

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95142518

※申請日期：95.11.17

※IPC 分類：A61D 18/00 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

禽流感免疫雞蛋之製作方法

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

養身生物科技有限公司

代表人：(中文/英文) 謝義雄

住居所或營業所地址：(中文/英文)

高雄縣大樹鄉統嶺村統嶺路 88 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國

三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

鄭長義

國 籍：(中文/英文)

中華民國

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☐ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種禽流感免疫雞蛋之製作方法，特別係將病毒純化減毒作為抗原打入雞隻(蛋雞)體內，使其產生抗體，經血清移轉至蛋黃中者。

【先前技術】

按(一) 世界衛生組織全球流行感冒計劃執行人「史提爾」於 2004 年 11 月 25 日警告：「可能衝擊全球每一個國家的新一波流感已前所未有地迫近」，「禽流感 H₅N₁ 病株當然是最有可能引爆下一波流感之病毒」。又世衛組織(WHO)西太平洋地區主任「尾身茂」2005 年 2 月 13 日警告指出：禽流感病毒若突變將引爆全球疫情，且病毒可能需數年才能根除。香港與美國科學家於 2006 年 10 月 31 日於美國「國家科學院學報」上發表報告指出：2005 年於中國發現的禽流感變種「類福建病毒」可能早已在中國與東南亞流竄。除發展出抗藥性，造成家禽與人類感染病例增加外，甚至可能繼續向歐亞大陸挺進，引發第三波禽流感疫情，造成人類的浩劫。

(二) 流感之發生流行史

1. 1918 年發生之流感可能由禽流感病毒引起。
2. 1957 年發生之流感係由 A 型感冒病毒結合人流感病毒及禽流感病毒重組而發生。
3. 1968 年發生之流感同 1957 年發生之病毒，得知「似乎人體同時感染二種不同流感病毒時將會特別的危險」。
4. 1996-2004 亞洲爆發 H₅N₁ 迄今，有愈演愈烈之現象，並造

成恐慌與不安。

至於禽流感之所以要重視原因係：

(一) 禽流感人傳人，應及早預防

禽流感病毒威力不遜於 SARS，其理由為

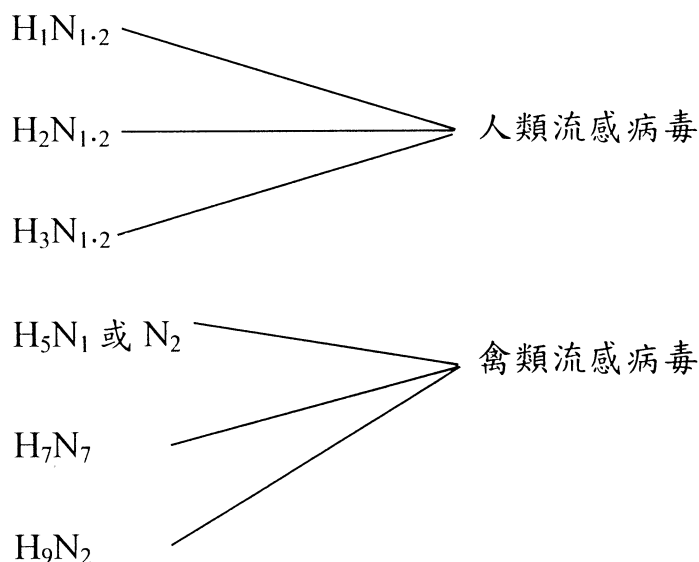
1. 人感染禽流感病毒，未發燒前即有傳染性，致一旦發生，則很難控制。

2. 死亡率高達 70%，據 WHO 統計自 2003 下半年至今，已造成 150 人喪命。

(二) 病毒分類及對人體侵害原因

1. 分類

流行性感冒病毒以表面抗原特徵分類，其中甲類流感病毒的主要抗原紅血球凝集素 H (Hemagglutinin) 及 N (Neuraminidase)。H 如病人的一把鑰匙，用以打開及侵入人類或牲畜的細胞，而 N 是一種幫助病毒感染其他細胞的酵素，不同的 H 及 N 抗原組合可變化出不同品種病毒。



(尾隨的數字 5 和 1，是代表該種抗原的類型，現今發現的 H₅N₁ 病毒乃兩種病毒通過媒體合併而成，它能夠同時在人類和禽類增殖)

2. 對人類侵害之原因

人體內有人類流感病毒之受體，禽類有禽流感病毒之受體，互不侵襲，但因豬隻同時具有人流感病毒及禽流感病毒二種受體，諸如豬隻同時感染二類不同的流感病毒後產生重組變化，而可使人類感染而致病。(如 H₅N₁ 強毒型)

3. H₅N₁ 流感病毒(亦稱人新型流感病毒)

該病毒已在東亞及東南亞造成至少九個國家的散播，該病毒屬乙基因型，此株可造成數種不同種類動物致病，對傳統抗病毒藥物(如 Anantadine, Rinantadine)都具有抗藥性。H₅N₁ 病毒可透過空氣傳播，打噴嚏在距離三呎內範圍，均可受傳染，亦可透過冷氣槽擴散，如有空調之交通工具及辦公室，都是病毒傳播的途徑。然到目前仍僅限於含抗體不高之血清或乳汁等極為困難之取得(消極預防)，即沒有任何人發明能產生抗體之物，收集容易，抗體取得衛生及抗體含量高與成本低及提隨時提供預防者，另外 H₅N₁ 病毒與一般流感病毒均屬濾過性病毒，其病徵包括：流鼻水、咳嗽、喉嚨痛、畏寒、胃痛、頭痛、肌肉痠痛、發燒及嘔吐等，並可迅速併發肺炎及併發心、肝、腎及血液循環等器官功能受損而致死，死亡率至少 50% 以上。

由上所述，得知該具有抗藥性之人新型流感病毒對人類之威脅已到達危險地步，因此是否能提供一種取得抗體較容易、

衛生及抗體含量高，並具生產成本低，預防效果佳之禽流感免疫雞蛋之製作方法，實有其必要，此亦乃為本案發明之發明目的所在。

【發明內容】

本發明提供一種禽流感免疫雞蛋之製作方法，其係利用生物科技免疫原理，即是利用生物科技的方法，將禽流感病毒(H_5N_2 或 H_5N_1)，經純化減毒後，當做抗原，打入蛋雞體內，利用長效性基劑的慢慢釋放，蛋雞體內會產生對禽流感病毒之抗體，由血清中移轉到蛋黃中(稱 IgY)後，即可獲得被動免疫(passive immunization)，而立即獲得抗體，食用禽流感之免疫雞蛋，可減低禽流感病毒之入侵，避免禽流感大流行。

本發明之優點：

- (1)製作免疫雞蛋之材料蛋雞，飼養規模容易擴大，不會匱乏。
- (2)雞蛋收集容易，由雞蛋取得抗體較血清來得衛生。
- (3)雞蛋中 IgY(蛋黃免疫抗體)，含量較哺乳類血清或乳汁中抗體之含量來得高。
- (4)生產成本低。
- (5)可每天食用，(雞蛋中富含其他營養素)，預防效果佳。

【實施方式】

本發明之禽流感免疫雞蛋之製作方法，敬請參閱第一圖所示，係為本發明之方法流程方塊圖，其主要係以禽流感之病毒(1) (H_5N_2 或 H_5N_1) 打入雞隻體內(2)(蛋雞)，於第二週追加一劑(3)，並於屆滿8週補強一劑，免疫後第三週雞隻體內血清，即呈現有禽流感病毒免疫抗體，而第四週其產蛋蛋黃中，即含

有病毒免疫抗體(4)(IgY)。

至於免疫雞蛋之製作方法，其係先準備：

(一) 材料：

選取並產蛋中之白來亨蛋雞(30-60 週齡)。

(二) 病毒培植、疫苗製作與抗原施打：

1. 病毒(H₅N₂ 或 H₅N₁)培植

(1) 將取得之病毒解凍後，加入抗生素。

(2) 直接打入受精蛋中，步驟同 2.疫苗(病毒)之製備。

(3) 抽出之尿囊液測定病毒力價穩定後便為第一代病毒液。

(4) 再以第一代病毒液進行增殖。

2. 疫苗(病毒)製備

敬請參閱照片 1.2.3.4.5.6，係分別為本發明疫苗(病毒)製備之接蛋前先照蛋，將氣室劃出之實施例及受精蛋放置操作台前經酒精消毒(器具包括：錐子、注射針都需經酒精燈消毒)之實施例及錐子經酒精燈過火，在劃線上方刺一小孔之實施例及注射針抽取病毒液，每顆蛋注入病毒液(一)(二)實施例及注入病毒液後，使用礦物油封住孔洞實施例，本發明之疫苗(病毒)製備，首先係：

(1) 加入抗生素 penicillin streptomycin 200-300μL。

(2) 病毒接蛋(受精 9-10 日雞蛋使用或受精 14 日鴨蛋)

步驟說明如下：

A. 接蛋前先照蛋，將氣室劃出。(照片 1.)

B. 受精蛋放置操作台前需先經酒精消毒(器具包括：錐

子、注射針都需經酒精燈消毒)。(照片 2.)

C. 錐子經酒精燈過火，在劃線上方刺一小孔。(照片 3.)

D. 注射針抽取病毒液，每顆蛋注入 0.2mL 病毒液。此時
需注意針頭後方不可以碰觸到雞蛋，以免污染。(照片
4.及照片 5.)

E. 注入病毒液後，使用礦物油封住孔洞。(照片 6.)

F. 接蛋後隔日照蛋，將胚胎死亡雞蛋丟掉。

G. 第 2 日照蛋，將胚胎死亡雞蛋置入 4°C 冰箱冷藏。

H. 第 3 天，不管胚胎有無死亡，均置入 4°C 冰箱冷藏。

經放置半天或隔日準備抽取尿囊液。

3. 抗原(疫苗)施打

第一次每隻施打疫苗 1mL 於胸部肌肉，二週後追加一劑，第三週開始，每週採血及撿蛋一次，測定血清中抗體及蛋黃中抗體(IgY)之力價。

(三)抗體力價判定方法

1. 血清力價測定：

(1) 血球液製作

A. 約取總採血液量 1/2-1/4 的抗凝固劑 (Alsver)於針筒中。

B. 採雞血後經細紗網過濾，以去除血液中大的凝塊，再加適量的滅菌生理鹽水，充份混合。

C. 1000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，再加入適量滅菌生理鹽水，輕輕懸浮紅血球。

D. 重複前述步驟，1000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，再

加入適量滅菌生理鹽水，輕輕懸浮紅血球。

E. 經 1500 rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液，將血球調成 1 % 雞紅血球懸浮液。

F. 將製備好之 1%雞紅血球懸浮液放置於 4°C 冰箱中。

※Alserver's Sol.配製

1. Dextrose 2.5 mg

2. Nacl 4.2 mg

3. Citric acid ($C_6H_8O_7$) 0.55mg

4. Sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_2 \cdot 2H_2O$) 8.0 mg

5. Distilled water 1000mL

調整 pH 值為 6.1-6.2，然後以 0.22mm 過濾膜過濾，保存在 4°C。

(2) 血球凝集試驗(HA)

目的：測病毒(抗原)數目

A. 取測定盤 96 孔每孔加入 0.85% NaCl 各 25 μ L。

B. 取病毒液 25 μ L，做連續 2 被稀釋至第 11 孔。

C. 每孔加入 25 μ L 0.85% NaCl。

D. 每孔加入 25 μ L 1% 雞隻 RBC。

E. 靜置 40 分鐘後判讀。

凝集 + 凝集為指標

降沈 —

4HA 的病毒液:HA 力價測定法測定後稀釋病毒成 4HA 單位病毒液要做 HI 所需加入之病毒液需做 HA 確定力價

後，再做 4HA 或 8HA，通常力價大於 2^{11} 即做 8HA 稀釋。

ex: 病毒液測出 $2^5 = 32$

4HA $= > 32/4 = 8 = > 7:1 = > \text{NaCl} : \text{病毒液}$

(3) 血球凝集抑制試驗 (HI)

- A. 取測定盤 96 孔每孔加入 0.85% NaCl 各 25 μ L。
- B. 取待測物 25 μ L，做連續 2 被稀釋至第 11 孔(待測物為血清與卵黃，在做分析前需要經過水浴 56 $^{\circ}$ C、30 分鐘，非動化過程，目的為去除非特異性血清或卵黃中還有其他因子始其造成不正常凝血)。
- C. 由第 1 至 11 孔每孔加入病毒液(力價確定，並且稀釋後)。
- D. 靜置 30 分鐘。
- E. 每孔加入 25 μ L 1% 雞 RBC。
- F. 靜置 40 分鐘後判讀。

凝集 +

降沈 — 降沈為指標

目的：測定抗體數目

2. 蛋黃抗體力價測定：

(1) 蛋黃萃取液之製備

目的：抽取抗體

- A 取 2 mL 蛋黃至離心管。
- B. 加入 2 mL 0.85% NaCl。
- C. 振盪機混合均勻。
- D. 加入 4 mL Chloroform (目的溶解脂肪)，把上搖勻至變硬。

E. 靜置 10 分鐘以上(約 15 分鐘)。

F. 利用離心機 2000rpm，4°C、10 分鐘。

G. 取上清液 (內含抗體及病原)。上清液中含有抗體病原，故可用於檢測蛋黃中是否含抗原。

H. 上清液冰至 -20°C 儲藏。

(2) 抗體力價測定

同血球凝集抑制試驗。

ps:因為卵黃為 2mL、NaCl 2mL、Chloroform 4mL

卵黃被稀釋成 1:3

所以抗體測出後要 $\times 3$

(四)結果判定:

由表一得知，免疫後第三週蛋雞體內血清即呈現有禽流感病毒免疫抗體，而第四週其產蛋之蛋黃即含有禽流感病毒之免疫抗體(IgY)，此即證明，生產禽流感之免疫雞蛋，應於母雞接種禽流感病毒後，第四週即可成功。

至於雞隻各週齡力價測定變化圖，敬請參閱如表二所示。

綜上所述，本發明確係利用自然法則之技術思想之創作，其申請前未曾見於刊物或公開使用，亦非為公眾所知悉，且非為其所屬技術領域中具有通常知識者依申請前之先前技術所能輕易完成，實符合發明專利要件，敬請 審查委員盡速准予專利權益，俾禽流感大流行時，得予快速提供國人食用，以減少感染擴大，達到遏阻之效果，並鼓勵國人之

發明創作。

【圖式簡單說明】

第一圖係為本發明之方法流程方塊圖。

照片一：係為本發明疫苗（病毒）製備之接蛋前先照蛋，將氣室劃出之實施例。

照片二：係為本發明之受精蛋放置操作台前經酒精消毒（器具包括：錐子、注射針都需經酒精燈消毒）之實施例。

照片三：係為本發明之錐子經酒精燈過火，在劃線上方刺一小孔之實施例。

照片四：係為本發明注射針抽取病毒液，每顆蛋注入病毒液(一)實施例。

照片五：係為本發明注射針抽取病毒液，每顆蛋注入病毒液(二)實施例。

照片六：係為本發明注入病毒液後，使用礦物油封住孔洞實施例。

表一：係為本發明血清及蛋黃中抗體力價測定結果。

表二：係為本發明白殼蛋雞各週齡力價測定變化圖。

【主要元件符號說明】

- (1) — 病毒
- (2) — 打入雞隻體內
- (3) — 第二週追加一劑及屆滿8週補強一劑
- (4) — 施打疫苗後第四週其產蛋蛋黃中即含有病毒免疫抗體(IgY)

五、中文發明摘要：

一種禽流感免疫雞蛋之製作方法，特別是將取得的病毒解凍加入抗生素直接打入受精蛋中，再抽取尿囊液作病毒培植、疫苗之製備及對雞隻施打並於二週後追加一劑，與屆滿8週補強一劑。蛋雞施打疫苗(H₅N₂或H₅N₁)使雞隻體內產生抗體，經由血清移轉到蛋黃中，第四週其產蛋之蛋黃即含有禽流感病毒之免疫抗體 Immunoglobulin of yolk(IgY)者。

六、英文發明摘要：

十、申請專利範圍：

1. 一種禽流感免疫雞蛋之製作方法，係以病毒解凍加入抗生素，直接打入受精蛋中，再抽取尿囊液作培植、疫苗之製備及對雞隻施打，並於二週後之追加一劑與屆滿8週之補強一劑，施打疫苗後使雞隻體內產生抗體，經由其血清移轉到蛋黃中，第四週其產蛋之蛋黃含有病毒之免疫抗體(IgY)，即可得免疫雞蛋。

2. 如申請專利範圍第1項所述之禽流感免疫雞蛋之製作方法，其中病毒可為禽流感病毒H₅N₂或H₅N₁。

3. 如申請專利範圍第1項或第2項所述之禽流感免疫雞蛋之製作方法，其中疫苗之製備包括：

(A) 將培植出之病毒加入抗生素；

(B) 將病毒液接蛋(於蛋之氣室刺小孔注入病毒液後，再用礦物油封住小孔)；

(C) 隔日照蛋，胚胎死亡的蛋丟棄；

(D) 第2日照蛋，將胚胎死亡的蛋置入4°C冰箱冷藏；

(E) 第3天，不管胚胎有無死亡，均置入4°C冰箱冷藏；

(F) 經放置半天或隔日即可抽取尿囊液，成為施打之疫苗。

4. 如申請專利範圍第3項所述之禽流感免疫雞蛋之製作方法，其中疫苗製備之病毒液接蛋，可為受精9-10日之雞蛋或受精約14日鴨蛋。

5. 如申請專利範圍第1項或第2項所述之禽流感免疫雞蛋之製作方法，其疫苗對雞隻之施打，係可為1mL於胸部肌肉。

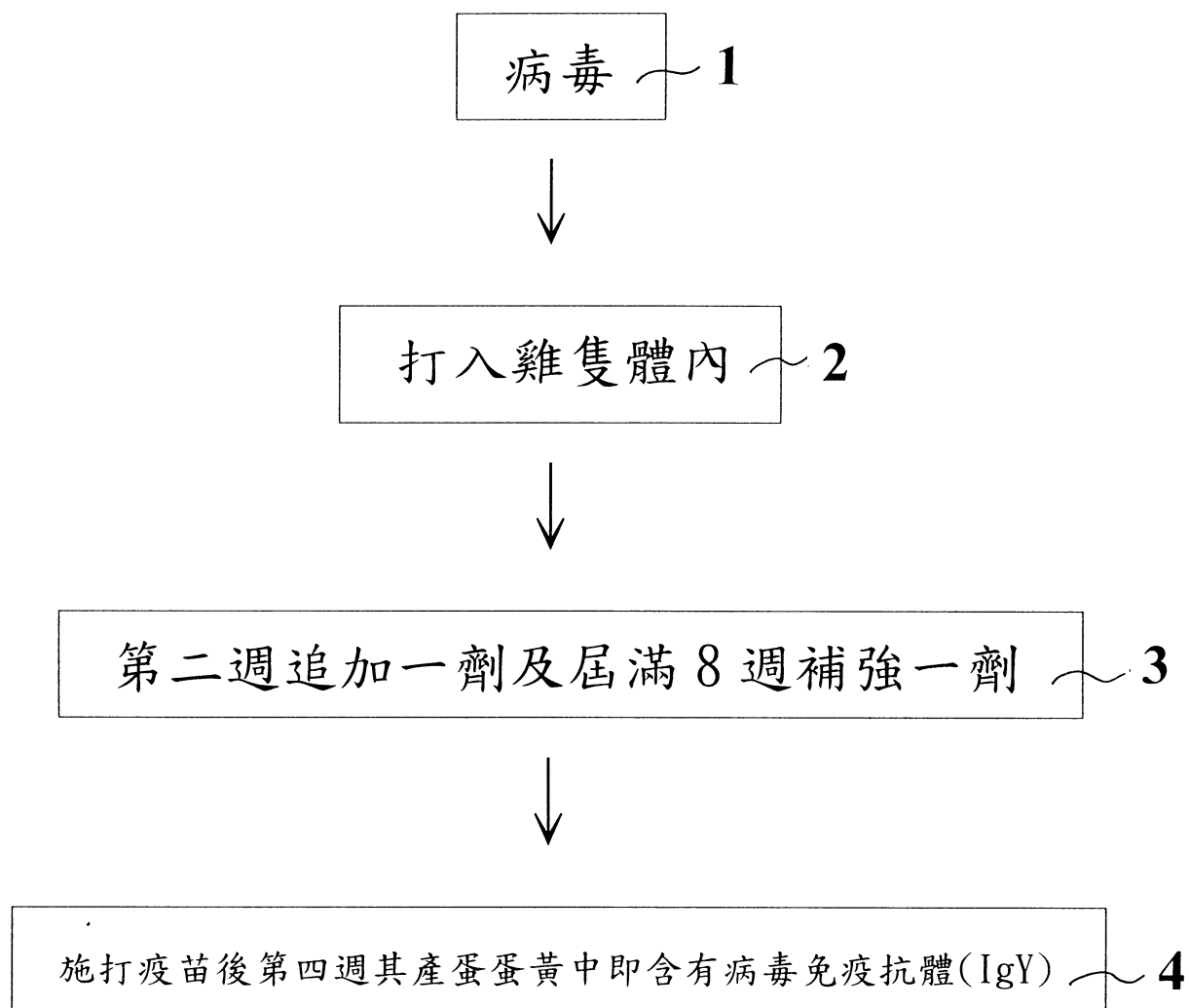
6. 如申請專利範圍第1項所述之禽流感免疫雞蛋之製作方法，其中蛋黃含有病毒之免疫抗體(IgY)之力價測定，係採血球凝

制試驗方法，包括：

- A. 取測定盤 96 孔每孔加入 0.85% NaCl 各 25 μ L。
- B. 取待測物 25 μ L，做連續 2 被稀釋至第 11 孔(待測物為血清與卵黃，在做分析前需要經過水浴 56 $^{\circ}$ C、30 分鐘，非動化過程，目的為去除非特異性血清或卵黃中還有其他因子始其造成不正常凝血)。
- C. 由第 1 至 11 孔每孔加入病毒液(力價確定，並且稀釋後)。
- D. 靜置 30 分鐘。
- E. 每孔加入 25 μ L 1% 雞 RBC。
- F. 靜置 40 分鐘後判讀。

凝集 +

降沈 — 降沈為指標



第一圖

表一、血清及蛋黃中抗體力價測定結果

免疫後週數	血清中力價(HI/mL)	蛋黃中力價(IgY/mG)
免疫前	< 2.00	< 2.00
三	3.70	< 2.00
四	6.80	8.58
五	6.90	10.08
六	6.00	8.91
七	6.40	7.75
八	7.00	6.78
九	9.50	6.92
十	9.33	6.08
十一	8.67	6.92
十二	6.78	5.92
十三	7.22	7.58
十四	7.00	6.81
十五	4.67	6.83
十六	6.50	7.36

※ 屆滿八週補強一次

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(1)－病毒

(2)－打入雞隻體內

(3)－第二週追加一劑及屆滿8週補強一劑

(4)－施打疫苗後第四週其產蛋蛋黃中即含有病毒免疫抗體(IgY)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：