

8 月 13 日 科長杜培文及鍾月容赴泰國普吉島，參加 APEC「第一屆生命科學創評論壇」，為期四天。

科長蔡淑貞參加 APEC 2003 年第三次資深官員會議之「標準及符合性次級委員會(SCSC)」，為期五天。

邀請台大醫院王綺嫻醫師蒞局，就「染髮劑過敏」專題演講。

8 月 14 日 舉辦「政府機關資安法律研習會」，計 132 人參加。

8 月 19 日 邀請微晶生物科技公司曾驥孟博士蒞局，講授「體外診斷用生物晶片之原理及應用」及「體外診斷用生物晶片之發展現況及實務問題」(8 月 26 日)。

8 月 25 日 辦理「食品衛生檢驗科技研討會」，為期二天，計 33 個單位 202 人參加。



## 科技顧問 FDA 李啟仁博士蒞局演講記實與心得

傅淑卿

李啟仁博士已服務於美國食品藥物管理局生物製劑評估與研究中心(Center of Biological Evaluation and Research, FDA)近 30 年，係細菌性疫苗之專家，尤其在多醣體疫苗方面，有深入之研究，他發表之論文與著作甚多，且自 1991 年起即擔任本局國外科技顧問，提供本局疫苗製劑之管理諮詢，助益良多，亦為我國於生物科技領域與美國 FDA 重要之橋樑。91 年 10 月 30 日趁其回國指導疫苗臨床試驗之際，蒞局為我們進行兩個主題之演講，分別為「美國疫苗發展之趨勢」及「肺炎結合多醣疫苗之保護免疫與有效性」，除了讓同仁瞭解未來疫苗發展之方向與重點，預作準備，以因應新疫苗之問世；而且亦為我們導入許多評估疫苗之保護力與有效性之方法，令局裏同仁，在成品檢驗技術範疇外，對疫苗研發過程有更深入之了解，整個演講循序漸進，同仁獲益匪淺，今將內容及心得摘述如下：

### 一、美國疫苗發展之趨勢

Trend of Vaccine Development in the United States



## 1. 未來疫苗發展之重點

未來疫苗發展之方向包括：

- (1) 進一步研究 T 細胞功能以開發黏膜免疫；
- (2) 利用病原體之毒性因子與 r-DNA 製造疫苗；
- (3) 尋找新的輔佐劑如 non-ionic block copolymer 與類蛋白中心體等更有效與安全之攜帶系統；
- (4) 新的免疫途徑。

## 2. 美國近十年疫苗發展之重點

表一列有美國醫藥協會(Institute of Medicine, IOM)於 1985 年依據市場需要性及發展性列出其後十年重點研發之疫苗共有 14 種，其中已有商品上市者共有 6 種，這些疫苗也都在台灣上市並為國人廣泛使用；1995 年 IOM 重新評估美國待研發之疫苗，約有 20 種，依感染宿主之途徑可分為四大類，包括呼吸道、腸胃道、性病及自體免疫類等，此外疫苗之定義亦不僅限於預防疾病，更擴及治療用途，如阿茲海默、癌症等慢性疾病之治療。

表中已有疫苗問世者包括流行性感冒病毒、肺炎鏈球菌、A 型肝炎病毒、B 型肝炎病毒、流行性 B 型嗜血桿菌、水痘病毒及百日咳菌等病原體，上述疫苗在國內亦皆有產品取得許可證。此外令國內許多家長擔憂之輪狀病毒，FDA 曾發給疫苗上市許可證，但使用不久即因臨床上發生多例腸套疊之嚴重副作用，而緊急回收產品並取消許可證。

表一、美國製藥協會評估在美國有防疫需要暨市場潛能可發展成為疫苗之病原體

1995 年	1985 年
<u>Respiratory infection</u>	
Influenza Virus A&B	Influenza Virus A&B *
Cytomegalovirus	Cytomegalovirus
Respiratory syncytial virus	Respiratory syncytial virus
Group A streptococcus	Group B streptococcus
<i>S. pneumoniae</i> *	-
<i>M. tuberculosis</i>	-
<u>Gastro-intestinal tract infection</u>	
Rotavirus	Rotavirus
<i>Shigella</i>	-
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	-
<i>H. pylori</i>	-
Hepatitis C virus	-
<u>Sexual transmitted diseases</u>	
<i>N. gonorrhoea</i>	<i>N. gonorrhoea</i>
Herpes simplex virus	Herpes simplex 1&2
Chlamydia	-
Human papilloma virus	-

1995 年	1985 年
<u>Autoimmune &amp; chronic disease</u> (Therapeutic vaccine)	
Rheumatoid arthritis	Hepatitis B virus *
Multiple sclerosis	Hepatitis A virus *
Melanoma	Haemophilus b *
Alzheimer's disease	Varicella-Zoster *
Insulin-dependent diabetes	Acellular Pertussis *
	Parainfluenza
	<i>C. immitis</i>

標有 \* 記號者表示預防該類病源體之疫苗產品，於國內及美國皆領有上市許可證

### 3. 亞洲疫苗發展之重點

世界衛生組織為了加速亞洲開發中國家迫切需要之疫苗的開發，於韓國成立國際疫苗研究所(International Vaccine Institute, IVI)，該所係一本著健康可經由發展、介紹及使用新的或改良過的疫苗予以改善的信念，著手研究、訓練、技術支援及傳播訊息等服務之科學研究中心。

IVI 接受例如比爾蓋茲基金會等之多方贊助進行各種評估，執行中之疫苗發展計畫，研究之對象包括霍亂弧菌、志賀氏菌與沙門氏傷寒桿菌，及流行性 B 型嗜血桿菌、肺炎鏈球菌、腦膜炎雙球菌、產毒型大腸桿菌、輪狀病毒、登革熱病毒及日本腦炎病毒等病原體，多為亞洲開發中國家公共衛生範疇常見之流行病，需要儘速予以改善者。

### 4. 國內疫苗發展之重點

由政府依預防接種計畫統一採購之疫苗共有 12 種（卡介苗、日本腦炎疫苗、白喉破傷風混合類毒素、成人用破傷風白喉混合類毒素、B 型肝炎疫苗、麻疹疫苗、德國麻疹疫苗、麻疹腮腺炎德國麻疹混合疫苗、口服小兒麻痺疫苗、白喉破傷風百日咳混合疫苗、結核菌淨素、B 型肝炎免疫球蛋白），僅前 4 種係國產品，其餘及其他自費施打之疫苗如 A 型肝炎疫苗、流行性 B 型嗜血桿菌疫苗、肺炎鏈球菌疫苗、白喉破傷風精緻百日咳混合疫苗、不活化小兒麻痺疫苗及水痘疫苗（此疫苗自 92 年度 9 月起亦列入我國預防接種計劃）皆須仰賴進口，因此增加自給率是國內疫苗發展之重要方向。

而本土性重大傳染病如腸病毒及登革熱病毒等，因市場取向，登革熱病毒之盛行區包括整個東南亞，或許還有國外疫苗廠願意投入，但是腸病毒則非靠國內產、官、學通力合作始能將其疫苗研發所須時間縮至最短，以儘早嘉惠國內幼兒，腸病毒疫苗目前已由學界完成病毒株之篩選，正由官方委託產界進行製程放大之評估，相信不久即有成果可以呈現給國人。

### 5. DNA 疫苗

疫苗在人類的歷史發展了上百年之後，大部分上市使用中之疫苗，皆有良好之成效，幫助了人類抵抗危險之傳染病，甚至像天花已從地球上絕跡，世界衛生組織 WHO 聯合疫苗製造大廠，並徵召萬名醫護人員，在第三世界以扇狀的型式，進行大規模接種，估計小兒麻痺幾年內亦可根除。

但是抗生素的使用不當與濫用，卻逐漸成了全球抵抗傳染病之隱憂，臨床上首先出現的是病原體抗藥性之問題，醫師面臨無藥可用之窘境，而在預防接種領域方面則發現，有些疫苗之有效率下降，以預防肺結核之卡介苗為最，即使接種了卡介苗，仍可能受突變種結核桿菌之侵襲，致世界各地肺結核病例逐年攀升。

為了改善上述情形及卡介苗本身的缺點，如人體免疫力下降時接種之活菌反而成為致病原，及其干擾結核菌淨素之篩檢等，因此 DNA 疫苗是有效解決問題之方法，目前於小鼠身上運用結核菌 heat shock protein (hsp65) 及 antigen 85 complex (Ag85A, B, C) 之 DNA 疫苗對抗結核菌，皆有初步之成果。

另一常見病原體如肺炎雙球菌，係一造成人類致病主要之革蘭氏陽性病原菌，全球每年約有 500 萬個小於 5 歲之兒童死於肺炎，該菌嚴重威脅全球老人與幼童之健康，目前臨床上雖然可以用抗生素治療，但是調查發現從病人身上分離出來之肺炎雙球菌約有 35 % 對盤林西林類之抗生素有耐藥性，另一常用於治療肺炎之萬古黴素也逐漸發生相同情形，令人憂心未來無藥可用之窘境。預防醫學上，則有含 23 種血清型之肺炎雙球菌多醣疫苗（適用 2 歲以上之幼兒及成人，MSD 及 Aventis 皆領有許可證）及含 7 種血清型之肺炎雙球菌多醣結合性疫苗（與破傷風類毒素結合，適用一般幼兒及成人，僅 Wyeth 領有許可證）可供預防注射以產生抗體，然而上述肺炎雙球菌多醣疫苗或多醣結合性疫苗皆未涵蓋所有之致病菌株。

因此科學家致力於尋找其他抗原，以解決肺炎雙球菌不同血清型及抗藥性變異株產生之限制，發展製造成本更低、品管更簡單、免疫效果更佳之疫苗，這個希望應可由 DNA 疫苗得到實現。

李博士從肺炎雙球菌最主要對人體造成毒性之細胞毒素 pneumolysin (Ply) 著手研究其 DNA 疫苗之保護性，19A 型之 Ply 的基因經解讀後，共含 1,413 個核苷酸，可轉譯為 471 個胺基酸，將 Ply 之 DNA 與 Liposomes 等載體形成複合物後，轉殖至細胞中形成融合瘤以大量製造 Ply，以小鼠進行動物免疫試驗，從抗體反應與菌體清除試驗，初步結果令人振奮。相信假以時日，肺炎雙球菌的 DNA 疫苗即可問市。

由於 DNA 疫苗具有非感染性、不再複製、以自然轉譯方式製造蛋

白質、成本低、室溫下也很安定、誘導 CTLs 之免疫反應等優點，除了上述之結核菌與肺炎雙球菌的 DNA 疫苗有初步成果以外，B 型肝炎、疱疹、愛滋等病毒亦都有臨床試驗在進行中。

## 6. 可食性疫苗 (Edible vaccine)

可食性疫苗係藉由帶有目標基因之細菌感染植物，以便將基因送入葉片細胞中，再挑選基因已殖入之細胞進行複製，運用組織培養技術，適時誘導發芽與長根，最後移入土壤中種植，待開花結果，取其果實食用即可達到接種疫苗之目的。

發展可食性疫苗有下列幾點須予以考量，包括：

- (1) 須選擇適於基因表現之植物細胞，例如香蕉、蕃茄、萵苣、紅蘿蔔、馬鈴薯、青豆及白米等；
- (2) 蛋白質抗原產量高者如 HBV(HBsAg)、Norwalk virus(NVCP)、霍亂弧菌及毒素原性大腸菌等較適合發展為可食性疫苗；
- (3) 須有效之疫苗攜帶系統，如佐劑 LT-B，免疫刺激因子 cytokine 等。

## 二、肺炎鏈球菌結合性疫苗之免疫保護性與評估 Protective Immunity and Evaluation of Pneumococcal Conjugate Vaccines

### 1. 肺炎鏈球菌結合性疫苗之簡介

在美國每年發生 3,000 例腦膜炎，菌血症與肺炎各 50,000 例，中耳炎更多達 7,000,000 例，而全球每年約有 1,200,000 個兒童死於肺炎鏈球菌感染所引起之各種副作用。肺炎鏈球菌依其血清型可分為 90 幾種，具致病力者約 30 種，自病人身上分離出來的，4、6B、9V、14、18C、19F 及 23F 等 7 型最為常見。

肺炎鏈球菌係一產莢膜之多醣類病原菌，1977 年含 14 種肺炎鏈球菌多醣體之疫苗上市，1983 年增加至 23 種，但是，該疫苗並無法保護 2 歲以下之嬰幼兒，直至 90 年代後期多醣接合技術發展出來並成功地運用於流行性感冒 b 型嗜血桿菌多醣結合性疫苗後，2000 年第一支肺炎鏈球菌多醣結合疫苗終於上市，該疫苗亦已於台灣取得許可證，惟在美國已供應不足，故至今尚未輸入國內。

肺炎鏈球菌疫苗未來發展方向有二，一為為多醣結合性疫苗尋找更有效之結合蛋白質，如該菌分泌之 pneumolysin 與 autolysin 等毒素，另外為解決多醣結合疫苗受限於肺炎鏈球菌血清型，無法阻擋所有肺炎鏈球菌之感染，因此科學家致力於尋找多醣體以外之抗原，以一併解決此盲點及抗藥性變異株產生，進而製造成本更低、品質更簡單之

疫苗，這個希望應可由 DNA 疫苗得到實現。

## 2. 疫苗之免疫保護性與評估

一支成功的疫苗在上市之前，需要經過許多的試驗，而在這些試驗中除了安全性以外，最重要的就是究竟有無產生抗體？產生的抗體有多少？是否足以對抗病原體的入侵？李博士介紹了主要評估新疫苗免疫保護效果之方法，摘述如下：

### (1) 抗體反應(Antibody response)

將 9~10 週齡之雌性小鼠免疫，二週後再追加一次，7 天後採血，以 ELISA 檢測血清中之抗體濃度，包括 IgG 及 IgM。

### (2) 抗體親抗原性(Avidity)

將不同稀釋倍數之抗體與抗原結合後，以 0.5 M 硫化氰酸鉀 (Potassium thiocyanate) 處理破壞其鍵結，之後測定殘留之結合體量，以 Avidity index(AI) 表示抗體抗原結合強弱。

### (3) 嗜菌力測定(Opsonophagocytic assay)

將不同稀釋倍數之抗體與病原菌於 37 作用 15 分鐘後，加入多形核(PMN)白血球繼續反應 60 分鐘，終了取 20  $\mu$ L 接種至血液瓊脂並過夜培養，可殺死 50 % 病原菌之最高稀釋階即為 OP titer。

藉由上述測定項目，可據以了解疫苗之免疫保護性，在評估不同結合蛋白等差異時，是一有力之工具。李博士與我們分享他分別以 pneumolysin 及 autolysin 與肺炎鏈球菌 type 9V 之多醣結合後，免疫小鼠，結果發現嗜菌力以 PS-Ply 64 倍為最高，其次為 PS-Aly 之 16 倍，而未結合蛋白質之多醣僅 8 倍，可直接得知免疫後之血清殺死肺炎鏈球菌之能力，以評估疫苗之免疫效果。

## 3. 肺炎鏈球菌結合性疫苗之品質管理

結合性疫苗中多醣與蛋白質結合體之含量與大小對結合性疫苗之免疫效果，扮演決定性之角色，故其品質管理亦著重於此二部分，重點包括：

- (1) 以 *in vitro* 之方法評估抗原(多醣)量，包括 Anthrone assay、Lowry assay、Nephelometry assay、NMR 及 ELISA 等，
- (2) 須以 HPLC Chromatography 測定抗原大小，
- (3) 須以適當方法如 ELISA 監視游離多醣之含量，以確保結合性疫苗之穩定與有效性，

這些檢驗方法在疫苗類的品管範疇皆為首見，詳見表二。

Nephelometry assay 係以 Nephelometer 進行試驗，該儀器多見於臨床檢驗，係利用抗體抗原結合後，分子變大，以光源照射時，會發生散射現象，於與光源成 90 度之處偵測散射強度，藉以評估抗體抗原之含量，係一具有專一性、良好線性與高靈敏度之檢驗方法。而核磁共振光譜 NMR 則是一個強大的鑑別工具，用於分辨來自不同血清型之多醣體非常快速。

從第一支疫苗問世已來，已經超過 200 多年了，比較表一中十年前、後，科學家與製藥廠冀望研發出來的疫苗種類，可以發現 1985 年所列 14 種，只有一半不到開發成功，剩餘的少部分被剔除，多數仍列入 1995 年待開發的名單中，繼續其研發的工作，顯示疫苗開發的不容易，但是卻有其必要與無可取代的地位，可以確信疫苗是公共衛生領域中最強而有利的預防醫學工具。

疫苗雖然是生物製劑中，歷史最悠久的，但是其發展卻是永無止境的，不光是需要疫苗以遏阻傳播的病原體一直出現，為了增進疫苗的有效性、安全性與方便性，其接種與製造方式也一直推陳佈新，而確認疫苗品質的檢驗方法也一直朝高特異性、專一性及符合保護動物精神的新生化檢驗方法邁進，疫苗的研發與製造實可謂處處為增進人類健康而努力。

表二、肺炎鏈球菌結合性疫苗之品質檢驗項目與方法

階段	檢驗項目	方法
分裝前	O-Acetyl group 含量	比色法
	多醣含量	Anthrone assay、Nephelometry assay、NMR 及 ELISA
	游離多醣含量	Nephelometry assay 及 ELISA
	蛋白質含量	Lowry assay
	核酸含量	比色法
	分子大小	HPLC Chromatography
	Endotoxin 含量	LAL assay
最終成品	鑑別	Immune blot
	總多醣含量	Anthrone assay
	無菌試驗	濾膜法
	Endotoxin 含量	LAL assay
	一般安全性試驗	小鼠及天竺鼠

## 參考文獻

1. 李啟仁博士演講內容.
2. <http://www.ivi.org>.
3. <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Aresist/aresist.htm>
4. <http://203.65.72.83/ch/vc/Publications.ASP>
5. [http://www.worldwidevaccines.com/pipe\\_line/intro.asp](http://www.worldwidevaccines.com/pipe_line/intro.asp)