

全球流感疫苗技術發展現況

胡勇誌 曾郁霽 陳柏伶 賴嘉俊

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

前 言

流感是由流感病毒 (influenza virus) 所引起的呼吸道疾病。每年冬季為疾病流行的高峰期，症狀包含疲倦、發燒、頭痛、肌肉痠痛與各種上呼吸道症狀，嚴重者會引起肺炎等併發症，甚至會造成病人死亡。

流感病毒屬於正黏液病毒科 (orthomyxoviridae)，分為 A、B、C 三種型別。A 型流感病毒可感染多種哺乳類與禽類。依照病毒表面的糖蛋白含紅血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 與神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 可分成不同的亞型。目前已發現 18 種 HA 蛋白與 11 種 NA 蛋白[1]，不同的 HA 蛋白與 NA 蛋白可組成不同亞型的 A 型流感病毒，例如：H1N1、N3N2、H5N1 與 H7N9；目前備受關注的禽流感病毒 (avian influenza virus) 便屬於 A 型流感病毒。B 型流感病毒主要感染人類，與 A 型流感病毒同為每年季節性流感的主要流行病毒。C 型流感病毒造成的

症狀輕微且不易引發大規模的流行。

流感病毒為 RNA 病毒，有八段負鏈 RNA 基因，RNA 病毒突變快速有利於病毒累積變異 (antigenic drift)，而分開的基因片段有利於病毒重組。流感病毒的流行可分為季節性流感 (seasonal) 與流感大流行 (pandemic)，季節性流感主要由 A 型流感 H1N1 與 H3N2，以及 B 型流感所引起。季節性流感每年大約造成三百至五百萬名重症病人，及二十五至五十萬死亡病例[2]；在經濟方面，根據模擬資料預測，季節性流感每年於美國造成約 870 億美金的損失，包含 104 億醫療費用以及 767 億產業損失[3]。疫苗接種可預防季節性流感，但因 RNA 病毒容易累積變異，使得季節性流感疫苗容易喪失保護力，目前世界衛生組織 (WHO) 每年均檢討一次疫苗株。

造成大規模流行的流感病毒株主要來自抗原移型 (antigenic shift)；當兩株以上的流感病毒感染同一宿主時，不同病毒株之間便有機會互相交

換部分基因，而成為新的流感病毒株[4]。新的病毒株可能通過基因交換得到在人群中傳播的能力，引入了免疫系統從未見過的新病原，因此有機會於人類社會中造成疾病的流行。二十世紀以來，有四次大規模的流感疫情爆發，分別是 1918 年西班牙流感、1957 年亞洲流感、1968 年香港流感，以及 2009 年新型流感。經病毒基因序列分析發現四次大流行的流感病毒株皆有重組的跡象，以 2009 年的新型流感為例，病毒便同時帶有人流感、禽流感與豬流感基因[5,6]。

近年來禽流感所造成的疫情越來越受到關注，禽流感可分為高病原株與低病原株，高病原禽流感病毒對家禽養殖業是一大威脅。2014 年初韓國爆發 H5N8 高病原禽流感疫情，有兩百多個禽類養殖場受到波及，撲殺約一千萬隻雞，造成嚴重的經濟損失[7]。禽流感也是公共衛生的潛在威脅，自 1997 年香港爆發 H5N1 禽流感以來人類感染 H5 禽流感的病例便不斷攀升，2013 年 H7N9 禽流感也在中國造成疾病的流行。雖然目前病毒在人類個體間傳播效率不佳，但禽流感病毒的高死亡率，以及流感病毒重組的可能性，使其成為各國的防疫重點。

為了有效防止流感傳播，疫情監測與疫苗開發是首要任務。以流感而言，因禽鳥亦為部份流感病毒的天然宿主，所以除了人類疫情的監控外，野鳥與禽類養殖場的監測也是重點之

一。

流感疫苗產業的發展

現今流感疫苗發展起源可以追溯於 1939 年，Burnet 發現流感病毒可以在受精胚蛋中 (egg-based) 進行大量繁殖之後，興起了關於流感病毒特性的廣泛研究及不活化疫苗的發展。在 1943 年美國核准了全球第一個不活化流感疫苗的使用。接著 1952 年，Salk 的研究證實流感疫苗的保護力，從此之後，開啟現今流感疫苗產業的蓬勃發展[8]。

目前世界上，除了不活化流感疫苗之外，有幾種主要的流感疫苗製備方式(表一)。科學家們為了提高疫苗的免疫力和保護力，也發展具有弱毒性的活性減毒疫苗，此項技術在 2003 年已在美國獲准上市。而不活化流感疫苗或是活性減毒疫苗大都是使用全病毒顆粒作為疫苗，但此類疫苗有機會產生較大的副作用。因此科學家們又發展出利用裂解病毒顆粒，去除脂肪套膜，保留所有結構蛋白與膜蛋白的裂解疫苗 (split-virus-vaccine)，來降低副作用的產生。除此之外，由於分子基因工程技術快速興起之後，科學家們也嘗試研究出成份更為簡單精純的疫苗，稱為次單位疫苗 (subunit vaccine) 或純化表面抗原疫苗 (purified surface antigen vaccine)，此類疫苗大多主要含紅血球凝集素與神經胺酸酶，但仍保有少

表一 流感疫苗發展情形

疫苗技術	優點	目前發展情形	代表公司
不活化流感疫苗 inactivated influenza vaccine	保持原始病毒的結構	已有產品上市使用 (Ex: Optaflu)	Novartis (諾華)
不活化流感裂解疫苗 (inactivated split-virus-vaccine)	副作用較全病毒顆粒疫苗少	已有產品上市使用 (Ex: Fluzone)	Sanofi Pasteur (賽諾菲)
鼻噴劑型活性減毒流感疫苗 live-attenuated, cold adapted influenza vaccines, LAIVs	具有較持久與較好的保護力	已有產品上市使用 (Ex: FluMist)	MedImmune
次單位疫苗或純化表面抗原疫苗	副作用更少	目前仍在開發及臨床研究階段	Novavax, Medicago
通用流感疫苗 universal influenza vaccine	具有較廣泛的保護性	目前仍在開發及臨床研究階段	Dynavax, Acambis

數病毒內部蛋白如核蛋白等等。藉由這種新興的疫苗技術達到更有效的保護力及降低副作用。

不活化流感疫苗

此類疫苗是將病原殺死（去活性），再接種到人體，使人體的免疫系統辨識，進一步產生免疫力。因疫苗本身已無活性，所以不會有致病力，然而產生的免疫反應也往往較不持久。目前市面上販售的不活化流感疫苗，大都具有三種病毒株的疫苗，稱為三價不活化流感疫苗 (trivalent vaccine)，主要包含三種類型的非活化流感疫苗病毒株：兩種 A 型 (H3N2、H1N1) 和一種 B 型。藉由流行病學家和流感專家評估分析後，預測下一流感季可能造成的流行病毒株，進而決定未來所使用的疫苗株。目前台灣所使用的流感疫苗主要

都是以此類疫苗為主，包括國光、諾華、賽諾菲等疫苗廠。但因各國流行病毒株不同，加上有 2 種 B 型流感的問題，所以才有共存，若預測錯誤，流感疫苗防疫效果將不如預期。疫苗病毒株之預測：台灣於 2003~2014 年 11 個流感流行季，其中有 3 個流感季以 B 型流感為主 (2004~2005, 2006~2007, 2011~2012)，惟僅 1 個流感季 (2011~2012 年) 流行株與疫苗株不吻合，因此三價流感疫苗對 B 型流感的保護效果仍有保護不完整的問題存在。另外，WHO 對流感疫苗組成之建議：WHO 對北半球 2015~2016 年流感疫苗之組成建議包括，三價疫苗株 (即 2 種 A 型 A/H1N1、A/H3N2 及 1 種 B 型)，以及四價疫苗株 (即另增加 1 種 B 型)。另目前全球流感疫苗使用量來看，仍以特別使用三價疫苗佔絕多數。此外，全球各國尚無以

四價疫苗取代三價疫苗之建議。

鼻噴劑型活性減毒流感疫苗

活性減毒冷適應流感疫苗 (live-attenuated, cold adapted influenza vaccines, LAIVs) 開始研發於 1960 年代，這類活性疫苗 2003 年在美國首次被核准使用，是一種鼻噴劑。這類疫苗是將對熱敏感及冷適應的流感病毒經過紅血球凝集素及神經胺酸酶基因重組所做成，目前在美國上市使用，由 MedImmune 公司進行生產，商品名為 FluMist。疫苗被稱為活性減毒流感疫苗[9]，是因為疫苗病毒只能適應在攝氏 25 度的鼻腔內進行有效地複製，比正常體溫低，所以不易造成對人體內部的呼吸器官造成感染。

利用基因及繁殖技術，讓原生的野生株經多次繼代培養 (repeated subpassage) 後減弱毒性，產生擁有病原特徵但對人體無致病力的病原株，之後再接種到人體，刺激免疫系統產生免疫力。透過這樣方式的好處是接近自然感染過程所產生的免疫力，通常能維持比較久的時間。然而可能的風險是病原本身是活的，在少數情況下仍可能突變而產生致病力，以及接種在免疫功能低下的宿主時，仍有致病的風險。

重組疫苗或純化表面抗原疫苗

隨著分子生物學的技术發展，科學家們針對病毒的基因體和蛋白質

結構進行分析，發展出使用類流感病毒顆粒 (influenza virus-like particle, VLP) 製備疫苗的技術。VLP 是非雞蛋、非哺乳類細胞培養的疫苗，此種疫苗以表現出三種流感病毒結構蛋白 (紅血球凝集素、神經胺酸酶及基質 M1 蛋白) 的桿狀病毒 (baculovirus) 系統來生產疫苗。目前 Novavax 及 Medicigo 公司均有發展此類型的流感疫苗並已進入臨床的試驗階段。其他如 DNA 疫苗、活性基因重組疫苗等仍在初期臨床發展階段，其有效性和安全性目前未知[11]。

通用流感疫苗

科學家們希望能夠研發出一種可以預防所有流感病毒株的通用流感疫苗 (universal influenza vaccine)，不需要因為每年流行的病毒株不同而改變其疫苗的成份。主要目標是針對 A 及 B 型流感，以應付全球隨時可能爆發的大流行。目前有 Dynavax 公司研發的疫苗，主要是包含兩種所有流感病毒株均存在的抗原，核蛋白 (nucleoprotein, NP) 及基質蛋白的細胞外主成份 (matrix 2 protein, M2e)。利用 NP 產生細胞毒殺性 T 細胞免疫反應，M2e 則提供對抗不同病毒株的保護抗體[12]，2010 年開始第一期臨床實驗。另外，2008 年 1 月 Acambis 公司也宣布成功完成通用流感疫苗 (ACAM-Flu-ATM) 的第一期臨床試驗，此疫苗乃利用流感病毒外殼的 M2 蛋白來提供保護力，藉由此類蛋

白質的低變異性，來對抗所有人類流感的 A 型病毒株[13]。

流感大流行疫苗生產應對方式

以雞胚蛋生產流感疫苗的技術

為了製造每年的季節性流感疫苗，目前各疫苗大廠使用的主要疫苗製造方法為使用雞胚蛋進行生產。生產流程包含：一、分析接下來可能造成流行的流感病毒株；二、利用基因重組和馴化等技術製造出包含所預測病毒株蛋白並且能夠在雞胚蛋上順利繁殖的生產用病毒疫苗株；三、在疫苗工廠中進行生產、去活化、品質檢測等步驟，來得到疫苗樣品；四、申請 FDA 有關疫苗產品包裝及販賣的許可；五、將疫苗產品包裝為單一劑型針劑或是多劑型瓶裝後上市販賣。此一製造技術已有五、六十年的製造經驗，被視為相當穩定且有經濟效應的製造方式，目前每年的季節性流感疫苗的製造，大多為此流程，整體所需的時間至少為二十週。但是這個雞胚蛋製造的疫苗仍有它的缺點，例如對雞蛋嚴重過敏的人不可以施打及需要有穩定且大量符合規格的雞胚蛋供給。

季節性流感疫苗的生產流程已相當穩定，對於防疫效果也有目共睹。但由於流感疫情的產生，整個流感疫苗製造面對了巨大的挑戰。以 2009 爆發的 H1N1 流感病毒疫情為例，該病毒首先於三月時在墨西哥被偵測出

來，原本美國預期在八月可能產生的第二波感染高峰時，能夠有疫苗可供應，但實際上，大約十月初才開始有能夠施打的疫苗，並且得到隔年一月才生產足夠供應 40% 美國人施打的一億二千四百萬劑疫苗，此時距離十月病毒感染的高峰，已落後三個月。面對可能爆發的疫情，這樣的時程緩不濟急，因此美國提出一系列計畫來縮短疫苗產出的時間。

縮短疫苗生產時程的方法

美國總統科學與科技諮詢委員會 (council of advisors on science and technology) 在 2010 年所提出的白皮書中[14]，對於在時限內生產出足夠疫苗以供大流行施打，提出了幾項建言：第一、繼續使用雞胚蛋進行去活化或是減毒兩種流感疫苗的生產。第二、除了兩種疫苗的生產流程方式之外，增加細胞培養生產流感疫苗的產能。第三、增加減活病毒疫苗的生產比例。由於活病毒疫苗可以以少量病毒得到相同的免疫反應，單一劑量的病毒含量可以為去活化病毒疫苗的十分之一，因此生產減活病毒疫苗的產量可以是去活化病毒疫苗的十倍。但是目前對於它的免疫機制還需要進一步的研究，並且對於在嬰兒和免疫力較低下成人的使用，還需要進一步研究。第四、使用重組 DNA 技術所製造的病毒蛋白疫苗來取代現有的去活化的病毒疫苗或活病毒疫苗。第五、

使用佐劑來提升疫苗的免疫效果，研究顯示，當使用佐劑後，可以以較少量病毒抗原達到相同免疫效果，疫苗生產的劑量可以因此增加二到四倍。第六、進行開發通用疫苗，使相同疫苗能夠對不同流感病毒株有免疫效果。採用這些改變，可以將流感疫苗製造時程，縮短兩到十周的時間，可以大幅增加對於緊急疫情的應變能力。

細胞培養技術進行疫苗生產

當使用細胞生產流感病毒時，由於細胞株平時保存在液態氮中，當需要使用時，可以在數週時間內，放大到所需的量，因此可以縮短疫苗製造時程，並且可以有更穩定的製造。如果使用胚胎蛋生產時，增加製造規模表示亦需增加新鮮雞胚蛋的供應，供應量通常較為限制，通常需要四到六個月的準備時間才能得到足夠雞胚胎蛋以應付緊急生產。因此，使用細胞生產技術生產流感疫苗的方式較有效率，因為不須考慮到生產符合規格的無菌雞胚蛋。

細胞生產流感疫苗生產製程包含幾個步驟：第一、挑選適合的細胞株，此細胞株需合乎安全標準，並且能夠產出有高效價的病毒，目前使用最多的是哺乳類動物的上皮細胞，代表者有猴腎細胞 (Vero cell) 和狗腎細胞 (MDCK cell)。但當細胞株選定並且經過驗證後，此細胞株即可使用在疫苗生產上。第二、挑選或製

造能在細胞上有高效價產出的疫苗病毒株，並且此病毒株的抗原性須和傳播中的流感病毒相符。通常使用的基因重組方法，是將野生病毒株負責抗原性表現的 HA 和 NA 病毒蛋白基因與能在細胞上高效價表現的疫苗病毒株之其他病毒蛋白基因進行組合，並在細胞中產生疫苗病毒株。當使用雞胚蛋生產流感疫苗時，也需要疫苗病毒株的製造，但這個部分是以前以細胞培養方式製造流感疫苗所面臨的瓶頸，因為大部分從 WHO 取得疫苗株都是透過雞胚但馴化過的，無法直接在細胞培養出高產能的病毒，需要一段時間的馴化才能使用。這幾年因應對 H5N1、H1N1 和 H7N9 的防疫生產時，發現這個步驟可能是很大的關卡。第三、放大細胞培養到大型生物反應器中，使用符合規範的細胞培養液進行培養，並且進行病毒產出。第四、將產出的病毒液進行純化，得到疫苗成品。

由於美國的疫苗白皮書建言，各大疫苗廠當時都積極發展細胞生產流感疫苗的技術，且有具體成果，目前已有數家疫苗廠商擁有細胞生產的流感疫苗產品，其中包含季節性流感疫苗和流感大流行疫苗 (H5N1、H1N1) 都有，但是細胞生產流感疫苗，主要的議題在於資金問題，在疫苗產業上，設備及研發成本相對於販賣所得的利潤，比例是相當高的。當希望疫苗產量達到能夠應付緊急疫情的要求時，則需要建造大型疫苗工廠，

所需的資金相當龐大，另外，維持專業技術的製造團隊所需的人力、基本原物料的需求、還有由於製造流程改變所需的研發需求等，這些資金對於疫苗公司是難以支付的。諾華公司 (Novartis AG) 原本是世界最大的流感疫苗供應公司，它花費了十億美元，在美國北卡羅萊納州 Holly Springs 興建了具有六個月可製造出一億五千萬劑以細胞來源的流感疫苗廠，美國衛生與公共服務部 (Department of Health and Human Services) 也資助了四億八千七百萬美元，它的細胞培養技術生產季節性流感疫苗商品 (Flucelvax) 已在 2012 年 11 月得到美國 FDA 核准，工廠也在 2014 年 7 月取得執照可以進行疫苗生產[18]。但諾華公司在 2014 年 4 月宣布將流感疫苗外的疫苗業務移轉給 GSK 公司，以交換 GSK 的腫瘤治療商品，並且在 2014 年 10 月宣布將流感疫苗業務包括 Holly Springs 的工廠以 2.75 億美元的價格賣給澳洲的 CSL 公司，以便將公司業務專注在獲利更高的製藥和腫瘤治療業務上[16]。Baxter 公司也在 2014 年 12 月將它的猴腎細胞相關技術，包括產品和製造工廠，賣給 Nanotherapeutics 公司，其中包含 H5N1、H1N1 和季節流感商品[17]。

重組疫苗與通用流感疫苗

重組疫苗是使用基因重組技術，在細菌、酵母菌、昆蟲細胞、植物細

胞或哺乳類動物細胞中，使某段病毒基因序列表現出病毒蛋白並製成疫苗。使用重組疫苗最大的優勢在於製程縮短，因為相較於使用雞蛋或細胞製造流感病毒時，必需製造能在雞蛋或細胞上具有高效價產出的病毒疫苗株以供生產，重組疫苗只需使用分子生物技術，由病毒株上取得病毒蛋白的 DNA 序列，則可以進行疫苗的製造，如此將可縮短疫苗的製造時間。另一優勢，則是此類疫苗已在市場上販售多年，例如人類乳突狀病毒 (human papillomavirus, HPV) 疫苗和 B 型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 疫苗，已是具有相當高產能的製造平台，使用這個平台技術，可以在時間限制上，取得足夠量的疫苗劑量。同時這個製造平台在不需製造流感疫苗時，還可使用於其他疫苗的製造，增加廠區的利用性。此類技術的優勢，還有不同批次間產品的差異性較少，並且生產的成本較低。「流感重組疫苗」剛剛在美國上市，費用為用雞胚疫苗售價的三倍左右，市場的接受度值得後續觀察。另一個令人興奮的技術為「通用流感疫苗」，目前也已進入臨床試驗階段，此技術可以一舉改變現有的流感疫苗製造方式，對於未來可能發生的流感大流行等，有較大的信心可以面對。

結語

每年流感於全球造成不少的生命

與經濟的損失，而接種疫苗是預防流感最直接、最有效、最經濟的方法。目前季節性流感疫苗的生產，雖然還是以雞胚胎培養平台為主，但已有數家疫苗廠投入細胞生產平台，且已有上市產品推出。並且為了能加快疫苗提供速度以應付突發的疫情，也有發展各種新興疫苗生產平台，而部分技術也已進入臨床測試，可望在數年以後發展成熟。台灣位於候鳥遷徙路徑，且鄰近國家禽流感盛行，因此疫苗的生產技術的整備更是流感防疫重要的一環。目前台灣已有季節性流感疫苗的生產與供應廠商，且國衛院亦有投入疫苗株製備與細胞生產平台的開發，希望對流感大流行疫情的整備有更進一步的幫助。

參考文獻

1. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al: Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol* 2014;22:183-91.
2. WHO (March 2014). Influenza (Seasonal). Available <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
3. Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, et al: The annual impact of seasonal influenza in the US: Measuring disease burden and costs. *Vaccine* 2007;25:5086-96.
4. Webster RG, Sharp GB, Claas EC: Interspecies Transmission of Influenza Viruses. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:25-30.
5. Worobey M, Han GZ, Rambaut A: A synchronized global sweep of the internal genes of modern avian influenza virus. *Nature* 2014;508:254-7.
6. MacKenzie, Debora. Deadly new flu virus in US and Mexico may go pandemic. *New Scientist*. 2009-04-26. Available <http://www.newscientist.com/article/dn17025-deadly-new-flu-virus-in-us-and-mexico-may-go-pandemic.html>. Retrieved 2009-11-08.
7. 王金和：他山之石可以攻錯：國外發生新型 H5 禽流感之情形。(2015.03.19) Available <http://www.vm.ntu.edu.tw/DVM/news/H5N8.pdf>
8. 行政院衛生署疾病管制局，臺灣兒科醫學會，臺灣感染症醫學會：認識流感疫苗—教學手冊(第一版)。臺北：行政院衛生署疾病管制局。2011。
9. Burnet FM: Influenza virus on the developing egg. I. Changes associated with the development of an egg-passage strain of virus. *Br J Exp Pathol*. 1936;7:282-93.
10. Salk JE: Principles of Immunization as Applied to Poliomyelitis and Influenza. *Am J Public Health Nations Health* 1953;43:1384-98.
11. Treanor JJ, Kotloff K, Betts RF, et al: Evaluation of trivalent, live, cold-adapted (CAIV-T) and inactivated (TIV) influenza vaccines in prevention of virus infection and illness following challenge of adults with wild-type influenza A (H1N1), A (H3N2), and B viruses. *Vaccine* 1999;10:899-906.
12. Haynes JR. Influenza virus-like particle vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:435-45.
13. World Health Organization. Acute Respiratory Infections: Influenza. 2009. (2010)
14. Report to the president on reengineering the influenza vaccine production enterprise to meet the challenges of pandemic influenza. Executive office of the president. President's council of advisors on science and technology. 2010 August.
15. Novartis Holly Springs facility becomes first US pandemic-ready site licensed by the FDA to produce cell-culture influenza vaccines. Novartis media releases. 2014 June.
16. Novartis announces divestiture of influenza vaccines business to CSL for USD 275 million. Novartis media releases. 2014 October.
17. Baxter to Divest Vero Cell Vaccines Platform to Nanotherapeutics. Baxter press releases. 2014 December.