

慢病毒載體(Lentiviral Vectors)指引

訂定日期：111.4.1

1. 前言

慢病毒載體是藉由對哺乳動物細胞的多質體轉染 (multi-plasmid transfection) 在體外產生的逆轉錄(又稱反轉錄)病毒。逆轉錄病毒顆粒從培養基中收穫，用於將轉基因穩定插入到目標細胞的基因組(genome)中。這些載體已經設計成能夠感染目標細胞，但在感染後不能複製。然而，由於大多數慢病毒載體來自人類免疫缺乏病毒(HIV)，仍存在載體可能恢復到複製狀態有關的疑慮仍然，也存在轉基因和插入性誘變(insertional mutagenesis)(例如導致基因活化或去活化)有關之風險。

在某些情況下，處理或保存病原體的實驗室或阻隔區域的適用阻隔要求，可能需要根據所執行的程序或與病原體有關的風險是否發生變化(例如病原體已被修飾)而進行改變。慢病毒載體通常比照第2級危險群(RG2)病原體。然而，一些慢病毒載體和轉基因可能具有增加其風險的獨特特性，導致對其安全處理的額外或修飾的生物安全要求，可能須比照第3級危險群(RG3)病原體。

1.1. 範圍

慢病毒載體指引說明對處理或保存慢病毒載體的阻隔區域，進行病原體風險評鑑或局部風險評鑑的生物安全注意事項及最佳規範，以便實施適當的減害措施。本指引介紹在進行風險評鑑和建立生物安全程序時，應考慮的風險因素和風險減害策略。本指引可搭配疾病管制署(簡稱疾管署)編定之「實驗室生物安全規範」(簡稱生安規範)和「實驗室生物安全指引」(簡稱生安指引)一起使用。

2. 慢病毒載體簡介

慢病毒載體系統來自於屬於逆轉錄病毒科的慢病毒屬的病毒(圖 2-1)。慢病毒載體最常見的是來自 HIV 1 型(HIV-1)。然而，也可能來自 HIV-2 和非人類的慢病毒，包括猴免疫缺乏病毒、貓免疫缺乏病毒、馬傳染性貧血病毒和牛免疫缺乏病毒。由於慢病毒能穩定整合到分裂和非分裂細胞的基因組中，並能長期表達轉基因，因此是基因傳遞的實用載體。然而，在訂定生物安全性原則時，慢病毒載體的潛在致病性是一個重要考量因素。

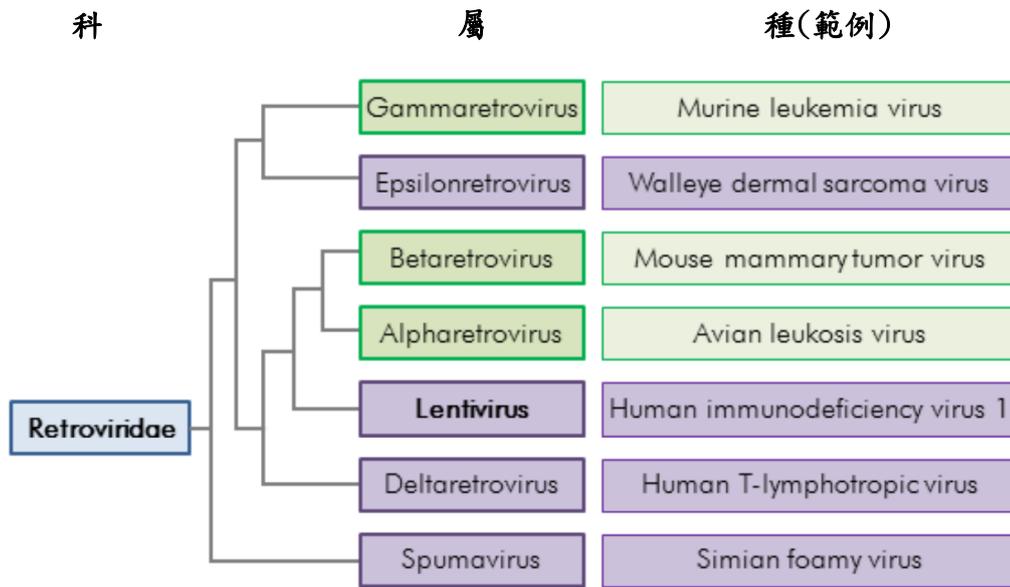


圖 2-1：逆轉錄病毒科的演化樹(phylogenetic tree)

圖中顯示逆轉錄病毒科的 7 個屬；複雜的逆轉錄病毒屬用紫色表示，簡單的屬用綠色表示。7 個屬中的每個屬都有一個種的範例。分支長度並不代表系統演化的距離，僅表示為一般參考。

HIV 是研究最多的慢病毒，也是目前主要可用的慢病毒載體的初代親源病毒(primary parent virus)。為克服與 HIV 致病性相關的意外感染、整合到人類基因組和持續的終身感染的風險，慢病毒載體設計成有複製缺陷。這是藉由將病毒複製和包裝所必需的基因與 HIV 基因組的其他部分隔離或剔除而實現。由此產生的病毒顆粒能夠感染目標細胞並傳遞其轉基因，但不能完成病毒生命週期的其餘部分，以形成具複製能力的逆轉錄病毒，這是傳播的關鍵步驟。

2.1. 逆轉錄病毒

逆轉錄病毒科由 7 個屬組成(圖 2-1)，由單鏈、包膜、核糖核酸(RNA)逆轉錄病毒組成，能夠引起人類和動物的疾病。根據 RNA 剪接模式和附屬基因的存在，大致分為簡單或複雜的逆轉錄病毒。逆轉錄病毒與宿主細胞表面的相互作用具高度特異性，是決定病毒宿主範圍的主要因素。在結合並穿透宿主細胞後，病毒 RNA 被轉錄成去氧核糖核酸(DNA)，然後經由使用宿主和病毒編碼的蛋白質的過程整合到宿主 DNA 中；在合成和組裝之後，此複製過程導致感染性病毒顆粒的釋出。為完成這些工作，所有的逆轉錄病毒都

含有病毒基因 gag、pol 和 env；這些基因的產物和功能之整理，參見表 2-1。

表 2-1：逆轉錄病毒基因和產物的作用和功能

基因	產物	功能
gag	蛋白衣殼(capsid)	保護核心
	基質	組裝包膜
	核衣殼	保護基因組並形成核心
pol	蛋白酶	成熟過程中對 Gag 蛋白的裂解十分重要
	反轉錄酶	將 RNA 基因組反轉錄為雙股 DNA
	整合酶	需要用於整合原病毒(provirus)
env	表面糖蛋白	外層包膜糖蛋白；主要病毒抗原
	跨膜蛋白 (transmembrane protein)	成熟包膜糖蛋白的內部成分

gag 基因編碼構成病毒內部結構的蛋白質，包括蛋白衣殼、與膜相關的基質和核衣殼。pol 基因編碼轉錄、將病毒基因組整合到宿主細胞的 DNA 以及病毒成熟所需的酶。env 基因編碼構成病毒外部的蛋白質，包括表面糖蛋白和跨膜蛋白，形成一個複合物，專門與目標細胞受體相互作用。逆轉錄病毒 5'和 3'端的長末端重複序列 (Long terminal repeats, LTR) 含有基因表達、逆轉錄和整合到宿主細胞基因組所需的元素；RNA 包裝信號 psi (Ψ) 是將 RNA 包裝到病毒中所需要。

除在簡單的逆轉錄病毒發現的基本元素外，逆轉錄病毒科的複雜屬（即慢病毒、epsilonretrovirus、deltaretrovirus 和 spumavirus）都有編碼附屬蛋白和調節蛋白的基因，為逆轉錄病毒提供對基因表現和病毒生命週期的一些控制。例如，慢病毒 HIV-1 含有附屬基因 nef、vif、vpu 和 vpr，促進 HIV 的感染性和致病性，還有調節基因 tat 和 rev，與 LTR 協調工作，進行病毒複製（表 2-2）。

表 2-2：HIV 特定基因和產物的作用和功能

基因	產物	功能
nef	附屬蛋白	增強病毒的感染力
vif		影響病毒顆粒的感染性
vpu		增強病毒的釋出
vpr		增強病毒的感染力

<i>tat</i>	調節蛋白	活化轉錄
<i>rev</i>		調控剪接/RNA 運輸

2.2. 逆轉錄病毒載體系統的演變

逆轉錄病毒整合到宿主基因組的能力，使其成為基因治療的潛在工具；然而，具有致病潛力之具複製能力的逆轉錄病毒之釋放，是一個重要的生物安全問題。為提高逆轉錄病毒載體系統的安全性，一些反覆的發展旨在減少複製能力的可能性。如下文詳述，藉由替換或剔除病毒複製和包裝所必需的基因編碼區實現；由此產生的逆轉錄病毒顆粒保留感染和向目標細胞傳遞轉基因的能力，但無法完成病毒生命週期的剩餘部分，包括具複製能力的逆轉錄病毒之形成。藉由將產生感染性病毒體所需的病毒成分分離到多個質體，實現進一步的安全水準。

早期的逆轉錄病毒載體系統是由簡單的逆轉錄病毒發展而來；由於簡單的逆轉錄病毒只能在有絲分裂過程中進入宿主的細胞核，所以只能整合到正在分裂的細胞中，所以這些載體的效用有限。相較之下，複雜的逆轉錄病毒由於增加基因組編碼的蛋白質，可以同時整合到分裂和非分裂的細胞中；因此，慢病毒載體系統現在是最主要的逆轉錄病毒載體系統。

2.2.1. 早期的逆轉錄病毒載體系統

最初的逆轉錄病毒載體系統是基於簡單的逆轉錄病毒，如小鼠白血病病毒 (MLV；圖 2-2，面板 A)，一種 gammaretrovirus。在這些系統，載體分成兩種質體，即一個轉移/載體質體和一個包裝/輔助質體 (圖 2-2，面板 B)。轉移質體包括 Ψ 和 LTR，分別是將轉基因包裝到病毒體和整合到宿主基因組所需。輔助質體含有 gag、pol 和 env 基因，這些基因編碼病毒包裝所需的蛋白質；輔助載體中缺乏 Ψ ，使轉錄的病毒 DNA 不能被整合到病毒體。最終的結果是一個無複製能力的病毒，包括感興趣的基因，但缺乏任何在宿主細胞內完成病毒生命週期所需的病毒基因。儘管在這種逆轉錄病毒系統中應用病毒基因組的分離，但單一的重組事件可能導致 Ψ 信號從轉移質體轉移到輔助質體上，從而導致具複製能力的逆轉錄病毒之形成。因此，使用這些早期的逆轉錄病毒載體系統需要採取額外的生物安全措施。



圖 2-2：MLV 的基因組和向三質體逆轉錄病毒載體系統的演變 (A) MLV 基因組與常見的逆轉錄病毒基因 (藍色)；注意該圖未按比例，只是為了顯示基因的相對位置。(B) 一個雙質體逆轉錄病毒載體系統。(C) 一個三質體逆轉錄病毒載體系統。

為解決 Ψ 信號從轉移質體轉移到輔助質體的問題，開發一個基於 MLV 的三質體逆轉錄病毒載體系統 (圖 2-2，面板 C)。在此系統中，輔助質體組分成兩個質體：一個輔助 (包裝) 質體包含 gag 和 pol 基因，而第二個 (包膜) 質體只包含 env 基因。由此產生的載體系統在將轉基因整合到分裂的細胞和維持轉基因表現方面，與早期的載體系統一樣有效。此外，由於 Ψ 、gag、pol 和 env 一起位於同一質體上需要至少兩次重組事件，形成具複製能力的逆轉錄病毒之可能性較小，提高該系統的生物安全性。然而，MLV 的使用表現在人類系統中基因轉移的效率很差，很可能是由於這些載體只能整合到正在分裂的細胞中，並被人類的補體系統去活性。

2.2.2. 第一代慢病毒載體系統

基於慢病毒載體系統的開發是為了克服早期基於 MLV 的逆轉錄病毒系統的缺陷。與簡單的逆轉錄病毒載體不同，HIV-1 和其他慢病毒由於其複雜的基因組含有額外的調節和附屬基因，所以能夠感染分裂和非分裂的細胞 (圖 2-3，面板 A)。這種更廣泛的能力使慢病毒成為基因治療應用的有希望的候選者，但其親源來源引起許多安全問題，使其無法進行人體試驗。

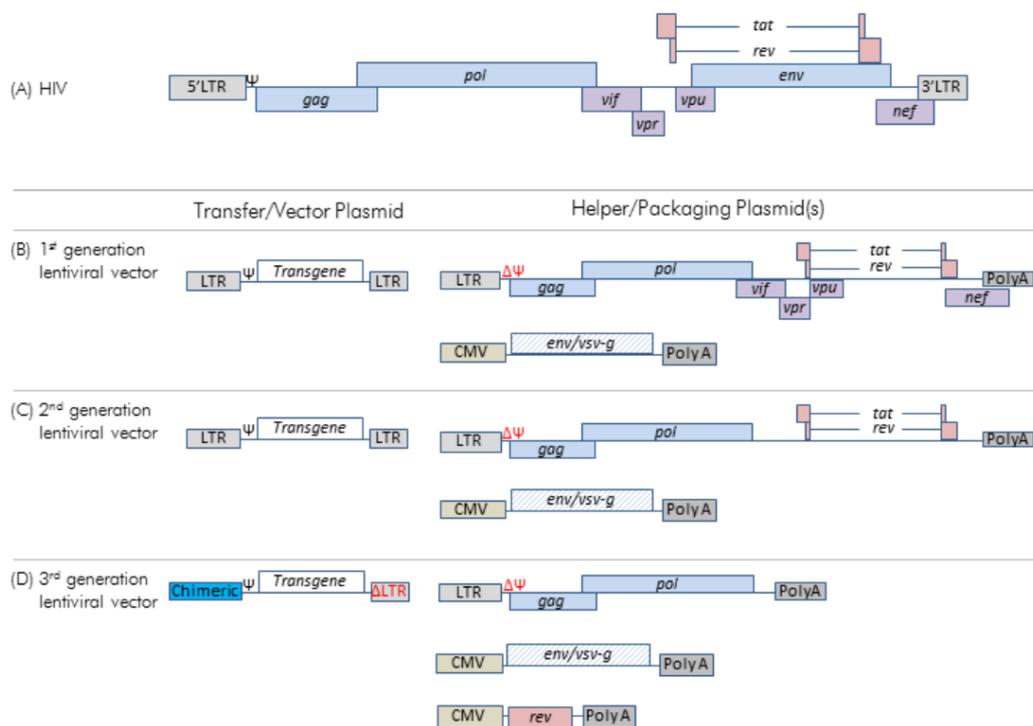


圖 2-3：HIV-1 的基因組和向第一代慢病毒載體系統的演變 (A) HIV 基因組，包括常見的逆轉錄病毒基因 (藍色) 和 HIV 特異性基因 (紫色和粉色)；注意該圖未按比例，只是為了顯示基因的相對位置。(B) 第一代三質體慢病毒載體系統。(C) 第二代三質體慢病毒載體系統。(D) 第三代四質體慢病毒載體系統。

第一代慢病毒載體系統是源自 HIV 的三質體系統，包括標準的逆轉錄病毒基因和 HIV 特異性基因 (圖 2-3，面板 B)。這些第一代慢病毒載體系統由以下部分組成：(1) 一個含 Ψ 的轉移質體；(2) 一個包裝質體，除 *gag* 和 *pol* 外，還含有 HIV 的附屬基因 *nef*、*vif*、*vpu* 和 *vpr* 以及調節基因 *tat* 和 *rev*；以及 (3) 一個包膜質體。為增加基於 HIV 的慢病毒載體系統的傾向性或細胞目標，包膜質體中的 HIV *env* 基因可以被異源糖蛋白基因取代，這一過程稱為假型 (pseudotyping)；慢病毒載體經常被編碼 vesicular stomatitis virus 糖蛋白 (VSV-G) 的基因假型。雖然假型提高載體的穩定性，但改變慢病毒載體的傾向性以包括幾乎所有的哺乳動物細胞，增加與慢病毒載體相關的固有風險。同時由於假型載體是人類或人畜共通病原體，仍須受疾管署生安規範管制。

2.2.3. 第二代慢病毒載體系統

為進一步提高慢病毒載體系統的安全水準，在第二代基於 HIV 的載體中，將有助於致病的 HIV 特異性附屬基因（nef、vif、vpu 和 vpr）從輔助/包裝質體中移除（圖 2-3，面板 C）。通過將慢病毒基因的數量從 9 個減少到 4 個，即使發生多個重組事件，形成具複製能力的逆轉錄病毒之機會也會大大減少。

2.2.4. 第三代及以上慢病毒載體系統

第三代慢病毒載體系統的發展是為了提高安全性和減少形成具複製能力的逆轉錄病毒之風險。5'LTR 被修改成一個嵌合的 5'LTR，帶有一個異源啟動子，不再依賴 tat 的轉導作用。由於不再需要 tat，因此從第三代包裝質體中刪除。此外，剩餘的 HIV 包裝基因被分成兩個包裝質體（一個含有 gag 和 pol，另一個含有 rev）。與轉移質體和包膜質體一起，所產生的四質體系統只包含 3 個 HIV 特異性基因，並且與早期幾代相比，大大降低具複製能力的逆轉錄病毒形成能力（圖 2-3，面板 D）。此外，一些第三代系統在轉移質體的 3'LTR 內有一個缺失，在反轉錄過程中被轉錄到 5'LTR；導致由於啟動子活性降低而產生的自失活(self-inactivating)載體。這種修改特別有用，因為解決生物安全問題，包括轉移質體和輔助質體之間的重組、LTR 導致的插入性致癌、以及隨後感染複製能力強的 HIV-1 時的具複製能力的逆轉錄病毒之調動。

開發具有改進的生物安全性的第四代慢病毒載體系統一直是多項科學研究的目標。在一項研究中，一個轉移質體重新配置，以防止一些 HIV-1 成分轉錄到轉錄基因中。這部分是通過移除 5'LTR，並將 RNA 信號（如 Ψ ，Rev-反應元件）置於自失活的 3'LTR 下游而實現。這種慢病毒載體系統的轉導效率目前低於標準技術，所以還沒有商品化。另外，一個慢病毒載體系統的包裝質體被分成五個獨立的質體，部分是通過分離 gag 和 pol 基因，但也通過重新引入 tat 基因。後一種系統以及一些第二代和第三代系統仍在使用，並可從商業管道獲得。

雖然這種可能性很小，但在使用第二代或第三代載體系統時，形成具複製能力的逆轉錄病毒之風險仍然存在。含有 HIV 基因的具複製能力之逆轉錄病毒如果被引入人類或動物宿主體內，可以顯示出 HIV 的病毒屬性。在載體開發和製造過程中監測具複製能力的逆轉錄病毒之形成，可以

在載體投入使用前檢測其存在。

3. 風險評鑑

生物安全涉及持續應用安全措施（即實體阻隔特性和操作規範），這些措施對於防止暴露到設施內處理的病原體或其從阻隔區域釋出，對工作人員、社區和環境造成的傷害至關重要。針對特定病原體、阻隔區域、工作區或程序的適當減害措施是基於風險評鑑，這是生物安全計畫所有組成部分的基礎。本章介紹對於慢病毒載體的工作，進行病原體風險評鑑和局部風險評鑑的考慮事項。

3.1. 病原體風險評鑑

病原體的危險群(RG)等級是經由病原體風險評鑑確定，該評鑑經由評估導致病原體風險的固有特徵如考慮致病性、有效預防和治療方法的可用性以及可傳播性等因素。病原體風險評鑑將確定 RG 等級，有助於確定適當的實驗室生物安全等級，並在局部風險評鑑中加以考慮。慢病毒載體的感染途徑與 HIV 相似，包括注射和黏膜表面或破損皮膚暴露感染性液體或氣膠。暴露在完整的皮膚上不被認為是重要的感染風險。對慢病毒有有效的治療和預防措施，由這些病原體引起的疾病傳播風險低。

依據「衛生福利部感染性生物材料管理作業要點」，慢病毒載體比照 RG2 病原體之管理規定。RG2 病原體是指對個人或動物的健康構成中度風險，對公眾健康構成低度風險的病原體。RG2 病原體能夠引起人類或動物的嚴重疾病，但不太可能發生這種情況。然而，在某些狀況下（例如使用第一代慢病毒載體系統，對載體進行修飾，插入致癌或有毒的轉基因），處理這些慢病毒載體的風險因而增加，可能需要額外或修改生物安全程序，或比照更高的危險群等級（即 RG3）。

建議對於規劃使用的慢病毒載體系統進行病原體風險評鑑，特別是在使用第一代系統或插入致癌或有毒轉基因時。有關病原體風險評鑑的更多資訊可參考疾病管制署訂定之「病原體風險評鑑指引」（疾管署首頁>傳染病與防疫專題>實驗室生物安全>實驗室生物安全技術規範及指引）。如果病原體風險評鑑的結果是將慢病毒載體系統提高到 RG3，或者如果實驗證據顯示慢病毒載體很有可能重組產生具有複製能力的 HIV，則應比照 RG3 病原體之管理規定。

3.1.1. 慢病毒載體的病原體風險評鑑需考慮事項

病原體風險評鑑首先要確定病原體本身所固有的、有助於其風險的特徵。雖然不是一個詳盡的清單，但以下是慢病毒載體的考慮事項。

- 轉基因插入的性質。已知的致癌基因或具有高致癌性或毒性的基因可能需要額外的生物安全規範。
- 根據慢病毒載體的不同，有可能出現其他的感染途徑。用 vsv-g 進行假型，在某些狀況下可以經由吸入感染。
- 製造過程中發生重組的可能性，這可能會導致具複製能力的逆轉錄病毒。儘管機率很低，但監測載體製備中是否存在具複製能力的逆轉錄病毒將對此進行評鑑。建議使用第三代系統（即低度具複製能力的逆轉錄病毒形成潛力）。
- 暴露後，由於病毒 DNA 整合到宿主基因組中導致的插入性突變或相鄰基因序列的轉導，有可能發生腫瘤。
- 可能被野生型病毒（例如 HIV）遷移（mobilization）（即拯救（rescue）），並將遷移的載體顆粒擴散到非目標細胞或組織（即特別是保留完整 LTR 的載體）。
- 在暴露的 HIV 陽性個體或慢病毒陽性的動物宿主中與野生型病毒重組的可能性，其原生病毒可能與載體重組或互補。
- 在注射或暴露於被具複製能力的逆轉錄病毒污染載體的實驗動物中，發生生產性感染的可能性，可能導致載體/病毒的排出。
- 由於病毒顆粒的假型或病毒啟動子序列的改變，慢病毒載體有可能變得能夠感染更多的人類和哺乳動物細胞。
- 儘管無複製能力，慢病毒載體的感染性仍然存在。慢病毒載體能夠感染目標細胞，然後這些細胞可以表現轉基因。

載體-轉基因組合的危險群別，將決定安全處理慢病毒載體的適當的實體阻隔要求和操作規範要求。即使在慢病毒載體比照 RG2 病原體的情況下，風險評鑑也可能確定安全處理所需的額外減害措施。

3.2. 局部風險評鑑

局部風險評鑑是對涉及病原體和毒素的活動相關風險的特定地點評鑑。以作為：

- 鑑別和描述與使用感染性物質或毒素進行的活動（即工作和程序）相關

的危害性因素。

- 根據事故發生的可能性（例如病原體和毒素的暴露、釋出或遺失）以及事故的後果，評鑑每種危害的風險；以及
- 訂定並實施減害措施（例如安全工作規範的標準作業程序(SOP)）。

3.2.1. 慢病毒載體的局部風險評鑑需考慮事項

由於實驗室暴露慢病毒載體最可能的途徑是注射和黏膜暴露，因此在對涉及慢病毒載體的工作進行局部風險評鑑時，需要考慮的關鍵危害包括：

- 使用尖銳物：慢病毒載體的主要感染途徑是接種(inoculation)。意外注射慢病毒載體可能導致 HIV 血清學陽性，轉基因表現（其他慢病毒載體和逆轉錄病毒也是如此），或插入突變。
- 處理用慢病毒載體轉導(transduce)的細胞培養物：慢病毒載體整合到細胞基因組中會對轉導的細胞產生有害影響，包括增加腫瘤形成的風險、插入突變和鄰近基因的激活。
- 處理慢病毒載體懸浮液：處理高效價的慢病毒載體懸浮液原液會增加工作人員暴露的可能性。
- 產生氣膠的程序：間接接觸氣膠產生過程中產生的飛沫（例如離心、移液）可導致飛沫傳播（即感染性病原沉積到表面，隨後轉移到接受者暴露的黏膜表面）。
- 進行動物工作：有證據顯示，載體可能在感染後 24 小時內從受感染的動物身上排出，導致經由黏膜與感染體液的直接接觸傳染給工作人員的可能性。

表 3-1 概述在進行與使用慢病毒載體有關的風險評鑑時需要考慮的一些因素，以及每個因素對增加或減少總體風險的作用。

表 3-1 病原體風險評鑑及局部風險評鑑需考慮事項

病原體風險評鑑		
	較低風險	較高風險
轉基因	<ul style="list-style-type: none">· 非致癌基因· 無毒性	<ul style="list-style-type: none">· 致癌基因· 具毒性
載體設計	<ul style="list-style-type: none">· 4 個或更多質體上的病毒基因· 剔除病毒附屬基因· 刪除 <i>tat</i> 調節基因	<ul style="list-style-type: none">· 2 個質體上的病毒基因· 表現病毒附屬基因· 表現 <i>tat</i> 調節基因· 完整的 3'LTR

	<ul style="list-style-type: none"> · 自失活載體 · 弱啟動子 · 非人類向性(tropism) 	<ul style="list-style-type: none"> · 強啟動子 · 擴大宿主範圍之假向性(pseudotropism)
局部風險評鑑		
	較低風險	較高風險
動物	<ul style="list-style-type: none"> · 非寄主性宿主（不太可能排出病毒） 	<ul style="list-style-type: none"> · 寄主性宿主或與人類細胞移植的宿主（更可能排出病毒）
產物	<ul style="list-style-type: none"> · 小規模（<10L） 	<ul style="list-style-type: none"> · 大規模（>10L）
操作	<ul style="list-style-type: none"> · 不使用尖銳物 · 不太可能產生氣膠 	<ul style="list-style-type: none"> · 使用尖銳物 · 可能產生氣膠

4. 阻隔考慮事項

4.1. 生物安全等級要求

經病原體風險評鑑確定所有使用慢病毒載體系統的活動，包括增殖性體外和體內活動，都可以在 BSL-2/ABSL-2 實驗室進行。然而，在某些情況下（如使用第一代或第二代慢病毒載體系統），可能需要在 BSL-2/ABSL-2 實驗室增加額外的操作要求，以防止工作人員暴露和汙染擴散到阻隔區域之外。

4.2. 工作規範

操作規範指的是行政和程序管制，包括 SOP，以防止人員無意間暴露於潛在的感染性物質，以及病原體和毒素從阻隔區域釋出。當操作規範納入 SOP 並排入人員訓練課程時，工作人員更能遵守操作規範。BSL-2/ABSL-2 實驗室的操作規範要求，可參照疾管署生安規範第 4 章規定。

在處理或保存慢病毒載體之區塊，安全工作規範包括正確使用和維護實驗室和生物安全設備（例如離心機、生物安全櫃(BSC)），以及使用優良微生物實驗室規範。

使用 BSC 或其他初級阻隔裝置，將保護工作人員在可能導致產生感染性氣膠或涉及高濃度或大量慢病毒載體的過程中，經由阻隔氣膠防止暴露（例如經由黏膜接觸）。使用密封的安全杯或在 BSC 內卸下的轉子，將圍阻離心慢病毒載體時可能產生的氣膠。

慢病毒載體傳播給工作人員的主要風險是通過意外接種、被汙染的器械割傷或刺傷，以及接觸開放性傷口。避免使用針頭和其他尖銳物將減少該等

風險。在不可避免使用尖銳物的情況下，可以訂定適當的 SOP，限制或提供有關使用尖銳物的正確處理說明，以便防止意外接種的方式使用器械。使用安全設計的尖銳物和針頭，可能減少風險。

如果使用得當，個人防護裝備（PPE），例如手套、實驗衣和安全眼鏡，可以保護工作人員在工作過程中可能接觸到的感染性物質。除依生安規範第 4.4 節規定的 BSL-2/ABSL-2 實驗室所需的 PPE 外，局部風險評鑑可能顯示需要額外的 PPE。例如，局部風險評鑑可能決定在產生氣膠的程序中佩戴呼吸防護具、護目鏡或面盾。

4.3. 動物工作的考慮事項

在體內（即在活體動物）進行的病原體和毒素工作是在動物阻隔區域進行。動物阻隔區域是指一系列共處的動物房，以及相關的走廊和支援性房間（例如儲存和準備區），其阻隔程度相同。關於動物阻隔區域的更多詳細資訊可參考生安規範及生安指引。

將慢病毒載體或慢病毒載體轉導的細胞送入動物體內必須在適當的生物安全等級實驗室進行。允許 HIV 複製的動物宿主，或被人類細胞移植的動物，可以支持感染性 HIV 的複製，因此可能需要採取額外的預防措施。鑑於動物接種增加的危害，實驗室工作人員在處理這類材料時，必須按照局部風險評鑑確定的方式，將事故的風險降到最低。例如為了最大限度減少自我接種的風險，可以藉由額外的預防措施和 PPE（例如防刺穿手套）加強必要的安全程序（例如動物保定）。如果在 BSC 內進行注射不可行時，可能需要額外的 PPE（例如護目鏡、呼吸防護具），以減少黏膜接觸氣膠的可能性。接種後，對動物或接種部位進行消毒或清洗，將消除可能殘留在動物表面的任何慢病毒載體。

4.3.1. 具複製能力的逆轉錄病毒之檢測

慢病毒載體系統經病原體風險評鑑明確指出，慢病毒載體系統有可能形成具複製能力的逆轉錄病毒，並有可能在整合後發生致癌作用。這種風險在早期的系統比較高；到目前為止，還沒有關於使用第三代慢病毒載體系統形成具複製能力的逆轉錄病毒之報告。在載體製造過程中進行具複製能力的逆轉錄病毒檢測，將有助於確認是否存在具複製能力的逆轉錄病毒；陽性檢測可能會否定載體的後續使用。

在接種後直到病毒清除前，載體可以從受感染的動物身上排出，並經

由黏膜與受感染體液的直接接觸傳染給人類。實驗室工作人員也可以經由意外注射載體製備而暴露。在這兩種情況下，插入的基因（如致癌基因）的性質將是一個重要的考慮因素，以確定有效的實體阻隔和操作規範，將暴露的風險降到最低。某些動物不支持感染性 HIV 的複製，因此被認為在注射慢病毒載體後形成具複製能力的逆轉錄病毒之機率可以忽略不計。在這種情況下，具複製能力的逆轉錄病毒排出的機率非常低。

考慮到具複製能力的逆轉錄病毒之形成和排出以及其他因素（例如動物可能暴露到更高風險的病原體或非本地動物病原體）的風險評鑑確定後，可允許載體傳遞後降低生物安全等級。例如如果局部風險評鑑確定感染的可能性極低或不存在，而且接種部位已做清潔並更換墊料，則可在接種後的幾天內將動物轉移到較低生物安全等級實驗室（時間將由局部風險評鑑決定，期間可能是 1 至 7 天）。同樣，對具複製能力的逆轉錄病毒檢測呈陰性的動物，可以在接種後的幾天內移出阻隔區域，條件是風險評鑑確定幾乎沒有感染或複製感染性病毒的風險，並且在同一阻隔區域內不處理較高風險的病原體（包括非本地動物病原體）。

目前，檢測具複製能力的逆轉錄病毒之最常見方法，是採用基於細胞培養的方法，然後對具複製能力的逆轉錄病毒成分進行終點檢測，這可以經由聚合酶鏈式反應（PCR）、檢測逆轉錄酶活性的檢測方法或抗原檢測而實現。值得注意的是，一些 RCR 檢測方法使用 RG3 陽性對照，恐增加工作人員發生事故的風險。

4.4. 暴露後預防措施

在使用慢病毒載體工作之前，應訂定暴露後應變計畫，解決計畫的慢病毒載體系統和活動的具體問題，作為健康監測計畫的一個組成部分。如果使用第一代或第二代慢病毒載體發生針扎或尖銳物傷害，及時進行暴露後預防（例如在 1 小時內），將使已經很低的 HIV 感染風險降到最低。潛在的致癌或有毒基因的轉導或插入性突變的風險，尚未被臨床證明可以經由 HIV 預防措施而預防。然而，抗逆轉錄病毒藥物（例如疊氮胸苷(AZT)）能夠在細胞培養中完全阻斷轉導。

4.5. 除汙和廢棄物管理

對接觸過潛在感染性物質的廢棄物、材料、設備和物體表面進行有效的除汙，可限制汙染擴散到工作區和設施之外。可以在現場提供除汙技術/設備，

或者將被汙染的廢棄物適當包裝並運送到指定的設施進行除汙。

4.5.1. 慢病毒載體之除汙

慢病毒載體並不穩定，所以表面很容易被各種化學品除汙，包括 5000 ppm 次氯酸鈉（約 1/10 的市售漂白水稀釋液）或 70% 乙醇，並有足夠的作用時間。如果使用漂白水，應準備新的稀釋液，殘留物必須用水沖洗乾淨，以防止腐蝕表面（例如不銹鋼）。液體廢棄物可經由高壓滅菌或與漂白水混合至最終濃度為 5,000 ppm 的次氯酸鈉，並放置至少 30 分鐘來進行除汙處理。固體廢棄物可以高壓滅菌或焚燒。

在從阻隔區域移出之前，對所有可能與慢病毒載體接觸過的材料進行除汙（並標明已除汙），可以防止被汙染的材料離開阻隔區域。如果材料要在實驗室外除汙，可放在一個封閉、具標示、防漏、經過表面除汙的容器中。