

生物安全教育訓練

慢病毒載體

原理、應用與生物安全操作

適用對象：P2 (BSL-2) 實驗室管理與操作人員

課程時數：60 分鐘

講員：梁毓津 醫研部副研究員

課程大綱

1

慢病毒載體之設計原理

Retrovirus 骨架、基因體結構、三代演進與安全設計

2

生醫領域之研究應用

穩定表現、基因靜默、CRISPR 遞送與本院研究情境

3

風險評估

兩大核心危害與傳播途徑

4

生物安全操作

法規、防護、除污、潑濺與暴露處置

1

慢病毒載體原理

Principles of lentiviral vectors

慢病毒載體如何從致病病毒，被改造成安全的基因遞送工具？

1

慢病毒是什麼？

慢病毒屬（學名：Lentivirus）是反轉錄病毒科（Retroviridae）旗下的一個屬。lenti- 源自拉丁文 lentus，意思是「緩慢的、遲緩的」，用來形容天然存在的慢病毒 (HIV、FIV、SIV) 感染後潛伏期很長、發病進展非常緩慢的特徵。

天然存在的慢病毒屬目前主要包含 10 種能感染靈長類 貓科 反芻動物 馬科 等哺乳動物的病毒。
例如: 造成人類愛滋病（AIDS）的主要病原體 HIV-1（人類免疫缺陷病毒 1 型）就是一種天然存在的慢病毒。

基因整合能力：能把自己的 RNA 反轉錄成 DNA，並永久嵌入宿主細胞的染色體中。（所有逆轉錄病毒科的病毒，都可以）
能在非分裂細胞中穿透核膜：分裂與非分裂細胞皆能感染。（只有 lentivirus 可以，其他逆轉錄病毒不行）

如何選擇：質體轉染 vs 病毒載體



優先用質體轉染

脂質體 lipofection
電穿孔 Electroporation
PEI/ 磷酸鈣

- 易轉染細胞株的瞬時表現
- 快速篩選、報告基因與過表現分析
- 需要大片段或多質體共轉染
- 成本 / 時程敏感、無需長期表現



優先用病毒載體

Lentivirus (LV)
Adenovirus (AdV)
AAV

- **難轉染**：原代 / 非分裂細胞
- 需建立**穩定表現**細胞株
- **體內**基因遞送與**動物**模式
- 基因治療、CAR-T 等**臨床轉譯**應用



病毒載體的代價（選用時須一併評估）

製備繁複耗時·較高**生物安全等級**與法規要求·免疫原性·整合型載體的插入突變風險·AAV 承載量限制（~4.7 kb）

常見病毒載體特性比較

比較面向	Lentivirus (LV)	Adenovirus (AdV)	AAV
基因體 / 形式	ss RNA (雙倍體) ； enveloped 常整合	dsDNA ； non-enveloped 多為游離型	ssDNA ； non-enveloped 多為游離型
宿主細胞範圍	分裂與非分裂細胞	分裂與非分裂細胞	分裂與非分裂細胞
約略載量	約 8 kb	約 7.5–36 kb*	約 4.7 kb
表現時間	長期 入核後插入宿主染色體	短至中期 外殼蛋白易引發免疫反應	長期（組織依賴） 入核後環化串聯&染色質化
主要生安關注	插入突變、RCL	強免疫反應、RCA	缺陷型病毒 helper-dependent 因重組而再活化的風險低
穩定性	可經有絲分裂傳遞; 穩定	因細胞分裂而稀釋	因細胞分裂而稀釋

RCL : Replication Competent Lentivirus
RCA: : Replication Competent AdV

慢病毒載體的改造歷史

把惡名昭彰的 HIV-1 病毒，一步步馴化成精準的基因治療工具

核心策略：將病毒的「複製基因」與「載體包裝基因」物理切割，質體越拆越多，安全性越高。



1989-90

第 1 站

概念萌芽

採用能穿透核膜的 HIV-1
克服當時 MMLV 無法轉染非分
裂細胞的限制



1996

第 2 站

第一代系統

Naldini 與 Trono 團隊建立三質體
系統：2包裝質體+1轉基因質體

VSV-G「假型化」：env 由 **VSV-G**
取代 拓寬宿主細胞限制，使載體幾
乎能感染所有哺乳類細胞。

(VSV-G: 可識別高度普遍的 LDL 受體家族)



1997

第 3 站

第二代系統

Zufferey 等人敲除 **vif**、**vpr**、
vpu、**nef** 四個輔助毒力基因，
安全性大躍進，成為實驗室主流
系統。

(轉錄 仍需 **tat** 蛋白質去活化
其 5' LTR 的啟動子)



1998-今

第 4 站

第三代系統

四質體系統 + SIN 自我失活：

包裝質體 - 再拆除 **tat**
轉基因質體 - 刪除 5' LTR U3區
替換為 **CMV** 或 **RSV** 等異源啟動子。

核心邏輯 質體（拼圖）越拆越多 → 必須同時湊齊所有片段才能複製，機率趨近於零 → 病毒被徹底馴服、安全性最高。

慢病毒載體三代系統比較

基因逐步「分家」，重組復原為 RCL 的風險隨世代遞減

○ gag-pol / 包裝 ○ rev ○ VSV-G ○ 轉移質粒

第一代

3 質粒

安全性 · 低



包裝質粒

env 由 VSV-G 取代



外膜質粒



轉移質粒

env 由 VSV-G 取代
突破對 CD4 的專一性
(可識別高度普遍的 LDL 受體家族)

保留全部輔助基因
vif-vpr-vpu-nef 皆在 → 致病性與重組風險最高

第二代

3 質粒

安全性 · 中

輔助基因已剔除



包裝質粒



外膜質粒



轉移質粒

輔助基因已剔除
刪除四輔助基因，消除致病性；gag-pol 與 tat/rev 仍同質粒

轉錄 仍需Tat 蛋白質去活化其 5' LTR 的啟動子

第三代

4 質粒

安全性 · 高



質粒一



質粒二



質粒三

SIN 5' LTR U3



轉移-SIN

gag-pol / rev 分離 · 移除Tat

改造5' LTR 的 U3 區域，替換為 CMV 或 RSV 等異源啟動子

須 ≥3 次重組才成 RCL

⚙️ 慢病毒載體：包裝系統與轉移質體相容性

Lentiviral packaging systems · 第二代 vs. 第三代 · 質體配對與相容性

第二代 · 3 質體系統

📦 2 包裝質體 Packaging

pCMV-ΔR8.91 (Gag · Pol · **Tat** · Rev)
pMDG (VSV-G)

🔄 1 轉移質體 Transfer (野生型 5' LTR ; 需依賴 Tat)

pLV系列 : pLVTHM . pLVCT-tTR-KRAB . pLVUT-tTR-KRAB .
pWP 系列: pWPXL . pWPT-GFP . pWPI

機制 具完整野生型 HIV-1 LTR 啟動子，須仰賴 Tat 蛋白激活方能高效轉錄病毒基因組 RNA。

第三代 · 4 質體系統 (不含 Tat)

📦 3 包裝質體 Packaging

pMDLg/pRRE (Gag · Pol)
pRSV-Rev (Rev)
pMD2.G (VSV-G)

🔄 1 轉移質體 Transfer (chimeric 5' LTR ; 不依賴 Tat)

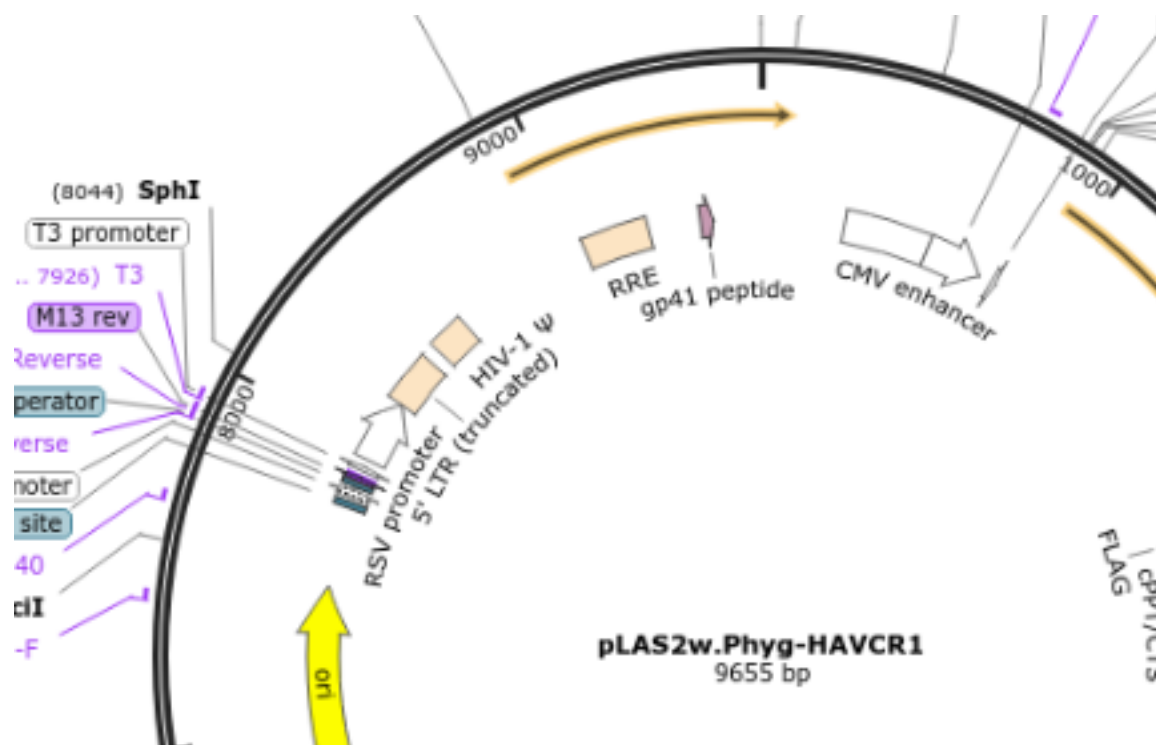
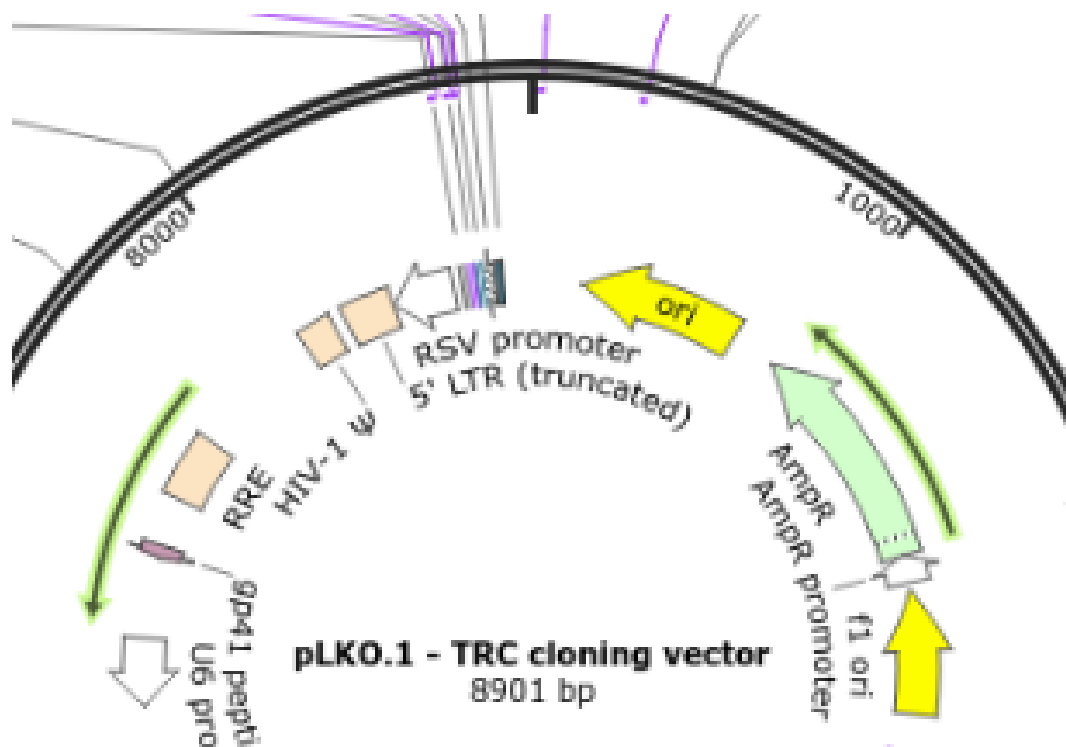
pLKO.1 · pLAS2w · pLenti6 · pCDH · lentiCRISPR v2 · pLL3.7

機制 5' LTR 經嵌合改造 (Chimeric 5' LTR)，為目前最主流的第三代相容載體。

用第二代包裝質體
Titer 通常較第三代高

⚠️ 相容性陷阱提示 Compatibility Pitfalls

- 第二代 轉移質體 (如 pLVTHM) 只能搭配第二代 (3 質體) 包裝系統；誤放入第三代系統會因缺乏 Tat 蛋白，導致 titer 極低或為零。
- 第三代 轉移質體 (如 pLenti6) 因 5' 端已 Chimeric LTR 改造，第三代 (4 質體) 與第二代 (3 質體) 系統皆可相容。



第三代 Lentivector 特徵:

- (一) 5'LTR 上游坐著一段 RSV 或 CMV promoter;
- (二) 5' LTR 的序列長度,
接近 630 bp (完整 U3-R-U5, 野生型 = 第二代)
只有 ~180 bp (R-U5, U3 已被換掉 = 第三代)

三代慢病毒載體系統：基因去留對照

逐一基因追蹤其命運：保留於包裝質粒、移除並替代、刪除、或獨立拆分至專屬質粒

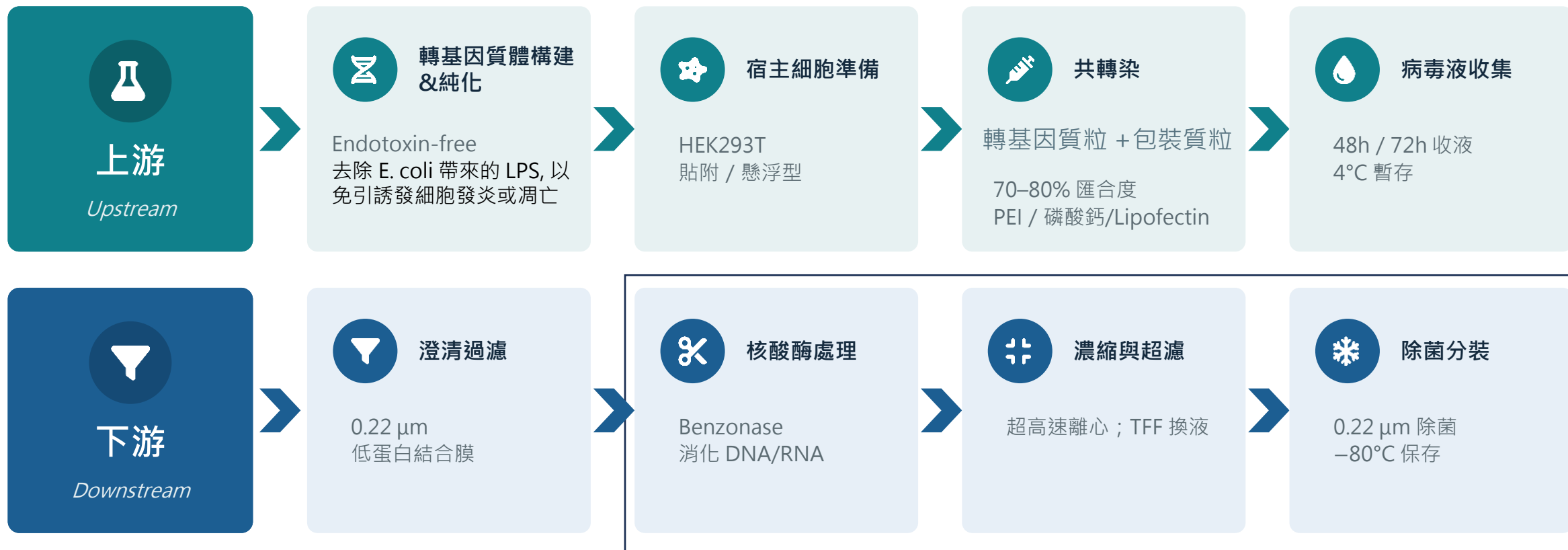
✓ 保留 (於包裝質粒) ⇄ 移除並替代 (VSV-G / 異源啟動子) ✗ 移除 / 刪除 🧬 獨立拆分至專屬質粒

基因	分類	第一代系統	第二代系統 (三質粒)	第三代系統 (四質粒)
env	● 外膜蛋白	⇄ 移除 以 VSV-G 取代	⇄ 移除 以 VSV-G 取代	⇄ 移除 以 VSV-G 取代
gag pol tat rev	● 核心結構	✓ 保留 包裝質粒	✓ 保留 包裝質粒	🧬 獨立拆分 Gag-Pol 質粒
	● 核心酵素	✓ 保留 包裝質粒	✓ 保留 包裝質粒	🧬 獨立拆分 Gag-Pol 質粒
	● 調節基因	✓ 保留 包裝質粒	✓ 保留 包裝質粒	⇄ 移除tat (搭配 異源啟動子)
		✓ 保留 包裝質粒	✓ 保留 包裝質粒	🧬 獨立拆分 Rev 質粒
vif	● 輔助基因	✓ 保留 包裝質粒	✗ 移除 刪除	✗ 移除 刪除
vpr		✓ 保留 包裝質粒	✗ 移除 刪除	✗ 移除 刪除
vpu		✓ 保留 包裝質粒	✗ 移除 刪除	✗ 移除 刪除
nef		✓ 保留 包裝質粒	✗ 移除 刪除	✗ 移除 刪除

第三代四質粒 = Gag-Pol 質粒 (gag 與 pol 同一質體) + Rev 質粒 + VSV-G 質粒 + 轉移質粒 ; tat 由異源啟動子取代 , 四輔助基因自第二代起完全刪除。

產病毒流程

從質體共轉染到除菌分裝 — 上游細胞包裝與下游純化濃縮



產物 含病毒顆粒的濃縮液，-80°C 分裝保存 — 接著進行產量（滴度）測定。

Lentivirus 效價 (Titer) 測定方法

病毒效價 (Titer) : 單位體積內具有感染能力的病毒數量 (如 IU/mL 、 PFU/mL 或 TU/mL)

功能性效價 Functional Titer · (TU/mL or CFU/mL) (可算 MOI) 反映實際感染能力

1

流式細胞術 / 螢光法 (帶報告基因 , 如 GFP)

序列稀釋感染 → 48–72 h 測 % 陽性細胞 ; 僅取線性範圍 (約 1–20% 陽性) 讀值 , 計算 TU/MI

2

抗藥性篩選 (puromycin / blasticidin)

稀釋感染 → 藥物篩選 → 計數存活細胞群落 , 得 % 陽性 , 計算 CFU/mL

3

qPCR 整合效價 (無報告基因時適用)

測整合入宿主基因體的病毒載體拷貝數(如 WPRE) , 相對於宿主單套參考基因 (如 RPP30), 得 % 陽性, 計算 TU/MI

功能性效價計算

$$\text{TU/mL} = (\text{感染時細胞數} \times \% \text{陽性} \times \text{稀釋倍數}) \div \text{病毒液體積(mL)}$$

TU/mL : Transducing Units ;

IU/mL : Infectious Units ;

CFU/mL : Colony-Forming Units .

功能性效價才代表真正可用於轉導的病毒量。

qPCR 整合效價 : 轉導後再培養數代 / 數天後收細胞。

太早收會把尚未整合的載體 DNA 一起算進去,高估效價

物理性效價 Physical Titer

取病毒液直接測
僅反映總顆粒數

p24 ELISA

定量 HIV-1 Gag p24 衣殼蛋白 → 換算總顆粒數 (空殼病毒也會算入)

qRT-PCR

定量上清液中病毒 RNA genome copies (不保證有感染力)

⚠ 物理:感染性顆粒比值高 , 物理效價會高估感染力 , 不可直接用於 MOI 。

關鍵操作要點

- 感染時加 polybrene (約 8 $\mu\text{g/mL}$) 提升轉導效率
- 以「感染當下」的細胞數為基準計算
- 每批病毒應實測效價 , 再據以設定 MOI



慢病毒轉導標準流程

Lentiviral Transduction — Standard Protocol

MOI (Multiplicity of Infection · 感染價數):
病毒顆粒與目標細胞的比率

1

細胞準備



匯合度 50–70%

轉導前一天回盤,過夜培養使細胞貼壁;轉導當天維持建議密度。

2

準備轉導培養基



+ Polybrene

將新鮮培養基與安全劑量的助感染劑(如 Polybrene)混合均勻。

Polybrene: 帶正電聚合物, 中和病毒env與細胞膜之間的靜電排斥力

3

加入病毒



依 MOI 計算

依目標 MOI 計算所需體積, 加入含病毒與 Polybrene 的培養基。

4

病毒孵育



6–24 小時

置於培養箱孵育,時間視細胞對病毒液與 Polybrene 的毒性耐受度而定。

5

更換新鮮培養基



再培養 24–48 小時

移除含病毒培養基,換上新鮮培養基,繼續培養讓基因充分表達。

6

抗生素篩選

選做 *Optional*



Puromycin

若載體帶抗藥性基因,轉導 48 小時後加抗生素篩選穩定細胞株。



MOI 換算：需要加入多少病毒液？

病毒效價 (Titer): 單位體積內具有感染能力的病毒數量 (如 IU/mL、PFU/mL 或 TU/mL)

MOI (Multiplicity of Infection · 感染價數): 病毒顆粒與目標細胞的比率

舉例: 感染 2×10^6 個細胞 | 病毒效價 1×10^9 IU/mL | 目標 MOI = 5

如何計算加樣體積

$$\text{病毒體積} = \frac{\text{目標 MOI} \times \text{細胞數}}{\text{病毒Titer (IU/mL)}}$$

代入 $\frac{5 \times (2 \times 10^6)}{10^9} = \frac{10^7}{10^9} = 0.01 \text{ mL}$

✓ 需加入病毒液 **10 μL** (等於 0.01 mL)

MOI 建議值怎麼選



難轉導的細胞，MOI 需往上提高。



原代免疫細胞

Primary T / Macrophage / B cell

MOI **50-100+**



易感染的細胞

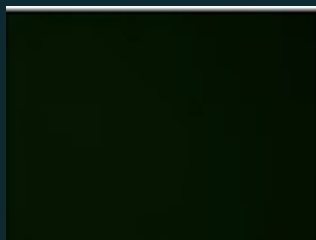
如 HEK293T, Hela

MOI **1-5**

轉導效率隨劑量遞增 — Lenti-GFP @72 h

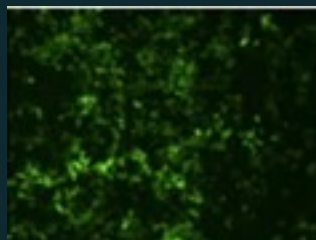
0 μL

未感染對照



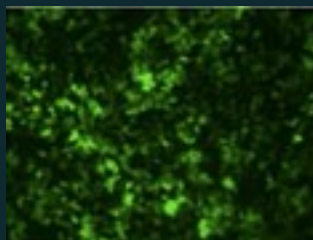
1 μL

MOI 1.75



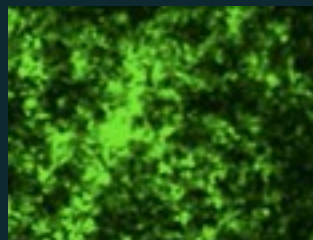
2.5 μL

MOI 4.38



5 μL

MOI 8.8



10 μL

MOI 17.5



20 μL

MOI 35



2×10^4 顆 HEK293T/well (96-well) · 以不同體積 Lenti-GFP (3.5×10^7 TU/mL · PS100071V) 轉導 · Lenti-vpak 包裝 (TR30037) ; 轉導後 72 小時擷取螢光影像。

2

研究與臨床應用

Applications in research

一個能長期、穩定改變細胞基因表現的工具，能做什麼？

2

基礎研究應用



01 基因功能研究

透過慢病毒穩定整合，長期操控標的基因的表現量



穩定基因敲除 / 干擾

Stable knockdown / knockout

shRNA

CRISPR-Cas9

- 可建立大規模篩選庫 (libraries)
- 整合至基因組，長期穩定沉默基因
- 適合功能喪失 (loss-of-function) 研究



過表現 Overexpression

導入外源基因至難轉染細胞



主細胞 *Primary cells*



幹細胞 *Stem cells*



神經細胞 *Neurons*



02 動物模型建立

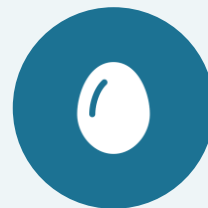
兩條導入途徑，最終生成穩定表現目標基因的轉基因動物模型



組織局部注射

Local tissue injection

將慢病毒直接注入特定組織，於**原位 (in situ)** 轉導**目標細胞**，適合探討局部器官的基因功能。



胚胎轉導

Embryo transduction

於早期**胚胎導入**慢病毒，使外源基因整合並可經生殖系傳遞，建立穩定的轉基因品系。



研究產出 穩定表現目標基因的轉基因動物模型 (Transgenic animal model)

臨床應用：細胞治療與基因治療

Ex Vivo 基因治療：臨床最成熟的範式

採集自體細胞 → 體外以慢病毒轉殖 → 擴增 → 回輸患者

血液惡性腫瘤 CAR-T
造血幹細胞(HSC) 基因治療



臨床現況 此範式在血液惡性腫瘤 CAR-T 與 單基因遺傳病的 造血幹細胞基因治療 皆已有多款上市產品，是目前證據最充分的路徑。

血液惡性腫瘤 CAR-T

以慢病毒把嵌合抗原受體（CAR）基因導入T細胞治療血液惡性腫瘤

產品名稱 (通用名)	研發廠商	靶向抗原	核心適應症 (血液惡性腫瘤)	臨床療效亮點	主要安全性與副作用
Kymriah <i>(Tisagenlecleucel)</i>	諾華 Novartis	CD19	急性淋巴性白血病 (B-ALL)	- 兒童 B-ALL 完全緩解率 > 80% - 全球首款上市產品，長期隨訪數據最完整	- 嚴重的細胞激素釋放症候群 (CRS) - 神經毒性 (ICANS) - 血球減少症 (Cytopenia) - 需追蹤 15 年以防範二次惡性腫瘤
Breyanzi <i>(Lisocabtagene maraleucel)</i>	百時美施貴寶 BMS	CD19	急性淋巴性白血病 (B-ALL)	- 嚴格控制 CD4+/CD8+ 細胞為 1:1 比例 - 限制CD4+ CAR-T 細胞數釋放的發炎因子	嚴重CRS 發生率低
Abecma <i>(Idecabtagene vicleucel)</i>	百時美施貴寶 BMS	BCMA	多發性骨髓瘤 (MM)	- 全球首款針對多發性骨髓瘤獲批的 CAR-T, 「單表位」設計 - 顯著延長晚期骨髓瘤患者的無進展生存期	- 常見 CRS 與血球減少症 - 免疫球蛋白低下 (需定期靜脈注射補充免疫球蛋白)
Carvykti <i>(Ciltacabtagene autoleucel)</i>	楊森製藥/ 傳奇生物 Janssen / Legend Biotech	BCMA	多發性骨髓瘤 (MM)	- 客觀緩解率 (ORR) 高達 98% - 雙表位設計，對癌細胞結合力極強	- 高比例的 CRS 與延遲性神經毒性 - 運動神經系統不良反應 (如帕金森氏症症狀) 具黑框警告 - 淋巴細胞數監測 + Tocilizumab抑制IL-6

註：CRS = 細胞激素釋放症候群；ICANS = 免疫效應細胞相關神經毒性症候群；ORR = 客觀緩解率；DLBCL = 瀰漫性大 B 細胞淋巴瘤；MM = 多發性骨髓瘤。

2012

全球首例兒童 CAR-T (Emily) 於
CHOP 完成輸注。



13+

年持續無癌

自 2012 年 5 月緩解至今

2026年第七屆唐獎生技醫藥獎

TANG PRIZE

Steven A. Rosenberg



史蒂文·羅森伯格

國籍：美國

Michel Sadelain



米歇爾·薩德蘭

國籍：法國 與 加拿大

Carl H. June



卡爾·瓊

國籍：美國

2026 Tang Prize Laureate Announcement

唐獎第七屆得獎人公布記者會

03

Emily 在 2012 年於費城兒童醫院（CHOP）參與賓州大學 Carl June 團隊主導的臨床試驗，當時使用的試驗藥物代號為 **CTL019**（即後來獲得 FDA 核准上市的 **Tisagenlecleucel / Kymriah**）

造血幹細胞(HSC) 基因治療

抽骨髓/造血幹細胞 → 用慢病毒 把 健康基因 植入細胞核 → 病人接受高劑量化療 (清空老舊骨髓) → 注入全新的超級幹細胞 → 骨髓重組重生

三款 FDA 核准藥物：療效與安全性對照 · 2026 最新臨床進展



Zynteglo

betibeglogene autotemcel

適應症
需定期輸血的 **β-地中海貧血**
(HBB 基因 多位點突變,使 beta鏈無法製造)

作用機制
以 BB305 慢病毒載體導入正常 (**HbA-T87Q globin gene**) 至自體造血幹細胞，補足成人血紅蛋白 (HbA) 。

臨床療效
90.2%
受試者達成擺脫輸血依賴 (TI)，療效於長期隨訪維持達 10 年。

安全性
相對最安全
長期隨訪安全性良好，未見與載體整合直接相關之血癌，為三者中相對最安全。



Lyfgenia

lovotibeglogene autotemcel

適應症
具血管阻塞危機的**鎌狀細胞疾病 (SCD)**
(HbS - E6V mutation)

作用機制
同以 BB305 慢病毒載體導入抗鎌狀化血紅蛋白 (**HbA-T87Q globin gene**)，阻斷異常 HbS 的聚合。

臨床療效
88–90%
患者的嚴重血管阻塞性疼痛危象 (VOC) 消除或顯著降低。

安全性
仿單加註黑框警告 · 15 年監測
帶血液惡性腫瘤黑框警告；試驗中出現 MDS 與 AML，須終身監測血癌達 15 年。



Skysona

elivaldogene autotemcel

適應症
早期活動性腦型腎上腺腦白質失養症 (**CALD**)
(ABCD1 基因多位點突變)

作用機制
以 Lenti-D 慢病毒載體導入 **ABCD1 基因**，HSC分化並遷徙至腦部，產生 ALDP 蛋白以分解破壞髓鞘的超長鏈脂肪酸 (VLCFA) 。

臨床療效
延緩
早期腦型神經功能衰退，避免無合適供體者面臨的高死亡風險。

安全性
限縮使用 · 15% 血癌
FDA 限縮適應症；15% (10/67) 術後罹患血癌。僅在無 HLA 相合異體骨髓捐贈者時作為最後手段。

體內直接生成 IN VIVO CAR-T

KLN-1010 — 在患者體內「就地」改造免疫細胞

Kelonia Therapeutics

iGPS® 體內基因定位系統 · 慢病毒平台

靶向 BCMA、針對 多發性骨髓瘤 (RRMM) 的體內 CAR-T 療法

單次靜脈輸注，無需白血球分離、體外製造或淋巴清除化療

設計原理 Design



盲化天然外殼 (Blinded Envelope)

改造慢病毒表面糖蛋白、破壞其與天然受體的結合，使載體無法感染非目標細胞。



掛載導航抗體 (Retargeting)

在外殼融合導向 T 細胞的分子，使載體僅與 T 細胞結合並融合，注入 CAR 基因。



組織專一性表達 (T-cell tropism)

透過工程化嗜性分子與 T 細胞專一性設計，達成體內組織專一的基因傳遞。

※ 機制屬此類慢病毒載體之一般設計邏輯；具體分子 (如特定糖蛋白 / 啟動子) 非官方揭露之細節。

臨床療效 inMMMyCAR Phase 1

100%

18 名可評估患者
MRD 陰性 (1 個月)

>10

首位患者深度 MRD
陰性緩解 (月)

18

累計收治患者
(ASCO 2026)



微小殘留病灶陰性 (MRD-negative)

所有可評估患者於單次靜脈輸注後 1 個月內達 MRD 陰性；整體反應率 (ORR) 100%。



反應具持久性與深化趨勢

最早接受治療者深度 MRD 陰性緩解已持續逾 10 個月，緩解隨時間推移持續深化。

資料來源：Kelonia Therapeutics (ASH 2025 / ASCO 2026)、Eli Lilly (2026/4/20)、ClinicalTrials.gov NCT07075185

併購 禮來 (Eli Lilly) 以預付 32.5 億美元收購 Kelonia，含里程碑款項總額最高達 70 億美元。

法規 已獲 FDA IND 核准與快速通道資格，於美國多中心擴大臨床試驗。

全球首款實體瘤 CAR-T 獲批上市：Satri-cel

晚期且已無法切除或已轉移的胃癌

科濟藥業 (CARsgen) satricabtagene autoleucel · 標靶 Claudin18.2

2026 / 06

中國 NMPA 核准
獲得在中國大陸合法上市與銷售的許可證。

CLDN18.2

專一標靶抗原

全球首款

實體瘤 CAR-T

臨床適應症與設計

- 適應症：CLDN18.2 陽性、HER2 陰性、經 ≥2 線治療失敗之晚期胃 / 胃食道結合部腺癌。
- 構造：人源化 anti-CLDN18.2 scFv + CD8α hinge + CD28 跨膜 / 胞內域 + CD3ζ (為第二代 CAR) 。
- 對抗 TME 的關鍵是「前置調理」策略——於清淋巴 (cyclophosphamide + fludarabine) 中加入低劑量 nab-paclitaxel，提升 CAR-T 浸潤，而非搭載細胞激素的武裝型設計。

為何是里程碑？

打破過去二十年 CAR-T 侷限於血液腫瘤的僵局，首次證明工程化細胞治療可在上皮性實體瘤取得法規等級療效。

參考連結：

↗ [CARsgen 官方核准公告](#)

↗ [The Lancet · CT041-ST-01 樞紐試驗](#)

↗ [FiercePharma · 全球首個實體瘤核准報導](#)

3

風險評估

Risk assessment

慢病毒載體在實驗室的兩大核心危害，以及它如何進入人體。



兩大核心危害

1

產生可複製型病毒

Replication-Competent Lentivirus (RCL)

- 載體元件間若發生重組，可能還原出能自我複製的病毒。
- 現代三代 SIN 系統機率極低，尚無通報案例
- 大量製備時 監測 RCL (replication-competent lentivirus)

2

插入突變 & 有害基因導入

Insertional mutagenesis / oncogenesis

- 載體整合入染色體時，可能活化致癌基因或破壞抑癌基因。
- Transgene 特性: 致癌基因、具毒性
- 單次整合也可能改變你細胞的基因、長期致癌

監測 RCL方法:

C8166 · SupT1 等人類 T 細胞株

至少 14-21 天

p24 ELISA + RT Assay

檢測培養上清液中是否存在 具活性的逆轉錄酶

避免使用尖銳物、防止氣膠產生

較低風險 vs. 較高風險因素對照

RG2

比照管理(預設)



風險因素偏高
時

RG3

提升管理

因素	較低風險	較高風險
轉基因	非致癌基因、無毒性	致癌基因、具毒性
載體設計	第三代載體 更安全	第一二代載體 風險高
產量	小規模 (< 10 L)	大規模 (> 10 L)
操作	不使用尖銳物、防止氣膠產生	使用尖銳物、可能產生氣膠

4

生物安全操作

Biosafety practice

從法規、防護、除污到暴露處置——把設計上的安全，落實到每一次操作。



實驗室內的傳播途徑

VSV-G 偽型化的載體幾乎能感染所有人類細胞。以下任一途徑都可能造成暴露：



紅色標記為高風險途徑：銳器與氣霧膠。這也是「所有操作在生物安全櫃內、盡量不用銳器」的直接理由。



風險部位的重點

暴露於「完整皮膚」不被視為重要感染風險；真正要緊的是破損皮膚、黏膜與接種（針扎）。這也是分流沖洗與後續評估的依據。

工程控制與個人防護

台灣法規框架：比照 RG2、以 BSL-2 操作

生物安全櫃（BSC）= 第一道防線

- 所有可能產生氣霧的操作，一律在 Class II 生物安全櫃內進行
開蓋、移液、稀釋、分裝病毒液
感染細胞、更換含病毒培養液
- 離心：使用密封轉子或安全離心杯，於 BSC 內開蓋
- 工作面於操作前後以 1:10 漂白水擦拭

個人防護裝備（PPE）

- 雙層手套
操作病毒時建議雙層手套，污染即更換外層
- 實驗衣
前扣或後扣式實驗衣，離開實驗室前脫除
- 護目鏡 / 面罩
防止黏膜噴濺（BSC 外仍建議配戴）
- 減少銳器
盡量以鈍針、免針系統取代針頭；禁止回套針頭

潑濺處理：

1

穿戴防護

操作時應穿戴好手套、實驗衣、護目鏡。

2

淨空與警示

大量潑濺立即通知在場人員、離開污染區，關上門，張貼警示。
若在 BSC 外，讓氣霧膠沉降約 30 分鐘再做**覆蓋消毒**處理。

3

覆蓋消毒

小量潑濺立即以紙巾 覆蓋潑濺區，倒上 1% 次氯酸鈉（家用漂白水 1:10，當日新鮮泡製）。靜置作用 ≥ 1 分鐘，確保足夠接觸時間。由外圍向中心擦拭除汙。

4

清理廢棄

由外向內收拾至生物醫療廢棄物容器；再以消毒液擦拭一次表面。
廢棄物需滅菌處理。

5

通報記錄

通報 PI / 實驗室主管與生安人員，記錄事件與後續處置。

除污與廢棄物

有效消毒劑

次氯酸鈉

家用漂白水 1:10 (約 0.5–1%)，當日新鮮泡製；接觸時間充足 (表面 ≥ 15 分鐘、潑濺 ≥ 30 分鐘)

酒精 / 醛類

70% 酒精、2% 戊二醛、甲醛等亦有效

廢棄物處理



雙層袋收集

含病毒之液體與固體廢棄物收集於雙層生物醫療廢棄物袋



高壓滅菌

以高壓蒸氣滅菌去活化後再依廢棄物流程處理



堅固容器

置於有蓋、堅固、防穿刺容器，張貼「生物醫療廢棄物」標示



銳器專用盒

針頭、刀片等銳器直接投入防穿刺銳器盒，不回套

暴露與急救：立即處理、務必通報

針扎 / 割傷

以流動清水沖洗傷口、輕擠出血，再依機構規範消毒（如以優碘刷洗約 20 分鐘）。

黏膜噴濺

以大量清水或洗眼器沖洗眼 / 口鼻至少 15 分鐘。

破損皮膚接觸

脫除污染衣物手套，大量清水與肥皂沖洗接觸部位。

通報與就醫

處理傷口後立即：

- ① 通報 PI / 實驗室主管
- ② 就醫並提供關鍵資訊：
 - 載體世代與質體數
 - 所帶 transgene
 - 病毒力價與暴露途徑
 - 暴露時間
- ③ 由職業醫學 / 感染科評估是否需預防性投藥 PEP——切勿自行服藥



風險部位的重點

暴露於「完整皮膚」不被視為重要感染風險；真正要緊的是破損皮膚、黏膜與接種（針扎）。這也是分流沖洗與後續評估的依據。

重點回顧

KEY TAKEAWAYS

- 1 慢病毒載體的安全性 建立在「設計」：拆質體、刪基因、SIN、**優先用第三代系統**。
- 2 台灣法規：慢病毒載體比照 **RG2**、以 **BSL-2** 操作，運作須經生安會核准。
- 3 風險因素：重組產生可複製病毒（RCL）；載體攜帶基因性質（**風險高 防護等級 須提升**）
- 4 所有可能產生 **氣霧** 的操作都在**生物安全櫃**內；離心用**密封轉子**、盡量不用 **銳器**。
- 5 暴露先**沖洗**、立即**通報**、**就醫**評估——切勿自行服藥；PEP 由職醫決定。

Q & A

操作有疑問時，先問 PI / 實驗室負責人，再開始操作。

延伸閱讀、官方指引與教學影片 → 見後兩頁

延伸資源：核心文獻與綜述

必讀

[Milone MC & O'Doherty U \(2018\) · Leukemia 32:1529–1541](#)

Clinical use of lentiviral vectors — 現代載體設計與臨床應用的權威綜述。

生安必讀

[Schlimgen R et al. \(2016\) · J Occup Environ Med 58\(12\):1159–1166](#)

Risks Associated with Lentiviral Vector Exposures — 暴露風險與處置的核心依據。

經典

[Naldini L et al. \(1996\) · Science 272:263–267](#)

慢病毒載體奠基之作:穩定轉導非分裂細胞。

經典

[Dull / Zufferey et al. \(1998\) · J Virol 72:8463 / 9873](#)

第三代四質體系統與 SIN 自我去活化載體設計。

最新

[Application Advances of Lentiviral Vectors \(2025\) · Mol Biotechnol](#)

從基因治療到疫苗開發的最新應用與安全綜述。

官方指引 · 實用資源 · 教學影片

官方指引

[感染性生物材料管理辦法](#)

全國法規資料庫

[疾管署 · 感染性生物材料](#)

危險群分級與作業要點

[NIH Lentivirus Containment](#)

慢病毒載體圍堵指引

[NIH Guidelines \(rDNA\)](#)

重組核酸研究準則

實用資源

[Addgene 慢病毒載體指南](#)

原理圖解

[Addgene 病毒製備 Protocol](#)

293T 轉染製備流程

[Addgene Quick Guide](#)

常見問題快速上手

[Cornell EHS Lentiviral BARS](#)

暴露/PEP 對照表

教學影片

[JoVE:Lentivirus Production](#)

病毒製備影片示範

[CDC:BSC 潑濺清理](#)



安全櫃內潑濺處理

[UC Berkeley:生物潑濺處理](#)

櫃外潑濺標準流程

[Cornell:安全操作生物安全櫃](#)

BSC 操作技巧