

番鴨誘導多能性幹細胞株應用於水禽小病毒疫苗 生產之研究⁽¹⁾

劉振發⁽²⁾ 陳裕信⁽³⁾ 江兆弘⁽⁴⁾ 曲鳳翔⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：114 年 6 月 30 日；接受日期：114 年 9 月 8 日

摘 要

目前國內水禽小病毒疫苗生產使用番鴨胚蛋來進行，因此當發生全國性的疫情流行時，需要大量清淨的番鴨胚蛋來應急。但在禽流感暴發時，若生產胚蛋的番鴨受到侵襲，則胚蛋的來源將受到影響，故尋找替代的基質來生產疫苗將成為當務之急。本研究之目的是建立番鴨的誘導多能性幹細胞株 (induced pluripotent stem cells, iPSC)，後續再評估此細胞株用作為疫苗生產之潛力。研究結果顯示，番鴨誘導多能性幹細胞 (muscovy duck iPSC, MD-iPSC) 經水禽小病毒感染後回收細胞，以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 方式進行檢測，結果均呈陽性反應，證實可做為水禽小病毒宿主細胞。分析回收病毒的力價為 $10^{5.77}$ EID₅₀/mL，病毒液以福馬林去活化後注射到 64 週齡沒有染水禽小病毒的清淨鵝隻進行免疫測試，經 2 次免疫注射分析血液抗體可達 32 – 512 倍。顯示 MD-iPSC 可作為水禽小病毒宿主細胞及具疫苗生產的潛力。

關鍵詞：番鴨、誘導多能性幹細胞、疫苗。

緒 言

水禽小病毒由於對環境的抵抗力很強，即使以乙醚、氯仿、pH 3.0 酸處理、pH 10.0 鹼處理或在 65°C 維持 30 分鐘的環境下，病毒力價並不會降低 (Takehara *et al.*, 1994)，加上國際交通運輸日益便利，在 1978 年後包括英國、日本等地皆相繼爆發此疾病 (Takehara *et al.*, 1995)。水禽小病毒受感染的動物主要為 1 – 3 週齡的番鴨及鵝，惟對番鴨以外品種的鴨隻較無病原性 (Ji *et al.*, 2010)。臺灣則分別在 1982 年及 1989 年亦曾爆發二次流行，小鵝平均死亡率達 90% (張等, 1983)；小鴨致死率 67% (Lu *et al.*, 1993)，其常見臨床表現為生長遲緩、水樣腹瀉和高死亡率 (Jansson *et al.*, 2007; Woźniakowski *et al.*, 2012)，造成重大經濟損失。目前水禽小病毒疫苗則是利用 MD 番鴨胚蛋進行生產，番鴨是長光照繁殖的禽種，產蛋季節大致在每年的 5 月至 10 月，於非產蛋季節恐有胚蛋供應不足之慮。雖然於非產蛋季節可利用人工光照來調節，以持續供應疫苗生產所需之胚蛋，然而飼養於密閉式水簾鴨舍，會因不鏽鋼網狀高床致使鴨隻趾瘤症情形嚴重，造成的動物福祉問題。且以胚蛋來生產疫苗仍是有潛在風險。如一旦爆發禽流感，合格等級蛋源的取得極可能出現不足，以致影響到疫苗生產作業。因此發展細胞培養製程技術，是目前世界上公認的疫苗發展的最新趨勢。

建立合適的細胞株，是發展細胞培養製程技術進行疫苗生產的重要關鍵之一，近年來已有成功開發利用鴨幹細胞 (EB66 細胞株) 作為疫苗與蛋白質生產平台 (Olivier *et al.*, 2010)。本研究建立的番鴨誘導多能性幹細胞株 (MD-iPSC)，係利用特定的 LIN28、NANOG、SOX2、OCT3/4、KLF4 和 c-MYC 轉錄因子轉殖至 MD 番鴨胎體纖維母細胞使其產生再程序化而得。此細胞具有典型的幹細胞特性，包括表現 OCT4、SOX2、NANOG 等分化多能性基因及形成類胚體，本研究之目的為進一步評估 MD-iPSC 用作為疫苗生產之潛力。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2840 號。
(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。
(3) 農業部畜產試驗所畜產經營組。
(4) 農業部畜產試驗所北區分所。
(5) 通訊作者，E-mail: fhchu@mail.tlri.gov.tw。

試驗材料與方法

本試驗動物免疫測試操作於畜試所北區分所試驗鵝舍進行，試驗動物之使用、飼養管理及試驗內容，經畜產試驗所北區分所實驗動物照護及使用小組以畜試竹動字 112-10 號核准。

I. 細胞培養

細胞株是源自 9 日齡之番鴨胚分離之纖維母細胞利用慢病毒 (Lentivirus) 轉染方式，將 LIN28、NANOG、SOX2、OCT3/4、KLF4 和 c-MYC 等轉錄因子轉染到番鴨胚纖維母細胞進行再程式化，以建立 MD-iPSC 細胞株，此細胞已被馴化成 2% 低血清需求，以含 2% FBS 及 2% antibiotic-antimycotic 的 DMEM 培養液，以及 38.5°C 及 5% CO₂ 之空氣的培養箱條件下培養，供生產水禽小病毒之增殖培養用 (劉等，2024)。

II. 水禽小病毒的增殖培養

病毒是使用水禽小病毒活毒疫苗 (動物製藥第 08212 號，家畜衛生試驗所，臺灣) 進行增殖培養。操作流程如下：

- (i) 將馴化後的 MD-iPSC (2.0×10^5 cell/mL) 置於 10 cm 培養皿 (Thermo Fisher, Nunclon Delta for adherent cells, Cat. No. 150464) 以 DMEM + 2% FBS 於 38.5°C 與含 5% CO₂ 之空氣的培養箱中培養 24 小時進行繼代，繼代培養 12 小時後再接種病毒。
- (ii) 將病毒調整為 $10^{1.5-102.5}$ TCID₅₀ / mL，取 500 μ L 輕輕滴入病毒培養皿進行病毒接種，並放置於 38.5°C 培養箱進行培養。
- (iii) 病毒接種後培養 36 – 72 小時，每天觀察細胞是否有發生細胞病變作用 (cytopathic effect, CPE) 或死亡的現象。

III. 病毒回收

當病毒感染細胞後產生 80 – 90% CPE 或死亡時，即將細胞及病毒刮下收集至 15 mL 離心管，以下列步驟進行病毒的回收：

- (i) 將大部分的培養液移除，僅留 2 – 3 mL 培養液在培養皿內。
- (ii) 以細胞刮杓刮下細胞 / 病毒混合物後，和剩下的培養液混合均勻。
- (iii) 將每個培養皿的細胞 / 病毒混合液從培養皿中吸出置於 15 mL 離心管中。以 -80°C 冷凍 / 37°C 解凍反覆進行 3 次後，以 805 xg 於 4°C 下進行離心 20 分鐘，收集上清液並分裝凍存於 -80°C 冰箱。

IV. 水禽小病毒檢測

利用病毒核酸萃取商業套組 (Xpress Virus DNA/RNA Kit, Cat# K1361-4, BioVision, Inc. USA) 將經水禽小病毒感染後回收的細胞進行 DNA 萃取，再以聚合酶連鎖反應方式進行檢測，針對水禽小病毒檢測所設計之引子：5'，-CCAAGCTACAACAACCACAT-3'，(sense) 和 5'，-TGAGCGAACATGCTATGGAAGG-3'，(antisense)。PCR 反應條件為：94°C，1 分鐘；之後進行 35 個 cycles 的 denature：94°C，15 秒；annealing：50°C，30 秒；extension：72°C，30 秒，接著 72°C，5 分鐘後進行 finalextension，維持在 4°C。若為陽性者經電泳分析則可擴增 1 段長度 539 bp DNA 片段 (Zádori *et al.*, 1995)。

V. EID₅₀ (50% embryo infective dose) 病毒力價分析

將病毒以序列稀釋的方法，接種於 96 孔細胞培養盤中之馴化後的 MD-iPSC，於 38.5°C 及 5% CO₂ 條件下培養 5 – 7 天，觀察是否有發生 CPE 並經由結晶紫 (crystal violet) 染色，來證實細胞受病毒感染的情形，以其最高具 50% CPE 的稀釋濃度決定 EID₅₀ 的效價。

選用 10 – 12 日齡水禽小病毒抗體陰性之 MD 正番鴨胚胎蛋，先利用燈光透視以鉛筆畫出氣室位置，並於胚胎對面無血管處進行標示，再拭以酒精進行消毒、打洞，再拭以酒精消毒，以 26 G/inch 長之針頭，採取與蛋平行方向插入 1/2 inch，將病毒液注入尿囊腔內 (圖 1)。病毒液以序列稀釋法稀釋成 10^{-1} – 10^{-6} ，再將不同稀釋的病毒液取 0.1 mL 分別接種五個水禽小病毒抗體陰性 10 – 12 日齡之 MD 正番鴨胚胎尿囊腔中，於接種後 7 天觀察胚胎是否有病變或死亡，並依 Reed and Muench (1938) 法計算病毒力價。

VI. 病毒的去活化

將上述增殖收集的病毒液，以最終濃度 0.02% 福馬林進行去活化處理 3 天 (林等，2005)，再將去活化處理後的病毒接種回細胞，觀察細胞是否有發生 CPE 或死亡的現象以確認是否完成去活化處理。

VII. 免疫測試

20 隻 64 週齡沒有染水禽小病毒的清淨鵝隻，其中 15 隻以 $10^{5.77}$ EID₅₀ / mL 的水禽小病毒去活化處理後作為抗原，再搭配親水性的乳化型免疫佐劑 (ImmunoFast™ Adjuvant, Energenesis Biomedical Co. Ltd., Taiwan) 混合。每隻雞免疫劑量之抗原與佐劑混合操作簡述如下，取 20 μ L 的 Reagent 1 與 180 μ L 抗原置於 2 mL 離心管進行預混合，再加入 300 μ L 的 Reagent 2 混合，然後取 1.5 mL 注射筒搭配 26 號注射針以反覆吸放方式進行 5 分鐘，待抗原與佐劑完全乳化再進行免疫注射。5 隻對照組則以佐劑與 PBS 混合後進行注射，試驗期間共進行 2 次免疫注射，注射位置為胸部肌肉，注射量 0.5 mL / 隻。於第 1 次免疫注射，間隔 14 天再進行補強注射，並分別於第 1 次免疫注射前、補強注射前及補強注射後 14 天進行採血，供作免疫後抗體分析。

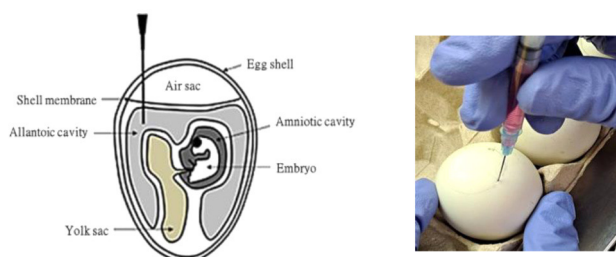


圖 1. 鴨胚蛋病毒液尿囊腔注射示意圖。

Fig. 1. Schematic diagram of injection of virus solution into the allantoic cavity of duck embryo eggs.

EID₅₀ 的效價計算方式 (Calculation of the index):

$$\text{Index} = (\% \text{ infected at dilution immediately above } 50\%) - 50\% / (\% \text{ infected at dilution immediately above } 50\%) - (\% \text{ infected at dilution immediately below } 50\%).$$

$$\text{Index} = (77\% - 50\%) \div (77\% - 42\%).$$

$$\text{Index} = 27 \div 35 = 0.77.$$

The index is then applied to the dilution that produces the percentage of infection immediate above 50%. Results suggested the optimal value is 10^{-4} dilution. The index of 0.77 is applied to this dilution.

In this working analysis the dilution that provided the 50% infection of eggs or 1 EID₅₀ is $10^{-4.77}$.

The reciprocal of this dilution is the amount virus contained in the 0.1 mL of the original suspension

$$= 10^{4.77} \text{ EID}_{50} / 0.1 \text{ mL}$$

$$= 10^{5.77} \text{ EID}_{50} / \text{mL}$$

VIII 血清中和試驗

將免疫注射後採集血液以 358 xg 離心 5 分鐘進行血清分離。將血清以 56°C 經 30 分鐘進行去補體 (decomplement) 處理後 (Gough and Spackma, 1982), 100 μ L 血以 MEM 連續 2 倍稀釋，另水禽小病毒病毒液稀釋為 100 TCID₅₀ 等量加入稀釋之血清，置 37°C 反應 60 分鐘，再加入 0.2 mL 番鴨 iPSC 細胞，接種之細胞置 37°C 繼續培養 6 日後，以甲醛固定後加入 0.5% 結晶紫液染色，各孔細胞若出現有細胞病變效應，則視該抗體濃度未具中和能力之示。最高稀釋倍數仍具有中和能力之稀釋被倍數則為抗體之力價。

結果與討論

I. 水禽小病毒的增殖培養與檢測

CPE 指的是由病毒感染引起的宿主細胞的活率和形態變化，最常見的 CPE 包括細胞的腫脹或皺縮、變圓、裂解、脫落，形成蝕斑、聚團、合胞體或內涵體等。不同種類的病毒在不同的宿主細胞中會產生不同程度的 CPE，有些會迅速破壞整個單層細胞，而有些僅會影響部分宿主細胞的形態。研究人員可以透過 CPE 對病毒進行定量，對中和抗體和抗病毒藥物等進行檢測和篩選，因此 CPE 實驗被廣泛地應用於多種病毒的基礎研究以及各類疫苗。

MD-iPSC 以 DMEM + 2% FCS 培養 12 小時後接種水禽小病毒，於病毒接種 48 – 72 小時後可觀察到受感染的細胞變圓並收縮及脫落之 CPE 或死亡的現象 (圖 2)。

水禽小病毒為是一種無套膜單股線型的 DNA 病毒，基因體大小約為 5,100 鹼基 (Zádori *et al.*, 1994)。有兩個開放讀碼區 (open reading frame, ORF)，左邊的 ORF 為非結構蛋白 (non-structural proteins, NS)，右邊的 ORF 為結構蛋白 (viral protein, VP) 的讀碼區。病毒具有 3 個主要結構蛋白分別為 VP1、VP2、與 VP3 (Zádori *et al.*,

1995) 和 2 個非結構蛋白 NS1 和 NS2 (Smith *et al.*, 1999)。水禽小病毒在感染後期透過細胞裂解釋方式將複製的病毒顆粒釋放 (Daeffler *et al.*, 2003)，然後再感染附近的細胞，最終導致細胞毒性作用和細胞死亡。NS1 在水禽小病毒的複製過程中扮演重要角色 (Berns, 1990)，細胞毒性作用主要由 NS1 誘導 (Herrero *et al.*, 2004)，NS1 是一種多功能蛋白，在水禽小病毒感染細胞時也能誘導細胞凋亡 (Moffatt *et al.*, 1998; Mengyu *et al.*, 2015)。

Saleh and Khodier (2020) 以源自鵝場確認感染鵝小病毒 (goose parvovirus, GPV) 的鵝隻分離出 GPV 病毒，將其感染到鴨胚胎纖維母細胞，於感染後 72 小時可觀察到受感染的細胞型態變圓並縮小之 CPE 現象；到 96 – 120 小時，整個單層 (monolayer) 細胞也因小病毒的感染發生細胞剝落情形。上述的感染後發生 CPE 的時間與細胞型態的改變在本實驗亦觀察到相似情形。Zhang *et al.* (2019) 利用間接免疫螢光分析 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 法進行 GPV 在 DFEs 複製觀察指出，GPV 在感染後 24 – 48 小時可觀察到複製情形，48 小時病毒快速複製並在 96 時達到複製高峰，於 120 小時後病毒量已趨於穩定。

當細胞被觀察到 CPE 或死亡的現象，此時即將細胞及培養液一併回收並凍存於 -80°C 。另取部分細胞以 -80°C 冷凍 / 37°C 解凍反覆進行 3 次致使細胞破裂釋放出病毒顆粒後，以 $805 \times \text{g}$ 於 4°C 下進行離心 20 分鐘離心，回收含有病毒顆粒之上清液。再以此含有病毒顆粒的上清液，重新進行細胞感染與病毒顆粒回收，做為進一步確認水禽小病毒是否可於 MD-iPSC 進行病毒顆粒的增殖複製。

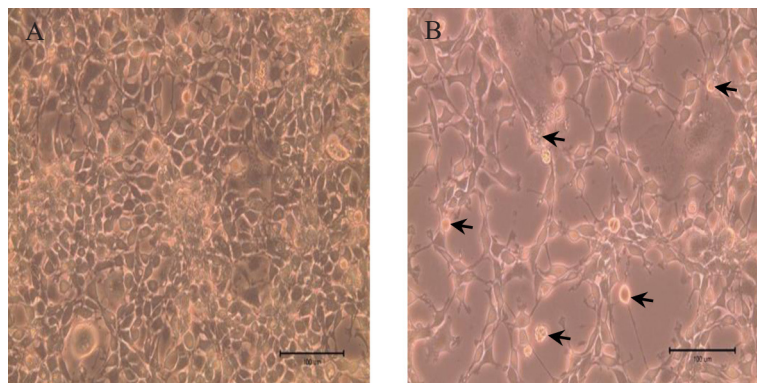


圖 2. 水禽小病毒感染測試。A：細胞沒有接種水禽小病毒，細胞生長狀況正常。B：細胞接種水禽小病毒後培養 48 – 72 小時，可見細胞死亡而脫落形成空洞及變圓收縮 (如箭頭所示) 等細胞病變作用 (CPE) 的現象。Scale bar = 100 μm 。

Fig. 2. Detection of waterfowl parvovirus infection. A: Cells without infection with waterfowl parvovirus. B: After infected with waterfowl parvovirus 48–72 hours, the cells showed cytopathic effects (CPE), including cell detachment leading to vacuole formation, as well as cell rounding and shrinkage (as indicated by arrows). Scale bar = 100 μm .

回收水禽小病毒感染後的細胞進行核酸萃取，再以 PCR 方式進行檢測。結果顯示感染後回收的細胞均呈現陽性反應，可被檢出一段分子量為 539 bp 的 DNA 片段。結果證實 MD-iPSC 經水禽小病毒感染後病毒可於細胞內進行複製，且所複製的病毒顆粒具有活性可再次感染細胞，確認 MD-iPSC 細胞株可作為水禽小病毒宿主細胞。此外，本研究同時也可以從沒有進行水禽小病毒感染操作的對照組 MD-iPSC 細胞 PCR 檢測呈陰性反應之結果，顯示本實驗建立之 MD-iPSC 細胞株為 parvovirus free (圖 3)。

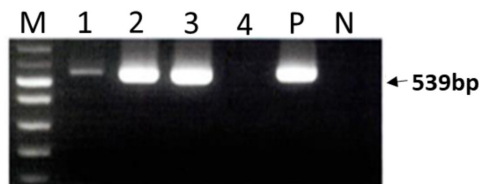


圖 3. 以聚合酶連鎖反應檢測經水禽小病毒感染的細胞。M：100 bp DNA ladder marker。1：以水禽小病毒感染之細胞。2 和 3：以水禽小病毒感染後回收細胞上清液感染之細胞。4：沒有感染之細胞。P：陽性對照組。N：陰性對照組。

Fig. 3. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of waterfowl parvovirus-infected cells. M: 100 bp DNA ladder marker. 1: Cells infected with waterfowl parvovirus. 2 and 3: Cells infected with waterfowl parvovirus recovered from cell supernatants of infected cells. 4: Cells without infection with waterfowl parvovirus. P: Positive control. N: Negative control.

II. EID₅₀ (50% Embryo infective dose) 檢測

為了評估增殖的病毒顆粒是否具有作為疫苗的潛力，將回收的病毒液以序列稀釋成 $10^{-1} - 10^{-6}$ ，再分別取 0.1 mL 接種到水禽小病毒抗體陰性之番鴨胚蛋 (10 - 12 日齡) 尿囊腔中，於接種後 7 天進行胚胎觀察是否有病變或死亡。結果在接種稀釋 $10^{-1} - 10^{-3}$ 的病毒液有超過 50% 的病變 (表 1)，且觀察到受感染的鴨胚胎死亡並伴有全身出血情形 (圖 4)，Saleh and Khodier (2020) 研究亦有相似的結果。依 Reed and Muench 法計算出 EID₅₀ 為 $10^{5.77}$ EID₅₀ / mL。

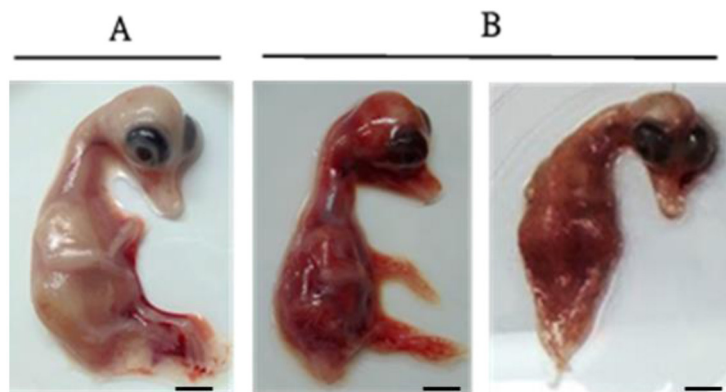


圖 4. 胚胎 EID₅₀ 感染劑量的測定。(A) 19 日齡 MD 番鴨胚胎作為對照組。(B) 胚胎在水禽細小病毒感染的第 7 天時表現出發育遲緩和皮下出血。Scale bar = 1 cm。

Fig. 4. Determination of embryo infection dose (EID₅₀). (A) A control 19-day-old MD muscovy duck embryo. (B) A waterfowl parvovirus infected embryos showed stunting and subcutaneous hemorrhage at 7 dpi. Scale bar = 1 cm.

表 1. MD iPSC 增殖之水禽小病毒進行 EID₅₀ 分析

Table. 1. EID₅₀ analysis of waterfowl parvovirus replicated by MD-iPSC

Dilution of inoculum	Check of eggs infected		Accumulated numbers		Total (A+B)	Percentage infected (%) A / (A + B) × 100%
	infected	not in-fected	infected (A)	not infected (B)		
10^{-1}	5	0	16	0	16	100 (16/16)
10^{-2}	4	1	11	1	12	91 (11/12)
10^{-3}	4	1	7	2	9	77 (7/9)
10^{-4}	3	2	3	4	7	42 (3/7)
10^{-5}	0	5	0	9	9	0 (0/9)
10^{-6}	0	5	0	14	14	0 (0/14)

III. 病毒液的去活化處理

將上述增殖收集 $10^{5.77}$ EID₅₀ / mL 的病毒液以最終濃度 0.02% 福馬林進行去活化處理 3 天，確保回收的病毒抗原無感染性，以利後續進行免疫測試。將去活化的病毒接種細胞進行感染測試，結果 MD-iPSC 接種去活化後的病毒液並未觀察到有 CPE 的現象，反之接種未去活化的病毒液之細胞有明顯 CPE 的現象發生 (圖 5)，顯示以最終濃度 0.02% 福馬林進行去活化處理 3 天，可以使病毒抗原尚失感染性。

IV. 血清抗體和試驗

20 隻 64 週齡沒有染水禽小病毒的清淨鵝分別於第 1 次免疫注射前、補強注射前及補強注射後 14 天進行採血分離血清，共採集 3 次血清。將不同稀釋倍數血清與等量之 $10^{5.77}$ EID₅₀ / mL 水禽小病毒液混合再加入細胞共培養 5 - 7 天，在以鵝隻免疫前收集的血清作為對照組均觀察到細胞有 CPE 現象，顯示免疫前的鵝隻血清中無抗體存在 (圖 6)。本研究以 MD-iPSC 增殖之水禽小病毒去活化後為抗原進行免疫，於第一次免疫後 14 天與第二次免疫後 14 天血清中的抗體力價分別為 4 - 128 倍與 32 - 512 倍，在免疫前的血清樣品均無抗體被檢出，另外僅注射免疫佐劑加 PBS 的對照組亦無抗體被檢出 (表 2)。

陳等人 (2014) 研究指出，以國產的水禽小病毒活毒疫苗對雛鵝於 2 日齡或 9 日齡施打疫苗，免疫後 14 日之抗體力價與未施打疫苗雛鵝隻抗體力價並無差異，且雛鵝施打疫苗無法使抗體及時爬升。因此目前國內生產的水禽小病毒活毒疫苗之使用均建議為提供健康種鴨、鵝進行免疫注射，藉由移行抗體保護雛鵝、雛鴨以預防水禽小病毒感染。

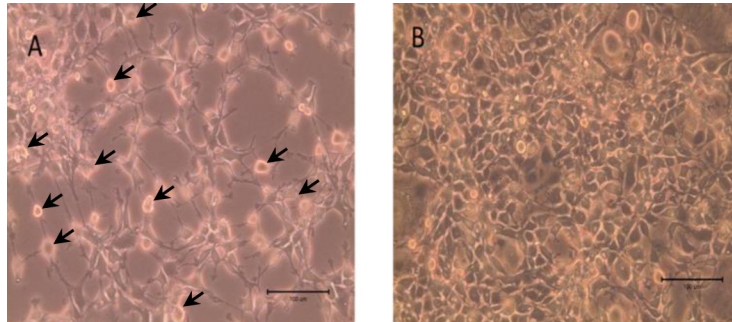


圖 5. 水禽小病毒去活化後感染測試。A：細胞感染未去活化處理之水禽小病毒，可見細胞死亡而脫落形成空洞及變圓收縮（如箭頭所示）等細胞病變作用 (CPE) 的現象。B：細胞接種去活化處理之水禽小病毒，細胞生長狀況正常。Scale bar = 100 μm。

Fig. 5. Post-inactivation infection assay of waterfowl parvovirus. (A) Cells infected with active virus displayed cytopathic effects (CPE), including cell detachment leading to vacuole formation, as well as cell rounding and shrinkage (as indicated by arrows). (B) Cells infected with inactivated virus maintained a normal morphology. Scale bar = 100 μm.

Goug and Spackman (1982) 指出，以減毒水禽小病毒疫苗對無抗體雛鵝施打，經免疫後 14 日檢測可觀察到抗體上升。李等人 (2005) 研究顯示利用胚蛋生產水禽小病毒製成不活化疫苗，對雛鵝及鴨進行免疫注射抗體力價均可達 800 倍以上。本研究以細胞進行水禽小病毒增殖去活化處理後作為抗原再搭配免疫佐劑，進行 MD 鵝隻免疫注射，在第 1 次免疫後 14 天亦可觀察到抗體的上升，大部分均可達 32 倍以上，且在經補強注射後 14 天其抗體力價可達 32 – 512 倍，但編號 1 – 8 和 1 – 13 其抗體第 1 次免疫後只小幅上升 4 倍；第 2 次免疫後僅再上升到 32 倍，推測可能與個體的免疫反應有關。

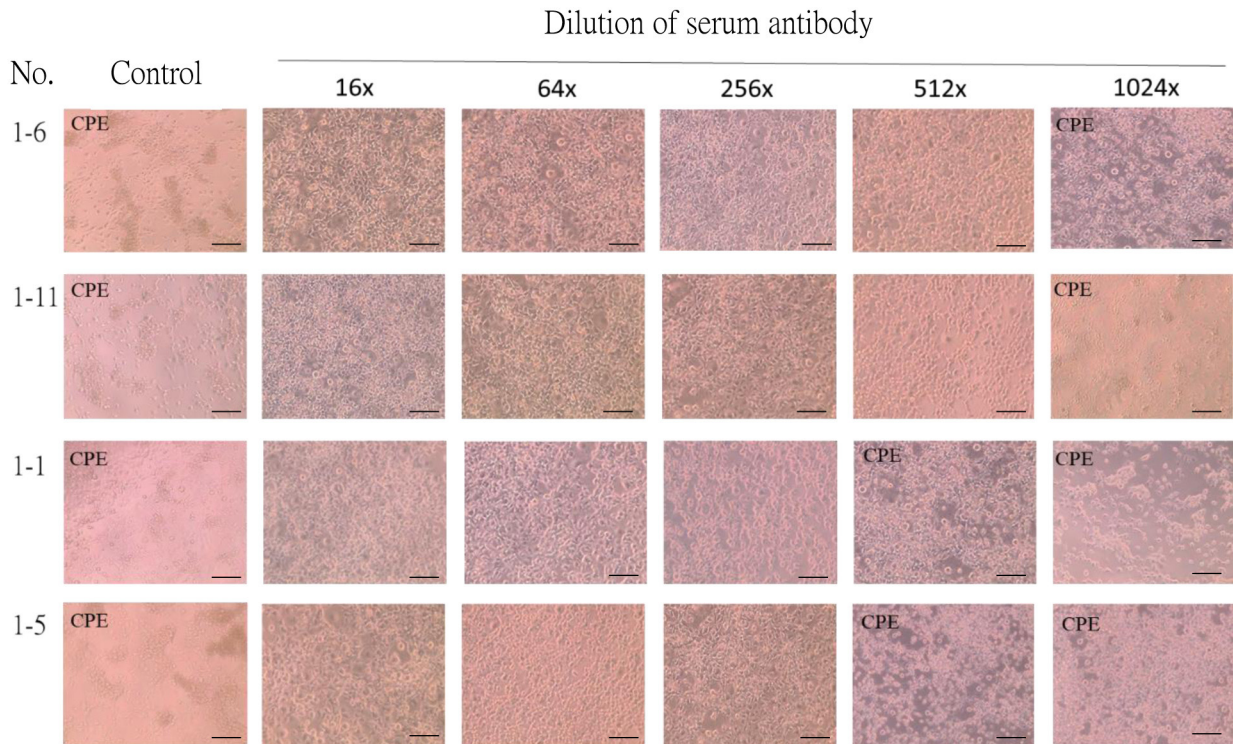


圖 6. 血清水禽小病毒抗體中和試驗。對照組：為免疫注射前收集之血清。Scale bar = 100 μm。

Fig. 6. Neutralization test of serum against waterfowl parvovirus antibody. Control group: serum collected before immunization. Scale bar = 100 μm.

表 2. 血清中水禽小病毒抗體力價分析

Table 2. Analysis of serum waterfowl parvovirus antibody titers

No.	Antibody titer		
	Before im — munization	14 days after the 1 st immunization	14 days after the 2 nd immunization
1 — 1	—	64	256
1 — 2	—	64	128
1 — 3	—	128	512
1 — 4	—	32	128
1 — 5	—	128	256
1 — 6	—	64	512
1 — 7	—	32	128
1 — 8	—	4	32
1 — 9	—	64	128
1 — 10	—	32	128
1 — 11	—	64	512
1 — 12	—	64	128
1 — 13	—	4	32
1 — 14	—	16	64
1 — 15	—	32	128
2 — 1	—	—	—
2 — 2	—	—	—
2 — 3	—	—	—
2 — 4	—	—	—
2 — 5	—	—	—

No. 1-1 ~ 1-15: The waterfowl parvoviruses were propagated in cells, inactivated with formalin, and mixed with an adjuvant for immunization. No. 2-1 ~ 2-5 : Control geese were injected with virus-free adjuvant.

目前商業化疫苗的生產方式主要可分為兩種：胚胎蛋製程與細胞培養製程。然以胚胎蛋為基礎的疫苗生產方式存在潛在風險，例如在禽流行情爆發期間，合格等級的蛋源可能出現短缺，進而影響疫苗的持續生產與供應。相較之下，細胞培養技術為目前全球疫苗開發領域所公認的最新發展趨勢。許多國際疫苗製造商已積極尋求替代胚胎蛋的生物基質，用以建立更穩定且可控的疫苗生產平台。以流感疫苗為例，細胞培養技術已被視為替代胚胎蛋生產的最佳方案。哺乳類細胞株如 Madin-Darby canine kidney(MDCK) 細胞與 African green monkey kidney epithelial(Vero) 細胞，已廣泛應用於商業化流感疫苗的生產 (Liu *et al.*, 2009 ; Ehrlich *et al.*, 2012)。

雖然已有部分研究報導禽類誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 應用於疫苗生產 (Shittu *et al.*, 2016 ; Liou *et al.*, 2019)，亦有以鴨源胚幹細胞 (如 EB66 細胞株) 成功作為疫苗與重組蛋白生產平台的平臺 (Olivier *et al.*, 2010)，但目前可應用於商業化疫苗量產之禽類 iPSC 細胞株，其相關製程技術仍處於起步階段，尚需進一步研究與開發，以提升其應用成熟度與生產穩定性。

我國現行用於水禽小病毒疫苗的生產方式，主要採用 MD 番鴨胚蛋作為病毒培養基質。然而由於番鴨產蛋具明顯季節性，於非產蛋季節易發生胚蛋供應不足之問題，進而影響疫苗生產流程。本研究成功建立番鴨誘導多能性幹細胞株 (MD-iPSC)，並證實其可作為水禽小病毒之宿主細胞。經病毒感染後，該細胞株可支持病毒於細胞內複製，且所產生之病毒顆粒亦具再次感染 MD-iPSC 的能力。進一步由該細胞株培養並收集的病毒液，經去活化處理並添加免疫佐劑後，施打於 MD 鵝隻進行免疫實驗，結果顯示可誘發良好的抗體反應。綜合上述結果，MD-iPSC 可作為水禽小病毒的宿主細胞，並具作為疫苗生產平台之潛力。

參考文獻

林德田、吳文童、廖明輝、劉宏仁、李獻德。2005。水禽小病毒感染症與鴨病毒性肝炎混合不活化疫苗之商品化

(I)。94 年度行政院農業委員會動植物防疫檢疫局期末摘要報告。

- 張照夫、蔡信雄、游碧艷。1983。肆虐本省之鵝病毒性腸炎。臺灣省畜牧獸醫學會會報 42：37-46。
- 陳燕萍、涂央昌、李淑慧、蔡向榮。雛鵝之水禽小病毒免疫試驗。2014。家畜衛試所研報 49：51-64。
- 劉振發、張家語、曲鳳翔、陳立人。2024。番鴨誘導多能性幹細胞株之建立與水禽小病毒感染測試。畜產研究 57：98-106。
- Berns, K. I. 1990. Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 54: 316-329.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus. Res.* 33: 91-174.
- Daeffler, L., R. R. Hörlein, and J. Nüesch. 2023. Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J. Virol.* 77: 2466-2478.
- Ehrlich, H. J., J. Singer, G. Berezuk, S. Fritsch, G. Aichinge, M. K. Hart, E. A. Wael, D. Portsmouth, O. Kistner, and P. N. Barrett. 2012. A cell culture-derived influenza vaccine provides consistent protection against infection and reduces the duration and severity of disease in infected individuals. *Clin. Infect. Dis.* 54: 946-954.
- Gough, R. E., and D. Spackman. 1982. Studies with a duck embryo adapted goose parvovirus vaccine. *Avian Pathol.* 11: 503-510.
- Herrero, Y. C. M., J. J. Cornelis, C. Herold-Mende, J. Rommelaere, J. R. Schlehofer, and K. Geletneky. 2004. Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int. J. Cancer* 109: 76-84.
- Jansson, D. S., R. Feinstein, V. Kardi, T. Mató, and V. Palya. 2007. Epidemiologic investigation of an outbreak of goose parvovirus infection in Sweden. *Avian Dis.* 51: 609-613.
- Ji, J., Q. M. Xie, C. Y. Chen, S. W. Bai, L. S. Zou, K. J. Zuo, Y. C. Cao, C. Y. Xue, J. Y. Ma, and Y. Z. Bi. 2010. Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop-mediated isothermal amplification assay. *Poult. Sci.* 89: 477-483.
- Liou, J. F., W. R. Wu, L. R. Chen, and Y. L. Shiue. 2019. Establishment of an induced pluripotent cell line from Taiwan black silkie chick embryonic fibroblasts for pseudovirus production. *Sci. Rep.* 9: 15745. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52282-72>.
- Liu, J., X. Shi, R. Schwartz, and G. Kemble. 2009. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 27: 6460-64603.
- Lu, Y. S., D. F. Lin, Y. L. Lee, Y. K. Liao, and H. J. Tsai. 1993. Infectious bill atrophy syndrome caused by parvovirus in a co-outbreak with duck viral hepatitis in duckling in Taiwan. *Avian Dis.* 37: 591-596.
- Mengyu, T., L. Fei, C. Shun, W. Mingshu, and C. Anchun. 2015. Advances in parvovirus non-structural protein NS1 induced apoptosis. *Chinese J. Virol.* 31: 679-684.
- Moffatt, S., N. Yaegashi, K., Tada, N. Tanaka, and K. Sugamura. 1998. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J. Virol.* 72: 3018-3028.
- Olivier, S., M. Jacoby, C. Brillon, S. Bouletreau, T. Mollet, O. Nerriere, A. Angel, S. Danet, B. Souttou, F. Guehenneux, L. Gauthier, M. Berthomé, H. Vié, N. Beltraminelli, and M. Mehtali. 2010. EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2: 405-415.
- Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 27: 493-497.
- Saleh, A. A., and M. H. Khodier. 2020. Preliminary Studies on the virus causing outbreak of duckling short beak and dwarfism syndrome (SBDS) in Egypt. *J. Appl. Vet. Sci.* 5: 55-60.
- Shittu, I., Z. Zhu, Y. Lu, J. M. Hutcheson, S. L. Stice, F. D. West, M. Donadeu, B. Dungu, A. M. Fadly, G. Zavala, N. Ferguson-Noel, and C. L. Afonso. 2016. Development, characterization and optimization of a new suspension chicken-induced pluripotent cell line for the production of Newcastle disease vaccine. *Biologicals* 44: 24-32.
- Smith, D., P. Ward, and R. Linden. 1999. Comparative characterization of rep proteins from the helper-dependent adeno-associated virus type 2 and the autonomous goose parvovirus. *J. Virol.* 73: 2930-2937.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
- Takehara, K., K. Hyakutake, T. Imamura, K. Mutoh, and M. Yoshimura. 1994. Isolation, identification and plaque titration of parvovirus from Muscovy ducks in Japan. *Avian Dis.* 38: 810-815.
- Takehara, K., T. Nishio, Y. Hayashi, J. Kanda, M. Sasaki, N. Abe, M. Hiraizumi, S. Saito, T. Yamada, and M. Haritani. 1995.

- An outbreak of goose parvovirus infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 4: 777-779.
- Woźniakowski, G., E. Samorek-Salamonowicz, and W. Kozdruń. 2012. Quantitative analysis of waterfowl parvoviruses in geese and Muscovy ducks by real-time polymerase chain reaction: correlation between age, clinical symptoms and DNA copy number of waterfowl parvoviruses. *BMC. Vet. Res.* <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/29>.
- Zádori, Z., J. Erdei, J. Nagy, and J. Kisary. 1994. Characteristics of the genome of goose parvovirus. *Avian Pathol.* 23: 359-364.
- Zádori, Z., R. Stefancsik, T. Rauch, and J. Kisary. 1995. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology* 212: 562-573.
- Zhang, J., P. Liu, Y. Wu, M. Wang, R. Jia, D. Zhu, M. Liu, Q. Yang, Y. Wu, X. Zhao, S. Zhang, Y. Liu, L. Zhang, Y. Yu, Y. You, S. Chen, and A. Cheng. 2019. Growth characteristics of the novel goose parvovirus SD15 strain in vitro. *BMC. Vet. Res.* 15: 63-71.

Study of induced pluripotent stem cell lines from muscovy ducks for applications in waterfowl parvovirus vaccine production ⁽¹⁾

Jenn- Fa Liou ⁽²⁾ Yu-Hsin Chen ⁽³⁾ Chao-Hung Chiang ⁽⁴⁾ and Fung-Hsiang Chu ⁽²⁾⁽⁵⁾

Received: Jun. 30, 2025; Accepted: Sep. 8, 2025

Abstract

Currently, the waterfowl parvovirus vaccines of Taiwan are produced by using muscovy duck embryonated eggs. When a nationwide endemic situation occurs, a large amount of clean fertilized duck eggs will be in critical demand. However, in the outbreak of avian influenza, the muscovy duck will also be under attack while the source of embryonated eggs will be affected. Therefore, an alternative matrix for vaccine production becomes a top priority. The purposes of this study was to establish muscovy duck induced pluripotent stem cell (MD-iPSC) line, followed by evaluating the potential of this cell line for vaccine productions. The results showed that muscovy duck iPSC (MD-iPSC) presented positive reaction via the polymerase chain reaction, after waterfowl parvovirus contracted infection and retrieved cells. It was confirmed that MD-iPSC could become the host cell of waterfowl parvovirus. The titers of retrieved cells for analysis was 105.77 EID₅₀ / mL, whereas the virus suspension was inactivated with formalin and administered via intramuscular injection into 64-week-old geese without waterfowl parvovirus for immunogenicity testing. Following two immunizations, the serum antibody titers ranged from 32 to 512 times, indicating the potential for MD-iPSC cell line to act as host cell for waterfowl parvovirus and production of vaccines against waterfowl parvovirus.

Key words: Muscovy duck, Induced pluripotent stem cells, Vaccine.

(1) Contribution No. 2840 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Livestock Management Division, MOA-TLRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Northern Region Branch, MOA-TLRI, Miaoli 36843, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: fhchu@mail.tlri.gov.tw.