

Hepatitis B Hepatitis B Hep Hepatitis B Hepatitis B Hep Hepatitis B Hepatitis B Hep

疫苗 的製造原理

陳進陽

台灣第一

B型肝炎已被證明與許多種肝疾，包括帶原者、慢性肝炎、急性肝炎、肝硬化及肝癌等關係密切。台灣地區的帶原者約有三百萬，占總人口的百分之十五到二十之間，約有百分之八十的人口曾被感染過。這種數字，較之世界上各先進國家，實在是不可說不驚人。到目前為止，B型肝炎是台灣公共衛生工作上一個最大的盲點。特別是依據衛生署民國七十二年的統計，肝硬化位居十大死因之第六位，肝癌更高居男性惡性腫瘤死因的第

一位。種種跡象顯示若不迅速抑止B型肝炎在台灣地區的傳播，對國家及社會經濟的影響將無可計數。

第一代疫苗

——血清疫苗

自從Krugmen於1971年第一次嘗試以帶原者血清來製造B型肝炎疫苗成功之後，世界上從事於生物技術研究的人莫不跟進。到目前為止，沿襲Krugmen的方法所發展出來的血清疫苗，已歷經考驗，證實可用於臨床上以預防B型肝炎。我國並已於民國七十三年七月一日展開全民預防接種十年計劃，前三年將以每年七萬多

個帶原者母親所生的新生兒為接種對象。

B型肝炎血清疫苗，亦即第一代疫苗是收集無症狀帶原者的血清，分離出其中B型肝炎的表面抗原(HBsAg)而得。由於帶原者的血清除了HBsAg外，尚含有Hepatitis B Virus (HBV)的DNA, DNA Polymerase及許多其他物質，故為了取得純粹HBsAg，需要多次粹取、濃縮、及純化，並經安全測試之後才能上市。這使得一劑疫苗的製造由收集血清到包裝約須65週的時間，耗時極久。而且帶原者血清的來源，不論現在或將來均屬十分有限，血清疫

苗的成本因而非常昂貴。再加上血清疫苗得自人類，即使製造過程極為嚴密，仍不免有可能攜帶某些致病因子的隱憂。因此，此時此地，除迅速建立傳統的產製方法以應實際需要外，更應加速發展遺傳工程技術。理論上，遺傳工程疫苗的供應是無限的，且製造過程中無污染之虞，安全性大大的提高。

第二代疫苗

——遺傳工程疫苗

由於血清疫苗的遠景不甚樂觀，因此在它還沒有完全發展成功之前，國外陸續有多篇論文發表，嘗試以其他方法來取代血清疫苗。首先，有科學家以能夠無限分裂的細胞株（cell line）來製造。其中最早發現的是PLC/PRF/5細胞株，此細胞株得自莫三鼻克一名肝癌患者，得到的HBsAg與自人類血清中分離出來的完全相同，並且不會製造完整的病毒顆粒及核心抗原（HBcAg），接種後不虞再感染。但由於它會同時產生 α -feto protein，且HBsAg產量不高，尤其考慮到以惡性組織來培養，若一旦惡性組織進入人體，其危險性如何，目前尚無法評估。

細胞株的發展有限，使得科學家將箭頭朝向生物技術的寵兒重組基因（Recombinant DNA）。以往HBV由於無法在cell culture中培養，且其自然宿主只有人類及猩猩，我們一直無法進一步去了解HBV的遺傳物質作用機轉。近年來隨著分子生物技

術的進步，除了可以辨識出HBV DNA上各段gene的用途外，並可以進一步將所要的gene切下，以表現在不同的宿主系統。本段將就常用的三種宿主系統：E. coli, yeast, mammalian cell來分別介紹。

(一)E. coli:

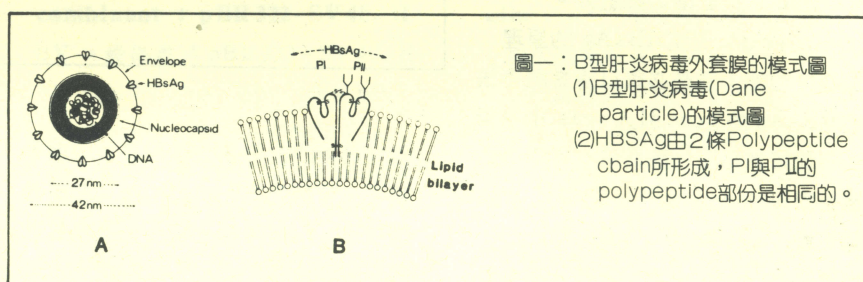
E. coli由於繁殖迅速，且擁有質體（Plasmid），改變遺傳物質頗為容易，長久以來即被廣泛地應用於遺傳工程，並且曾成功地製造出胰島素、生長激素、干擾素、酶等較短的多勝鏈。因此一旦要發展遺傳工程疫苗，自然而然首先想到E. coli。

首先以限制酶將能錄出（code

獲得疫苗，這使得疫苗的純度降低。

(2) E. coli合成HBsAg之後，反而會抑制它的生成。

(3)將粹取物注入兔子中，測試它的免疫效力（Immunogenicity）。結果所得的抗體其效價（titer）頗低。分析其原因，可能由於HBsAg醣蛋白（Glycoprotein），而E. coli並不具有醣化（Glycosylation）的能力，因此使HBsAg多勝鏈的立體結構改變，而降低其效能。另一可能原因是，E. coli為一原核生物（prokaryotic cell），它細胞膜的構造與真核生物



圖一：B型肝炎病毒外套膜的模式圖
(1)B型肝炎病毒(Dane particle)的模式圖
(2)HBsAg由2條Polypeptide chain所形成，PI與PII的polypeptide部份是相同的。

) HBsAg的gene自HBV DNA上切下，而後將之與E. coli的質體（plasmid，最常用為pBR322），或噬菌體的DNA連接在一起，而後移入E. coli，讓它在培養血中大量繁殖，可惜，到目前為止，有關E. coli的研究，成果均不甚理想。其原因如下：

(1)由於E. coli不能將PT釋出細胞外，因此必須以粹取的方式來

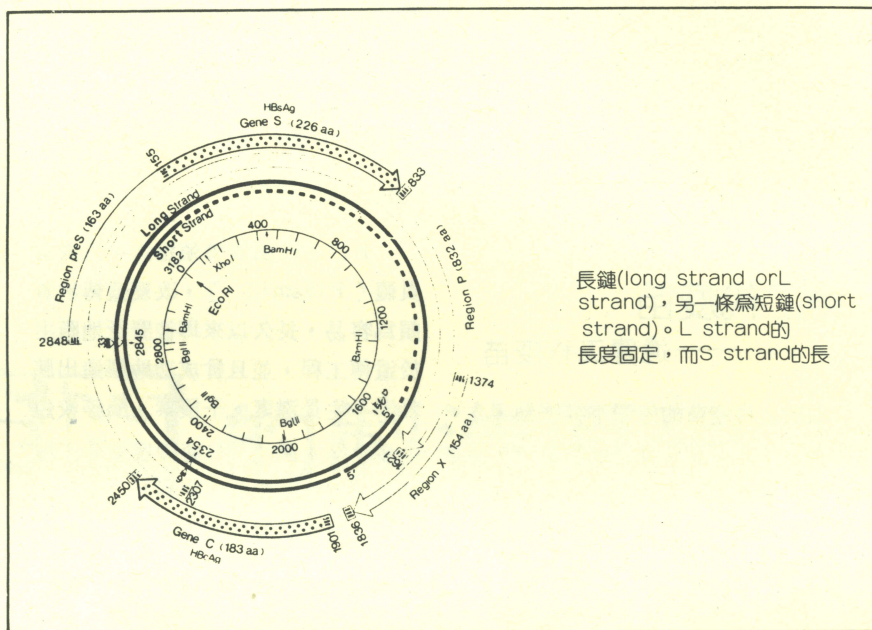
（Eukaryotic cell）並不同。而HBsAg在自然宿主及肝癌細胞株中均是以聚集的顆粒型式出現（圖一），由實驗得知：呈顆粒型式的HBsAg它的免疫效力（Immunogenicity）是單獨多勝鏈的1000倍。E. coli可能就是由於膜的不同，加上生化機能，酶系統不夠進化，而導致HBsAg的聚集及品質有問題

，而降低了免疫效力。

(二) yeast:

以 *E. coli* 來製造 HBsAg，其結果顯然並不令人滿意，即使在 HBsAg 的 gene 前加上強有力的細菌起動座 (bacterial Promotor) 以增強 *E. coli* RNA 聚合酶轉錄 (transcription) 的能力，效果仍不理想。科學家們只好將研究方向轉向比較接近哺乳動物，而遺傳物質又不會太複雜，容易培養的 yeast 身上。yeast 為真核細胞 (Eukaryotic cell)，細胞膜及胞器均較 *E. coli* 複雜得多，並且能以類似高等哺乳動物細胞的方式，將蛋白質醣化 (Glycosylation) 並分泌出細胞外。

以 yeast 表現 HBsAg 的原理 *E. coli* 相同，還是必須以適當的方法將 HBsAg 的 gene 引入 yeast 中複製。首先用數種限制酶將帶有 HBsAg 遺傳密碼的 gene 切下，連在 *E. coli* 的質體 (plasmid) pBR 322 上，再置入 *E. coli* 中大量繁殖，如此可得到大量而相同的 HBsAg gene。而後再切下這段 gene 將之連到 yeast 的 plasmid pMA-56 上，pMA-56 上具有 yeast 乙醇去氫酶 I (Alcohol Dehydrogenase I) 的起動座 (promotor)，這個起動座可以帶動 HBsAg gene 被轉錄 (transcription) 成 RNA。到這個步驟，將 HBsAg 的 gene 引入 yeast 的媒體 (vector) 已製成，隨後將此重組質體 (Recombinant plasmid) 引



倍。再將純化後的產物置於電子顯微鏡下，可發現 HBsAg 的確以顆粒狀態存在，但經詳細計算後，發現這些粒子的直徑並不一，平均約在 17nm 左右，比人類血清中的 HBsAg (直徑 22 nm) 略小。而後再將產物注射入兔子體內，試驗其誘發抗體的能力，結果非常令人滿意，兔子體內抗體的效價，應用於人體以抗拒 B 型肝炎的感染仍綽綽有餘。

這些由 yeast 所做出的結果，解答了許多科學家心中的疑惑。首先我們只將 HBsAg 的 gene 嵌入 vector 中，而 yeast 仍能以顆粒型式製成，顯示要形成 HBsAg 顆粒除了這段

入 yeast，並置於培養皿中繁殖。

自 culture 中粹取出 HBsAg 後，以各種化學及物理方法來檢驗，並比較由 yeast 所製得的 HBsAg 與由人類血清中分離出來的 HBsAg 之間的異同。結果發現他們的 buoyant density 同為 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ ，沈降速率也同為 55 S，由這些資料，我們可以知道 yeast 如同 HBV 的自然宿主一樣，將 HBsAg 製成之後聚合成 particle 型式再釋出細胞外，並有相似的 Protein / Lipid 比值。這點非常重要，因為呈顆粒狀態的 HBsAg，其免疫效力 (Immunogenicity) 是單獨 HBsAg 多肽鏈的 1000

gene 之外，並不須別的指令，關鍵還是在宿主系統。也就是說，今後遺傳工程技術來製造 B 型肝炎疫苗，還是只須要切這一段 gene 就可以。

以往遺傳工程及 recombinant DNA 的發展，僅限於用 *E. coli* 製造一些簡單的 peptide，對於 vector 的使用，也不若今日這麼靈活。yeast 系統的開發成功，除了讓我們對於真核細胞與原核細胞之間的異同，有更多的瞭解外，也為遺傳工程技術，開闢了更廣的領域，今後將有更多的物質可以利用 yeast 這個設備完善的「工廠」製造出來。

1984 年 6 月，美國 Merck, Sharp & Dohme 藥廠宣佈，他們由 yeast 所製得的 HBsAg 已在 37 個健康人身上接種成功，獲得令人滿意的結果。這是自 1981 年科學家著手研究 yeast 以來一項意義非凡的成就，專家們並且估計，最遲在 1990 年以前，遺傳工程疫苗必定可以上市，屆時對於需要疫苗極為殷切的台灣將是一項無上的福音。

(三)mammalian cell:

在觀察了 HBsAg 在 *E. coli* 及 yeast 的表現情形後，科學家們更急欲知道 HBsAg 在 mammalian cell culture 中的表現情形。

首先遇到的問題是 mammalian cell 與 yeast *E. coli* 不同，它的遺物質無法以質體的形式存在，於是如何設計出一種媒體以引入 HBsAg 的 gene，使人大傷腦筋。為了克服這

個問題，匠心獨具的科學家想出以猴病毒 SV-40 (Simian Virus 40) 來做 vector

以限制酶 Bam HI 由 HBV 上切下一條 1350 bp (base pair) 長的 DNA 片段，接到 pBR 322 上，再一起移入 *E. coli* 中大量複製，而後再以 Bam HI 切下這些 HBV DNA 片段，並用電泳 (electrophoresis) 來分離，取得純粹 DNA 片段。同時另外準備許多的 pBR 322-SV 40 Recombinant，這也是用限制酶切開彼此的 gene，再用連接酶 (ligase) 使之合在一起而成。下一步驟是使以上這兩個 Recombinant：pBR 322-HBV 及 pBR 322-SV 40，經由限制酶的作用，產生一個大型的 Recombinant：pBR 322-SV 40-HBV。最後再將 pBR 322-SV 40-HBV 以限制酶 Hae III 切，移去 pBR 322 的 gene，產生一條線狀，長 4950bp 的 HBV-SV 40 Recombinant。這就是我們用來運送 HBV gene 的 vector。

也許有人要問，何不直接合成 SV 40-HBV 的 Recombinant 呢？這是因為 *E. coli* 的複製非常迅速每 20 分鐘就有一個 generation，因此若需要大量複製某種 vector，幾乎都是利用 *E. coli* cell culture。而上述這樣的一個 Recombinant 將無法在 *E. coli* cell culture 中大量繁殖，只好透過 pBR 322 這個「媒婆」分別在 *E. coli* 中大量複製，而後再丟掉 pBR 322，產生大量的 SV 40-

HBV recombinant。

完成了 SV 40-HBV 之後，再將之感染由猴腎細胞所製成的組織培養基，數天後以免疫方法測定，發現有 HBsAg 的產生，並且有與人類血清中 HBsAg 相同的 buoyant density 與 sedimentation rate。再進一步以電子顯微鏡直接觀察，在鏡下所見的顆粒，其外形與血清中所發現的幾乎無法分別，更令人興奮的是，除了球形顆粒外，也可找到呈絲狀 (filament) 的表面抗原聚合體。這顯示由猴腎細胞所製的 HBsAg 比 yeast 所製的，更接近天然的 HBsAg 同樣以直徑 22 nm 的顆粒出現，並在分析 HBsAg 多肽鏈之後，發現由肽鏈組成（一條為 MW 23,000 的 polypeptide (p1) 另一條為第一條 (p1) 加以醮化而成 (p2)）。

以實驗結果而言，這個實驗是成功了。而由結果所引出的一些想法，就相當值得人深省。由於猴腎細胞能絲毫不差的表現出 HBsAg，顯示以往 HBV 在 cell culture 中培養失敗，不是因為除了高等靈長類動物的肝細胞以外，沒有其他 cell 能表現 HBsAg，而必有其他原因存在。其次，就生化的觀點來看，高等動物的細胞顯然比真核細胞多了一些能修飾 (modify) 蛋白質，或是加上一些必要的功能基，以及將之聚合成特殊構造以符合生理上能力。

就如同在 yeast 上的成功一樣，以 mammalian cell 成功培養出 HBsAg，除了再一次拓展遺傳工程的領

域，也提供了更多的資料，以供我們去瞭解B型肝炎。

第三代疫苗

——牛痘疫苗

Vaccinia virus——這個為人類所熟悉的老朋友，在完成撲滅天花的重責大任，沈寂世界舞台數年之後，又再度大肆活躍。並有取代遺傳工程疫苗，一舉拔得頭籌的聲勢。

由於 vaccinia virus 的 DNA 分子量大，可容許嵌入許多外來的 gene，而且 Vaccinia virus 本身又

是減毒病毒，如此只須一次接種，就可一舉數得，同時預防好幾種疾病。

實驗結果顯示，HBsAg 的 gene 嵌入 Vaccinia Virus 之後，vaccinia virus 可將之製成類似帶原者血清中的顆粒狀 HBsAg，並將之釋入培養基中，純化此種產物，注入兔子體內，也可得到效價頗高的抗體。

因此，此種設計一旦發展完成，將兼具費用低廉及接種方便兩大優點，最適合用於需要大規模接種的地區。尤其是一次接種同時預防好幾種疾病的這種優點，是自發展出 DPT 三

合一疫苗後，醫學界的又一傑作。

雖然這個方法顯得如此吸引人，但是目前還是有幾點問題尚待突破。在 1979 年 WHO 宣佈停止接種牛痘之前，世界上 39 億人口絕大多數都接種過牛痘，也就是他們對 Vaccinia virus 的感染皆具有免疫力。而現在若再接種一次 Vaccinia Virus，其生長情形必定不理想，對 HBsAg 的表現及日後的免疫效果也必定大打折扣。這是目前一個橫亘在 Vaccinia Virus

之前的最大障礙。除非能再發展出具有類似 Vaccinia virus 特點的大型 attenuated virus。

另一問題則是 Vaccinia virus 本身的安全性，當 1966 年 WHO 開始世界性的接種牛痘時，曾遭到英、美兩國的反對。原因是這兩個地區天花自然感染的病例數猶低於因接種 vaccinia virus 發生副作用而產生的病例數。但這個問題若是在流行區則不成問題。

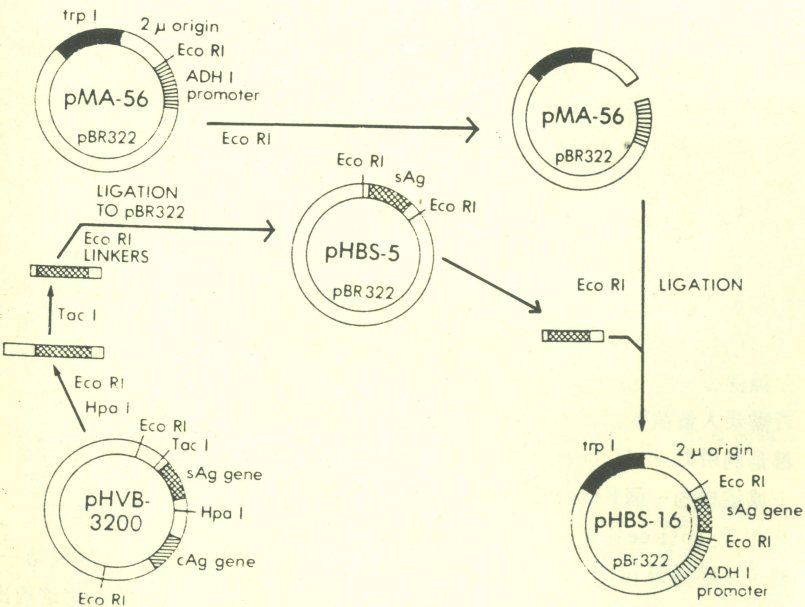
第四代疫苗

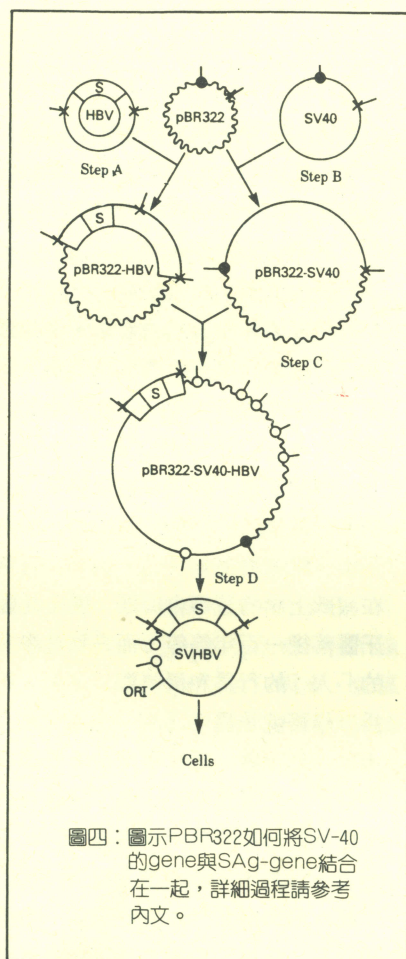
——人工合成疫苗

去年（1984 年）四月，美國 Science 雜誌刊登了一則有關 B 型肝炎疫苗最新的突破，一群科學家完全利用人工合成的方法，製造出 HBsAg gene 前方那一段 gene（稱 pre-S gene）所錄出的蛋白質，並在兔子身上成功地完成動物試驗。

對於這方面的研究，將是製造疫苗最終努力的方向，科學家們將會繼續選擇 HBsAg 中的某一段來合成，

圖三：由 HVB 上切下 SAg gene，連上 PBR322，在 E.coli 中大量複製，再與已製備好 PMA-56 plasmid 結合，就可得到用以在 yeast 中表現 SAg-gene 的 PHBS-16。





務求找出能引起最強 immune response 的那段 peptide。

B型肝炎疫苗在台灣

台灣地區 B 型肝炎帶原者占總人口的百分率高居世界第一位，感染機率之大，實在令人吒舌。尤其是帶原者母親所生下的新生兒，若不於生下

後立即接種疫苗，每年將有三萬名新生兒日後百分之百成為帶原者。並且這個數字將隨時間而繼續升高。

因此，此時此地發展遺傳工程疫苗，除了順應輿情以提供社會大眾需要，改善國民健康外，並利用此一世界性的發展生物技術潮流，大量引進尖端科技，以刺激本土現有的遺傳工程人材，發展、開發新的技術，希望能在短時間內達到同時向下紮根，向上結果的雙重標的，以趕上歐美先進國家。國科會乃自民國七十年十月開始，全面輔導推動國內相關研究機構，包括中研院動物所及植物所，台大醫學院生化研究所及微生物研究所，陽明醫學院生化研究所，以及國防醫學院生化研究所。集合國內十餘位這方面的精英共同努力，三年來已能製成微量 HBsAg，如今正朝如何提高產量努力。

國內目前所研究的內容，也分 E. coli, yeast, mammalian cell 三個宿主系統進行，研究方法大致如上所述。雖然美國 Merck, Sharp & Dohme 藥廠已宣佈小規模臨床試驗成功，但國內人員也正加緊步調趕上國際間研究水準，相信一旦法國巴斯德研究中心開發遺傳工程疫苗成功，技術轉移給我國之後，必能與目前國內的植根工作銜接，整體地提昇國內生物技術的水準。

結語

在一片混沌未開、萬無頭緒中摸索了好長一段時間，而後曙光乍現，無數新知、新發現衝破無知的烏雲，燦爛奪目，令你目不暇給，幾乎所有的科學都是如此。站在歷史的角度，縱向的看科學發展，不禁感佩先進們對知識絕對負責，對真理絕對服膺的那種謙虛態度，及科學巨流的壯闊。而 B 型肝炎疫苗的發展，不過只是滄海之一粟罷了。做個醫學生，真該有投身科學巨流，不然至少也掀起一陣波濤的抱負才是。願以此與同學們共勉。

參考資料

- (1) "Biology of Hepatitis B Virus" Science Vol. 213, 24 July 1981
- (2) "Production of immunologically active surface antigens of hepatitis B virus by E. coli" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, No. 7, pp. 4510 ~ 4514, July 1981
- (3) "Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast" Nature Vol. 298, 22 July 1982
- (4) "Expression of the hepatitis B virus surface antigen in cell culture by using a simian virus 40 vector" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, No. 4, pp. 2606 ~ 2610, April 1981