

# 結核桿菌疫苗發展之現況

陳義元 張嘉茹 黃偉峰 杜鴻運

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

## 前 言

結核病 (tuberculosis) 屬第三類法定傳染病，依據疾病管制局的統計資料得知台灣每年仍有約一萬三千名的新個案，其長久來一直位居重要傳染病的首位。雖然目前世界各國皆聯手致力於結核病的防疫工作，但根據流行病學的研究報告可知在全球每分鐘有將近二十人得到結核病，有四個人死於結核病[1]。雖然結核病在全球的發病率 (morbidity) 和死亡率 (mortality) 是下降的，但是罹病率和死亡率的下降可能是由於全球人口的增長速率比結核病的發生率 (incidence) 還快所致，因此在過去十年來，全球結核病的總數仍未因各種防疫策略而顯著的減少[1]。而近年來又因為多重抗藥性的問題使得結核病更難以治療，以及愛滋病人同時感染結核病的問題 (愛滋病人會因為 CD4<sup>+</sup> T 細胞數目的減少而導致結核分枝桿菌

(*Mycobacterium tuberculosis*) 感染的機率增加)，使得核病控制面臨更加嚴峻的考驗[2,3]。為了有效的控制結核病的傳播，抗結核病疫苗的研發，已是全球眾多免疫學者以及醫界全力追求的重要課題。

目前世上最廣泛使用且唯一用來對抗結核病的疫苗：卡介苗 (Bacille Calmette-Guerin, BCG) 為 1908 年，由法國的 Calmette 及 Guerin 兩位醫師，將有毒的牛型結核桿菌 (*M. bovis*) 經多次的人工繼代培養而減毒馴化的活性疫苗。我國從民國 40 年即開始執行卡介苗接種工作，初期使用的是液態卡介苗，其有效價不穩、注射後易引起淋巴腺腫大、保存的效期較短，儲存不易等缺點。經改良後，卡介苗改以 Tokyo 172 菌種製造乾燥的卡介苗。民國 69 年起，全國均採用疾病管制局血清疫苗研製中心 (前預防醫學研究所) 以 Tokyo 172 菌種所製造的乾燥卡介苗。卡介苗已被證實可以預

防幼兒發生結核性腦膜炎，但根據臨床試驗的結果顯示，傳統卡介苗對成年人的保護性差異相當大，其效價可自 0% 至 80% 不等[4]。Murray 等人推測一個具有 50% 保護效果 (protective efficacy) 新疫苗的研發與施打，到 2030 年前可以防止九百萬人死於結核病。而近期發生廣泛抗藥性結核菌 (extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB) 的出現無異使結核病防治上更加困難，由此可見新疫苗研發的迫切性。

### 當代結核桿菌疫苗研發的情形

大部分受到結核分枝菌感染的人由於身體有足夠的抵抗力，會自然痊癒而一生都不發病，但有少部分受到結核菌感染的人，在身體健康情況較差，免疫力低下時，潛伏於體內的結核菌會因而重新活動且繁殖起來而發病，或是經由二次感染而發病，故現今結核病疫苗的研發方向包含針對未感染者 (預防) 和已感染者的疫苗 (治療)。理想的結核菌疫苗須具有下列特性：最首要的是要安全且能保護施打的宿主對抗結核病、能具有長時間的保護效力、對熱穩定且保存期限長，其次為不會干擾結核菌素皮膚試驗 (tuberculin skin test, TST) 之診斷、價格便宜等。截至 2011 年為止，目前已有多種形式的結核桿菌疫苗進入臨床試驗階段 (表一)[1]，其主要是以下列幾個大方向進行研發：

### 一、基因重組疫苗 (recombinant BCG vaccine)

基因重組疫苗是利用分子生物學及基因工程學的實驗方法，將結核分枝桿菌之特定抗原表現於牛型結核桿菌，藉此誘發適當的免疫反應，保護宿主。目前有兩個 rBCG 疫苗已經進入臨床試驗階段。rBCG30 是由 Horwitz 等人在加州大學所研發出的基因重組疫苗，其利用牛型結核桿菌的生長繁殖，表現出 30 kDa 的 Ag85B 保護性抗原，藉以增強宿主的免疫力，以天竺鼠進行實驗已證實具有良好的保護效果[5]。Hoft 等人進行第一期的臨床試驗亦證實這個疫苗用於人是安全的，且可誘發適當的免疫反應[6]。另一種方法是利用牛型結核桿菌表現李斯特菌溶菌素 (listeriolysin)，藉以改變吞噬小體 (phagosome) 通透性，促使抗原可由吞噬小體 (phagosome) 釋放，並經由 HLA class I 分子呈現抗原，激發 CD8<sup>+</sup> T 細胞的活化[7]。此重組疫苗目前已在南非進入第二期的臨床試驗 (Phase IIa)。

### 二、減毒疫苗 (attenuated vaccine)

減毒疫苗是利用宿主在潛伏感染期會持續釋出致敏原 (sensitins)，以維持記憶性免疫反應，藉此對抗相同菌株的重複感染。目前發展中的減毒疫苗主要可以區分成兩大類，一類為使用無毒的快速生長結核分枝桿菌做為疫苗 (例如：*M. semgmatis* 或者 *M. vaccae*)，其作用的原理為這些菌株並

表一 目前已經進入臨床試驗階段的結核桿菌疫苗

| 疫苗種類及名稱                               | 試驗階段 | 特性描述   |
|---------------------------------------|------|--|
| <b>Recombinant BCG prime vaccine</b>  |      |  |
| VPM 1002                              | 1    | rBCG prague strain expressing listeriolysin and carries a urease deletion mutation |
| rBCG30                                | 1    | rBCG Tice strain expressing 30 kDa Mtb antigen 85B (Ag85b)                         |
| Aeras-422                             | 1    | rBCG Danish 1331 strain expressing Ag85A, Ag85Band Rv3407                          |
| <b>Viral-vectored booster vaccine</b> |      |  |
| Oxford MVA85A/Aeras-485               | 2    | Modified vaccine Ankara vector expressing Ag85A                                    |
| Crucell Ad35/Aeras-402                | 2    | Replication-deficiency adenovirus 35 vector expressing Ag85A, Ag85b and TB10.4     |
| AdAg85A                               | 1    | Replication-deficiency adenovirus 5 vector expressing Ag85A                        |
| <b>Recombinant protein vaccine</b>    |      |  |
| Hybrid-1 + IC31                       | 1    | Fusion of Ag85B and ESAT-6 in adjuvant IC-31                                       |
| Hybrid-1 + CAF01                      | 1    | Fusion of Ag85B and ESAT-6 in adjuvant CAF01                                       |
| M72                                   | 2    | Fusion of Rv1196 and Rv0125 in adjuvant AS01 or AS02                               |
| HyVac4/Aeras-404                      | 1    | Fusion of Ag85B and TB10.4 in adjuvant IC-31                                       |
| <b>Others</b>                         |      |  |
| RUTI                                  | 1    | Fragmented Mtb cells   |
| <i>M. vaccae</i>                      | 3    | Inactivated whole cell non TB mycobacterium  |
| <i>M. smegmatis</i>                   | 1    | Whole cell extract   |

無法在宿主中長期存活，但其可誘發宿主產生免疫反應。另一類的減毒疫苗為利用轉位子插入 (transposon insertion) 突變的方式或同質性基因重組的方法製造營養缺陷型 (auxotroph) 的疫苗，因營養缺陷的菌株會快速死亡，且實驗證實此種疫苗對嚴重免疫缺陷的老鼠沒有致死性，但可誘發宿主產生免疫功能，因此其施打於免疫

功能低下之病人身上危險性相對較低。概括而言，活性減毒疫苗的優點為可誘發較佳且長時間的記憶性免疫反應、且其價格相對便宜。缺點是仍可能因施打疫苗而造成免疫力低下之病人感染，故在使用上還是有其限制性。

### 三、病毒載體疫苗 (viral vector vaccine)

病毒載體疫苗常以腺病毒 (adenovirus) 或牛痘病毒 (vaccinia virus) 為載體，如 Aeras-402 是利用一種在複製上有缺陷的腺病毒 (adenovirus serotype 35) 做為載體，藉其表現結核分枝桿菌的抗原包括 Ag85A、Ag85B 和 TB 10.4。AdAg85A 則是使用同類不同血清型的病毒 (adenovirus serotype 5) 做為載體，表現結核分枝桿菌的 Ag85A 抗原。此類疫苗可以誘發細胞性免疫反應，特別是 HLA class I 的 CD8<sup>+</sup> T 細胞免疫反應，上述兩種疫苗目前皆已經進入第二期臨床試驗 (phase II)。MVA85A 則是以改造過的牛痘病毒 (vaccinia virus Ankara, MAV) 表現結核分枝桿菌的 Ag85A 抗原，此疫苗施打於曾注射過卡介苗的老鼠、天竺鼠、牛等動物身上，可誘發更佳的保護效果，且這個疫苗也已進入第二期臨床實驗 (phase IIb)。由於腺病毒和牛痘病毒發展歷史悠久，相關的基因和致病機轉皆已有深入的研究，因此在基因工程學上的改造和用於人體相對容易掌控和使用，此類疫苗優點是可以引起適當的體液性免疫和細胞性免疫反應，但對免疫不全的病人 (例如：愛滋病患者) 還是具有危險性。

#### 四、DNA 疫苗

DNA 疫苗是由含有保護性抗原的 DNA 片段所組成，主要是將具有誘發免疫反應的基因片段經由酵素的剪切和黏接放置於質體 (plasmid) 上，

此質體可以經由大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 大量產生和純化。製備完成的疫苗，經由肌肉注射可以誘發宿主產生強烈的細胞性和體液性免疫反應。HG85 A/B 為利用結核分枝桿菌的 Ag85A 及 Ag85B 抗原所製造出來的疫苗，目前已經進入臨床前試驗階段，其他尚有多種類似疫苗也正進行研發當中，例如：使用癩瘋桿菌 (*M. leprae*) Hsp65 (heat shock protein 65) 的 DNA 分子、或者使用結核分枝桿菌的 Ag85A、Ag85B、ESAT-6 等 DNA 製成的 DNA 疫苗，皆已於動物實驗證明具有良好的保護效果。

#### 五、次單位疫苗 (subunit vaccine)

次單位疫苗主要是由蛋白質佐以免疫性佐劑 (immunological adjuvant) 所組成。M72 是由葛蘭素史克藥廠 (Glaxo-SmithKline Biologicals, GSK) 藉由純化結核分枝桿菌 (*M. tuberculosis* 39 and 32) 一個 72 kDa 的蛋白 (Rv1196 and Rv0125) 配合佐劑 AS01 (Liposome-based, surface-active saponin QS21 and TLR-4 ligand) 和 AS02 (oil-in-water emulsion, surface-active saponin QS21 and TLR-4 ligand) 所研發出來的疫苗。此疫苗在 phase I 的階段已證實可誘發抗原專一性的 CD4<sup>+</sup> T 細胞免疫反應，並已進入第二期臨床試驗 (phase IIa)。Hybrid-I 則是由丹麥血清研究所 (Statens Serum Institute, SSI) 藉由純化結核分枝桿菌的兩個分泌性抗原 ESAT-6 和 Ag85B，配合奧地利生

技公司 Intercell 所研發的佐劑 IC-31 (cationic antimicrobial peptide (KLKL5KLLK polypeptide) and TLR-9 ligand) 或丹麥血清研究所自行開發的佐劑 CAF01 (liposome-based, lipoid MINCLE ligand25) 所研發而成的疫苗。而 HyVac 4/AERAS-404 是由 Ag85B 和 TB 10.4 佐以佐劑 IC-31 所研發而成的疫苗。此類疫苗的優點為較少引起有害的反應，且因其使用的抗原成分通常為已知分子，容易再次製造，但因疫苗的主成分是由蛋白質所組成，所以缺點為蛋白質純化的過程所費不貲，且有可能需要二次追加注射以增進免疫效果。

### 國家衛生研究院目前研究方向

目前國家衛生研究院所進行的卡介苗研究，主要是朝取代現行以 Tokyo 172 菌種所製造的卡介苗為方向。根據前人的研究報告可知結核桿菌生長時所分泌的蛋白質具有強烈的抗原性，這群蛋白質統稱為培養過濾液蛋白 (culture filtrate proteins, CFP)[8,9]。將此類蛋白免疫小白鼠可誘發 Th1 細胞性免疫反應，促使 Th1 細胞產生 interferon  $\gamma$ ，藉以保護宿主免於受到結核桿菌的感染。國衛院由杜鴻運博士所帶領的研究團隊以基因重組方式，已發展出一可以同時表現出 Ag85B、CFP10 及 interleukin-12 的重組 BCG 疫苗[8]。經由動物實驗及結核菌生長抑制實驗顯示，經重組

BCG 疫苗免疫後的小鼠，其保護效力顯著的優於傳統卡介苗，且其相較於傳統卡介苗更可以誘發出較佳的免疫反應，為我國未來極具潛力的候選替代性疫苗。

### 結論與展望

結核病是一個蔓延全世界且至今尚無法有效撲滅的重大傳染病，而根據菌株分型及流行病學報告得知，北京株未來恐成為比台灣結核病感染及流行的最主要菌株，而現行卡介苗的保護性效果，尚無法全面的預防結核病感染，因此一個具有優良保護效果的替代性疫苗，對結核病的防治是當前急迫需要的。一個新疫苗的產生極為耗時費資，除了要以動物實驗確定其具有良好的免疫能力，以期通過臨床前試驗外，還須審慎評估其用於人身上的安全性及是否有良好的保護效果。經過冗長的臨床試驗階段後，疫苗製造還必須以良好的製程來生產 (good manufacturing practices, GMP)，以確保疫苗的品質。隨著全世界科學家共同的努力及對結核分枝桿菌致病機制的了解，期待在不久的未來能產生出一個替代性的疫苗，並能有效控制結核病的感染與傳播。

### 參考文獻

1. Kaufmann, SH: Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *Lancet Infect Dis* 2011;11:633-40.

2. Gandhi NR, P Nunn, K Dheda, et al: Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* 2010;375:1830-43.
3. Harries AD, R Zachariah, EL Corbett, et al: The HIV-associated tuberculosis epidemic--when will we act? *Lancet* 2010;375:1906-19.
4. Fine PE: The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis* 1989;11:S353-9.
5. Horwitz MA, G Harth, BJ Dillon, et al: Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13853-8.
6. Hoft DF, A Blazevic, G Abate, et al: A new recombinant bacille Calmette-Guerin vaccine safely induces significantly enhanced tuberculosis-specific immunity in human volunteers. *J Infect Dis* 2008;198:1491-501.
7. Grode L, P Seiler, S Baumann, et al: Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest* 2005;115:2472-9.
8. Sonnenberg, MG, and JT Belisle: Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 1997;65:4515-24.
9. Orme IM, P Andersen, and WH Boom: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993;167:1481-97.
10. Lin CW, IJ Su, JR Chang, et al: Recombinant BCG coexpressing Ag85B, CFP10, and interleukin-12 induces multifunctional Th1 and memory T cells in mice. *APMIS* 2012;120:72-82.