

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

疫苗 的製造原理

台灣第一

B 型肝炎已被證明與許多種肝炎，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 K rugmen 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 K rugmen 的方法所發展出來的血清疫苗，已歷經考驗，證實可用於臨床以上以預防 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

陳進陽

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，需要多次萃取、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限制分裂的細胞株（

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龐兒重組基因（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、酶等較短的多肽鏈。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

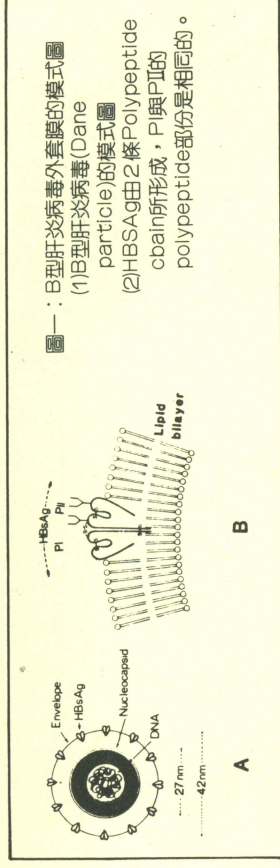
獲得疫苗，這使得疫苗的純度降低。

(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 糖蛋白（Glycoprotein），而 E. coli 並不具有糖化（Glycosylation）的能力，因此使 HBsAg 多肽鏈的立體結構改變，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型肝炎病毒外殼的模式圖
(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

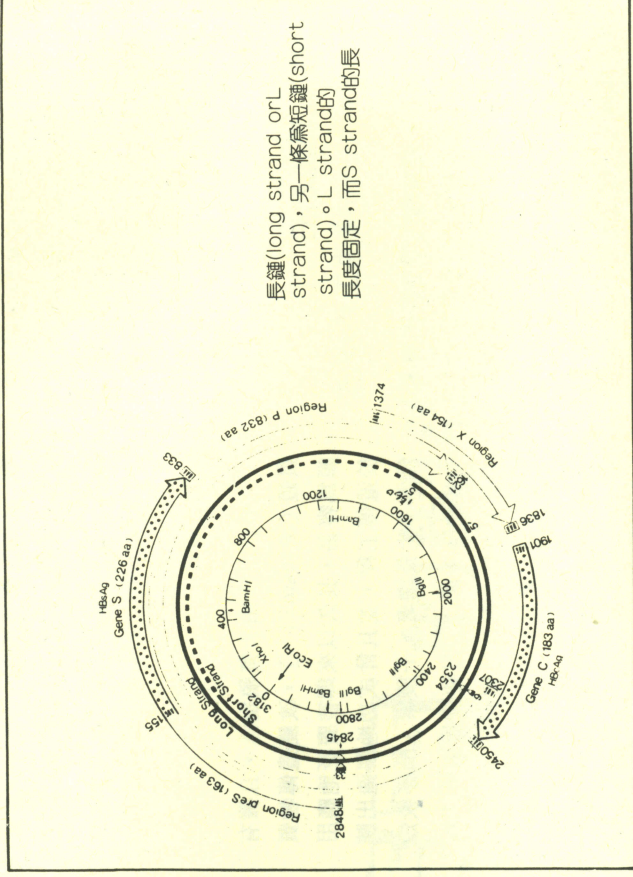
（Eukaryotic cell）並不同。而 HBsAg 在自然宿主及肝細胞株中均是以聚集的顆粒型式出現（圖一），由實驗得知：呈顆粒型式的 HBsAg 它的免疫效力（Immunogenicity）是單獨多肽鏈的 1000 倍。E. coli 可能就是由於膜的不同，加上生化機能，酶系統不夠進化，而導致 HBsAg 的聚集及品質有問題

，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，將蛋白質糖化 (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)，這個起動產可以帶動 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



長鏈(long strand ori strand)，另一條為短鏈(short strand)。L strand的長度固定，而S strand的長

入 yeast，並置於培養皿中繁殖。自culture中萃取出 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 1.2g/cm³，沉降速率也同為 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 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 22nm) 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

gene 之外，並不須別的命令，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，也不若今日這樣靈活。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 II 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 22nm 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) 加以醱化而成 (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 分子量極大，可容許嵌入許多外來的 gene，而且 Vaccinia virus 本身又

是滅毒病毒，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遠低於因接種 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。

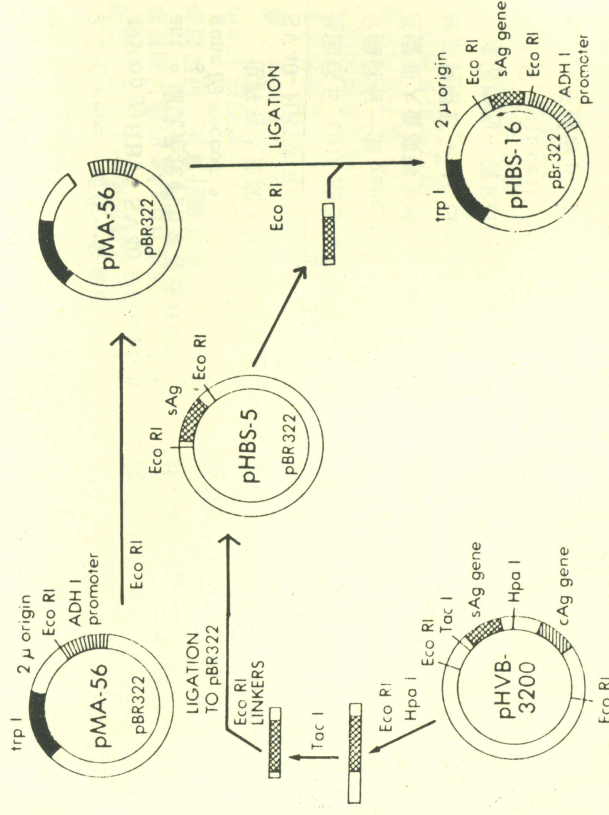
第四代疫苗

——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，

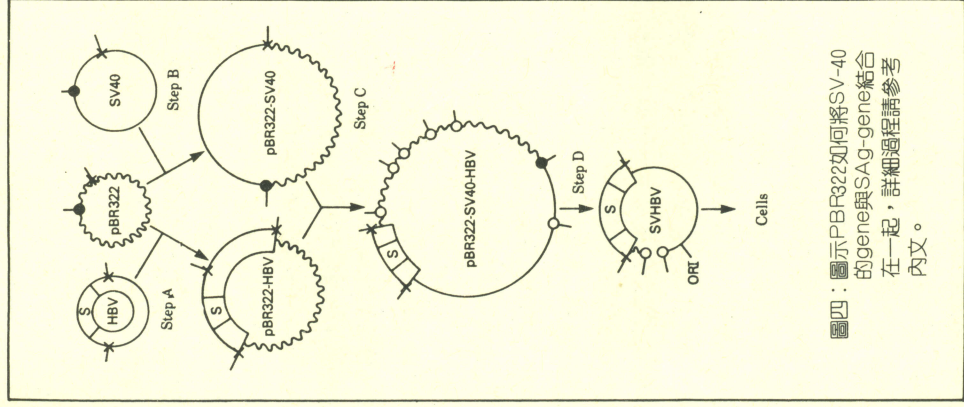
圖三：由 HVB 上切下 SAg gene，連上 pBR322，在 E.coli 中大量複製，再與已製備好 PMA-56 plasmid 結合，就可得到用以在 yeast 中表現 SAg-gene 的 PHBS-16。



後立即接種疫苗，每年將有三萬名新生兒日後百分之百成爲帶原者。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，包括中研究動物所及植物所，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。

圖四：圖示PBR322如何將SV-40的gene與SAG-gene結合在一起，詳細過程請參考內文。



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，實在令人咋舌。尤其是帶原者母親所生下的新生兒，若不於生下

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 immunological-ly 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

結語