗體生成量與未接種者無差異，MF59 為優秀的注射型佐劑，但是是劣等的黏膜型佐劑[32,33]。

## 佐劑的分類與介紹

目前已經被發表於文獻中的佐劑約有數百種之多[34]，不同的佐劑有不同促進免疫反應的機轉，由於多重及彼此重疊的生物學特性，佐劑的分類確有困難。依照「接種途徑」分類可分為：黏膜型佐劑與非黏膜型佐劑；依照「劑型」分類為：水溶液狀、油質狀、顆粒狀、水膠狀...等；依「特性」可分為：物理功能佐劑由礦物

油、脂質、界面活性劑、聚乳酸、聚甘醇酸、褐藻酸、幾丁聚醣...等等製成(例如微脂粒、微胞、微粒和ISCOM等)，化學功能佐劑由化學合成物質(例如維生素C、維生素E)，生物功能佐劑由微生物病原菌物質或動物、植物的物質製成(例如CT-B、細胞激素、生長因子、脂多醣、monophosphoryl lipid A (MPL)、CpG motif、破傷風類毒素Tetanus toxoid、白喉類毒素Diphtheria toxoid、綠膿桿菌外毒素Pseudomonas exotoxin)。更進一步地分類，依照引發「免疫反應」分類：活化先天性免疫(innate immunity)反應佐劑，利用病原相關分子型態(Pathogen associated molecular patterns, PAMP)外來之病原分子結構，使模式辨識受體(pattern recognition receptors)家族中，類鐸受體(Toll-like receptor, TLR)的辨認，如：聚甘露醣(mannose, mannan)作用於Toll-like receptor 2[35]，polyinosinic-polycytidylic acid類似微生物之雙股RNA(dsRNA)作用於TLR3[36]，革藍氏陰性菌表面之脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)作用於Toll-like receptor 4[37]，細菌之鞭毛(flagellin)作用於Toll-like receptor 5[38]，微生物之單股RNA(ssRNA)作用於TLR7或TLR8[39,40]，微生物之CpG DNA作用於TLR9[40]；作用並活化後天性免疫(adaptive immunity)反應佐劑，調控後天性免疫反應的啟動，如：細胞激素(cytokines)或化學激素(chemokines)，其中有顆粒球巨噬細胞聚落刺激因子(granulocytemacrophage colony stimulating factor, GM-CSF)[41]或介白質素12(interlukin 12, IL-12) [42]等等。依照「傳遞系統」佐劑可分類為：油包水(Water-in-oil)之油質佐劑[43,44]，礦物鹽類之氫氧化鋁或鈣鹽[45]，顆粒載體如微粒(microparticles)[46]、微脂粒(liposomes)[47]、免疫刺激複合物(Immune stimulate complex, ISCOM)[48]、仿病毒顆粒佐劑(Virus-like particles, virosome)[49]。

### 佐劑的功能與作用機制

學理上，不同的佐劑有促進不同免疫反應的功能和免疫原性(immunogenicity)。歸納出五個要點：一、地域性概念的免疫反應性；二、倉庫效應(depot effect)理論，

在接種後抗原仍處於局部化[50]；三、佐劑扮演訊息 0 (Signal 0)，引導抗原決定位 (epitope) 的訊息 1 (Signal 1) 和經辨識受體分辨病原相關分子型態的訊息 2 (Signal 2) [51]；四、訊息 2 扮演佐劑活化初始 T 細胞；五、經外緣性和內緣性的危險訊息活化免疫反應[52,53]。

## 1.4 顆粒性疫苗傳輸系統

倉庫效應是抗原傳輸系統能夠成功地引發免疫反應的主要原因。假設佐劑滿足倉庫效應，那麼佐劑的化學組成與設計會決定免疫反應的型態，例如：由共同刺激分子或抗原控制，使 B 細胞產生不同的 isotype 的抗體，使 T 細胞分泌不同的細胞激素。有許多佐劑類型屬於『顆粒性疫苗傳輸系統』，包括微脂粒、聚合的微粒、奈米粒子、仿病毒顆粒佐劑...等等[54]。由於可溶性抗原或死毒抗原在經黏膜接種時均無法達到有效的免疫反應，因此，將這些抗原經由顆粒性的包覆於黏膜部位接種時能引起局部地與系統性地免疫反應。歸納下列因素使顆粒性佐劑有效的原因：一、顆粒性佐劑和抗原形成的巨分子複合物使抗原更有效地生存於黏膜的環境，避免於酵素水解或破壞；二、顆粒性佐劑幫助抗原通過黏膜纖毛層；三、顆粒性佐劑比可溶性的分子更易在 Peyer's patches 經由 M 細胞攝入後引導至產生 IgA 區域；四、顆粒性佐劑可能扮演倉庫效應使得抗原緩慢釋放。由於以上因素，使得局部黏膜接種疫苗的接種方式得以實現，因而仍有許多研究團隊持續研究有效地黏膜型顆粒性佐劑。包括研究微粒的 O'Hagan，研究免疫刺激複合物的 A.Osterhaus 和 G.Rimmelzwaan，和研究微脂粒的 S.Michalek 和 N.Childrens。

## 1.5 微脂粒佐劑

### 微脂粒簡介

微脂粒 (Liposome) 又稱脂質體 (fat body)，由脂質所構成的仿生物細胞之載體。

西元 1965 年英國科學家 Bangham 等人首次發現，將磷脂質薄膜分散於水相環境系統中，會形成類似洋蔥圈的多層結構 (multilamellar structure) 之通透性脂質小泡 [55]。直到 1968 年科學家 Sessa 和 Weissman 正式將小泡命名為 Liposome，並明確定義：微脂粒是由一層到數層磷脂質雙層膜所組成的微小囊泡，具有自行密合 (self-closing) 的特性 [56]。微脂粒主要是由磷脂質所組成，磷脂質本身具有疏水性的碳鏈與親水性的頭基，因此可包覆親水性 (hydrophilic) 物質在中空球體內部之水相區域及包覆疏水性 (hydrophobic) 之物質鑲嵌在脂雙層中。另外，也因為微脂粒是由磷脂質之天然物質所組成的關係，其具有良好的生物相容性 (biocompatibility) 及生物降解性 (biodegradable)，因此在西元 1972 年，開始被用來作為藥物輸送的載體 [57]。並在西元 1995 年，核准特殊配方微脂粒可施打於人類之應用 [58]。

### 微脂粒性質與分類

微脂粒依粒子大小、脂質的組成份與電性分類。一般依照脂雙層結構的層數 (number of lamellae) 或是粒子大小 (size) 分類。大致上可分為下列四種：一、多層微胞微脂粒 (multilamellar vesicles, MLVs) 通常是由五個以上同心層所組成，其粒徑約為  $1\mu\text{m}$  以上，由於每個微脂粒有多層脂雙層膜，具有持續釋放的功能，被包覆在外層的物质會先被釋放出來，包覆在內層的物质則被慢慢釋放出來。二、單層大微胞微脂粒 (Large unilamellar vesicles, LUVs) 由一個脂雙層所包圍封閉形成，粒徑約為  $1000\text{ nm}$ 。三、單層中微胞微脂粒 (Intermediated unilamellar vesicles, IUVs) 由一個脂雙層構成的微脂粒，其粒徑約在  $100\text{ nm}$  的等級。四、單層小微胞微脂粒 (Small unilamellar vesicles, SUVs) 由一個脂雙層所包圍封閉而成的微脂粒，其粒徑較 MLVs、LUVs 和 IUVs 小，粒徑約在  $25\sim 100\text{ nm}$ 。微脂粒脂質的組成份：一、甘油醯脂質 (Glyceroglycolipid)，例如：半乳糖派喃醯 (galactopyranoside)。二、抱合磷脂質 (Sphingophospholipid)，例如：神經磷脂質 (sphingomyelin)。三、抱合醯脂質 (Sphingoglycolipid)，例如：神經醯胺半乳派喃醯 (ceramide galactopyranoside)。四、

甘油磷脂質 (Glycerophospholipid)，例如：卵磷脂(Lecithin)。微脂粒電性分類是依照脂質的選擇組成，構成帶負電荷 (Negatively charged) 微脂粒，如磷脂醯絲胺酸( Phosphatidylserine, PS)、磷脂醯甘油( Phosphatidylglycerol, PG)或磷脂醯肌醇(Phosphatidylinositol, PI)。帶正電荷 (Positively charged) 微脂粒，如硬脂胺 (Stearylamine, SA)。兩性電荷 (Natural charge) 微脂粒，如磷脂醯膽鹼 (Phosphatidylcholine, PC)和磷脂醯乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)。微脂粒做為藥物的載體時，可依不同脂質的組成份、粒徑大小、界面電位的高低以達到有效地藥物或抗原輸送目的。

### 微脂粒佐劑

西元 1984 年起微脂粒始被應用於免疫佐劑[59,60]，微脂粒被發現具有啟動免疫反應之潛力，是由於微脂粒做為癌症藥物傳輸系統時，微脂粒最終都被網狀內皮系統 (Reticuloendothelial System, RES) 中的抗原呈現細胞 (Antigen Presenting Cell, APC) 之一的巨噬細胞 (Macrophage) 吞噬。微脂粒可被巨噬細胞和其他在血液、淋巴和組織中(如淋巴結、肝臟和脾臟)的吞噬細胞吞噬後而釋放抗原。Alving 學者在西元 1991 年、Gregoriadis 學者在西元 1990,1992 和 1995 年發表微脂粒佐劑經由注射接種的方式，能夠有效地引發免疫反應[59-62]。微脂粒佐劑作用的機制，可能為以下因素：一、保護並穩定抗原，模仿的功能(如病原微生物的表面)；二、促進對準抗原呈現細胞主動與被動式的攝入；三、攝入後增加並控制抗原處理。

### 微脂粒黏膜佐劑

由於微脂粒佐劑經由注射接種，獲得良好的免疫反應。因此，陸續有學者專家將微脂粒疫苗接種途徑應用於黏膜接種方式[63]。以增加疫苗使用的順應性、方便性與有效性。黏膜接種方式主要有口服(Oral)途徑與點鼻(Nasal)途徑，最早研究微脂

粒口服疫苗於大鼠動物模式系統，能有效使唾液中產生*Streptococcus mutans*抗體可預防蛀牙產生[64,65]。同樣地將微脂粒包覆*Streptococcus mutans*部分的醣蛋白結構，於人類口服接種後，經由唾液與血清檢驗均能提升IgA抗體之生成[66,67]。另將霍亂弧菌毒素的Lipid A包覆於多層微泡微脂粒(MLV)於大鼠口服接種後，能增加大鼠腸道內IgA生成[68,69]。黏膜接種微脂粒疫苗並未受限於口服途徑的物理性屏障(例如：胃酸破壞造成微脂粒不穩定，使得抗原被酵素分解)。El Guink學者在西元1989年首次發表文獻，說明微脂粒包裹流行性感冒病毒抗原，同時以點鼻與注射方式模式接種於小鼠，經點鼻接種微脂粒疫苗的小鼠在鼻沖洗液中有高力價的IgA抗體，以及少量的血清中抗體力價，經攻毒實驗證實能夠有效且百分之百保護小鼠耐受過流行性感冒病毒之攻擊[70]。西元1995年de Haan和其研究團隊也發現，給予小鼠點鼻接種微脂粒包覆之次單位抗原，能持續分泌IgA抗體長達五個月的時間於小鼠肺部與鼻腔，足以保護小鼠免於病毒感染[71]。另外，de Haan和其研究團隊也發現，點鼻接種小鼠後，抗體之生成不僅僅局限在鼻腔或肺部生成，在腸道、生殖道和血清均會分泌抗體生成[72]。

### 微脂粒黏膜佐劑之免疫作用機制

在微脂粒佐劑的作用之下，抗原呈現細胞(antigen-presenting cells, APCs)特別是巨噬細胞(macrophages)與樹突狀細胞(dendritic cells, DCs)為極重要的角色，它們因為先天性免疫反應(innate immune response)的機制與微脂粒佐劑接觸後，巨噬細胞與樹突狀細胞被活化而引發後天性免疫反應(adaptive immune response)，將微脂粒佐劑胞吞、處理並將微脂粒包覆之抗原呈現於T細胞。巨噬細胞活化指標之一為一氧化氮(nitric oxide, NO)之生成[73,74]。當NO由巨噬細胞生成，NO造成細胞激素的生成，並引起附近淋巴細胞內的訊息傳遞，包括 p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK)、extracellular signal-related kinase 1/2 (ERK1/2)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)和phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)。另外，訊息傳遞物質之一的 nuclear

factor kappa B (NF- $\kappa$ B)也扮演重要的角色，經活化後在細胞內產生激素如 co-stimulatory molecules type I interferon、chemokines 或 cytokines [75]。

## 1.6 脂多醣體與黏著性多醣體

### 脂多醣體

脂多醣 (Lipopolysaccharide; LPS) 為內毒素 (endotoxin) 一種，為格蘭氏陰性菌細胞壁的主要成分之一。LPS 最早被做為佐劑於西元 1956 年 [76]，LPS 的最外側為一段具有抗原特異性的多聚醣，稱為 outer-polysaccharide；由於其內含可誘發專一抗體的 O 抗原 (O-specific chain)，因此可被應用於臨床診斷做為辨識各種不同格蘭氏陰性菌的依據。至於 LPS 中間一段較短被稱為 core-polysaccharide (core region) 的多聚醣，其以共價鍵的結合方式連接 O-specific chain 及 lipid A。LPS 是一種兩性分子，特徵有帶負電、有較高的耐熱性與分子聚集大小會隨 pH 和鹽濃度不同而不同等。也正因其疏水性而與塑膠類製品有強的親和力。當細胞受到細菌的侵犯時，細胞會被內毒素刺激，內毒素可活化巨噬細胞，使其分泌細胞激素，包括 TNF、IL-1、IL-6、IL-8 等。LPS 導致白血球 (Macrophages、Neutrophils) 活化之過程，可說是細胞對格蘭氏陰性菌產生非特異性免疫反應之基石。巨噬細胞 (macrophage) 與單核吞噬細胞 (mononuclear phagocyte) 是已知在內毒素刺激下，可產生與分泌各種 cytokines (ex: TNF, IL) 的細胞，在體內內毒素藉 cytokine 的仲介，會引發 endotoxemia 包括敗血症與器官損傷。在細菌侵入宿主細胞時由細胞壁所釋放的 LPS 會刺激體內包括 T 細胞、單核球細胞、巨噬細胞、上皮細胞、血管內皮細胞在內多種不同細胞的生理反應 (例如: 調節物質的產生、胞飲作用、增生及分化等)，而造成宿主嚴重的發炎、水腫、以及敗血性休克。目前已知低濃度的 LPS 會活化 Th 細胞，進而激化 B 細胞產生有專一性的抗體。而高濃度的 LPS 則可以活化非專一性的 B 細胞與之結合。

## 黏著性多醣體

### 銀耳多醣

「白木耳」又稱為「銀耳」、「雪耳」或「川耳」，其學名為 *Tremella fuciformis* (TF)，銀耳是銀耳科植物銀耳的子實體，在中國被視為食物的一種或是如補藥的「中藥」。近年來，研究發現銀耳萃取的銀耳多醣具有許多生理藥理的活性[77]，其中具有免疫調節之功能以增強免疫力，免疫調節活性由非澱粉型式的多醣體，特別是由 $\beta$ -glucan，增加細胞性與體液性免疫功能[78,79]。

### 三仙膠

三仙膠(Xanthan gum (XG))由十字花科黑腐病菌 *Xanthomonas campestris* 所生成的多醣體，由甘露糖(mannose)、葡萄糖(glucose)，及葡糖醛酸(glucuronic acid)構成。其主鏈由 $\beta$ -1,4鍵結的葡萄糖。側鏈對主鏈的比率較大，側鏈所含有的羧酸基(carboxyl group)與由丙酮酸(pyruvic acid)而來的負電荷，構成為擁有較大負電荷的酸性多醣類。三仙膠被廣泛使用於口服藥物的賦型劑，做為穩定與分散藥物用[80]。

## 1.7 雞隻黏膜感染病毒

### 新城病毒的病毒學特性

新城病毒(Newcastle disease virus, NDV)最早被記載於 1926 年在印度尼西亞的爪哇始爆發流行，並且蔓延於全世界[1]。由鳥類分離出來，是一種副黏液病毒屬(Paramyxovirus, PMV)，1956 年以前鳥類副黏液病毒沒有明顯的第二種血清型，但近年已由鳥類分離到數群的 PMV 病毒，用傳統的血清學試驗，將之分類成九種不同的病毒群，即 PMV-1~PMV-9。新城病毒其具有單股 RNA，病毒顆粒一般為橢圓形，有時為多形狀，其大小約 150-300 nm [81]。

## 新城病毒之感染途徑和傳播方式

### 感染途徑：

新城病毒經由上呼吸到進入到雞隻體內，病毒顆粒會先在氣管繁殖，然後釋放入血液循環，再進入內臟器官繁殖接著又釋出病毒到血液中形成第二個循環，病毒進入神經系統後，感染雞隻開始發生新城病症狀，開始排出病毒到循環中，病毒之排出經呼吸氣管及糞便。

### 傳播方式：

新城病毒顆粒經由呼吸道的分泌物及糞便一起排出體外，並可藉由空氣傳播給其他雞隻。



## 第二章 論文研究目的

目前認為微脂粒具有黏膜佐劑的作用，但到目前為止，應於禽類的點鼻接種，其免疫效果仍未被研究，由於禽類微脂粒點鼻接種疫苗模式的缺乏，研究仍有限，特別是不同材料之微脂粒佐劑對於後天性免疫反應的影響，所知更有限。有鑑於此，本論文的研究目標如下：

1. 比較點鼻接種活新城病毒與以微脂粒包覆活新城病毒，在雞身上引發之免疫反應。論文首先評估微脂粒免疫促進抗體生成的效果，與建立微脂粒點鼻接種雞隻之動物模式。
2. 探討不同電性材料組成之微脂粒包覆去活化之新城病毒於雞隻點鼻接種後之免疫反應，其中探討微脂粒點鼻接種次數與免疫反應效果。
3. 以 LPS 塗覆於微脂粒表面，藉由免疫細胞上 TLR4 之先天性免疫反應之辨認，此種先天性免疫細胞的重要細胞表面接受器為對象，比較 LPS 免疫刺激劑之輔助佐劑效果。
4. 增加微脂粒黏著度，以具有生物黏著性之三仙膠或銀耳多醣塗覆於微脂粒表面，比較生物黏膠材料微脂粒接種後於雞隻產生免疫反應的效果。
5. 微脂粒佐劑使不活化新城病毒之抗體表達加強，但對於微脂粒與雞的免疫反應角色並不清楚，因此論文的最後一部分是比較微脂粒對於雞免疫細胞之機制之探討。

## 第三章 材料與方法

### 3.1 實驗動物

9-11 日齡之無特定病源 Specific Pathogen Free (SPF)種蛋與 4 週齡 SPF 來亨氏雞 (white leghorn chickens)。動物來源為行政院農委會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所購買。動物實驗依據農委會之動物福利照護與校內實驗動物實施準則。

### 3.2 病毒

#### (1) 免疫株

以福馬林不活化新城病毒(La Sota strain)做為抗原其病毒力價  $10^{9.8}$  EID<sub>50</sub>/mL 由台灣生物製劑股份有限公司提供。

#### (2) 攻毒株

病毒佐藤株(Sato strain)病毒力價 1000 MLD 由台灣生物製劑股份有限公司提供。



### 3.3 實驗試藥及分析試劑

#### 3.3.1 試劑藥品

1,2-di-O-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC),  
1,2-di-palmitoyl-*sn*-glycero-3- phospho-L-serine (DPPS) 購自 Avanti Polar Lipid (USA), Epikuron 200SH Phosphatidylcholine (PC) 購自 Degussa BioActives (Hamburg, Germany) 。 Stearylamine (SA) 、 3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholestene (Cholesterol) 、 Carbonate-Bicarbonate 、 Tween 20 、 Chloroform 、 Tris-NaCl 、 Tris 、 NaCl 、 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 、 Bovine Serum Albumin (BSA) 、 1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) 、 PBS 、 LPS (*Escherichia coli*

0127:B8) 、 Xanthan gum 、 DEPC water 、 Isopropanol 和 BCIP/NBT 購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 。 3,3',5,5''-tetramethyl benzidine (TMB) 、 Protease inhibitor cocktail 和 Phosphatase inhibitor cocktail 、 Taq enzyme 、 dNTP 和 SYBR green 購自 Bionovas Biotechnology (USA) 。 p38 MAPK inhibitor (SB-203580) 、 MAPK kinase (MEK) inhibitor (U-0126) 和 I $\kappa$ B phosphorylation inhibitor (Bay 11-7085) 購自 Biomol (Plymouth, PA, USA) 。 BCA Kit 購自 Pierce Biotechnology (Thermo Scientific, USA) 。 Agarose 和 MTS 購自 Promega (USA) 。 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit 購自 Applied Biosystems (USA) 。 Ficoll-Paque 購自 Amersham Pharmacia Biotech (USA) 。 RPMI-1640 、 RPMI-1640 W/O phenol red 、 PS 、 Trypsin-EDTA 、 FBS 、 FCS 購自 Gibco (USA) 。

Primer 購自 MB Mission Biotech (Taiwan) :

Sato HN :

forward : 5'-GTA CCC TCC AAT CCC AAA CT-3'

reverse : 5'-TCC GGA TCT GGT AAT CTT GC-3'



Chicken GAPDH :

forward : 5'-GGC CGC CTG GTC ACC AGG GCT GCC-3'

reverse : 5'-GGA GGA GTG GGG GAG ACA GAA GGG-3'

### 3.3.2 抗體

(1) Goat anti-chicken IgG conjugated HRP 購自 Bethyl Laboratories (USA) 。

(2) Goat anti-chicken IgA conjugated HRP 購自 Bethyl Laboratories (USA) 。

(3) Goat anti-chicken IgM conjugated HRP 購自 Bethyl Laboratories (USA) 。

(4) Mouse anti-chicken antibody (CVI-ChNL-68.1) 購自 Prionics AG (USA) 。

- (5) Goat anti-mouse IgG-FITC 購自 Invitrogen (USA)
- (6) Beta-actin mouse monoclonal IgG<sub>1</sub> 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)
- (7) p-p-38 MAPK rabbit polyclonal IgG 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)
- (8) p-ERK mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub> 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)
- (9) NF-kappa B p-50 rabbit polyclonal IgG 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)
- (10) NF-kappa B p-65 rabbit polyclonal IgG 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)
- (11) Goat anti-mouse IgG-AP 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)
- (12) Goat anti-rabbit IgG-AP 購自 Santa Cruz Biotechnology (USA)

### 3.3.3 塑膠、玻璃製品與膜

- (1) 酵素免疫連結分析：Maxisorp ELISA Immuno plate 96 微孔盤購自 Nunc (USA)
- (2) 血球凝集抑制試驗：U 型 96 微孔盤購自 Greiner (Germany)
- (3) 細胞培養：96 微孔、24 微孔和 6 微孔細胞培養平盤購自 Nunc (USA)
- (4) 蛋白質與一氧化氮偵測：96 微孔平盤購自 Greiner (Germany)
- (5) PVDF Membrane
- (6) PC membrane

## 3.4 微脂粒包覆病毒抗原

### 3.4.1 微脂粒配方

- (1) 脂質濃度 20mM, DPPC : Cholesterol=4 : 1
- (2) 脂質濃度 20mM, DPPC : DPPS : Cholesterol=3 : 1 : 1
- (3) 脂質濃度 20mM, DPPC : SA : Cholesterol=3 : 1 : 1

### 3.4.2 製備流程

- (1) 將脂質秤重後加入磨口圓底燒瓶中，加入適量 chloroform 使其脂質完全溶解。
- (2) 磨口圓底燒瓶接上減壓濃縮機，水浴溫度於 55°C 持續抽乾 1 小時至形成完整薄膜於瓶底。
- (3) 加入 NDV 抗原液於圓底燒瓶
- (4) 使用水浴式超音波震盪機，使磨口圓底燒瓶內之薄膜震下以形成微脂粒
- (5) 再以探針式超音波震微脂粒以形成單層大顆微脂粒

### 3.4.3 粒徑、界面電位與包覆率

#### (1) 粒徑分析

- I. 取微脂粒疫苗置於乾淨之 4mL 四面透光樣品槽中，再以二次水稀釋
- II. 將樣品槽置於 BIC 90 PLUS 粒徑暨界面電位分析儀
- III. 設定參數(包括黏度、折色率等)進行測量。
- IV. 每個樣品測量 10 次，取得粒徑平均值。



#### (2) 界面電位分析

- I. 樣品插入電極，置於 BIC 90 PLUS 粒徑暨界面電位分析儀中接上電源。
- II. 設定參數(溫度、溶劑、折射率...等)進行測量。
- III. 每個樣品測量 10 次，取得界面電位平均值。

#### (3) 包覆率分析

- I. 將微脂粒疫苗置於離心管，離心轉速 100,000g，離心時間 1 小時，溫度 4°C。
- II. 離心之後取上清液。
- III. 利用分光光度計檢測吸光值(OD 280nm)。

IV. 計算抗原被包覆之總量。

### 3.4.4 相轉移溫度

- (1) 將微脂粒置入試樣容器(pan)中，以密封試樣容器的機器將試樣容器密封，避免液體外漏。
- (2) 打開DSC電源，熱機20分鐘。
- (3) 將待測樣品放在爐子上後將上蓋密封，設定掃描速率(scanning rate)、掃描溫度範圍(scanning range)等參數。
- (4) 待系統平衡後啟動實驗。儀器會依照所設定的實驗方法進行相轉移溫度的量測，並記錄其熱量變化。
- (5) 實驗結束後分析圖形可得相轉移溫度。



### 3.4.5 螢光微脂粒

微脂粒配方如下

- (1) 脂質濃度 20mM, DPPC : Cholesterol : DiI=4 : 1 : 0.04
- (2) 脂質濃度 20mM, DPPC : DPPS : Cholesterol : DiI=3 : 1 : 1 : 0.04
- (3) 脂質濃度 20mM, DPPC : SA : Cholesterol : DiI=3 : 1 : 1 : 0.04

### 製備流程

- (1) 將螢光脂質(DiI)與脂質秤重後加入磨口圓底燒瓶中，加入適量 chloroform 使其脂質完全溶解。
- (2) 磨口圓底燒瓶接上減壓濃縮機，水浴溫度於 55°C 持續抽乾 1 小時至形成完整薄膜於瓶底。
- (3) 加入 PBS 抗原液於圓底燒瓶

(4) 使用水浴式超音波震盪機，使磨口圓底燒瓶內之薄膜震下以形成微脂粒

(5) 再以擠壓器將微脂粒擠壓形成粒徑均一的單層大顆微脂粒

### 3.4.6 雙佐劑微脂粒

將 1 mL LPS (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 與上述 <3.4 微脂粒包覆病毒抗原> 製備得之微脂粒各 0.6 mL 均勻混合。

### 3.4.7 銀耳多醣微脂粒和三仙膠微脂粒

將 1 mL 1% Tremella 或 1mL 0.2% Xanthan gum 與上述 <3.4 微脂粒包覆病毒抗原> 製備得之中性電荷微脂粒 1 mL 均勻混合。

## 3.5 免疫接種、採血與鼻與氣管沖洗液

(1) 免疫前採血做為陰性對照：

經血球抑制凝集試驗確認每隻雞 NDV 抗體 HI 力價 < 2，始進行免疫接種。

雞隻點鼻免疫組別與次數由下表表示：

	PBS	活新城病毒微脂粒疫苗接種劑量	不活化新城病毒微脂粒疫苗接種劑量	多醣使用劑量	一次免疫	二次免疫	三次免疫
Con	30 $\mu\text{L}$	—	—	—	—	—	—
NDV	—	30 $\mu\text{L}$	—	—	—	√	—
NDV	—	—	60 $\mu\text{L}$	—	√	√	√
PC-Lip	—	30 $\mu\text{L}$	—	—	—	√	—
PC-Lip	—	—	30 $\mu\text{L}$	—	—	√	—
PC-Lip	—	—	60 $\mu\text{L}$	—	√	√	√
PC-Lip	—	—	120 $\mu\text{L}$	—	√	—	—
PS-Lip	—	30 $\mu\text{L}$	—	—	—	√	—

PS-Lip	—	—	60 $\mu$ L	—	√	√	√
SA-Lip	—	30 $\mu$ L	—	—	—	√	—
SA-Lip	—	—	60 $\mu$ L	—	√	√	—
NDV-LPS	—	—	60 $\mu$ L	100 $\mu$ L	√	√	√
PC-Lip-LPS	—	—	60 $\mu$ L	100 $\mu$ L	√	√	√
PS-Lip-LPS	—	—	60 $\mu$ L	100 $\mu$ L	√	√	√
SA-Lip-LPS	—	—	60 $\mu$ L	100 $\mu$ L	√	√	—
NDV	—	—	100 $\mu$ L	—	—	√	—
PC-Lip	—	—	100 $\mu$ L	—	—	√	—
Tremella-PC-Lip	—	—	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	—	√	—
Xanthan-gum-PC-Lip	—	—	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	—	√	—

## (2)點鼻接種時間

一次免疫週齡均為四週齡，二次免疫時週齡均為五週齡，三次免疫時週齡均為六週齡



## (3)採血

一次免疫組採血日在四週齡、五週齡和六週齡；二次免疫組採血日在四週齡、五週齡、六週齡和七週齡；三次免疫組採血日在四週齡、五週齡、六週齡、七週齡和八週齡；血清取得步驟如下：

由雞靜脈以 3.5 mL 真空採血管採集血液，將真空採血管以 2500 rpm 離心 30 分鐘，取得血清以 56°C 水浴 30 分鐘去除補體，分裝於微量離心管保存於-20°C 待抗體確效使用。

## (4)鼻與氣管沖洗液取得

一次免疫組為六週齡時取得，二次免疫組為七週齡時取得，三次免疫組為八週齡時取得；鼻與氣管沖洗液取得步驟如下：

將雞以二氧化碳安樂死，迅速將雞隻縱向解剖，取出氣管將 4 mL 緩衝液（1 mM PBS 加 0.1% BSA）注入，由雞鼻孔取得鼻與氣管沖洗液，再分裝後保存於-20℃。

### 3.6 血球抑制凝集試驗與酵素免疫連結分析法

#### (1) 血球抑制凝集試驗 (HI test)

將 U 型 96 微孔盤注入 50  $\mu$ L 0.85%，血清於冰上退冰，待血清完全溶解後，各取 50  $\mu$ L 血清注入 U 型 96 微孔盤的第一列，連續 2 倍稀釋血清，將 4HAU 之 NDV 病毒 50  $\mu$ L 注入 96 孔於室溫下感作 60 分鐘，將 50  $\mu$ L 之 1% RBC (red blood cell) 注入 96 孔於室溫下感作 60 分鐘，以肉眼判讀數據。

#### (2) 酵素免疫連結分析法 (ELISA)

測定血清、鼻與氣管沖洗液之抗體

- I. 將 NDV 抗原以 coating buffer 1:1000 稀釋，注入 50 $\mu$ L 於 96 微孔盤中，置於 4℃ 反應隔夜
- II. 取出 96 微孔盤並將溶液甩乾，注入 wash buffer 於每孔中，甩乾溶液，重覆此動作 3 次，甩乾 96 微孔盤中殘餘之溶液
- III. 每孔加入 50  $\mu$ L blocking buffer 於室溫下作用 30 分鐘；注入 wash buffer 於每孔中，甩乾溶液，重覆此動作 5 次，甩乾 96 微孔盤中殘餘之溶液
- IV. 在 96 孔中加入 50  $\mu$ L 之抗體檢體於室溫下作用 1 小時  
血清：以 sample conjugate buffer 稀釋之血清  
鼻與氣管沖洗液：原倍之鼻與氣管沖洗液
- V. 將 96 微孔盤內之溶液甩乾，注入 wash buffer 於每孔中，甩乾溶液，重覆此動作 4 次，甩乾 96 微孔盤中殘餘之溶液
- VI. 在 96 孔中加入 50  $\mu$ L 抗體於室溫下作用 1 小時

- VII. 將 96 微孔盤內之溶液甩乾，注入 wash buffer 於每孔中，甩乾溶液，重覆此動作 4 次，甩乾 96 微孔盤中殘餘之溶液
- VIII. 加入 50  $\mu$ L TMB 作用 30 分鐘
- IX. 加入 50  $\mu$ L 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- X. 以 OD 450 nm 酵素免疫分析儀/微量盤判讀儀偵測

### 3.7 攻毒實驗

#### (1) 點鼻攻毒劑量測定

將雞分為 7 組每組各 6 隻，每組分別給予 300  $\mu$ L ( $1 \times 10^{1.0-7.0}$  EID<sub>50</sub>/mL) 新城病毒強毒株 Sato 原液，攻毒後觀察 1 週，定義 1 MLD 之病毒劑量。

#### (2) 點鼻攻毒試驗

經接種疫苗之雞隻於免疫後第 14 天給予點鼻攻毒 1000 MLD 之 Sato 強毒株，觀察 14 天並記錄各組存活隻數與發病症狀。



### 3.8 雞脾臟細胞分離

- (1) 將未免疫過的雞以二氧化碳犧牲取得脾臟，取出脾臟並浸泡於冰 PBS 中
- (2) 將脾臟磨碎，脾臟細胞緩緩注入 5 mL Ficoll-Paque 中，於室溫下離心 30 分鐘
- (3) 輕輕地抽取分離出的霧狀環帶層之細胞
- (4) 以 PBS 洗細胞，於室溫下離心 3 分鐘
- (5) 去除上清液，再緩緩加入 RPMI-1640 培養液
- (6) 以 Trypen blue 於顯微鏡下數細胞

### 3.9 共軛焦顯微鏡

- (1) 將未免疫過的雞以二氧化碳犧牲取得脾臟，以  $10^4$  cells/mL 雞脾臟細胞培養於  $41^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (2) 去除培養液加入不含 FBS/FCS 之 RPMI-1640 培養液作用過夜於  $41^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (3) 加以 10  $\mu\text{L}$  各組成份之 <3.4.5 螢光微脂粒>，共同培養 24 小時於  $41^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (4) 去除培養液加入冰 PBS
- (5) 去除 PBS 加入以 PBS 配製之 0.5% paraformaldehyde 15 分鐘
- (6) 去除 0.5% paraformaldehyde 並以 PBS 輕輕洗細胞
- (7) 加入以 3% BSA/PBS 配製之 CVI-ChNL-68.1 抗體作用 1 小時於  $4^\circ\text{C}$
- (8) 以 PBS 輕輕洗細胞
- (9) 加入以 3% BSA/PBS 配製之 Goat anti-mouse IgG-FITC 抗體作用 1 小時於室溫
- (10) 以共軛焦顯微鏡 Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System 觀察螢光微脂粒被脾臟細胞之單核/巨噬細胞胞吞量



### 3.10 RT-PCR 偵測病毒

- (1) 將攻毒後存活的雞隻以二氧化碳犧牲，取出氣管、肝臟、脾臟和肺臟，將檢體凍於  $-80^\circ\text{C}$  待使用
- (2) 各部位之組織秤重 50g，加入液態氮研磨成粉狀，加入 1mL TRIzol 與粉末劇烈混合
- (3) 加入 200  $\mu\text{L}$  Chloroform 劇烈混合，以 12000 rpm 離心 30 分鐘
- (4) 取上清液約 500  $\mu\text{L}$ ，加入等量之 isopropanol 充分混合，以 12000 rpm 離心 30 分鐘於  $4^\circ\text{C}$
- (5) 取上清液，加入冰的 75%酒精，以 7500 rpm 離心 15 分鐘於  $4^\circ\text{C}$
- (6) 去除上清液，待酒精揮發後加入 DEPC 水

- (7) 以 260/280 nm 測 RNA 純度與濃度
- (8) 取 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  之 total RNA 以 ABI reverse transcriptase kit 於 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 2 小時
- (9) 取 3  $\mu\text{L}$  cDNA 加入 Sato primer、Taq、dNTP 和二次水，由 95 $^{\circ}\text{C}$  起始 62 $^{\circ}\text{C}$  雜合  
共 30 個循環
- (10) 取 10  $\mu\text{L}$  PCR 產物，加入 2% 洋菜(含 SYBR green) 膠電泳約 30 分鐘
- (11) 以 UV 箱照膠比對 PCR 產物

### 3.11 材料對細胞之毒性偵測

- (1) 將未免疫過的雞以二氧化碳犧牲取得脾臟，以  $10^4$  cells/mL 雞脾臟細胞培養  
96 well 於 41 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (2) 去除培養液加入含 10%FBS/5%FCS 之 RPMI-1640 培養液作用過夜於 41 $^{\circ}\text{C}$   
5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (3) 去除 100  $\mu\text{L}$  培養液加以 100  $\mu\text{L}$  培養液與 10  $\mu\text{L}$  各組成份之微脂粒，共同培  
養 24 小時於 41 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (4) 每 well 加入 20  $\mu\text{L}$  之 MTS 溶液，作用 4 小時於 41 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (5) 以 490 nm 酵素免疫分析儀/微量盤判讀儀偵測

### 3.12 偵測細胞培養液中 NO

- (1) 將未免疫過的雞以二氧化碳犧牲取得脾臟，以  $10^6$  cells/mL 雞脾臟細胞培養  
24 well 於 41 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (2) 去除培養液加入含 10%FBS/5%FCS 之 RPMI-1640 培養液作用過夜於 41 $^{\circ}\text{C}$   
5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱
- (3) 去除 1.2 mL 培養液加入 700  $\mu\text{L}$  10%FBS/5%FCS 之 non phenol red  
RPMI-1640 培養液，加入 p38 MAPK inhibitor (SB-203580)、MAPK kinase

- (MEK) inhibitor (U-0126) 和 I $\kappa$ B phosphorylation inhibitor (Bay 11-7085)於 41°C 5% CO<sub>2</sub> 培養 1 小時
- (4) 加入 1  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 各組成份之微脂粒、多醣材料，共同培養 24 小時於 41°C 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培箱
  - (5) 將細胞培養液加 50  $\mu$ L 於 96 well 中加入 Greiss reagent 溶液(1% sulfanilamide 和 50  $\mu$ L 之 0.1% naphthylenediamine (溶於 2.5% phosphoric acid solution))
  - (6) 以 570 nm 酵素免疫分析儀/微量盤判讀儀偵測

### 3.13 西方點墨法偵測蛋白質表現

- (1) 雞隻經由微脂粒疫苗免疫後 2 週以二氧化碳安樂死，取出脾臟凍於-80°C 待使用
- (2) 脾臟秤重並剪碎脾臟組織，加入 RIPA buffer (已加入 protease inhibitor cocktail/phosphatase inhibitor cocktail)於冰上作用 10 分鐘
- (3) 於 4°C 離心 30 分鐘後取上清液，保存於-20°C 或即時使用
- (4) 蛋白質濃度以 BCA Kit 偵測
- (5) 各取 30  $\mu$ g 蛋白質跑 SDS-PAGE
- (6) 將 SDS-PAGE 上的蛋白質轉漬於 PVDF Membrane
- (7) 將 PVDF Membrane 浸於 3% BSA-PBST blocking solution 30 分鐘
- (8) 以 PBST 洗 PVDF Membrane 3 次每次 10 分鐘
- (9) 加入以 PBST 稀釋 1000 倍之 Beta-actin 抗體、p-p-38 MAPK 抗體、p-ERK 抗體、NF-kappa B p-50 抗體和 NF-kappa B p-65 抗體，於 4°C 作用隔夜
- (10) 以 PBST 洗 PVDF Membrane 3 次每次 10 分鐘
- (11) 加入以 PBST 稀釋 5000 倍之 Goat anti-mouse IgG-AP 和 Goat anti-rabbit IgG-AP 於室溫作用 1 小時
- (12) 以 PBST 洗 PVDF Membrane 3 次每次 10 分鐘

(13) 加入 BCIP/NBT 呈色



## 第四章 結果

### (一)佐劑材料之物理性質分析

#### (1) 微脂粒粒徑與包覆率分析

由三種電性電荷組成之磷脂質構成的多層微胞微脂粒(MLV)，包覆分散於緩衝液中的活新城病毒或不活之新城病毒抗原，經由雷射粒徑分析儀分析，其平均粒徑為1030-1223 nm，由包覆率試驗分析多層微胞微脂粒的病毒包覆率為中性電荷微脂粒 PC-Lip 的 20.58%，負電荷微脂粒 PS-Lip 的 2.57%，正電荷微脂粒 SA-Lip 的 43.26% (表一)。

#### (2) 微脂粒界面電位與相轉移溫度分析

為評估微脂粒佐劑的電荷特性，將製備完成的微脂粒新城病毒疫苗各組，利用界面電位分析儀檢測各微脂粒新城病毒疫苗的粒子電性。從實驗數據可見，中性電荷微脂粒 PC-Lip 的界面電位為-17.70 mV，負電荷微脂粒 PS-Lip 的界面電位為-51.79 mV，正電荷微脂粒 SA-Lip 的界面電位為 33.52 mV。經由熱差微分分析儀(DSC)分析各組成份之多層微胞微脂粒，其相轉移溫度為中性電荷微脂粒 PC-Lip 的 43.0°C，負電荷微脂粒 PS-Lip 的 62.0°C，正電荷微脂粒 SA-Lip 的 58.0°C(表一)。

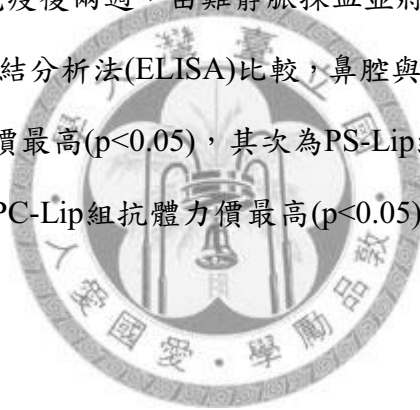
### (二)活毒與微脂粒包覆活毒抗體分析

四週齡白色來亨氏雞分成三組，每組各七隻雞。分別給予點鼻接種活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為NDV組)，以中性電荷微脂粒包覆活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為EPC-Lip組)，以及接受PBS 30  $\mu$ L(為Control組)。在免疫後第七日，由雞靜脈採血並將雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與氣管沖洗

液中分泌型s-IgA抗體與血清中IgG抗體均為中性電荷微脂粒包覆活新城病毒組(EPC-Lip組)生成抗體力價較高。顯示以微脂粒包覆活病毒抗原，能有效提升雞隻體內抗體生成量無論在局部的黏膜部位或是全身性的血液部位(圖一)。

### (三)不同電荷微脂粒包覆活毒抗體分析

四週齡白色來亨氏雞分成五組，每組各十隻雞。分別給予點鼻接種活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為NDV組)，以中性電荷微脂粒包覆活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為EPC-Lip組)，負電荷微脂粒包覆活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為PS-Lip組)，正電荷微脂粒包覆活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為SA-Lip組)，以及接受PBS 30  $\mu$ L(為Control組)。兩週後進行第二次點鼻免疫接種，在二次免疫後兩週，由雞靜脈採血並將雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與氣管沖洗液中分泌型s-IgA抗體以EPC-Lip組抗體力價最高( $p < 0.05$ )，其次為PS-Lip組(統計上無顯著差異)(圖二)。血清中IgG抗體為EPC-Lip組抗體力價最高( $p < 0.05$ )，其次為PS-Lip組(統計上無顯著差異)(圖三)。



### (四) 抗體生成曲線與微脂粒包覆不活化病毒劑量比較

#### (1) 抗體生成曲線

四週齡白色來亨氏雞分成二組，每組各二十一隻雞。分別於給予點鼻接種活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為Live NDV組)，以中性電荷微脂粒包覆活新城病毒抗原30  $\mu$ L(為Liposomal-inactivated NDV組)。於點鼻接種後每組每兩日犧牲三隻雞，以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與氣管沖洗液中分泌型s-IgA抗體，在第三日至第八日雞隻接種Liposomal-inactivated NDV組均有較多量之s-IgA抗體生成，由第九日起雞隻Live NDV組的分泌型s-IgA抗體逐漸減少但是抗體生成量均比接種Liposomal-inactivated NDV組抗體生成量為多，而接種

Liposomal-inactivated NDV組的雞隻黏膜部位抗體生成量逐漸減少。顯示以微脂粒包覆不活化抗原以點鼻接種雞隻，在黏膜部位抗體生成發生時間較活毒迅速(圖四)。

## (2)微脂粒包覆不活化病毒劑量比較

四週齡白色來亨氏雞分成五組，每組各七隻雞。分別於給予點鼻接種不同劑量之不活化新城病毒抗原，分別為60  $\mu$ L(為Virus alone組)，60  $\mu$ L(為Lip PC-ND組)，30  $\mu$ L(為Low dose Lip PC-ND組)，120  $\mu$ L(為High dose Lip PC-ND組)以及接受PBS 30  $\mu$ L(為Control組)。於免疫後兩週，將雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與氣管沖洗液中分泌型s-IgA抗體以接種60  $\mu$ L(為Lip PC-ND組)抗體力價最高( $p < 0.01$ )，其次為接種120  $\mu$ L(為High dose Lip PC-ND組) ( $p < 0.05$ 與Control組比較)但僅比Virus alone組的s-IgA抗體生成量多，但統計上無顯著差異(圖五)。因此，本研究在接下來的研究主題，比較不同電荷材料組成微脂粒包覆不活化病毒或添加脂多醣、黏性多醣體之研究中，均以微脂粒包覆60  $\mu$ L之抗原接種劑量做比較。

## (五)微脂粒包覆不活化新城病毒抗體分析

### (1)黏膜抗體表現量

四週齡白色來亨氏雞分成五組，每組各二十隻雞。分別於給予點鼻接種同劑量(60  $\mu$ L)，但不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原，分別為Virus alone組、PC-Lip組、PS-Lip組、SA-Lip組以及接受PBS 30  $\mu$ L(為Control組)。在一次免疫後一週，隨機取十隻雞進行雞靜脈採血並將雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。同時，將剩餘的十隻雞進行第二次點鼻免疫接種，在二次免疫後兩週，由雞靜脈採血並將雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與

氣管沖洗液中分泌型s-IgA抗體比較，在各組雞隻接受二次免疫接種微脂粒疫苗，均可提升黏膜抗體表現量，其中一次與二次免疫後分泌型s-IgA抗體比較有顯著差異組別為接種PC-Lip組、PS-Lip組和SA-Lip組( $p<0.05$ )。唯接種Virus alone組在兩次抗體比較均無顯著上升，表示在黏膜部位只接種不活化抗原是無法提升抗體表現量。在比較不同電性微脂粒各組成份，經由一次點鼻免疫或是二次點鼻免疫接種PC-Lip組抗體力價最高( $p<0.01$ ) (圖六A)。

## (2)血清抗體表現量

雞隻接受的免疫計畫同上，由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較血清中anti-NDV IgG抗體生成量，在各組雞隻接受二次免疫接種微脂粒疫苗，均可提升全身性抗體表現量，其中一次與二次免疫後IgG抗體生成量比較有顯著差異組別為接種PC-Lip組( $p<0.05$ )。較特別的在接種Virus alone組、PS-Lip組和SA-Lip組在兩次抗體比較均無顯著上升，表示在黏膜部位接種不活化抗原、PS-Lip包覆或SA-Lip是無法提升血清中抗體表現量。在比較不同電性微脂粒各組成份，經由一次點鼻免疫或是二次點鼻免疫接種PC-Lip組抗體力價最高( $p<0.01$ ) (圖六B)。

## (六)脂多醣體塗覆微脂粒包覆不活化新城病毒抗體分析

### (1) 脂多醣體給予時間

雞隻隨機分成兩組，每組各五隻雞，其中一組雞隻在免疫接種微脂粒疫苗前 24 小時先給予脂多醣體 LPS，另一組雞隻免疫接種微脂粒疫苗同時給予微脂粒疫苗和脂多醣體 LPS，於免疫後一星期，取得鼻腔與氣管沖洗液，發現在同時給予微脂粒疫苗和脂多醣體 LPS 組別的雞隻不論是 IgA、IgG 和 IgM 均產生較多專一性的抗體(圖八)。

## (2) 黏膜抗體表現量

依照免疫接種次數分為一次免疫(七隻)、二次免疫(七隻)和三次免疫(七隻)。免疫期間間隔為一週，分別於給予點鼻接種同劑量(60  $\mu$ L)，但不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原，分別為 Virus alone 組、PC-Lip 組、PS-Lip 組、SA-Lip 組，接種同劑量(160  $\mu$ L，其中微脂粒疫苗 60  $\mu$ L 與脂多醣體 LPS 100 $\mu$ L)不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原同時塗覆脂多醣體 LPS，分別為 Virus-LPS 組、PC-Lip-LPS 組、PS-Lip-LPS 組、SA-Lip-LPS 組，以及接受 PBS 30 $\mu$ L (為 Control 組)。在各次免疫後兩週，隨機取七隻雞進行雞靜脈採血並將雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與氣管沖洗液中分泌型 s-IgA 抗體比較，在各組雞隻接受二次免疫接種微脂粒疫苗，均可提升黏膜 s-IgA 抗體表現量，唯獨在 PC-Lip-LPS 組抗體生成量反而降低。整體比較經由一次點鼻免疫或是二次點鼻免疫接種 PC-Lip 組抗體力價最高( $p < 0.01$ )，顯示脂多醣體 LPS 塗覆微脂粒在點鼻接種後，在黏膜生成之抗體量無明顯助益(圖九)。

## (3) 血清抗體表現量

雞隻接受的免疫計畫同上，由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較血清中 Anti-NDV IgG 抗體生成量，在各組雞隻接受兩次免疫接種微脂粒疫苗，其中僅在 PC-Lip 組 ( $p < 0.05$ )、PC-Lip-LPS ( $p < 0.05$ ) 組和 SA-LPS 組是二次免疫後抗體生成量提升(圖九)。

## (七) 血球抑制凝集試驗

### (1) 血清抗體表現量

四週齡白色來亨氏雞分成九組，每組各二十一隻雞。依照免疫接種次數分為一次免疫(七隻)、二次免疫(七隻)和三次免疫(七隻)。免疫期間間隔為一週，分別於給予點鼻接種同劑量(60  $\mu$ L)，但不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原，分別為

Virus alone 組、PC-Lip 組、PS-Lip 組、SA-Lip 組，接種同劑量(160  $\mu$ L，其中微脂粒疫苗 60  $\mu$ L 與脂多醣體 LPS 100  $\mu$ L)不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原同時塗覆脂多醣體 LPS，分別為 Virus-LPS 組、PC-Lip-LPS 組、PS-Lip-LPS 組、SA-Lip-LPS 組，以及接受 PBS 30  $\mu$ L (為 Control 組)。於每週隨機取七隻雞進行雞靜脈採血。以血球抑制凝集試驗比較，各組雞隻接受接種微脂粒疫苗於一次免疫、二次免疫和三次免疫在血清中抗體表現量。由表二顯示在一次免疫後 PC-Lip 組和 PC-Lip-LPS 組的血清稀釋 640 倍後，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。PS-Lip 組血清僅能稀釋至 40 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。PS-Lip-LPS 組血清僅能稀釋至 20 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。Virus alone 組和 Virus-LPS 組血清僅能稀釋至 10 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。SA-Lip 組和 SA-Lip-LPS 組血清僅能稀釋至 8 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。在接受二次免疫接種後，各組血球抑制凝集力價均提高，尤其在 PS-Lip-LPS 組血清僅能稀釋至 2560 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。且在 PC-Lip 組、PC-Lip-LPS 和 PS-Lip 組血清之血球抑制凝集力價提高至 1280 倍。唯 SA-Lip 組和 SA-Lip-LPS 組血清之血球抑制凝集力價降低。在接受三次免疫接種後，PC-Lip 組、PC-Lip-LPS、PS-Lip 組和 PS-Lip-LPS 組血清僅能稀釋至 10240 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。Virus alone 組和 Virus-LPS 組血清僅能稀釋至 10 倍，SA 組和 SA-Lip 組則沒有測得數據。


## (2) 黏膜抗體表現量

雞隻接受的免疫計畫同上，於每週隨機取七隻雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。同時，將剩餘的雞隻進行第二次與第三次點鼻免疫接種，再犧牲雞隻以取得鼻腔與氣管沖洗液。以血球抑制凝集試驗比較，各組雞隻接受接種微脂粒疫苗於一次免疫、二次免疫和三次免疫在鼻腔與氣管沖洗液中抗體表現量。由表三顯示在一次免疫後 PC-Lip 組黏膜部位之抗體稀釋 32 倍後，仍然能有效地抑制紅血球

的凝集。PC-Lip-LPS 組黏膜部位之抗體稀釋 16 倍後，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。在接受二次免疫接種後，各組血球抑制凝集力價均提高，尤其在 PC-Lip、PC-Lip-LPS 組黏膜部位之抗體稀釋至 64 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。且在 PS-Lip 組和 PS-Lip-LPS 組黏膜部位之血球抑制凝集力價提高至 32 倍。唯 SA-Lip 組和 SA-Lip-LPS 組黏膜部位之血球抑制凝集力價降低。在接受三次免疫接種後，PC-Lip 組和 PC-Lip-LPS 組黏膜部位之抗體稀釋至 256 倍，仍然能有效地抑制紅血球的凝集。PS-Lip 組、PS-Lip-LPS 組、Virus alone 組和 Virus-LPS 組黏膜部位之血球抑制凝集力價均為 32 倍。SA 組和 SA-Lip 組則沒有測得數據。

## (八)攻毒試驗

### (1)點鼻攻毒劑量



依國家法規，不活化新城病疫苗效力試驗，需以新城病之強毒(佐藤株)1,000MLD 肌肉注射攻擊，經二週觀察，注射二劑量者均須健存，接種二分之一劑量者須有七五%以上，不呈反應或呈輕微反應後耐過而健存，對照雞，須呈典型新城病症而斃死。但本研究期望能模擬新城病感染途徑，故將攻毒方式改由以點鼻給予，新城病強毒株(佐藤株)1,000MLD。

首先將新城病強毒(佐藤株)做序列稀釋，由  $1 \times 10^{7.0}$  EID<sub>50</sub>/mL 稀釋至  $1 \times 10^{1.0}$  EID<sub>50</sub>/mL，每隻空白組試驗雞隻均給予 300  $\mu$ l 病毒液。病毒液濃度在  $1 \times 10^{4.0}$  EID<sub>50</sub>/mL 時，死亡率達到 50 % (圖十一)。由此結果得知，若以點鼻給予 300  $\mu$ l 新城病強毒(佐藤株)方式攻毒，其 1 MLD 為  $1 \times 10^{4.0}$  EID<sub>50</sub>/mL，並且實驗雞隻會在攻毒後約第 3-7 天內死亡。故本研究攻毒試驗將採用，點鼻給予 1,000 MLD 新城病強毒(佐藤株)，即給予每隻實驗雞隻 300  $\mu$ l ( $1 \times 10^{7.0}$  EID<sub>50</sub>/mL) 新城病強毒。

## (2)微脂粒包覆不活化病毒劑量比較點鼻攻毒結果

四週齡白色來亨氏雞分成五組，每組各十隻雞。分別於給予點鼻接種不同劑量之不活化新城病毒抗原，分別為 60  $\mu\text{L}$  (為 Virus alone 組)，60  $\mu\text{L}$  (為 Lip PC-ND 組)，30  $\mu\text{L}$  (為 Low dose Lip PC-ND 組)，120  $\mu\text{L}$  (為 High dose Lip PC-ND 組)以及接受 PBS 30  $\mu\text{L}$  (為 Control 組)。於免疫後兩週，進行攻毒試驗，每隻雞點鼻給予 1,000 MLD 新城強毒(佐藤株)，即給予每隻實驗雞隻 300  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^{7.0}$  EID<sub>50</sub>/mL)新城強毒。在給予一次接種後的實驗雞隻中，60  $\mu\text{L}$  (為 Lip PC-ND 組)可達到 80%的保護力，120  $\mu\text{L}$  (為 High dose Lip PC-ND 組) 可達到 50%的保護力，而 30  $\mu\text{L}$  (為 Low dose Lip PC-ND 組)僅存 20%雞隻存活。60  $\mu\text{L}$  (為 Virus alone 組)僅存 10%雞隻存活。接受 PBS 30 $\mu\text{L}$  (為 Control 組)雞隻則完全死亡(表四)。

## (3)脂多醣體塗覆微脂粒包覆不活化新城病毒比較點鼻攻毒結果

依照免疫接種次數分為一次免疫(十隻)、二次免疫(十隻)和三次免疫(十隻)。免疫期間間隔為一週，分別於給予點鼻接種同劑量(60  $\mu\text{L}$ )，但不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原，分別為 Virus alone 組、PC-Lip 組、PS-Lip 組、SA-Lip 組，接種同劑量(160  $\mu\text{L}$ ，其中微脂粒疫苗 60  $\mu\text{L}$  與脂多醣體 LPS 100  $\mu\text{L}$ )不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒抗原同時塗覆脂多醣體 LPS，分別為 Virus-LPS 組、PC-Lip-LPS 組、PS-Lip-LPS 組、SA-Lip-LPS 組，以及接受 PBS 30  $\mu\text{L}$  (為 Control 組)。在一次免疫後兩週，隨機取十隻雞進行點鼻攻毒試驗。在二次免疫後兩週，隨機取十隻雞進行點鼻攻毒試驗。在三次免疫後兩週，隨機取十隻雞進行點鼻攻毒試驗。點鼻攻毒病毒劑量為每隻實驗雞隻 300  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^{7.0}$  EID<sub>50</sub>/mL)新城病強毒。由表五所示，在給予一次接種後的實驗雞隻中，PC-Lip 組可達到 80 %的保護力，PC-Lip-LPS 組則達到 40%的保護力，而其餘四個組則僅有低於 30 %的保護力。其中以 Virus alone 組最差，僅有 10%的保護力。在給予二次接種後的實驗雞隻中，

PC-Lip 組可達到 90 %的保護力，PC-Lip-LPS 組、PS-Lip 組、PS-Lip-LPS 組均達到 80%的保護力。Virus alone 組、Virus-LPS 組和 SA-Lip-LPS 組僅達到 40%的保護力。在給予三次接種後的實驗雞隻中，PC-Lip 組、PC-Lip-LPS 組和 PS-Lip-LPS 組可達到 100 %的保護力(表五)。

### (九)黏著膠之黏度分析

將微脂粒與生物黏著膠均勻混合後於 41°C，剪切力為 0.09 s<sup>-1</sup> 得到之黏度值相比較，如表六所示。在此我們定義落在 500~600 cp 為高黏度物質，落在 200~300 cp 為中黏度物質(表六)。

### (十)黏著膠塗覆微脂粒包覆不活化新城病毒之抗體分析

#### (1)黏膜抗體表現量

四週齡白色來亨氏雞分成五組，每組各八隻雞。分別於給予點鼻接種同劑量之不活化新城病毒抗原，分別為100 μL (為NDV alone組)，100 μL (為Lip-PC-NDV組)，200 μL (為T+Lip-PC-NDV組)，200 μL (為XG+Lip-PC-NDV組)以及接受PBS 30 μL (為Control組)。共進行兩次點鼻免疫接種，於二次免疫後兩週進行雞隻犧牲以取得鼻腔與氣管沖洗液。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，鼻腔與氣管沖洗液中分泌型s-IgA抗體比較，T+Lip-PC-NDV組在黏膜分泌最多量之Anti-NDV s-IgA抗體(p<0.01)，其次則為Lip-PC-NDV組分泌抗體量高於XG+Lip-PC-NDV組與NDV alone組(p<0.05)(圖十一)。

#### (2)血清抗體表現量

雞隻接受的免疫計畫同上，於二次免疫後兩週進行雞隻靜脈採血。由酵素免疫連結分析法(ELISA)比較，血清中抗體量最高為T+Lip-PC-NDV組(p<0.01)，其次則為

XG+Lip-PC-NDV組(圖十二)。

### (3)血球抑制凝集試驗分析

雞隻接受的免疫計畫同上，於二次免疫後兩週進行雞隻靜脈採血。由血球抑制凝集試驗分析血清中抗體中和病毒之能力。最高的血球抑制凝集試驗抗體力價256為T+Lip-PC-NDV組，其次則為力價64屬XG+Lip-PC-NDV組、PC-Lip-NDV組和Virus alone組(表七)。

### (4)攻毒後結果

雞隻接受的免疫計畫同上，於二次免疫後兩週進行雞隻點鼻攻毒試驗，點鼻攻毒病毒劑量為每隻實驗雞隻300  $\mu$ L ( $1 \times 10^{7.0}$  EID<sub>50</sub>/mL)新城病強毒。由表七顯示，攻毒後雞隻在各組間發病狀態，其中控制組全體在第6.5天產生新城病的臨床症狀，在第8.5天死亡超過半數。Virus alone組、PC-Lip組和XG-PC-Lip組在第7天有半數雞隻產生臨床症狀。T-PC-Lip組在攻毒後有100%存活率，Lip-PC-NDV組、XG+Lip-PC-NDV組與NDV alone組均只維持60%存活率(表七)。

### (5)檢體分析病毒殘存量

將攻毒後存活的雞隻以二氧化碳犧牲，取出氣管、肝臟、脾臟和肺臟觀察在雞體內是否仍殘留Sato病毒。Sato病毒的RNA經RT-PCR分析後控制組雞隻體內殘留的病毒量最多且在各個分析部位都有病毒的殘存。T-PC-Lip組在氣管沒有病毒殘留，但是在肺臟、脾臟和肝臟都可以偵測到少量的病毒RNA。Virus alone組、PC-Lip組和XG-PC-Lip組在各部位都有病毒的RNA，經PCR檢定分析到病毒RNA量則均無明顯差異(表八)。

## (十一)微脂粒於雞脾臟巨噬細胞活性之影響

### (1)共軛焦顯微鏡

雞脾臟細胞培養於 41°C 且 5% CO<sub>2</sub> 的細胞培養箱，加入不同電荷組成之螢光微脂粒，共同培養 24 小時。共軛焦顯微鏡 Leica TCS SP5 Confocal Spectral Microscope Imaging System 觀察螢光微脂粒被脾臟細胞之單核/巨噬細胞胞吞量，由圖十三顯示，微脂粒成份 PC-Lip 聚集較多量於雞脾臟細胞中，其次則為微脂粒成份 SA-Lip，而被胞吞量最少的為微脂粒成份 PS-Lip。

### (2)微脂粒細胞毒性之分析

將不同材料之佐劑加入雞脾臟巨噬細胞共同培養 24 小時，由 MTS 試驗分析(圖十四)，可知在實驗中選用的材料都不具毒性，顯示在本實驗中的微脂粒材料與生物黏性材料與微脂粒都可以使細胞正常生長。

### (3)巨噬細胞活化一氧化氮之釋放

佐劑刺激免疫細胞使雞的巨噬細胞產生 NO 的釋出。將佐劑與雞脾臟巨噬細胞共同培養 24 小時，細胞上清液以 Greiss reagent 偵測 NO 的含量。控制組的雞脾臟巨噬細胞產生少量的 NO。給予微脂粒的巨噬細胞產生的 NO 為 6.09±4.7 uM (p<0.05)，給予三仙膠或脂多醣體的組別均產生 NO，且與劑量成正相關性。然而，給予銀耳多醣的組別則無產生 NO。顯示微脂粒、三仙膠與脂多醣體均會造成巨噬細胞的活化(圖十五)。

同樣地，我們將三種不同電荷材料的微脂粒加入培養液中與巨噬細胞共同培養 24 小時，各組成份微脂粒釋放出的 NO 與微脂粒劑量成正相關性，其中 PS-Lip 產生最多 NO(\* p<0.05, \*\*p<0.01 與控制組比較)。PC-Lip 刺激 NO 產生的量次之，在

使用劑量為 5  $\mu$ L 的 PC-Lip 時則明顯生成 NO(#  $p < 0.05$ )。SA-Lip 引起巨噬細胞活化的 NO 量則為最少(圖十六)。

更進一步，我們在細胞培養液中加入抑制劑：分別為 U0126 抑制 MAPK kinase (MEK) 訊息傳遞、SB-203580 抑制 p-38 MAPK 訊息傳遞和 Bay 11-7085 抑制 I $\kappa$ B 磷酸化訊息傳遞。U0126 抑制劑抑制訊息傳遞路徑中 MAPK 家族成員之一的 MEK1/2 為 ERK 路徑的上游，在使用 U0126 抑制劑比較，U0126 抑制 LPS (1  $\mu$ g/mL 及 10  $\mu$ g/mL) 刺激生成的 NO，U0126 抑制劑劑量影響抑制 NO 的量(圖十七)。SB-203580 為 pyridinyl imidazoles 之一，抑制 p38-MAPK 訊息傳遞路徑，SB-203580 (1  $\mu$ M 或 5  $\mu$ M) 都不能抑制微脂粒刺激產生 NO，SB-203580 確能夠抑制 LPS 產生 NO，抑制劑濃度愈高抑制效果愈明顯(圖十八)。脊椎動物細胞內 NF- $\kappa$ B 家族轉錄因子若仍處於靜止狀態，表示 NF- $\kappa$ B 與抑制型 I $\kappa$ B 蛋白質形成複合物。當細胞內訊息傳遞因子被活化時，I $\kappa$ B 蛋白質被磷酸化且由 NF- $\kappa$ B 釋放，接著進行細胞核的遺傳易位，接著啟動基因的轉譯。Bay 11-7085 藉由抑制 I $\kappa$ B 磷酸化以防止 NF- $\kappa$ B 的活化。Bay 11-7085 能夠抑制微脂粒生成 NO，使用的 Bay 11-7085 濃度愈高抑制效果愈明顯，並且能夠完全地抑制 LPS 產生 NO(圖十九)。

在微脂粒佐劑與巨噬細胞共同培養 24 小時，由使用的抑制劑可說明微脂粒刺激並活化免疫細胞的訊息傳遞路徑主要為活化 NF- $\kappa$ B 路徑與 MEK 路徑。

#### **(4) 蛋白質磷酸化訊息傳遞**

微脂粒疫苗點鼻後兩週，微脂粒疫苗引起有效的黏膜抗體與血清抗體，在經由攻毒後發現微脂粒疫苗僅有 60 % 的保護率，在 T-PC-Lip 組在攻毒後有 100 % 存活率。微脂粒能夠有效地活化巨噬細胞並刺激生成 NO，但是銀耳多醣無法刺激巨噬細胞生成 NO，無法說明銀耳多醣的免疫機制。因此，本實驗特在雞免疫微脂粒後取得

脾臟，以瞭解微脂粒在雞身上的訊息傳遞路徑，以西方點墨法分析雞脾臟內產生的訊息傳遞蛋白質。我們分析p-38 MAPK、p-ERK和p-NF- $\kappa$ B，發現在免疫兩週後所有組別的雞都無p-38 MAPK和p-NF- $\kappa$ B，唯獨在p-ERK的路徑比較上有差異，其中T-PC-Lip組蛋白質磷酸化量較少，而Virus alone組、PC-Lip組和XG-PC-Lip組都有明顯的p-ERK存在(圖二十)。



## 第五章 討論

### 微脂粒佐劑於雞隻點鼻接種疫苗模式

利用微脂粒包覆技術將活新城病毒(Live NDV)或不活化新城病毒(Inactivated NDV)以點鼻方式接種於雞隻後，微脂粒佐劑能夠成功在雞隻黏膜部位與血清中產生特异性抗體(anti-NDV s-IgA 及 anti-NDV IgG)，這些現象與研究哺乳動物於點鼻接種後的免疫反應模式類似。進一步比較微脂粒包覆不活化新城病毒與活新城病毒在雞隻的抗體生成曲線，可以發現一些差異。利用微脂粒包覆後的疫苗，於點鼻後的第四日至第五日即可產生大量的抗體，相較於利用活毒點鼻疫苗在第八日至第九日於黏膜部位使分泌抗體產生。微脂粒佐劑可縮短接種後抗體生成的時間。表示顆粒性佐劑能夠幫助增加抗原傳遞於雞隻的黏膜環境。研究發現，聚合的顆粒性佐劑以口服或點鼻等方式接種疫苗，在被攝入於 M 細胞或傳遞於鼻相關淋巴組織的過程，能使得包覆於佐劑內的抗原有效地保護，並使抗原穩定地釋放且避免被微環境的酵素與酸性物質降解[82-84]。在我們的雞隻模式中發現微脂粒佐劑能有效地促進抗體提早出現，這現象顯示雞隻也可以以點鼻接種微脂粒疫苗，但是微脂粒疫苗的種類與型態多樣，因此仍需要更進一步地研究而得到印證。

文獻指出，微脂粒的佐劑性(adjuvanticity)會影響疫苗的免疫性(immunogenicity)，而微脂粒的基本的物理化學(physicochemical)特性會影響微脂粒的佐劑性，例如：組成微脂粒的脂質成份、微脂粒的粒徑和界面電位[85]。由於文獻指出，微脂粒的製備方法會影響包覆的蛋白質之活性，並且微脂粒粒徑會影響溶解於水相環境的蛋白質之包覆總量。因此，在我們的研究中，首先將活新城病毒以薄膜水合法(Thin-film hydration methods)包覆於不同材料特性的微脂粒的水相環境，製備成多層微胞微脂粒(MLVs)粒徑分佈在 1  $\mu\text{m}$ 。文獻指出，顆粒性佐劑粒徑落在 1~3  $\mu\text{m}$

能更有效地被免疫細胞(例如：巨噬細胞或樹突狀細胞)胞吞，進而產生免疫反應[86]。正電荷微脂粒以靜電的作用(electrostatic interactions)，而更容易地與帶負電荷的細胞膜吸附進而融合[87,88]。以 PS 組成的微脂粒，使微脂粒帶負電荷，但是其表面的頭基能夠更專一地被巨噬細胞表面的受體(receptor)辨認而胞吞[89]。因著我們選擇的脂質材料製成含 SA 的帶正電荷的微脂粒、含 EPC 帶中性電荷的微脂粒和含 PS 帶負電荷的微脂粒。透過雞隻模式動物實驗，本論文發現雞隻接種有微脂粒包覆技術的組別的抗體表達都有有效的提升，無論是在黏膜部位與血清中。

### 微脂粒包覆不活化病毒劑量比較

使用活毒病毒包覆於微脂粒做為疫苗有許多風險因子，因此將病毒以福馬林不活化處理。但是不活化病毒在黏膜接種時更需要佐劑輔助其抗原呈現。本研究進而發展微脂粒包覆不活化新城病毒疫苗。首先，探討抗原的使用劑量，再以最適化條件之抗原量包覆於不同組成份之微脂粒。文獻指出，黏膜接種疫苗時抗原劑量多寡會影響到免疫耐受的機制[90]。抗原劑量過低無法引起免疫反應[91-93]，但是若抗原劑量過高又會造成黏膜耐受(mucosal tolerance)的現象，使得免疫細胞對抗原的變應性缺失(angery)[94,95]。同樣地，在我們的研究中也發現，點鼻接種高病毒劑量組雞隻在黏膜 s-IgA 抗體力價較低，而接種低劑量病毒量又無法引起抗體生成。因此，在我們的研究中，選用 60  $\mu\text{L}$  劑量(病毒量  $6 \times 10^{7.8}$  EID<sub>50</sub>/mL)做為抗原使用量。

### 微脂粒包覆不活化新城病毒抗體分析

經由微脂粒包覆技術使活毒抗原抗體生成量提升。因此，在我們的研究中，比較雞隻接種不同電荷微脂粒包覆不活化新城病毒，在血清中與黏膜抗體生成之影響。文獻指出，不活化疫苗至少要接種兩次以上才能達到良好的免疫保護效果，

而且僅產生體液免疫(humoral immunity)，不產生細胞免疫(cell-mediated immunity)，也不能產生 s-IgA 抗體。不活化疫苗提供的免疫原是外源性抗原(exogenous antigens)。外源性抗原所引發的免疫細胞以 CD4<sup>+</sup> 助手型 T 細胞(T-helper cell)為主。助手型 T 細胞辨識抗原後，經一連串的訊息傳遞反應後，而產生細胞激素(cytokines)，進而活化免疫細胞達到免疫目的地。因這一連串的反应須經歷一段時間，故免疫效果的產生較慢，且免疫記憶(immune memory)效果差。不活化病毒在黏膜接種時，往往無法造成局部甚至系統性免疫反應，需要佐劑或載體幫助抗原通過黏膜下層以達到抗原呈現。由微脂粒帶電性說明，正電荷微脂粒包覆的抗原量高於中性電荷與負電荷微脂粒，並且正電荷微脂粒與黏膜細胞更容易因電荷因素融合；帶負電荷微脂粒雖然抗原包覆率相當低，但是其組成的脂質頭基—磷脂醯絲胺酸(Phosphatidylserine, PS)能夠專一且迅速地被巨噬細胞膜上的磷脂醯絲胺酸受體(phosphatidyl serine receptor (PSR))辨識，而含 phosphatidyl-L-serine 頭基的微脂粒被巨噬細胞辨識過程[96]，就如同凋亡的細胞(apoptotic cells)被巨噬細胞吞的”垃圾處理”步驟，活化免疫細胞使產生體液性與細胞性免疫反應[97-99]。然而，在我們的研究中，發現比較不同電荷微脂粒包覆活毒病毒或不活化病毒經點鼻接種後，均是以中性電荷微脂粒造成黏膜部位與血清中抗體力價最高。而重覆免疫後抗體也是以中性電荷微脂粒生成優於正電荷或負電荷微脂粒。中性電荷的微脂粒疫苗使抗原持續釋放於黏膜部位之免疫細胞附近，增加抗原與免疫細胞進而進行抗原傳遞與呈現。

文獻指出，微脂粒組成成份會影響微脂粒佐劑性[85]，以微脂粒膜相轉移溫度說明，存在於脂雙層中的高熔解溫度的磷脂質如 D-L- $\alpha$ -distearoylphosphatidylcholine(DSPC, Tc)，提高微脂粒的穩定性使其結構穩定，使得微脂粒不易與細胞膜接觸而被吸附[100,101]，能夠刺激強的免疫反應的組成其相轉移溫度必須低於 DSPC 之相轉移溫度(54°C)[85]，屬於低相轉移溫度的磷

脂質如 D-L- $\alpha$ -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC,  $T_c$  41 °C) 、 D-L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC,  $T_c$  23°C) 、 egg lecithin ( $-10^\circ\text{C}$ )能更有效地引起免疫反應[102]。Bakouche et al.(1986)[102]和 Raphael et al.(1984)[103]曾提出微脂粒相轉移溫度影響免疫反應。本研究中所使用的微脂粒組成，均加入少量的膽固醇以增加微脂粒穩定度，但也使得微脂粒的相轉移溫度增加。含 PS 組成的負電荷微脂粒其相轉移溫度為 62°C，含 SA 組成的正電荷微脂粒其相轉移溫度為 58°C，這些高相轉移溫度的微脂粒其膜的結構堅硬且物理穩定性高，使得抗原釋放量少，微脂粒脂雙層又難以與黏膜細胞融合，因此，巨觀方面說明，在動物實驗的抗體表達部分，高相移溫度的微脂粒組的雞，明顯地在黏膜分泌型抗體與血清抗體的力價都較低。由微觀方面，雞脾臟巨噬細胞吞量的表現，低相轉移溫度組微脂粒累積在雞脾臟巨噬細胞的量比高相轉移溫度微脂粒多。本研究中，低相轉移溫度微脂粒由主成份 DPPC 組成，兩性電荷微脂粒其相轉移溫度為 43°C。動物實驗對象為雞隻，而雞的體溫約  $41\pm 1^\circ\text{C}$ ，雞隻點鼻接種 DPPC 組成的兩性電荷微脂粒佐劑接種時，微脂粒相轉移溫度與雞體溫差兩度，使得微脂粒更柔軟且更容易與雞鼻黏膜細胞融合，並且將抗原由雞鼻腔傳遞到下層的免疫相關淋巴組織，或者是雞的哈氏腺(Haderian glands, HG)的位置，在哈氏腺存有許多免疫細胞與漿細胞(plasma cell)，提供局部性的抗體分泌到鼻腔、眼睛或唾液中[104,105]。

### 脂多醣體塗覆微脂粒包覆不活化新城病毒抗體分析

脂多醣體(LPS)佐劑被巨噬細胞上的 TLR4 辨識而產生發炎性細胞激素，進而刺激 B 細胞分化再調節 MHC class II 於抗原呈現細胞上的表現[106]。LPS 塗覆於不同電性微脂粒表面，點鼻免疫雞隻後，在雞的體內產生的免疫反應不盡相同。本研究中，LPS 只促進 PC 組成的微脂粒和 PS 組成的微脂粒在補強接種抗體生成增加。文獻指出，脂多醣體摻和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)或卵白蛋白(ovalbumin)吸入後，能增加血清中抗體量[107]。另外，脂多醣體摻和牛血清白蛋

白吸入，再口服微脂粒包覆牛血清白蛋白後，同樣地也增強抗體力價[108]。有文獻指出，給予啮齒類動物口服 LPS 與羊紅血球細胞，其中 LPS 會造成免疫反應的削弱[109]。在不同的黏膜部位，LPS 與不同種類的抗原會引起不同結果的免疫反應。抗原和 LPS 可選擇以不同傳輸途徑，LPS 以注射給予再以黏膜接種抗原，在黏膜的抗體量均增加[110,111]。

### 攻毒結果與黏膜、血清抗體量之相關性

在本研究，動物以點鼻模式攻毒，目的為真正模擬新城病毒的傳染途徑。攻毒後的結果顯示，雞產生的抗體量與攻毒後雞隻存活率成相關性。PC 微脂粒包覆抗原劑量 60  $\mu\text{L}$  (病毒量  $6 \times 10^{7.8}$  EID<sub>50</sub>/mL) 組引起黏膜部位分泌型 s-IgA 抗體量最高，攻毒後結果有 80 % 的雞隻存活。PC-Lip 組、PC-Lip-LPS 組、PS-Lip 組和 PS-Lip-LPS 組在一次免疫後，黏膜部位與血清部位特異性抗體量最多的組別為 PC-Lip 組，由血球抑制凝集試驗結果抗體力價在血清中達 640 且黏膜中抗體力價達 32，攻毒結果有 80 % 的雞隻存活。各組在二次免疫後，PC-Lip 組和 PS-Lip 組在黏膜部位的特異性抗體量明顯增加，PC-Lip 組和 PC-Lip-LPS 組在血清部位的特異性抗體量明顯增加。PC-Lip 組、PC-Lip-LPS、PS-Lip 組和 PS-Lip-LPS 的功能性抗體力價達 1280-2560，黏膜中功能性抗體力價達 32-64，攻毒結果有 80-90 % 的雞隻存活。在第三次免疫接種後，PC-Lip 組、PC-Lip-LPS、PS-Lip 組和 PS-Lip-LPS 組的功能性抗體力價達 10240，其中 PC-Lip 組與 PC-Lip-LPS 黏膜中功能性抗體力價達 256，攻毒後在 PC-Lip 組、PC-Lip-LPS 和 PS-Lip-LPS 組有 100 % 的雞隻存活。微脂粒佐劑能夠有效地促進特異性抗體在黏膜生成，形成病毒防禦的第一道重要的保護線，當微脂粒持續將抗原釋放後血清中抗體持續增加，做為完整的第二道病毒的防禦網路，使雞隻經強病毒株攻毒後仍能有極高的存活率。文獻指出，黏膜抗體或血清中特異性抗體生成量都與動物存活率有極大的相關性，尤其是當病毒以呼吸道途徑感染動物[112-117]。

## 黏著膠塗覆微脂粒包覆不活化新城病毒之抗體分析

微脂粒能夠增進抗原經由黏膜黏液層傳遞至免疫細胞[61,118,119]，但經由點鼻接種動物時，不能不考慮微脂粒停留在鼻黏膜上皮細胞的時間，由於本實驗前期所使用的微脂粒於溶液中的黏度與水相當，動物點鼻接種微脂粒疫苗後，微脂粒在鼻腔停滯時間短暫，並且微脂粒可能由喉頭吞嚥，使微脂粒疫苗無法完全地被傳遞於黏膜下層。

更進一步，本研究為改善微脂粒黏度現象，特在微脂粒溶液環境加入水溶性多醣黏性材料如銀耳多醣(Tremella)和三仙膠(Xanthan gum)，使微脂粒之黏度增加。經由我們的研究發現，在同樣黏度的銀耳多醣微脂粒與三仙膠微脂粒中，銀耳多醣微脂粒的免疫效果最佳，有效地引起大量的特異性抗體在鼻腔/氣管的黏膜部位與血清中，攻毒後也有 100 % 的存活率，攻毒株病毒 RNA 在存活的雞也比其他組別的雞隻少。文獻指出，多醣類物質可能扮演免疫促進者或免疫調節者的角色，這些多醣體可能具有抗微生物之反應[120,121]。多醣體可能同時影響先天性與後天性免疫反應，並且包括細胞性與體液性免疫反應[121,122]。Cheng et al.(1988)也指出，銀耳多醣萃取物做為佐劑，在雞身上對抗 Merake's 疾病的血清抗體力價顯著地增加[123]。銀耳多醣萃取物與不活化新城病毒接種於雞後，發現其免疫器官與控制組比較，都明顯地增加重量[123]。Fang et al.(1993)也指出，在禽用霍亂弧菌疫苗加入銀耳多醣萃取物，能促進淋巴細胞轉移速率[125]。Tang et al. (1998)也提出 T 淋巴細胞活化以及轉換速率由銀耳多醣萃取物引起，並且 T 淋巴細胞轉換速率與銀耳多醣萃取物劑量成正相關[126]。

## 微脂粒佐劑於雞脾臟巨噬細胞活性之影響

本研究在探討體外模式之微脂粒對巨噬細胞活化的部分，首先將不同電荷微脂粒

加入雞脾臟巨噬細胞，微脂粒均有活化巨噬細胞產生 NO 並且與劑量成正相關，雞脾臟巨噬細胞可被微脂粒刺激而活化產生 NO，其中 PS-Lip 產生的 NO 量最多，巨噬細胞直接辨認 PS-Lip 上組成的 phosphatidyl-L-serine 而非 phosphatidyl-D-serine[95]。NO 是內生性免疫調節劑[75]。但有文獻指出，在哺乳動物系統中，PS 或 PA 微脂粒均抑制 NO 的生成，NO 能維持免疫調控及免疫抑制的平衡並且 NO 會負向調控 Th2 免疫性，而抑制 IL-3 的釋放，使抗體生成量降低。

由於先前動物實驗結果，均說明 PC 組成的微脂粒引起良好的體液性免疫反應以及良好的保護率。更進一步地，為瞭解微脂粒造成免疫細胞如巨噬細胞內的訊息傳遞路徑。特在巨噬細胞培養液中分別加入不同的抑制劑，以阻斷訊息傳遞路徑 (U0126 抑制 MAPK kinase 中 MEK 訊息傳遞、SB-203580 抑制 p-38 MAPK 訊息傳遞和 Bay 11-7085 抑制 I $\kappa$ B 磷酸化訊息傳遞)。在巨噬細胞體外培養以及微脂粒的作用情況下，訊息傳遞路徑主要為活化 I $\kappa$ B 磷酸化訊息傳遞以走向 NF- $\kappa$ B 磷酸化路徑，並且在 MEK 磷酸化路徑也有影響，而 MEK 磷酸化的下游為 ERK 磷酸化路徑。文獻指出，NF- $\kappa$ B 在後天性免疫反應具有重要的功能，經由活化免疫細胞分泌細胞激素正向調節免疫系統，其中也對於 T 細胞之生成與分化成特異性抗原 T 細胞(antigen specific T cells)具有平衡調節的作用。在本研究中，微脂粒佐劑可能具有調節雞免疫細胞產生特異性 NDV 之 T 細胞，因而產生較多的 NDV 抗體生成。

由體外實驗觀察，微脂粒能夠增加免疫細胞特異性的 T 細胞反應。進一步我們觀察雞隻免疫接種微脂粒或微脂粒加入銀耳多醣後，雞隻體內的免疫細胞中蛋白質磷酸化訊息傳遞路徑。我們的結果表示，免疫兩週後所有組別的雞都無 p-38 MAPK 和 p-NF- $\kappa$ B，唯獨在 p-ERK 的路徑比較上有差異，表示 p-38 MAPK 和 p-NF- $\kappa$ B 這兩種屬於免疫反應初期的磷酸化蛋白質已不存在，而 p-ERK 仍持續存在於免疫細胞中。文獻指出，p-38 MAPK 的生成與細胞激素 IL-12 有關，使得 T 細胞走向 Th1

途徑，使動物產生細胞性免疫反應的模式；然而，p-ERK 是能夠增加 IL-10 的細胞  
激素，降低 IL-12 的合成，使得免疫反應以 Th2 免疫反應模式[76]。



## 第六章 結論

經由本論文的實驗結果，我們對於微脂粒佐劑點鼻接種雞隻在其免疫反應提出下列看法：

微脂粒確實具有佐劑的功能，選擇微脂粒相轉移溫度接近動物體溫的組成份，容易與巨噬細胞融合進而傳遞抗原進入細胞內，再促進抗體在黏膜部位與血清部位生成，並達到保護的效果。加入刺激 TLR4 的 LPS 在微脂粒佐劑中僅幫助 PC 與 PS 成份微脂粒在血清中抗體生成量。雞隻接種加入黏性多醣體—銀耳多醣於 PC 組成之微脂粒佐劑，使雞隻同時具有體液性與細胞性免疫反應，在強毒株攻毒後具有 100 % 的保護率，可能的訊息傳遞路徑主要以 p-ERK 路徑活化免疫組織。微脂粒佐劑功能在依 NF- $\kappa$ B 路徑活化巨噬細胞與淋巴細胞使產生特異性 NDV 之 Th2 細胞，因而產生較多的抗體生成。



## 參考文獻

1. Alexander DJ. Newcastle disease and other Paramyxoviridae infections. Iowa State University Press 1997:541-569.
2. Lage M, Catelli, G., Rampin, T., Mandelli, G. Comparative remarks on the pathogenicity of a velogenic strain of NDV towards five species of galliformes. *Atti della Societa Italian delle Scienze Veterinaire* 1974;28:746-750.
3. Muller H, Nostitz, D., Gurk, W. Zur Klinik und Pathologie der Newcastle Disease bei Fasanen (*Phaisnus colchicus*). *Monatshefte fur Veterinarmedizin* 1990;45:467-469.
4. Bang BG, Bang FB. Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. *Am J Pathol* 1968;53(5):735-751.
5. Jeurissen SH, Janse EM, Koch G, De Boer GF. Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell Tissue Res* 1989; 258(1):119-124.
6. Fagerland JA, Arp LH. A morphologic study of bronchus-associated lymphoid tissue in turkeys. *Am J Anat* 1990;189(1):24-34.
7. Jeurissen S, Vervelde L, Janse EM. Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poult Sci Rev* 1994;5:183-207.
8. Glick B, Olah I. Gut-associated-lymphoid tissue of the chicken. *Scan Electron Microsc* 1981(Pt 3):99-108.
9. Befus AD, Johnston N, Leslie GA, Bienenstock J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J Immunol* 1980;125(6):2626-2632.

10. Montgomery RD, Maslin WR, Magee DL, Boyle CR. Effects of modified-live infectious bronchitis virus vaccines on the head-associated lymphoid tissue (HALT). *Avian Dis* 1994;38(4):847-856.
11. Bienenstock J, Befus, D. Gut- and bronchus-associated lymphoid tissue. *Am J Anat* 1984;170:437-445.
12. Fagerland JA, Arp LH. Structure and development of bronchus-associated lymphoid tissue in conventionally reared broiler chickens. *Avian Dis* 1993;37(1):10-18.
13. Fagerland JA, Arp LH. Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related differences. *Reg Immunol* 1993;5(1):28-36.
14. van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2000;6(2):123-132.
15. Vogel FR. Modulation of the Immune Response to Vaccine Antigens. . *Dev Biol Stand* 1998;92:241-248.
16. Kwak LW, Longo DL. Modern vaccine adjuvants. 1996:749-763.
17. Glenny AT, Pope CG, Waddington H, Wallace V. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J Path Bact* 1926;29:38-45.
18. Eidson CS, Kleven SH. A comparison of various routes of Newcastle disease vaccination at one day of age. *Poultry Sci* 1976;55:1778-1787.
19. Ewert DL, Barger BO, Eidson CS. Local antibody response in chickens: analysis of antibody synthesis to Newcastle disease virus by solid-phase radioimmunoassay and immunofluorescence with class-specific antibody for chicken immunoglobulins. *Infect Immun* 1979;24(1):269-275.
20. Beard CW, Easterday BC. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. I. Serological and virus isolation studies. *J Infect Dis*

- 1967;117(1):55-61.
21. Banda A, Villegas P, Purvis LB, Perozo F. Protection conferred by coarse spray vaccination against challenge with infectious bursal disease virus in commercial broilers. *Avian Dis* 2008;52(2):297-301.
  22. Rodriguez-Avila A, Oldoni I, Riblet S, Garcia M. Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines against a recent challenge strain from the United States. *Avian Pathol* 2008;37(3):287-292.
  23. Devlin JM, Browning GF, Gilkerson JR, Fenton SP, Hartley CA. Comparison of the safety and protective efficacy of vaccination with glycoprotein-G-deficient infectious laryngotracheitis virus delivered via eye-drop, drinking water or aerosol. *Avian Pathol* 2008;37(1):83-88.
  24. Thornton DH. Quality control of vaccines. In: Alexander DJ, editor. *Newcastle Disease*. London, 1988.
  25. Yoshida I, Oka M, Shimizu F, Yuasa N, Tsubahara H. Neutralizing antibody in the respiratory tract of chickens inoculated with Newcastle disease vaccines. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1971 Summer;11(2):75-82.
  26. OIE Terrestrial Manual 2008. Chapter 1.1.8. - Principles of veterinary vaccine production. pp.90-104.
  27. Vogel FR. Adjuvants in perspective. In: Brown F, Haaheim LR, editors. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*. Dev. Biol. Stand. Basel: Karger. 1998; 92: 241–8.
  28. Kwak, L.W. and Longo, D.L. (1996) Modern vaccine adjuvants. In *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* (Chabner, B.A. and Longo, D.L., eds), pp. 749–763.
  29. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine

- adjuvants. *Vaccine* 2009;27(25-26):3331-3334.
30. Vogel FR, Powell MF. A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ, editors. *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*. New York, 1995. pp. 234-250.
31. Edelman R. Vaccine adjuvants. *Rev Infect Dis* 1980;2(3):370-383.
32. Nicholson KG, Colegate AE, Podda A, Stephenson I, Wood J, Ypma E. Confronting a potential H5N1 pandemic: a randomised controlled trial of conventional and MF59 adjuvanted influenza A/Duck/Singapore997 (H5N3) surface antigen vaccine. *Lancet* 2001;357:1937-1943
33. Boyce TG, Hsu HH, Sannella EC, Coleman-Dockery SD, Baylis E, Zhu Y, et al. Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults. *Vaccine* 2000;19(2-3):217-226.
34. Aguado T, Engers H, Pang T, Pink R. Novel adjuvants currently in clinical testing November 2-4, 1998, Fondation Merieux, Annecy, France: a meeting sponsored by the World Health Organization. *Vaccine* 1999;17(19):2321-2328.
35. Nigou J, Vasselon T, Ray A, Constant P, Gilleron M, Besra GS, et al. Mannan chain length controls lipoglycans signaling via and binding to TLR2. *J Immunol* 2008;180(10):6696-6702.
36. Salem ML, Kadima AN, Cole DJ, Gillanders WE. Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. *J Immunother* 2005;28(3):220-228.
37. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, Cluff C, Mossman S, Johnson D, et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(7):1129-1138.

38. Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* 2007;25(4):763-775.
39. Stockfleth E, Trefzer U, Garcia-Bartels C, Wegner T, Schmook T, Sterry W. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. *Br J Dermatol* 2003;149 Suppl 66:53-56.
40. Weeratna RD, Makinen SR, McCluskie MJ, Davis HL. TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine* 2005;23(45):5263-5270.
41. Heufler C, Koch F, Schuler G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 1988;167(2):700-705.
42. Lynch JM, Briles DE, Metzger DW. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12. *Infect Immun* 2003;71(8):4780-4788.
44. Woodard LF, Jasman RL. Stable oil-in-water emulsions: preparation and use as vaccine vehicles for lipophilic adjuvants. *Vaccine* 1985;3(2):137-144.
45. Kimura J, Nariuchi H, Watanabe T, Matuhasi T, Okayasu I, Hatakeyama S. Studies on the adjuvant effect of water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion of sesame oil. 1. Enhanced and persistent antibody formation by antigen incorporated into the water-in-oil-in-water emulsion. *Jpn J Exp Med* 1978;48(2):149-154.
46. Butler NR, Voyce MA, Burland WL, Hilton ML. Advantages of aluminium hydroxide adsorbed combined diphtheria, tetanus, and pertussis vaccines for the immunization of infants. *Br Med J* 1969;1(5645):663-666.
47. Singh M, Kazzaz J, Ugozzoli M, Malyala P, Chesko J, O'Hagan DT.

- Poly(lactide-co-glycolide) microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems. *Curr Drug Deliv* 2006;3(1):115-120.
48. Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8<sup>+</sup> T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol* 2006;177(4):2324-2330.
49. Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX adjuvant for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(3):465-474.
50. Kundig TM, Senti G, Schnetzler G, Wolf C, Prinz Vavricka BM, Fulurija A, et al. Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(6):1470-1476.
51. Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kundig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev*;156:199-209.
52. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1-13.
53. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296(5566):301-305.
54. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.
55. Storni T, Kundig TM, Senti G, Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(3):333-355.
56. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13(1):238-252.
57. Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res* 1968;9(3):310-318.

58. Weinstein JN, Leserman LD. Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* 1984;24(2):207-233.
59. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol* 1995;13(12):527-537.
60. Gregory RL, Michalek SM, Richardson G, Harmon C, Hilton T, McGhee JR. Characterization of immune response to oral administration of *Streptococcus sobrinus* ribosomal preparations in liposomes. *Infect Immun* 1986;54(3):780-786.
61. Gregoriadis G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunol Today* 1990;11(3):89-97.
62. Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants: approaches to immunopotentialization including ligand-mediated targeting to macrophages. *Res Immunol* 1992;143(2):178-185.
63. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol* 1995;13(12):527-537.
64. Tafaghodi M, Jaafari MR, Sajadi Tabassi SA. Nasal immunization studies using liposomes loaded with tetanus toxoid and CpG-ODN. *Eur J Pharm Biopharm* 2006;64(2):138-145.
65. Wachsmann D, Klein JP, Scholler M, Frank RM. Local and systemic immune response to orally administered liposome-associated soluble *S. mutans* cell wall antigens. *Immunology* 1985;54(1):189-193.
66. Wachsmann D, Klein JP, Scholler M, Ogier J, Ackermans F, Frank RM. Serum and salivary antibody responses in rats orally immunized with *Streptococcus mutans* carbohydrate protein conjugate associated with liposomes. *Infect Immun* 1986;52(2):408-413.
67. Childers, N.K., and Michalek, S.M. Liposomes. In *Novel Delivery Systems for Oral*

- Vaccine Development (ed. D.T. O'Hagan); Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994: pp. 241–254.
68. Michalek SM, Childers NK, Katz J, Dertzbaugh M, Zhang S, Russell MW, et al. Liposomes and conjugate vaccines for antigen delivery and induction of mucosal immune responses. In: J. Ciardi JK, and J.R. McGhee, editor. In *Genetically Engineered Vaccines: Prospects for Oral Disease Prevention 1992*.
69. Pierce NF, Sacci JB, Jr. Enhanced mucosal priming by cholera toxin and procholera toxin with a lipoidal amine adjuvant (avridine) delivered in liposomes. *Infect Immun* 1984;44(2):469-473.
70. Pierce NF, Sacci JB, Jr., Alving CR, Richardson EC. Enhancement by lipid A of mucosal immunogenicity of liposome-associated cholera toxin. *Rev Infect Dis* 1984;6(4):563-566.
71. el Guink N, Kris RM, Goodman-Snitkoff G, Small PA, Jr., Mannino RJ. Intranasal immunization with proteoliposomes protects against influenza. *Vaccine* 1989;7(2):147-151.
72. de Haan A, Geerligs HJ, Huchshorn JP, van Scharrenburg GJ, Palache AM, Wilschut J. Mucosal immunoadjuvant activity of liposomes: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with an influenza subunit vaccine and coadministered liposomes. *Vaccine* 1995;13(2):155-162.
73. de Haan A, Renegar KB, Small PA, Jr., Wilschut J. Induction of a secretory IgA response in the murine female urogenital tract by immunization of the lungs with liposome-supplemented viral subunit antigen. *Vaccine* 1995;13(7):613-616.
74. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-350.
75. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*

- 2001;2(10):907-916.
76. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 2002;20:55-72.
77. Johnson AG, Gaines S, Landy M. Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1956;103(2):225-246.
78. Misaki A, Kishida E, Kakuta M, K T. Antitumor Fungal (1→3)-b -D-Glucans: Structural Diversity and Effects of Chemical Modification. London, 1993.
79. Gao Q, Seljelid R, Chen H, Jiang R. Characterisation of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk with cytokine stimulating activity. *Carbohydr. Res* 1996;288:135-141.
80. Gruber, J.V., 1999. Polysaccharide-based polymers in cosmetics. In: Goddard, E.D., Gruber, J.V. (Eds.), *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care*. Marcel Dekker, New York, pp. 325–389.
81. Seal BS, King DJ, Sellers HS. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* 2000;24(2-3):257-268.
82. Singh M, Ott G, Kazzaz J, Ugozzoli M, Briones M, Donnelly J, et al. Cationic microparticles are an effective delivery system for immune stimulatory CpG DNA. *Pharm Res* 2001;18(10):1476-1479.
83. Kanke M, Sniecinski I, DeLuca PP. Interaction of microspheres with blood constituents: I. Uptake of polystyrene spheres by monocytes and granulocytes and effect on immune responsiveness of lymphocytes. *J Parenter Sci Technol* 1983;37(6):210-217.
84. Tabata Y, Ikada Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J Biomed Mater*

- Res 1988;22(10):837-858.
85. Mazumdar T, Anam K, Ali N. Influence of phospholipid composition on the adjuvanticity and protective efficacy of liposome-encapsulated *Leishmania donovani* antigens. *J Parasitol* 2005;91(2):269-274.
86. Aramaki Y, Akiyama K, Hara T, Tsuchiya S. Recognition of charged liposomes by rat peritoneal and splenic macrophages: effects of fibronectin on the uptake of charged liposomes *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 1995;3:63-70.
87. Nakanishi T, Kunisawa J, Hayashi A, Tsutsumi Y, Kubo K, Nakagawa S, et al. Positively charged liposome functions as an efficient immunoadjuvant in inducing immune responses to soluble proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240(3):793-797.
88. Yotsumoto S, Kakiuchi T, Aramaki Y. Enhancement of IFN-gamma production for Th1-cell therapy using negatively charged liposomes containing phosphatidylserine. *Vaccine* 2007;25(29):5256-5262.
89. Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(14):6688-6692.
90. Richman LK, Chiller JM, Brown WR, Hanson DG, Vaz NM. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J Immunol* 1978;121(6):2429-2434.
91. Miller SD, Hanson DG. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. IV. Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. *J Immunol* 1979;123(5):2344-2350.
92. MacDonald TT. Immunosuppression caused by antigen feeding. I. Evidence for the activation of a feedback suppressor pathway in the spleens of antigen-fed mice. *Eur*

- J Immunol 1982;12(9):767-773.
93. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM. Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. J Immunol 1991;147(7):2155-2163.
94. Melamed D, Friedman A. Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. Eur J Immunol 1993;23(4):935-942.
95. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 1992;148(7):2207-2216.
96. Henry F, Boisteau O, Bretaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Gregoire M. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. Cancer Res 1999;59(14):3329-3332.
97. Masse D, Voisine C, Henry F, Cordel S, Barbieux I, Josien R, et al. Increased vaccination efficiency with apoptotic cells by silica-induced, dendritic-like cells. Cancer Res 2002;62(4):1050-1056.
98. Stach CM, Turnay X, Voll RE, Kern PM, Kolowos W, Beyer TD, et al. Treatment with annexin V increases immunogenicity of apoptotic human T-cells in Balb/c mice. Cell Death Differ 2000;7(10):911-915.
99. Antimisiaris SG, Jayasekera P, Gregoriadis G. Liposomes as vaccine carriers. Incorporation of soluble and particulate antigens in giant vesicles. J Immunol Methods 1993;166(2):271-280.
100. Moghimi SM, Patel HM. Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes. FEBS Lett 1988;233(1):143-147.
101. Davis D, Gregoriadis G. Primary immune response to liposomal tetanus toxoid in mice: the effect of mediators. Immunology 1989;68(2):277-282.

102. Bakouche O, Gerlier D. Enhancement of immunogenicity of tumour virus antigen by liposomes: the effect of lipid composition. *Immunology* 1986;58(3):507-513.
103. Raphael L, Tom BH. Liposome facilitated xenogeneic approach for studying human colon cancer immunity: carrier and adjuvant effect of liposomes. *Clin Exp Immunol* 1984;55(1):1-13.
104. del Cacho E, Gallego M, Marcotegui MA, Bascuas JA. Follicular dendritic cell activation in the harderian gland of the chicken. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;35(3-4):339-351.
105. Akaki C, Simazu M, Baba T, Tsuji S, Kodama H, Mukamoto M, et al. Possible migration of harderian gland immunoglobulin A bearing lymphocytes into the caecal tonsil in chickens. *Zentralbl Veterinarmed B* 1997;44(4):199-206.
106. Ohta M, Nakashima I, Kato N. Adjuvant action of bacterial lipopolysaccharide in induction of delayed-type hypersensitivity to protein antigens. II. Relationships of intensity of the action to that of other immunological activities. *Immunobiology* 1982;163(5):460-469.
107. Mizoguchi K, Nakashima I, Hasegawa Y, Isobe K, Nagase F, Kawashima K, et al. Augmentation of antibody responses of mice to inhaled protein antigens by simultaneously inhaled bacterial lipopolysaccharides. *Immunobiology* 1986;173(1):63-71.
108. Ogawa T, Kotani S, Shimauchi H. Enhancement of serum antibody production in mice by oral administration of lipophilic derivatives of muramyl peptides and bacterial lipopolysaccharides with bovine serum albumin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1986;8(2):117-125.
109. Michalek SM, McGhee JR, Kiyono H, Colwell DE, Eldridge JH, Wannemuehler MJ, et al. The IgA response: inductive aspects, regulatory cells, and effector

- functions. *Ann N Y Acad Sci* 1983;409:48-71.
110. Ulrich JT, Cantrell, J.L., Gustafson, G.L., K.R., M., Rudbach, J.A., Hiernaux, J.R. The adjuvant activity of monophosphoryl lipid A. In *Topics in Vaccine Adjuvant Research*. 1991:133-143.
111. Keren DF, McDonald RA, Carey JL. Combined parenteral and oral immunization results in an enhanced mucosal immunoglobulin A response to *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1988;56(4):910-915.
112. Asahi-Ozaki Y, Itamura S, Ichinohe T, Strong P, Tamura S, Takahashi H, et al. Intranasal administration of adjuvant-combined recombinant influenza virus HA vaccine protects mice from the lethal H5N1 virus infection. *Microbes Infect* 2006;8(12-13):2706-2714.
113. Song SK, Moldoveanu Z, Nguyen HH, Kim EH, Choi KY, Kim JB, et al. Intranasal immunization with influenza virus and Korean mistletoe lectin C (KML-C) induces heterosubtypic immunity in mice. *Vaccine* 2007;25(34):6359-6366.
114. Ichinohe T, Kawaguchi A, Tamura S, Takahashi H, Sawa H, Ninomiya A, et al. Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect* 2007;9(11):1333-1340.
115. Zhang L, Zhang M, Li J, Cao T, Tian X, Zhou F. Enhancement of mucosal immune responses by intranasal co-delivery of Newcastle disease vaccine plus CpG oligonucleotide in SPF chickens in vivo. *Res Vet Sci* 2008;85(3):495-502.
116. Bacon A, Makin J, Sizer PJ, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Illum L, et al. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infect Immun* 2000;68(10):5764-5770.

117. Takada A, Kida H. Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus. *Vet Microbiol* 1996;50(1-2):17-25.
118. Alving CR. Immunologic aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. *Biochim Biophys Acta* 1992;1113(3-4):307-322.
119. Gonzalez-Rothi RJ, Straub L, Cacace JL, Schreier H. Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: functional and morphologic interactions. *Exp Lung Res* 1991;17(4):687-705.
120. Xia EN, Cheng QH. Isolation, analysis and bioactivities of *Tremella fuciformis* fruit body polysaccharides. *Acta Mycol Sin* 1988;7:166-174.
121. Xue M, X. S. Meng. Review on research progress and prosperous of immune activities of bio-active polysaccharides. *J Tradit Chin Vet Med* 1996;3:15-18.
122. Lien EJ, H. Gao. Higher plant polysaccharides and their pharmacological activities. *Int J Orient Med* 1990;15:123.
123. Cheng FS, Hu TJ, Liang JL. Effect of 8301- polysaccharide on MD vaccine efficacy in chickens. *J Tradit Chin Vet Med* 1998;17:8-9.
124. Zhang LC, J. B. Wang, Y. P. Sun, D. Z. Ma, M. L. Shi, Z. H. Wang. Effect of adding Chinese herb polysaccharide preparations to a Newcastle disease inactivated vaccine on the development of the immune organs in chickens. *Chin J Vet Sci* 1998;18:378-381.
125. Fang BT, Y. L. Yuan, J. L. Liang. Study of mechanism of enhanced avian cholera vaccine by 8301 polysaccharide. *J Tradit Chin Vet Med* 1993;1:5-10.
126. Tang XM, Y. L. He, B. K. Zong. Effect of *Astragalus membranacea* Radix polysaccharides on T lymphocyte transformation in the peripheral blood of chickens.

Chin J Vet Sci 1998;18:269-271.



表

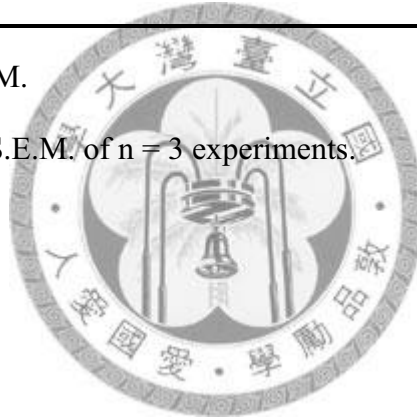
**Table 1**

**The particle size, zeta potential, phase transition temperature, and encapsulation efficiency of various compositions of liposomal-vaccine.**

Liposome formula <sup>a</sup>	Particle size (nm) <sup>b</sup>	Zeta potential (mV) <sup>b</sup>	Encapsulate efficiency (%)	Phase transition temperature (°C)
PC-Lip	1030.0(±56)	-17.70(±1.9)	20.58(±1.9)	43.0±(0.2)
PS-Lip	1188.0(±25)	-51.79(±1.7)	2.57±(1.7)	62.0±(0.4)
SA-Lip	1223.0(±53)	33.52(±3.2)	43.26±(2.0)	58.0±(0.2)

<sup>a</sup>Lipid concentration, 20 mM.

<sup>b</sup>Values represent mean ± S.E.M. of n = 3 experiments.



**Table 2**

**Serum hemagglutination-inhibition (HAI) antibody titers against NDV after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> vaccinations**

Vaccine formulation <sup>a</sup>	GMT <sup>b</sup> 1 <sup>o</sup> vaccination HAI antibodies (n = 7)	GMT 2 <sup>o</sup> vaccination HAI antibodies (n = 7)	GMT 3 <sup>o</sup> vaccination HAI antibodies (n = 7)
Control	< 2±1	< 2±2	< 2±2
Virus alone	10±4	40±2	10±4
Virus-LPS	10±3	40±1	10±3
PC- Lip	640±40	1280±38	10240±40
PC- Lip-LPS	640±70	1280±24	10240±40
PS -Lip	40±20	1280±40	10240±40
PS -Lip-LPS	20±8	2560±80	10240±40
SA -Lip	8±2.8	4±1	—
SA -Lip-LPS	8±1	4±1.4	—

<sup>a</sup>Formulations are described in Table 1.

<sup>b</sup>Titers are expressed as geometric mean titer (GMT)

Groups of 7 chickens were i.n.-immunized with inactivated NDV antigen with or without liposomal adjuvants, and equal aliquots of sera pooled from 7 chickens of each group. Each serum sample was assayed in triplicate, and expressed as geometric mean titer per group. The titer is the reciprocal of the highest antibody dilution inhibiting 4 hemagglutination units (HAU) of virus.

**Table 3**

**Nasal hemagglutination-inhibition (HAI) antibody titers against NDV after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> vaccinations**

Vaccine formulation <sup>a</sup>	GMT <sup>b</sup> 1 <sup>o</sup> vaccination HAI antibodies (n = 7)	GMT 2 <sup>o</sup> vaccination HAI antibodies (n = 7)	GMT 3 <sup>o</sup> vaccination HAI antibodies (n = 7)
Control	< 2±1	< 2±2	< 2±2
Virus alone	4±4	4±2	32±1
Virus-LPS	8±3	8±1	32±1
PC- Lip	32±4	64±8	256±1
PC- Lip-LPS	16±7	64±24	256±1
PS -Lip	8±2	32±4	32±1
PS -Lip-LPS	8±4	32±8	32±1
SA -Lip	3±2.8	2±1	—
SA -Lip-LPS	8±1	2±1.4	—

<sup>a</sup>Formulations are described in Table 1.

<sup>b</sup>Titers are expressed as geometric mean titer (GMT)

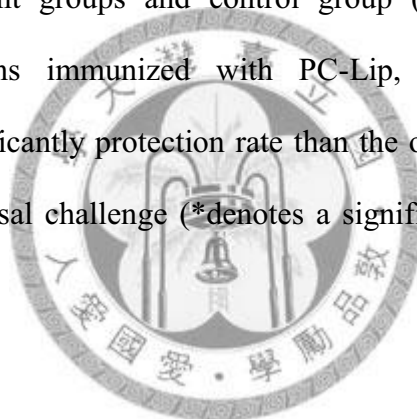
Groups of 7 chickens were i.n.-immunized with inactivated NDV antigen with or without liposomal adjuvants, and equal aliquots of sera pooled from 7 chickens of each group. Each serum sample was assayed in triplicate, and expressed as geometric mean titer per group. The titer is the reciprocal of the highest antibody dilution inhibiting 4 hemagglutination units (HAU) of virus.

**Table 4**

**Chickens against virulent NDV Sato strain challenge survival rate after the 1<sup>st</sup> vaccination with different dose of vaccine**

Vaccine formulation	1 <sup>o</sup> vaccination Survival rate (%) ( <i>n</i> =10)
Control	0
Virus alone	10
PC- Lip	80*
Low dose-Lip PC-NDV	20
High dose-Lip PC-NDV	50

The percent survival of chickens immunized once with PC-Lip was significantly greater than all of the experiment groups and control group ( $p < 0.05$ ). After secondary vaccinations, the chickens immunized with PC-Lip, PC-Lip-LPS, PS-Lip and PS-Lip-LPS showed significantly protection rate than the other experiment groups and control group after intranasal challenge (\*denotes a significant difference to the other groups,  $p < 0.05$ ).



**Table 5****Chickens against virulent NDV Sato strain challenge survival rate after the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> vaccinations**

Vaccine formulation <sup>a</sup>	1 <sup>o</sup> vaccination Survival rate (%) (n=10)	2 <sup>o</sup> vaccination Survival rate (%) (n=10)	3 <sup>o</sup> vaccination Survival rate (%) (n=10)
Control	0	0	0
Virus alone	10	40	60
Virus-LPS	30	40	80
PC- Lip	80*	90*	100*
PC- Lip-LPS	40	80*	100*
PS -Lip	30	80*	25
PS -Lip-LPS	20	80*	100*
SA -Lip	30	30	—
SA -Lip-LPS	20	40	—

<sup>a</sup>Formulations are described in Table 1.

The percent survival of chickens immunized once with PC-Lip was significantly greater than all of the experiment groups and control group ( $p < 0.05$ ). After secondary vaccinations, the chickens immunized with PC-Lip, PC-Lip-LPS, PS-Lip and PS-Lip-LPS showed significantly protection rate than the other experiment groups and control group after intranasal challenge (\*denotes a significant difference to the other groups,  $p < 0.05$ ).

**Table 6.**

**Viscosity of bioadhesive polysaccharide gels**

Polysaccharide	Concentration (%, w/v)	Volume ratio polysaccharide/liposome	Viscosity (cp)
XG	0.3	1:1	533.6(±1.8)
XG	0.2	1:1	250.0(±2.0)
T	1.75	1:1	583.1(±2.3)
T	1	1:1	250.0(±1.4)

The viscosity of the polysaccharides was measured at 41°C. Results are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments.



**Table 7****Serum hemagglutination-inhibition (HAI) antibody titers against NDV and survival rate after the 2<sup>nd</sup> vaccinations**

Vaccine formulation	GMT <sup>a</sup> Secondary vaccination HAI antibodies ( <i>n</i> = 8)	Secondary vaccination Survival rate (%) ( <i>n</i> =10)
Control	< 2±2	30
Virus alone	64±2	60
PC- Lip	64±38	60
T-PC-Lip	256±2	100
XG-PC-Lip	64±2	60

<sup>a</sup>Titers are expressed as geometric mean titer (GMT)

Groups of 8 chickens were i.n.-immunized with inactivated NDV antigen with or without liposomal adjuvants, and equal aliquots of sera from 8 chickens of each group. Each serum sample was assayed in triplicate, and expressed as geometric mean titer per group. The titer is the reciprocal of the highest antibody dilution inhibiting 4 hemagglutination units (HAU) of virus.

The percent survival of chickens immunized once with PC-Lip was significantly greater than all of the experiment groups and control group ( $p < 0.05$ ). After secondary vaccinations, the chickens immunized with PC-Lip, PC-Lip-LPS, PS-Lip and PS-Lip-LPS showed significantly protection rate than the other experiment groups and control group after intranasal challenge (\*denotes a significant difference to the other groups,  $p < 0.05$ ).

**Table 8**

**Shedding of NDV challenge virus**

Group	Tracheal	Lung	Spleen	Liver
Control	++++	++++	++++	++++
Virus alone	++	++	++	++
PC- Lip	++	++	++	++
T-PC-Lip	-	+	+	+
XG-PC-Lip	++	++	++	++

The data are the birds that shed virus and survival after 14 days of the experiment of challenge study. NDV shedding was determined by RT-PCR of tracheal, lung, spleen and liver. Scores compared with Control group of chickens' PCR products.



圖

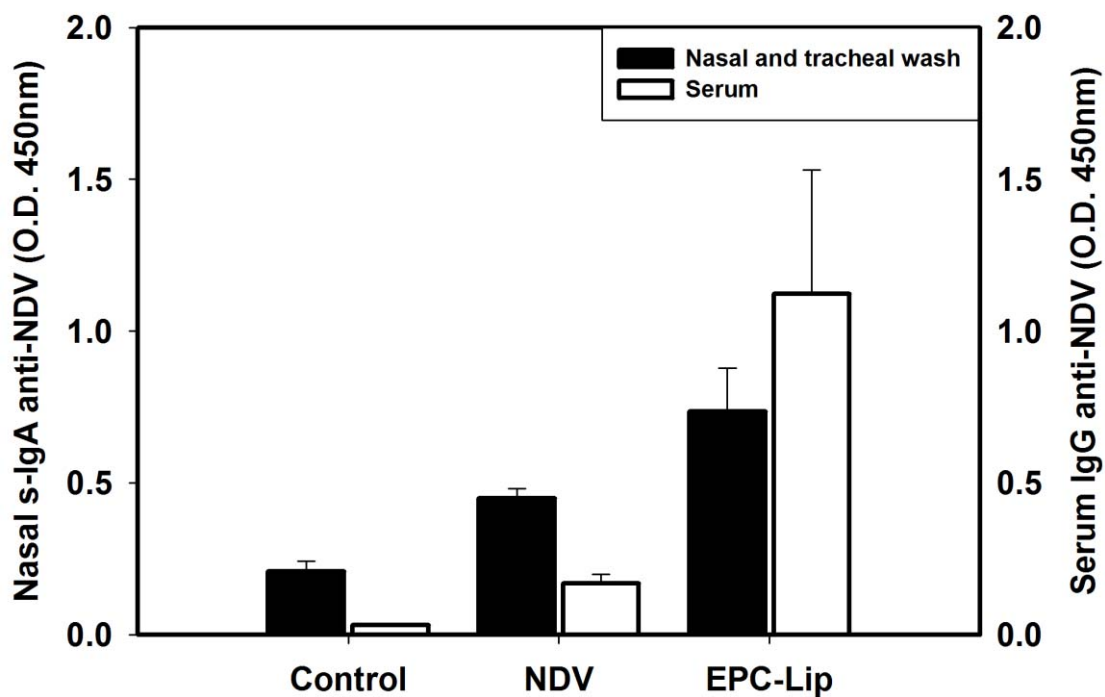
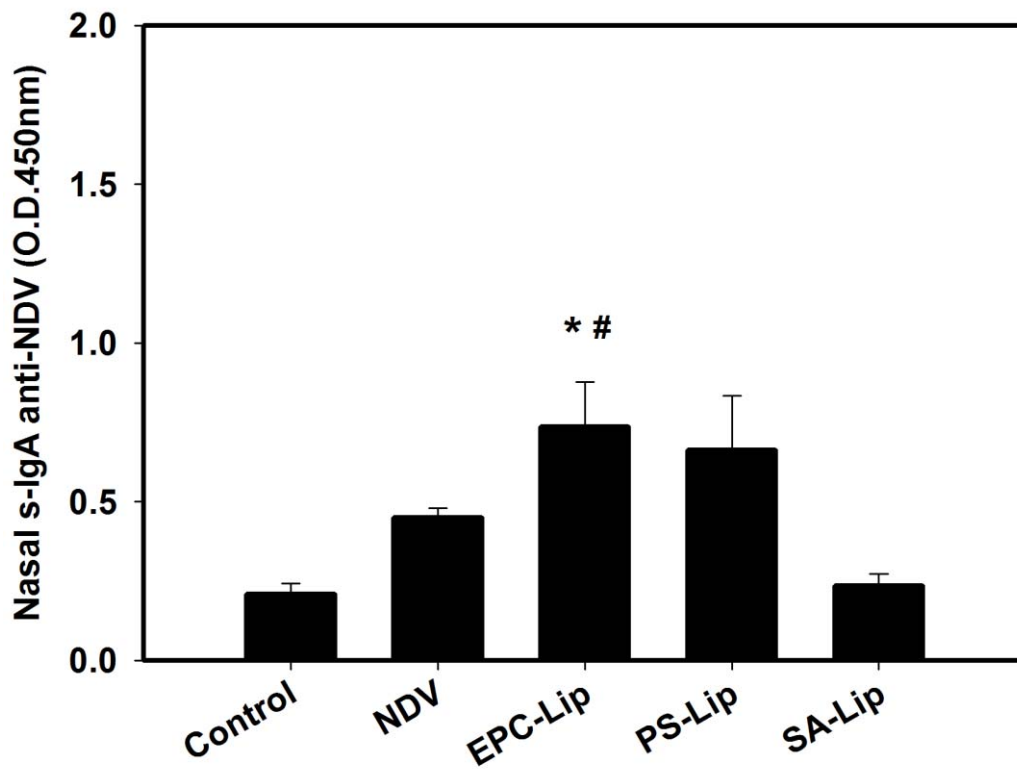


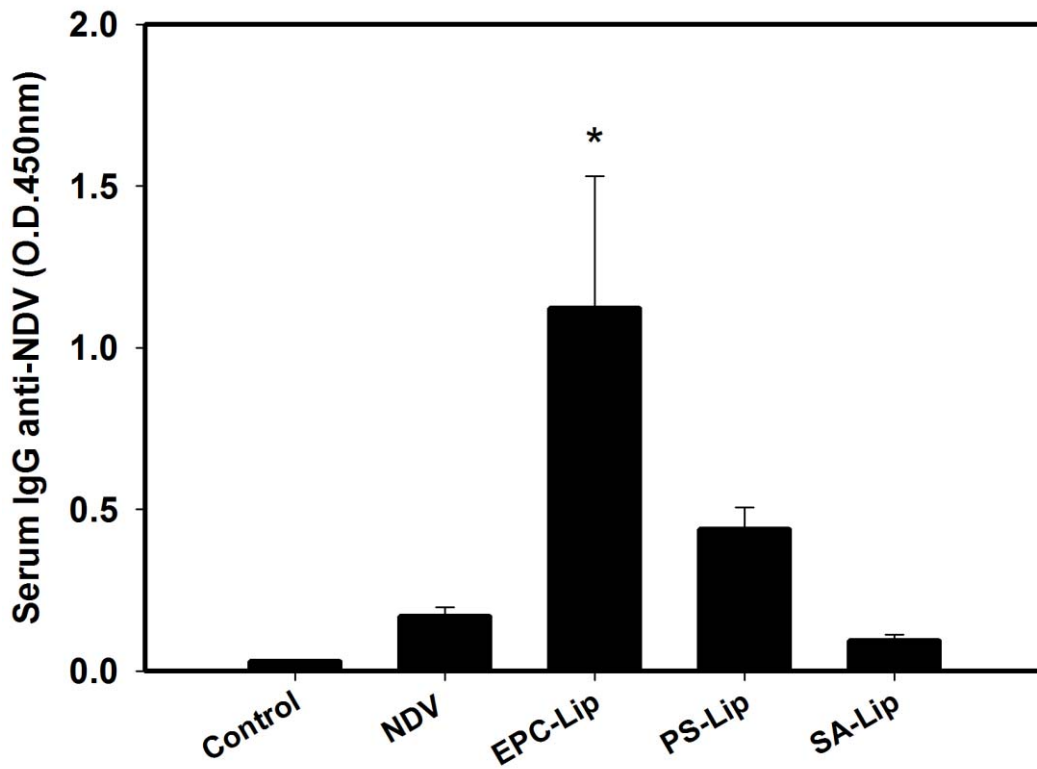
Figure 1 Antibody response

ELISA titer of mucosal s-IgA and serum IgG after vaccinated with the liposomal vaccine. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were boosted at weeks 0 and 2, and nasal wash was collected at week 4.



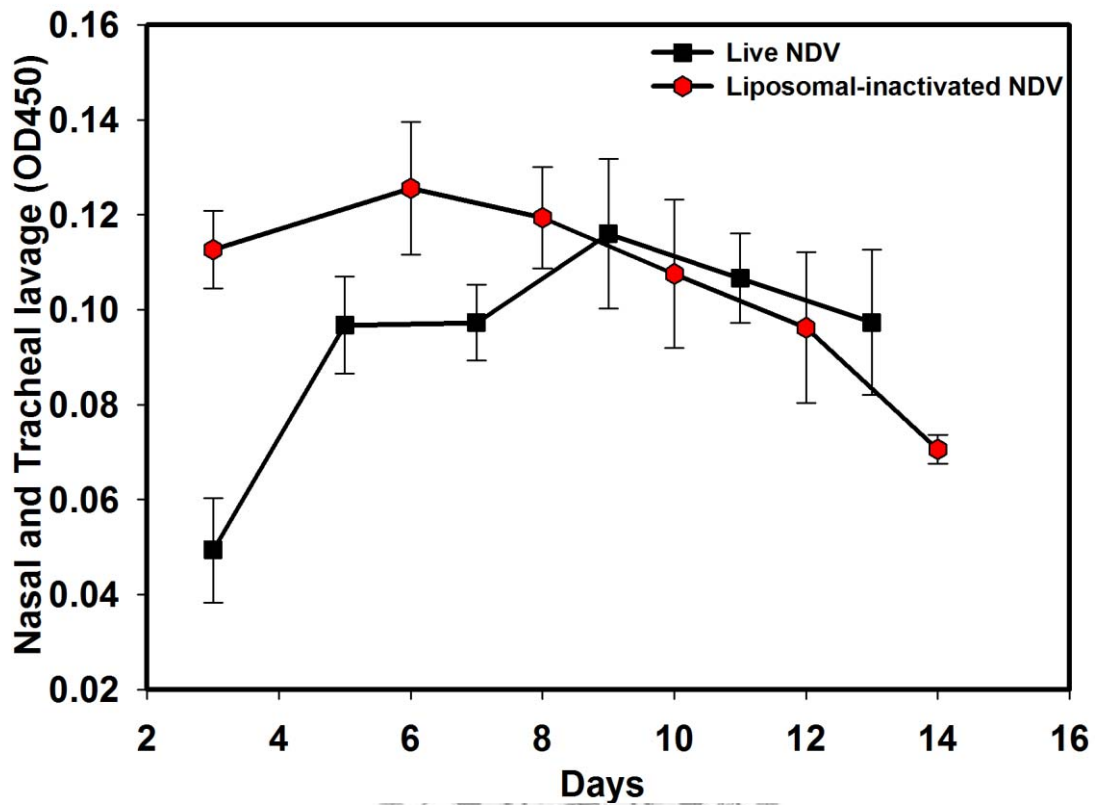
**Figure 2. Nasal specific-NDV antibody**

ELISA titer of mucosal s-IgA after vaccinated with the liposomal vaccine. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were boosted at weeks 0 and 2, and nasal wash was collected at week 4. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of ten chickens. \*  $p < 0.05$  compared to the NDV alone group. #  $p < 0.01$  compared to the SA-Lip group.



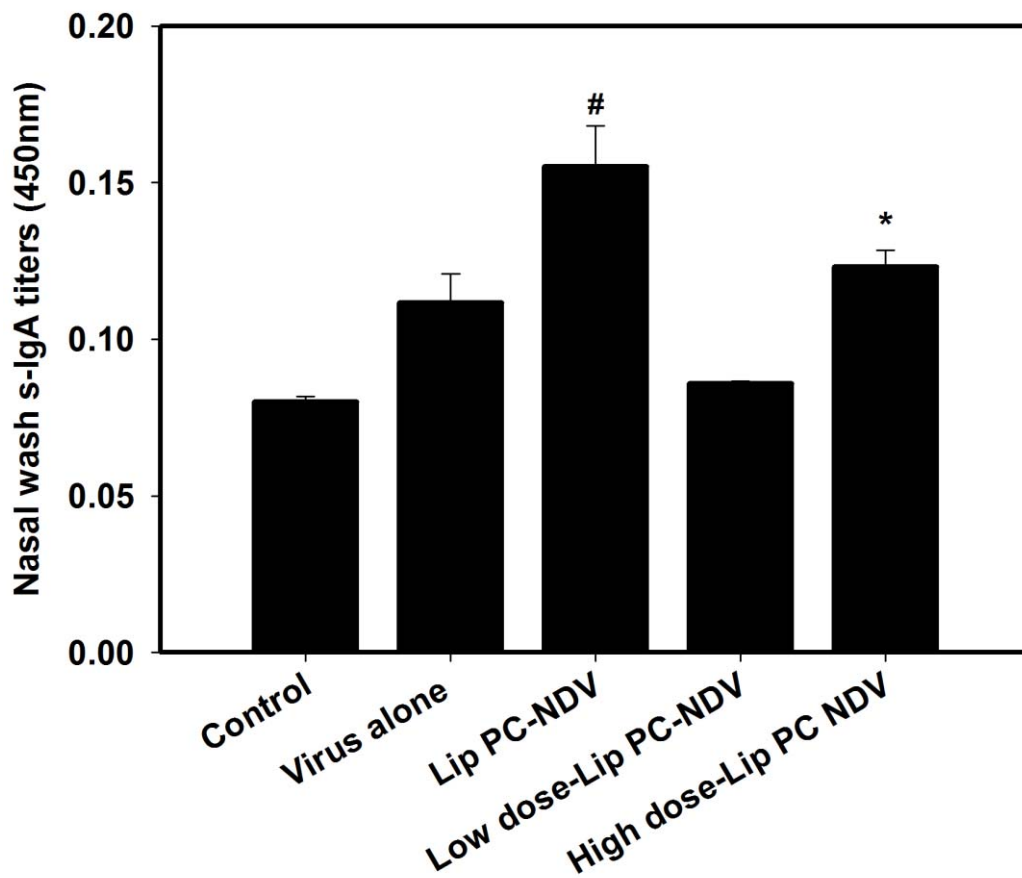
**Figure 3. Serum specific-NDV antibody**

ELISA titers of serum IgG after vaccinated with the liposomal vaccine. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were boosted at weeks 0 and 2, and blood was collected from a vein every week. Results are expressed as the mean  $\pm$  SE optical density of a 1:250 dilution of samples. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of ten chickens. \*  $p < 0.05$  compared to the NDV alone group, PS-Lip, and SA-Lip groups.



**Figure 4. Antibody producing time**

ELISA titer of mucosal s-IgA after vaccinated with the liposomal vaccine or live NDV alone. Chickens were vaccinated at day 0 and nasal wash was collected and observed for 2 weeks.



**Figure 5. Liposomal-NDV vaccine dose**

ELISA titer of mucosal s-IgA after vaccinated with different dose of liposomal vaccine. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were boosted at weeks 0 and 2, and nasal wash was collected at week 4. \*  $p < 0.05$  compared to the Virus alone group. #  $p < 0.01$  compared to the Virus alone group.

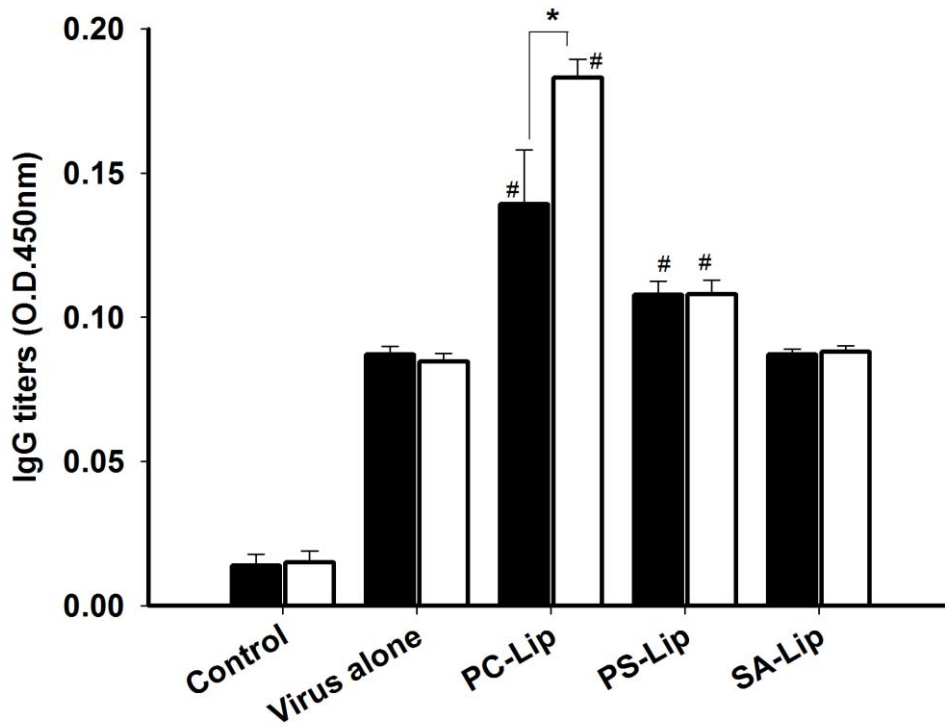
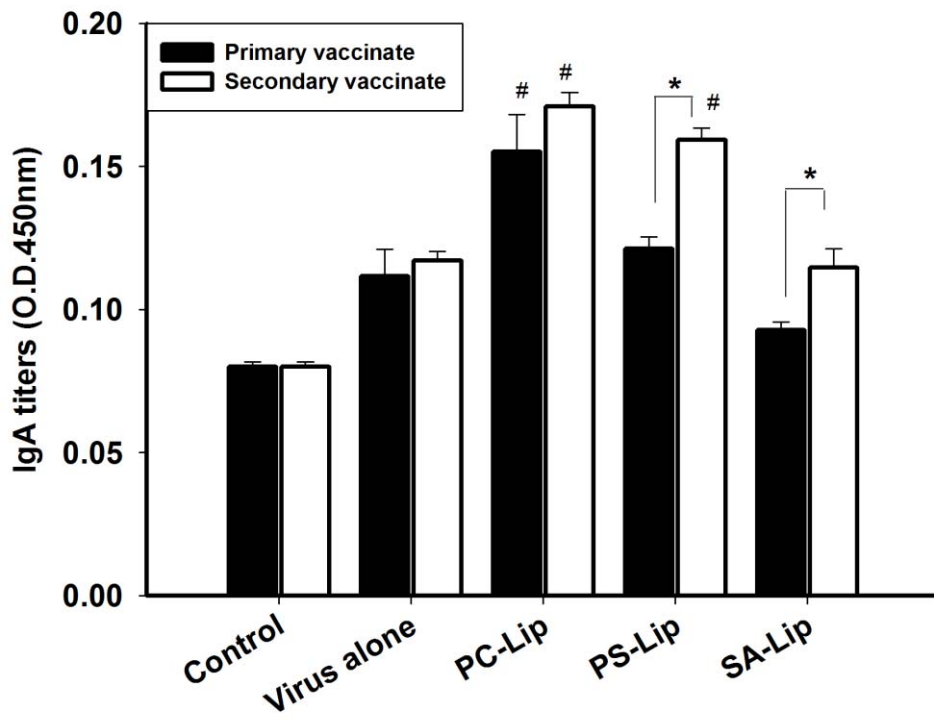
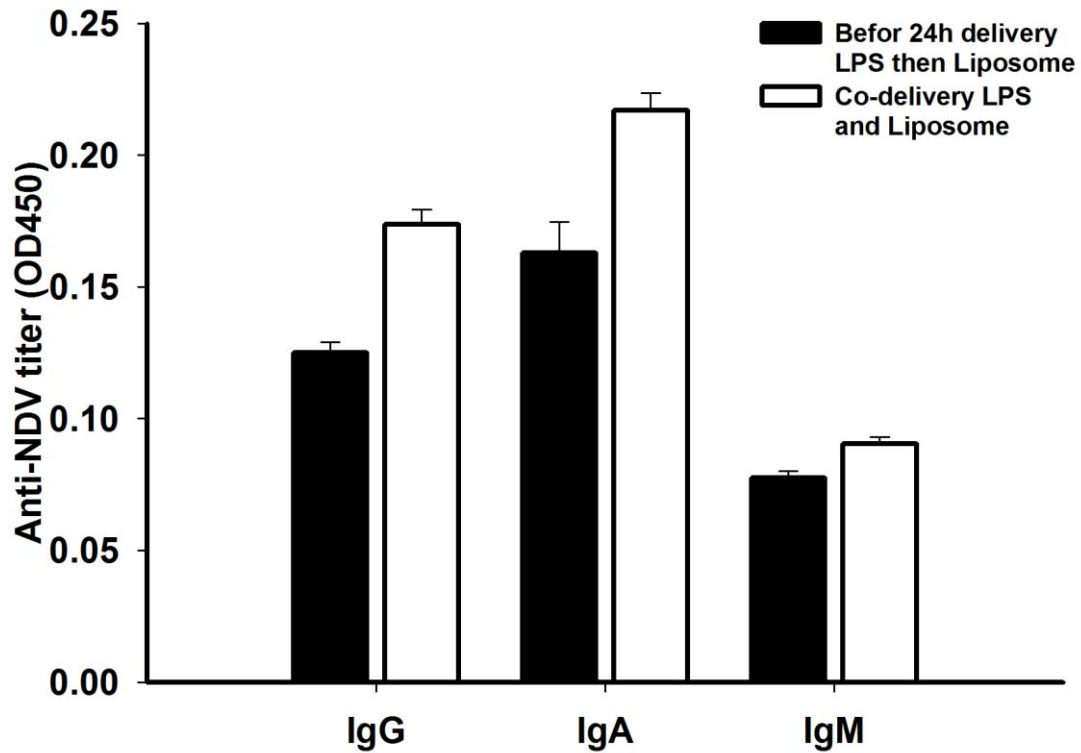


Figure 6 A.B. Anti-NDV s-IgA levels in tracheal lavages and sera.

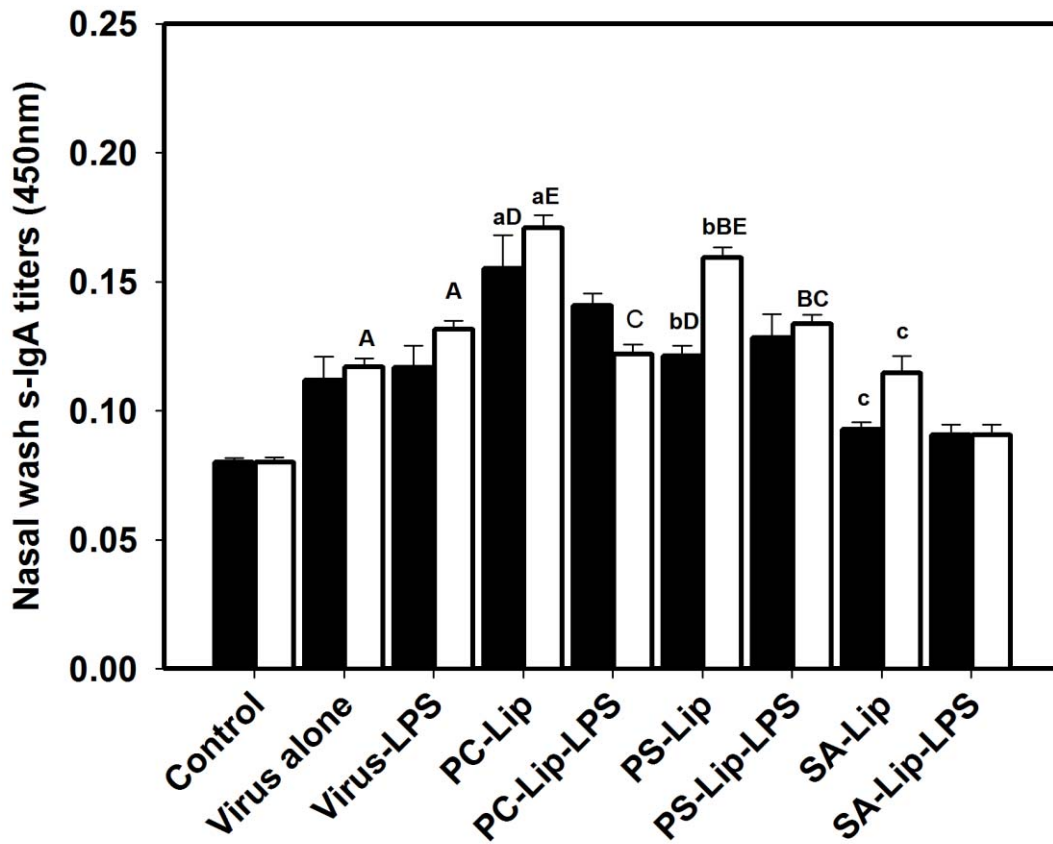
(A) tracheal lavages; (B) sera. Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM); n = 10. A significant difference between primary and secondary vaccination was observed ( $*P<0.05$ ). Significant differences between chickens receiving inactivated NDV alone and those receiving liposomes vaccines was observed ( $\#P<0.01$ ).





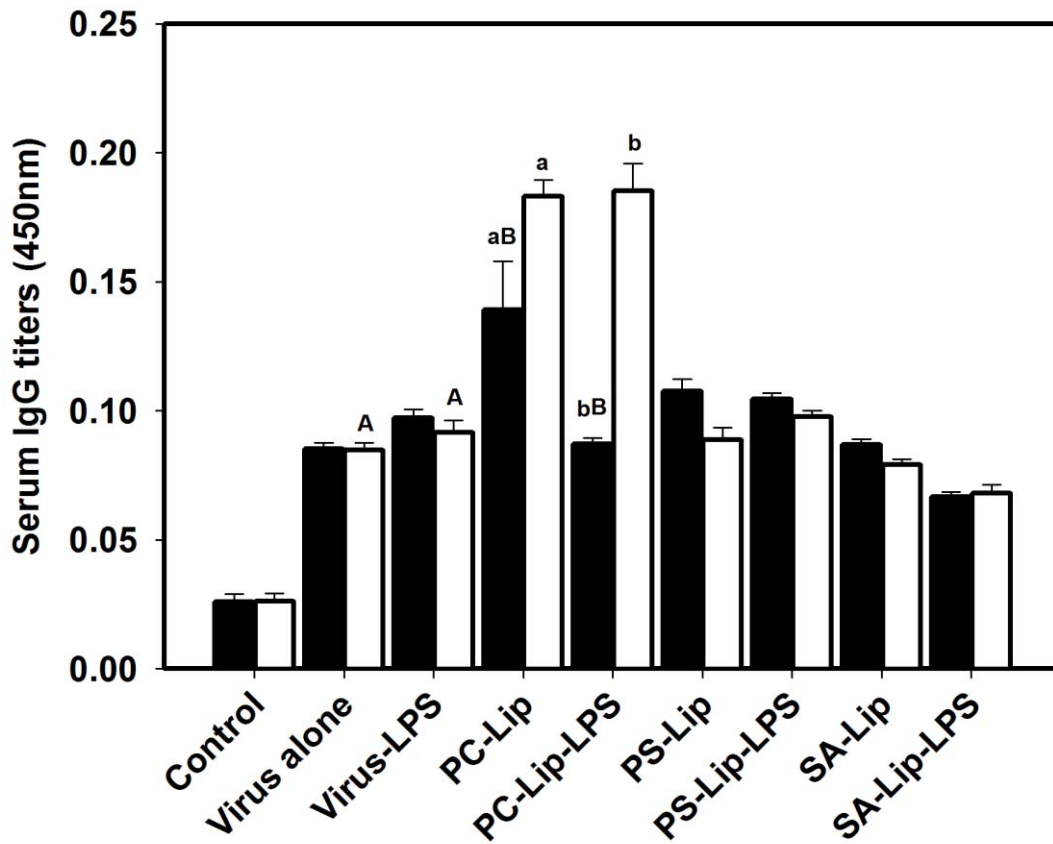
**Figure 7. LPS and Antibody producing**

ELISA titer of mucosal anti-NDV antibody after vaccinated with the liposomal vaccine with LPS. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were vaccinated at weeks 0 and nasal wash was collected at week 2.



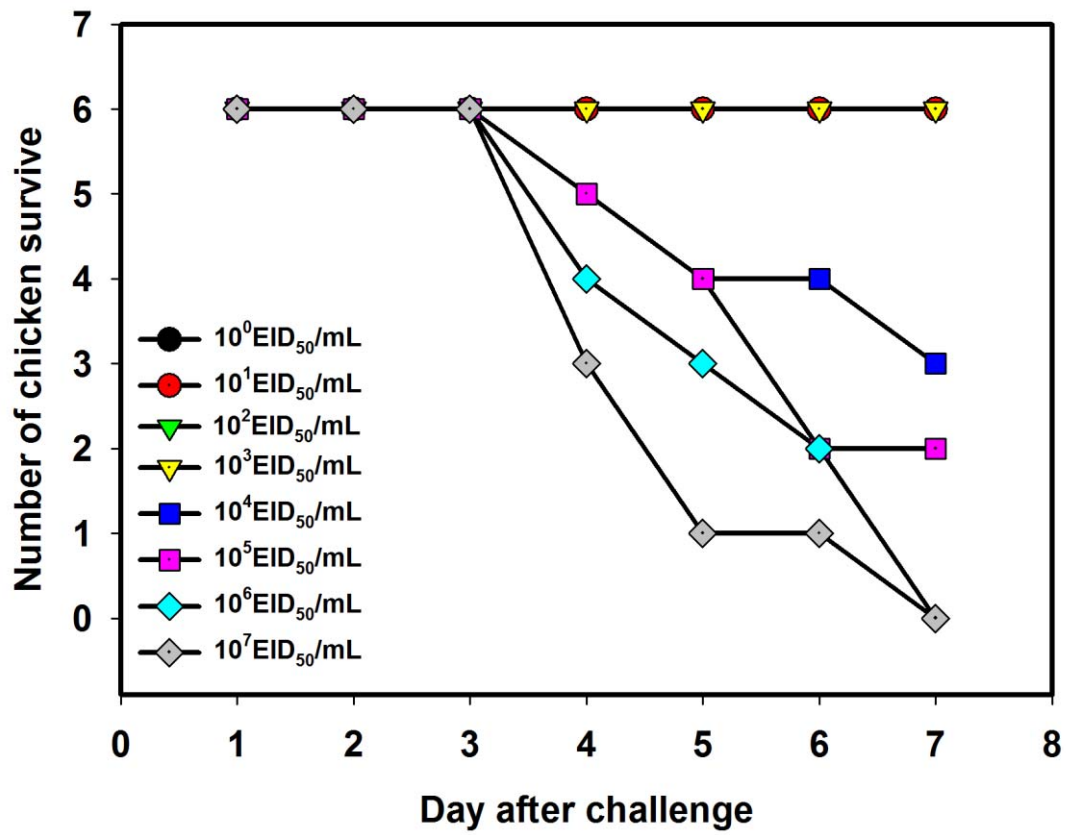
**Figure 8. Specific-NDV antibody between primary and secondary immunization**

Antibody titers of tracheal lavage after primary vaccination (closed bar) and secondary vaccination (open bar) following intranasal immunization of chickens ( $n = 7/\text{group}$ ) with inactivated Newcastle disease virus (NDV) as a free antigen, or in PC-Lip, PC-Lip-LPS, PS-Lip, PS-Lip-LPS, SA-Lip and SA-Lip-LPS. Optical densities (OD) were read at 450 nm, and results were expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Bars sharing a letter were significantly different ( $p < 0.05$ ). Minor case letters indicated a comparison between first and second vaccinations whereas a capital letter was for differences between treatment groups.



**Figure 9. Specific-NDV serum antibody between primary and secondary immunization**

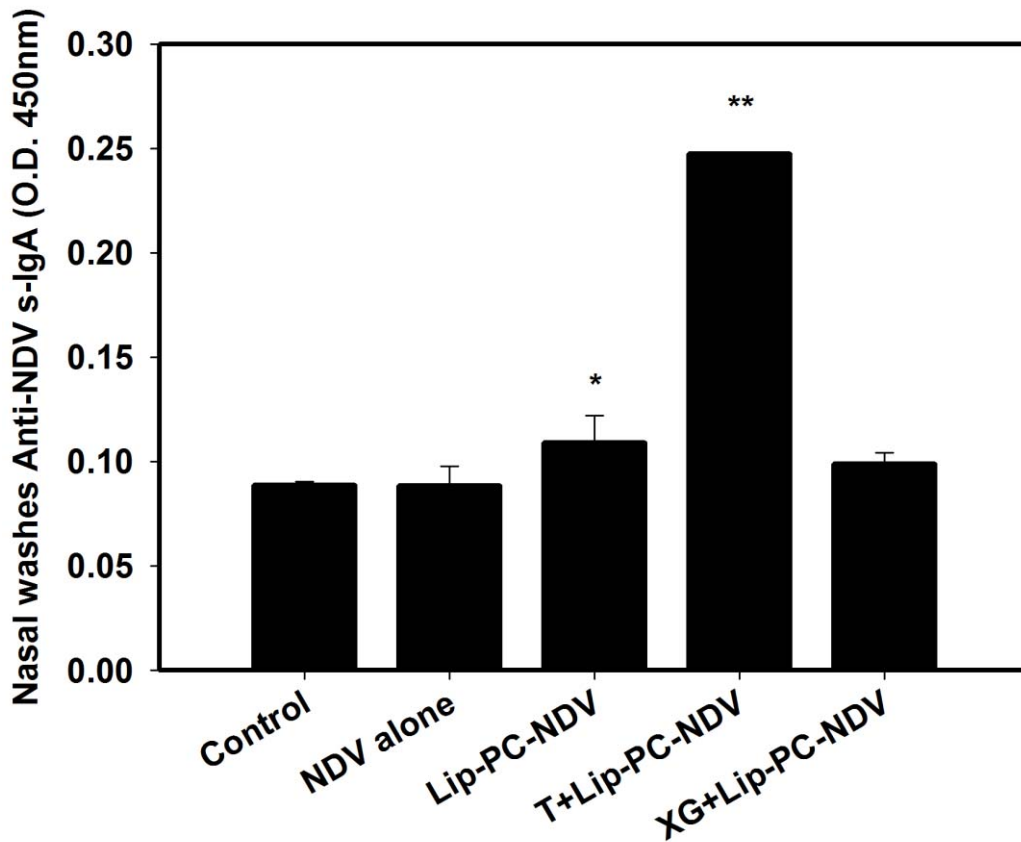
Serum antibody titers after primary vaccination (closed bar) and secondary vaccination (open bar) following intranasal immunization of chickens ( $n = 7/\text{group}$ ) with inactivated NDV as a free antigen, or in PC-Lip, PC-Lip-LPS, PS-Lip, PS-Lip-LPS, SA-Lip and SA-Lip-LPS. Serum samples were diluted 1:125 and optical densities (OD) were read at 450 nm. Each column represented the mean  $\pm$  S.E.M. Bars sharing a letter were significantly different ( $p < 0.05$ ). Minor case letters indicated a comparison was between first and second vaccinations while a capital letter was for differences between treatment groups.



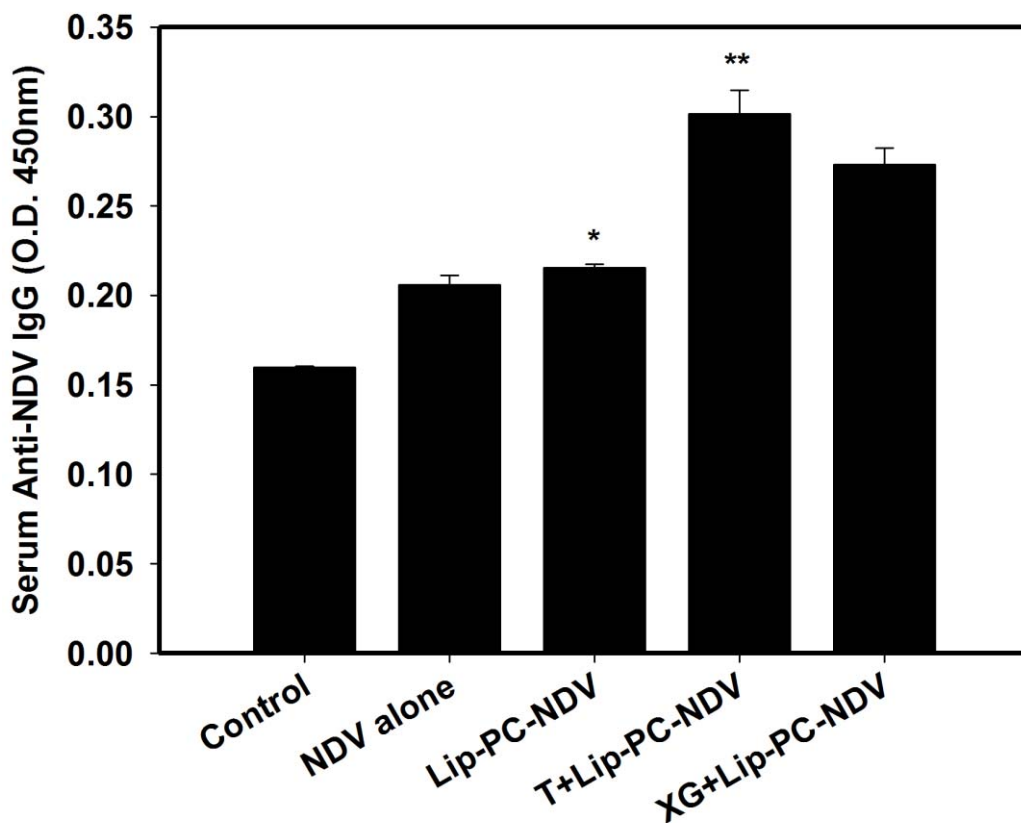
**Figure 10. Nasal challenge virus dose**

Intranasal route challenge with 10<sup>0</sup> EID<sub>50</sub>/mL~10<sup>7</sup> EID<sub>50</sub>/mL dose of Sato strain virus.

Six birds for each dose of virus.

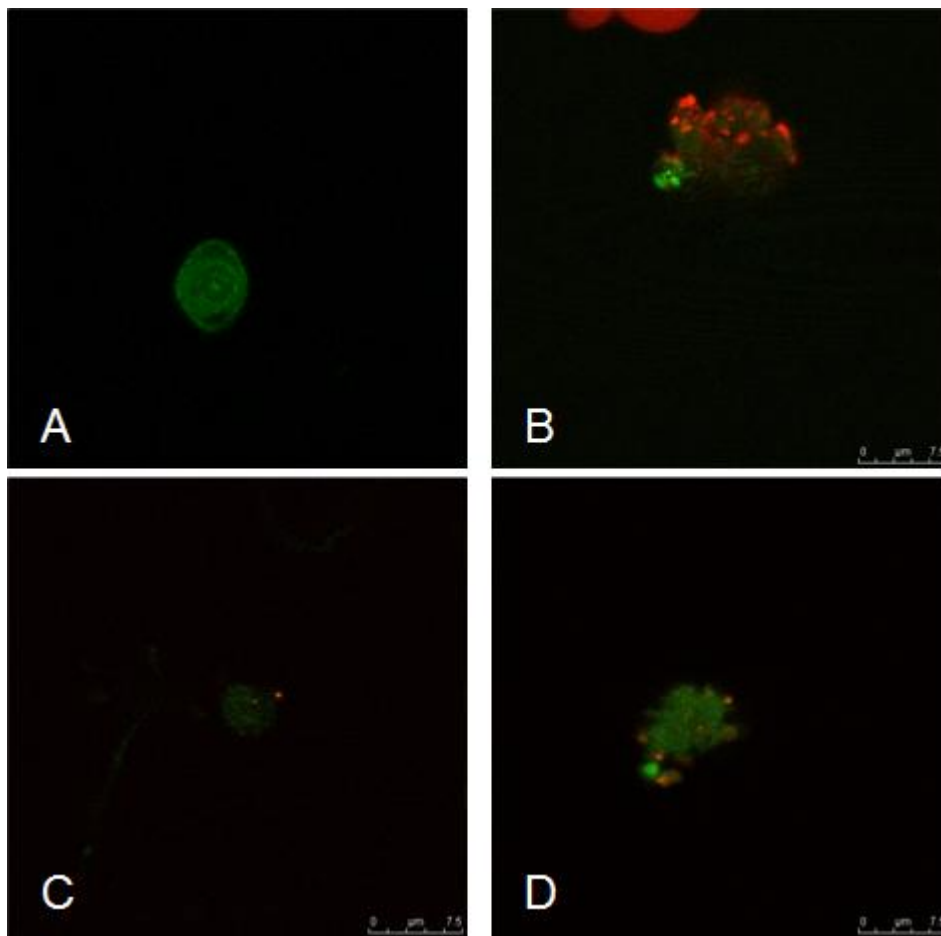


**Figure 11. Nasal secreted antibody from immunized bioadhesive liposomal-vaccine**  
 ELISA titer of mucosal s-IgA after vaccinated with the adhesive polysaccharide liposomal vaccine. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were boosted at weeks 0 and 2, and nasal wash was collected at week 4. Data are expressed as the mean standard deviation of eight chickens. \*  $p < 0.05$  compared to the NDV alone group. \*\* $p < 0.01$  compared to the NDV alone group.



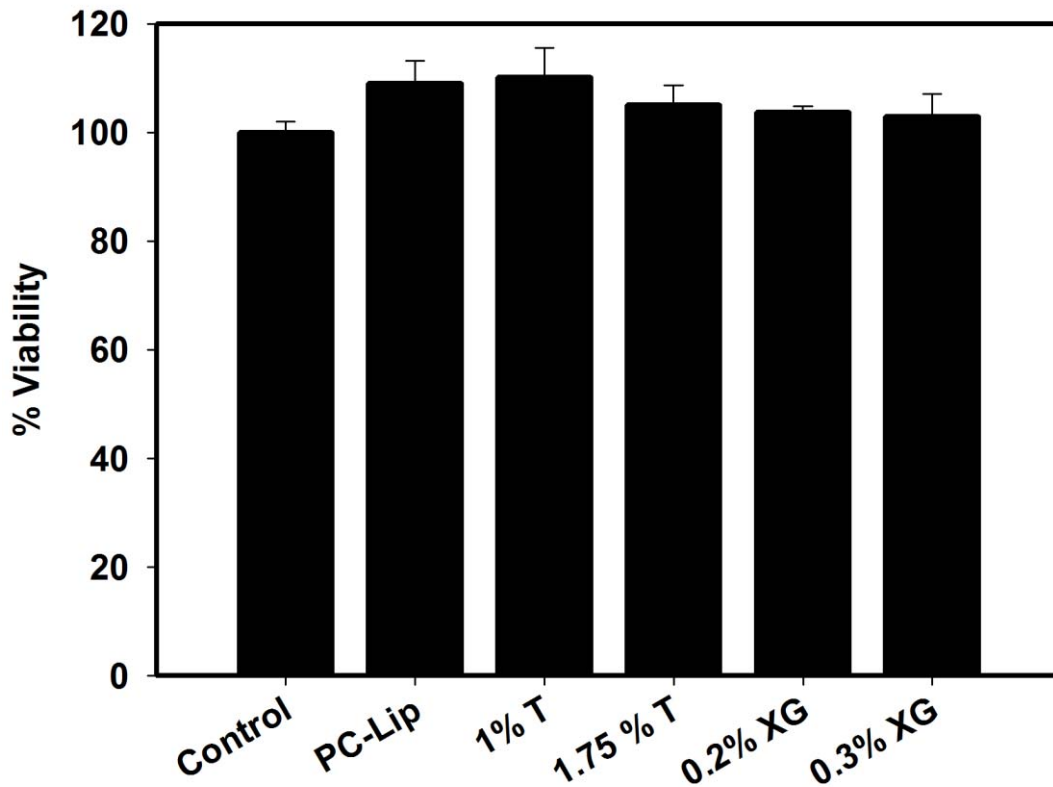
**Figure 12. Serum antibody from immunized bioadhesive liposomal-vaccine**

ELISA titer of serum IgG after vaccinated with the adhesive polysaccharide liposomal vaccine. NDV antigen encapsulated in liposomes with different components was intranasally delivered. Chickens were boosted at weeks 0 and 2, and serum was collected at week 4. Data are expressed as the mean standard deviation of eight chickens. \*  $p < 0.05$  compared to the NDV alone group. \*\* $p < 0.01$  compared to the NDV alone group.



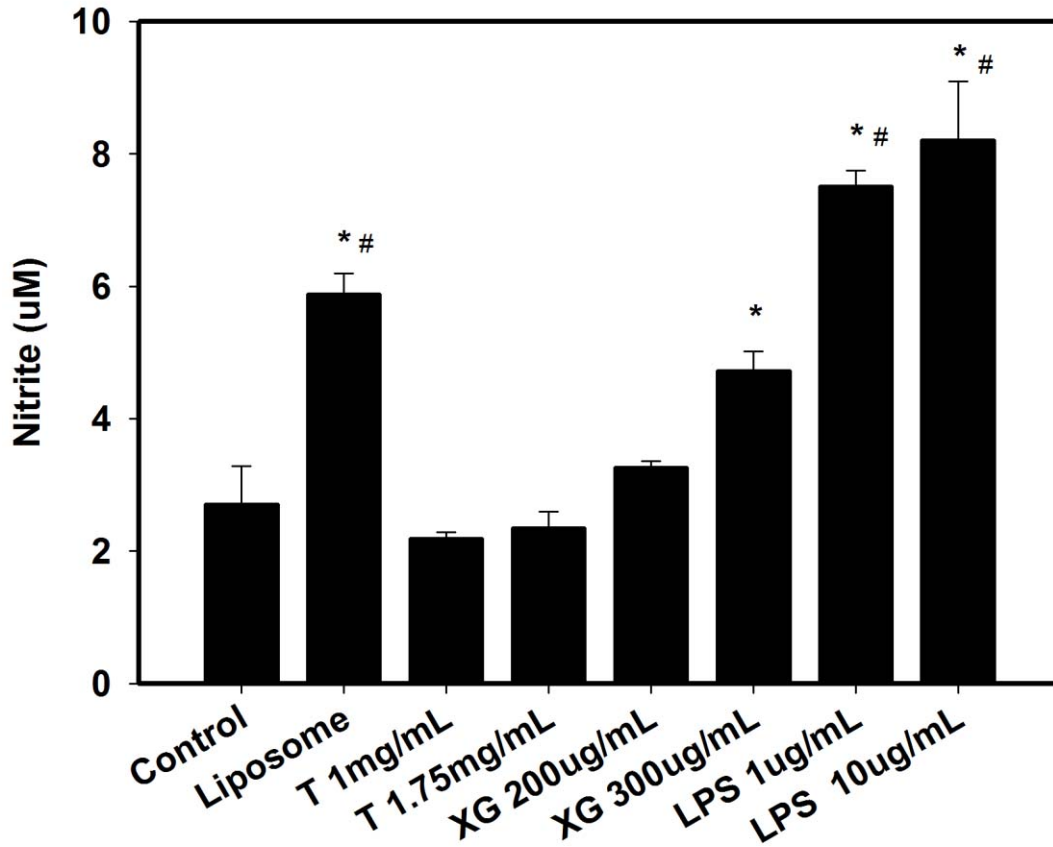
**Figure 13. CLSM of chicken macrophages.**

Macrophages (in green) (A) were incubated with phosphatidylcholine-1,1'-dioctadecyl-3,3,3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-liposomes (PC-Di-I-Lip) (in red) (B), phosphatidylserine-1,1'-dioctadecyl-3,3,3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-liposomes (PS-Di-I-Lip) (in red) (C), or stearylamine-1,1'-dioctadecyl-3,3,3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-liposomes (SA-Di-I-Lip) (in red) (D). The data are representative of three independent experiments.



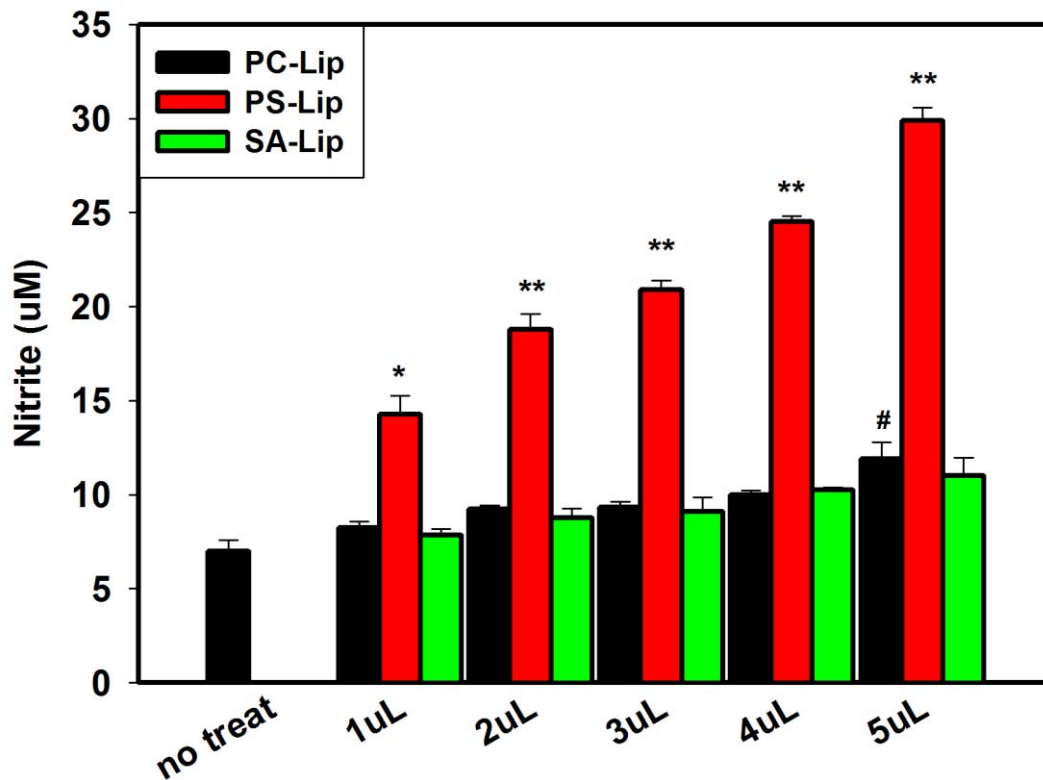
**Figure 14. Cell toxicity**

The in vitro cytotoxicity of liposomes and bioadhesive polysaccharides gel against chicken spleen macrophages was assessed. To determine the cytotoxicity of the materials, macrophages were incubated with 10  $\mu$ L of liposomes, 10  $\mu$ L of 1% T, 10  $\mu$ L of 1.75% T, 10  $\mu$ L of 0.2% XG, or 10  $\mu$ L of 0.3% XG at 41°C for 24 hours. After 24 hours of culture, the cell viability was measured using the MTS assay. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of triplicate determinations.



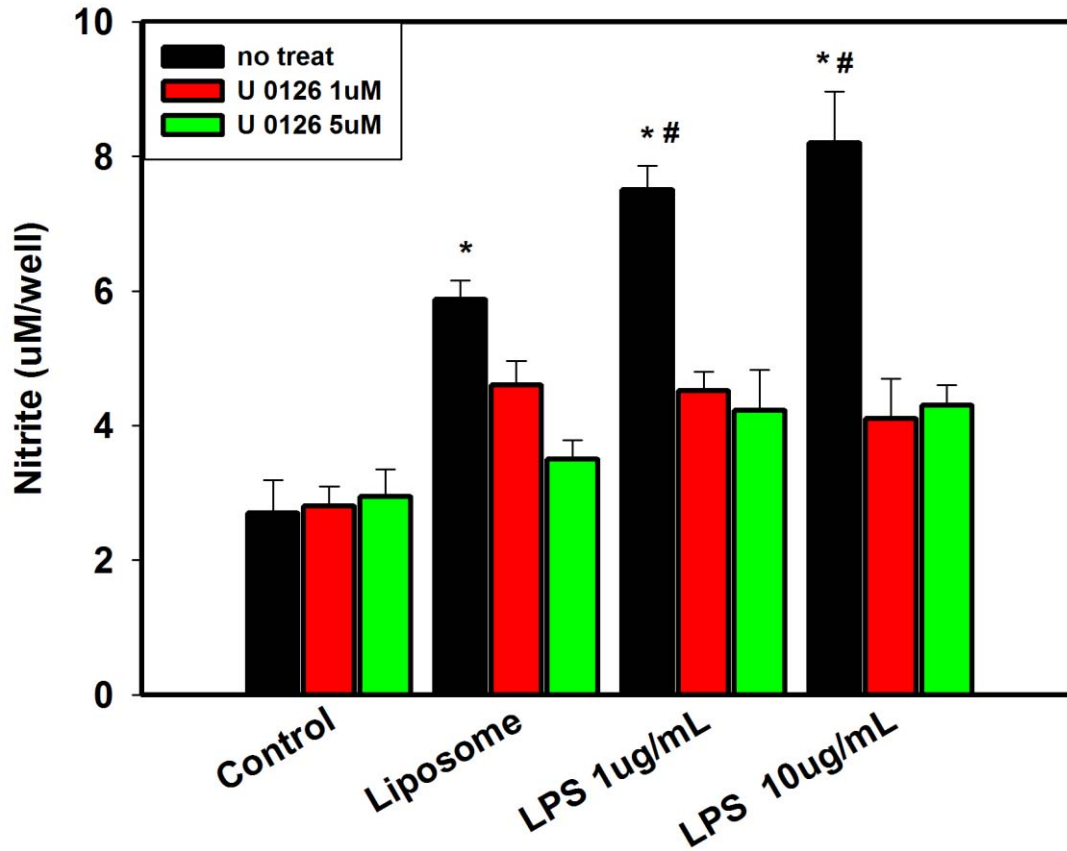
**Figure 15. NO production from adjuvant stimulated**

Adjuvants causes increase NO production in chicken spleen macrophages. Cells were incubated with liposomes adjuvants (PC-Lip), tremella (T), xanthan gum (XG) or LPS for 24 hours. NO synthesis was assayed by measuring the NO present in the culture supernatants. The sign \* indicates difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control in which cells were not treated with adjuvants. The sign # indicates difference ( $p < 0.01$ ) compared to the cells were treated with tremella or xanthan gum adjuvants.



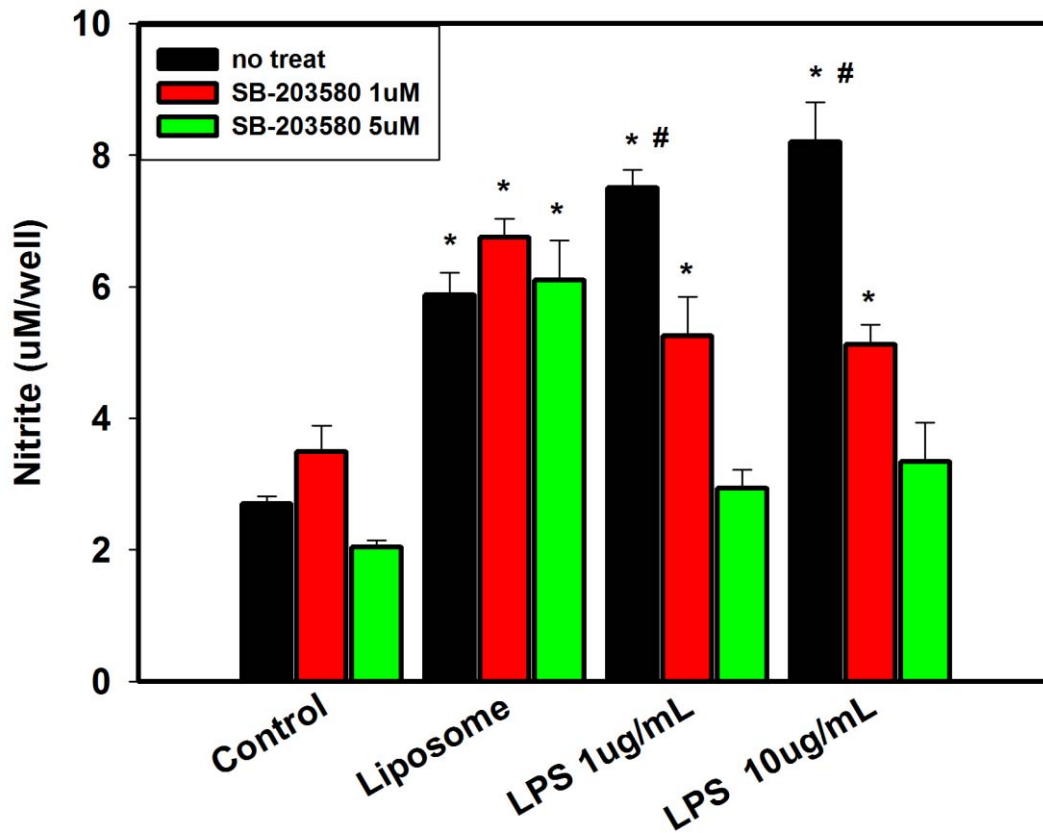
**Figure 16. NO production from liposomes stimulated**

Adjuvants causes increase NO production in chicken spleen macrophages. Cells were incubated with PC-Lip, PS-Lip or SA-Lip for 24 hours. NO synthesis was assayed by measuring the NO present in the culture supernatants. The sign # indicates difference ( $p < 0.05$ ) compared to the cells were treated with untreated cells. The sign \* indicates difference ( $p < 0.05$ ) and sign \*\* indicates difference ( $p < 0.01$ ) compared to the control in which cells were not treated with adjuvants.



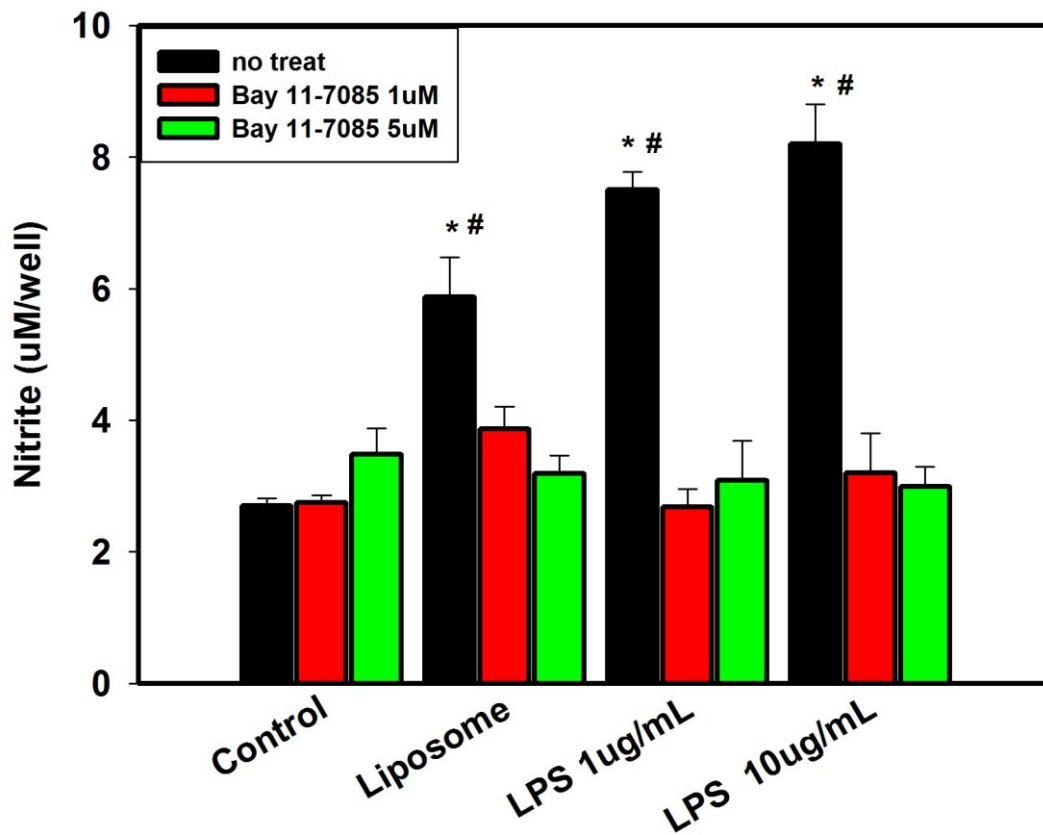
**Figure 17 NO production after treated with U0126 inhibitor**

Effects of MEK-MAPK inhibitor U0126 on liposomes stimulated NO production. The sign \* indicates difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control in which cells were not pretreated with inhibitor. The sign # indicates difference ( $p < 0.01$ ) compared to the cells in which cells were pretreated with U0126 inhibitor.



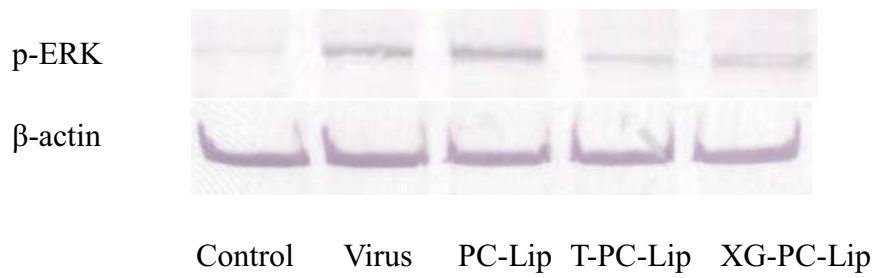
**Figure 18. NO production after treated with SB-203580 inhibitor**

Effects of p-38MAPK inhibitor SB-203580 on liposomes stimulated NO production. The sign \* indicates difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control in which cells were not pretreated with inhibitor. The sign # indicates difference ( $p < 0.01$ ) compared to the cells in which cells were pretreated with SB-203580 inhibitor.



**Figure 19. NO production after treated with Bay 11-7085 inhibitor**

Effects of NF- $\kappa$ B inhibitor Bay 11-7085 on liposomes stimulated NO production. The sign \* indicates difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control in which cells were not pretreated with inhibitor. The sign # indicates difference ( $p < 0.01$ ) compared to the cells in which cells were pretreated with Bay 11-7085 inhibitor.



**Figure 20. Western blot**

Activation of ERK signaling pathway with adjuvant stimulation. Chickens spleens were lysis by RIPA buffer total protein was isolated, separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (30ug/lane), and analyzed by immunoblotting of phosphor-(Thr202/Tyr204)-ERK or  $\beta$ -actin. Data shown are representative of three independent experiments.



## 發表論文列表

1. **Li-Ping Tseng**, Chwei-Jang Chiou, Ming-Chung Deng, Mei-Hsiu Lin, Ryh-Nan Pan, Yi-You Huang, Der-Zen Liu. (2009) Evaluation of intranasal administration of liposomes encapsulating Newcastle disease virus using various phospholipids to improve the humoral immunity in chickens, **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, SCI, in press
2. **Li-Ping Tseng**, Chwei-Jang Chiou, Chien-Chung Chen, Ming-Chung Deng, Tze-Wen Chung, Yi-You Huang, Der-Zen Liu. (2009) Effect of Lipopolysaccharide on Intranasal Administration of Liposomal Newcastle Disease Virus Vaccine to SPF Chickens, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, SCI, in press
3. **Li-Ping Tseng**, Hong-Jen Liang, Ming-Chung Deng, Kuo-Ming Lee, Ryh-Nan Pan, Jen-Chang Yang, Yi-You Huang, Der-Zen Liu. (2009) The influence of liposomal adjuvant on intranasal vaccination of chickens against Newcastle disease, **The Veterinary Journal**, SCI, accepted
4. Chwei-Jang Chiou, **Li-Ping Tseng (equal first)**, Ming-Chung Deng, Pei-Rong Jiang, Shang-Li Tasi, Tze-Wen Chung, Yi-You Huang, Der-Zen Liu. (2009) Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. **Biomaterials**, SCI, accepted
5. **Li-Ping Tseng**, Chwei-Jang Chiou, Ming-Chung Deng, Yi-You Huang, Der-Zen Liu.

(2009) Intranasal delivery of mannan-coated liposomes enhances antibody responses to a Newcastle disease virus vaccine. **Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications**, accepted

6. **Li-Ping Tseng**, Hong-Jen Liang, Tze-Wen Chung, Yi-You Huang, Der-Zen Liu. “Liposomes Incorporated with Cholesterol for Drug Release Triggered by Magnetic Field” **Journal of Medical and Biological Engineering**, 27(1):29-34,2007. EI

7. Yu-Min Lin, Der-Zen Liu\*(correspondence), Haw-Ming Haw and **Li-Ping Tseng**. (2007) Measurement of the Second Virial Coefficient of DPPC and DPPG Liposomes by Isothermal Titration Calorimetry. **J.Chin. Inst. Chem. Engs**, SCI

