

結核疫苗發展趨勢

王梨容 1 李欣純 2 柯文謙 2

成功大學醫學院附設醫院 1 感染控制委員會 2 內科部感染科

前 言

肺結核是目前全世界面臨最重要，且對生命具威脅性的細菌性疾病；根據世界衛生組織的調查，目前全球大約有 17 億的人口受感染，每年約三百萬人口死亡，以及大約將近八百萬的新個案出現[1]。AIDS 的病人因為 CD4+T 細胞數目在循環中的減少增加了結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染的敏感性，即使給予抗病毒治療可降低病人體內病毒含量及回復其免疫競爭性，但仍受高費用與治療複雜性的限制，更造成此感染症在非洲、東南亞及拉丁美洲的散播；加上移民、旅遊、以及結核分枝桿菌多重抗藥性菌株(Multiple drug resistant *M. tuberculosis*; MDR-TB)的出現，均對目前世界各國的結核病控制政策造成威脅。為控制結核病人的增加，ACET(Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis)與 CDC(Centers for Disease Control and Prevention)於 1989 年訂出到 2010 年每百萬人口只有 1 人以下感染的"美國肺結核清除政策計劃"；ACET 在 1996 年也認為必須要有有效疫苗的發展才能將結核病從美國清除[2]。至於在有 HIV 與 MDR-TB 流行的西歐及非洲國家，以及藥物與經費來源受限之高盛行率國家，控制結核病散佈最有效而長期的策略亦為有效疫苗的發展[3]。因此，有效結核疫苗的發展為達到結核病防治目標的重要政策。

結核疫苗之發展

結核分枝桿菌為高度複雜之細胞內寄生物，能有效的阻斷或中和宿主正常的細胞性防禦機轉。根據結核病流行病學調查，結核分枝桿菌感染者約只有 10%會出現症狀，因此推測大多數人均有天然的保護性免疫反應。所以結核疫苗免疫的目標主要為：一、加強大多數人對結核桿菌的天然免疫反應，使感染但不致病的百分比提高；二、藉由疫苗的作用使宿主產生的保護程度更高而且更持續，同時不會造成組織傷害或副作用的產生[4]。一般而言，疫苗的發展乃探討抗原對宿主的選擇性及表現性，藉著選擇結核桿菌基因中可產生保護性細胞激素的基因，而對高危險群之特殊族群產生保護作用。因此，理想結核疫苗的特性必須包括：安全、具保護宿主對抗疾病與感染的能力、不須注射給予、能產生長時間的免疫反應、價格便宜、對熱穩定且半衰期長、不會干擾結核菌素皮膚試驗之診斷及其它疫苗的保護作用等。

BCG (Bacille Calmette-Gu'erin)疫苗的發現

1908 年，Calmette and Gu'erin 二位法國科學家將由結核性乳腺炎之母牛分離出的 *Mycobacterium bovis* 菌株每隔 3 週次培養在 glycerinated beef bile-potato medium，總共在 230 次的次培養之後，發現此菌對實驗動物失去毒性。而利用結核桿菌毒性菌株在長期次培養後會慢慢減毒而對實驗動物失去毒性，並保護宿主免於受隨後高毒力結核桿菌侵襲的減毒菌株而發展的疫苗，即為現今所熟知之 BCG 疫苗。在 1921

年，針對由結核病母親所生的小孩以及屬於結核性腦膜炎高危險群的小孩進行 BCG 疫苗注射後，發現他們並不會發展出活動性肺結核，因此證明此疫苗可提供年幼的小孩足夠的保護性免疫來對抗此高感染性的病原菌[5]；隨後的實驗也顯示 BCG 疫苗能阻斷結核菌的血行散播而防止高致死率結核性腦膜炎的出現[6]。自 1935 年至今國際間約有 17 個人體實驗報告，結果顯示其對人體的有效性約可達 75%-84%[7]。雖然目前有許多利用結核分枝桿菌分子生物技術的研究來促進 BCG 疫苗的效用[8]，但至今仍然以 BCG 疫苗為人類有效的活性疫苗。

BCG 疫苗的優點包括安全性、容易以皮內注射給予且價格便宜，缺點除了會產生淋巴腺炎及骨髓炎之副作用外，也會使免疫功能低下的病人產生擴散性感染。但由於其效力大約在注射後十年便會消失，對成人肺結核的預防效果不大，加上它具有可能干擾皮膚測試的篩檢反應的缺點，因此在結核病發生率低的國家並不建議廣泛進行 BCG 疫苗免疫。雖然如此，BCG 疫苗仍是暴露於結核病感染之高危險群，如監獄、醫院工作者，以及以結核病為主要公共衛生問題之非洲、亞洲及中美洲等國家控制結核病的主要方法。

目前發展中的疫苗

結核病新疫苗發展的類別包括：純化或合成之結核分枝桿菌蛋白質月太或非月太抗原、BCG 及結核分枝桿菌之部分減毒突變型、依結核分枝桿菌基因型而發展的 DNA 疫苗、將分枝桿菌基因嵌入活的疫苗帶原菌株(如減毒的沙門氏菌，牛痘病毒等)或自然減毒的結核桿菌(如 *M. vaccae*, *M. microti*)。由於疫苗在得以進行人體試驗之前均須先完成動物模式實驗以評估疫苗的安全性及有效性[9]，但至今仍沒有一細胞激素對實驗動物或人類族群有一致的保護性免疫能力，因此仍待持續研究以期能有所進展。目前至少有 4 類抗結核疫苗正在測試其對實驗動物的安全性、免疫性，及保護性(表一)。

一、活性減毒疫苗(live attenuated vaccine)

活性減毒疫苗的原理，即利用帶原者在潛伏感染期間會釋出維持記憶性免疫的致敏原(sensitins)，以對抗相同菌株的重複感染。實驗顯示，當老鼠先給予低於致死劑量之結核分枝桿菌毒性菌株 H37Rv 時，會產生持續性感染來保護老鼠對抗隨後致死劑量之毒性 Erdman 菌株對肺部之直接刺激。然而以無毒性的變異種(H37Ra)接種於老鼠時，H37Ra 菌株會被宿主組織快速清除，因此幾乎無法對毒性 Erdman 菌株之再次刺激提供保護性之抗性。對照組方面，接種活性 BCG 疫苗的老鼠，則是在肺中產生自癒性的系統性感染並誘導出強烈的免疫反應來保護宿主。

目前發展中的活性減毒疫苗，主要可分為基因重組型與營養缺陷型兩種，基因重組型疫苗又可分為(1)以基因方法修正並表現結核分枝桿菌保護性抗原或細胞激素的 BCG 疫苗，也就是藉 BCG 來有效傳送外來抗原與細胞激素，而在感染部位誘導 T 細胞的增生作用及保護性免疫反應；此種方式亦可利用結核分枝桿菌保護性抗原表現在活性減毒媒介物(如牛痘或 avipox virus)或基因工程細菌(如沙門氏菌及李斯特菌)上而顯現；(2)以結核分枝桿菌基因突變之無致病性菌株(通常是無毒性的快速生長性結核分枝桿菌，如 *M. smegmatis*, *M. vaccae*, 與 *M. microti*)作為疫苗或疫苗載體(vectors)，其特性為利用此類菌株在哺乳動物宿主無法長久生存，且在死亡前可使宿主對常見之結核分枝桿菌保護性抗原 Ag85 產生致敏作用之原理以達到保護性免疫的結果，不過此類疫苗在動物實驗顯示若以死菌接種並無保護效力，以活菌注射則反而會使實驗動物之結核病更惡化，因此並不適用[10]。

另一類的活性減毒疫苗為營養缺陷型(Auxotrophs)疫苗。營養缺陷型為需要營養性生長因子才能生長的細菌性突變物。早期有 Jacobs 等人利用以轉位子插入(transposoninsertion)為的技術得到出二種針對 leucine 及一種針對 methionine 的營養缺陷型疫苗[11]。以結核分枝桿菌 H37Rv(mc2 3026)的 lysine auxotroph(H37RvLy-)為例，在 lysine 缺乏的情況下，即使給予高劑量的疫苗注射仍無法在宿主體內生長或產生持續性的保護性。但是在加入 lysine 後，以單一劑量的 H37RvLy-疫苗接種老鼠後對結核分枝桿菌 Erdman 菌株的再刺激仍幾乎無抗性產生，但若予以重複接種，則可達到類似 BCG 疫苗控制組之保護程度。近來藉著使用轉位子突變作用(transposon mutagenesis)或對偶基因交換作用(allelic exchange)來破壞特殊的合成基因使結核分枝桿菌減毒所產生的營養缺陷型疫苗，目前則正在接受老鼠及天竺鼠的免疫能力測定。由於結核桿菌的營養缺陷型疫苗能使病人產生免疫作用，同時菌體本身會快速死亡不會造成疾病，因此它對高危險性免疫功能低下的病人而言是一種適當的疫苗。且由於此疫苗對嚴重免疫功能缺陷的老鼠沒有致死性，因此對 AIDS 病人可能也具安全性。整體而言，活性減毒疫苗的優點為：能引發長時間持續的記憶性免疫反應、能引發黏膜表面的免疫反應，且價格便宜。缺點是對免疫能力缺陷的病人仍有引發感染的危險性，因此還是有使用上的限制。

二、次單位疫苗(subunit vaccine)

大部份的次單位疫苗是由蛋白質或脂質組成，亦可能包括脂質與碳水化合物抗原。由於此類疫苗大多需要使用免疫輔助劑(immunological adjuvants)來促進免疫反應能力的誘導，但現今最有效的免疫輔助劑 Freund's complete adjuvant 卻對人體有毒性，因此目前已有改良性免疫輔助劑的發展及測試。曾經報告指出以 *M. tuberculosis* 培養過濾蛋白質 65kDa hsp (heat shock protein), Ag85A, Ag85B, MPT64 及 ESAT-6 吸附於硝酸纖維粒子上再與適當的免疫輔助劑注入老鼠時，可誘導強烈的細胞性反應使具毒性的結核桿菌在肺及脾臟的生長降低，然而由這些蛋白質誘導出的抗菌程度，卻仍然無法與 BCG 疫苗控制組的相同[12]。

次單位疫苗的優點為它們是由已知分子成份組成，較少引起有害反應，且容易再生製造；缺點則為此種疫苗成分純化過程花費昂貴且其免疫期也較短，因此有可能需要再一次的注射以提高其免疫效果。

三、免疫治療性疫苗

曾有報告指出死的 *M. vaccae* 可促進某些成人對於抗藥性結核桿菌感染的治療反應。但在以南非感染肺結核之礦工所從事之對照實驗中卻發現此類疫苗對這些病人的治療效果不佳，使得此類疫苗的免疫效果受到質疑而無法確認此論點是否正確。

四、DNA 疫苗(DNA vaccines)

DNA 疫苗是由含 DNA 遺傳訊息的保護性抗原組成，可以藉由大腸桿菌來產生及純化。其作用原理是以特定之毒性基因與保護性基因接合於質體(plasmid)內，將這些基因注入質體 pJW4303 並與組織漿細胞原活化劑(tissue plasminogen activator; TPA)訊號序列結合後，再打入免疫宿主肌肉，使宿主細胞能因為此保護性蛋白質抗原刺激了新的免疫反應路徑，而出現較高的抗體反應[13]。目前大部份接受測試的基因均與 *M. tuberculosis* 培養過濾蛋白質 65kDa hsp, Ag85A & B, ESAT-6, KatG)有關。曾有

研究以 100 μg 的 DNA 疫苗(實驗組)及 106 活性 BCG 疫苗(控制組)以每次間隔三週的方式分別注射老鼠，總共在三次注射後，再使老鼠暴露於少量的毒性 *M.tuberculosis* Erdman cells；4 週後再分別測試實驗組及控制組老鼠肺部及脾臟中之結核桿菌數目。結果發現，大部份接受測試的 DNA 疫苗在脾臟中誘導出的 $\text{INF } \gamma$ 為肺部中誘導之 $\text{INF } \gamma$ 的 2-10 倍，然而產生的保護性反應卻比活性 BCG 疫苗的低。因此研究者又嘗試以不同的免疫方式來增進 DNA 疫苗的有效性，他們分別以 10 μg ，50 μg 以及 200 μg 的 DNA 混劑(combo, 5DNA-combination)注射於實驗老鼠後，發現以 200 μg 的 DNA 混劑注射的老鼠其肺研磨物中所測得之 $\text{INF } \gamma$ 及 IL-4 的量，相當於實驗老鼠受 *M. tuberculosis* 培養過濾蛋白質刺激所測得的量，而且這些老鼠對隨後毒性菌株刺激所產生的保護程度亦可達到注射 BCG 疫苗控制組的程度；相反的以 10 μg 或 50 μg 的 DNA 混劑免疫注射的老鼠則無法達到此保護程度[14]。不過到目前為止只有含結核分枝桿菌蛋白質 Ag85 或 hsp 60 二種分子之 DNA 疫苗有完整的動物模式試驗報告，並有令人滿意的實驗結果。

雖然 DNA 疫苗對人類長期的效用及安全性尚未確立，但其使用簡單、少量花費即可獲得大量抗原，及能對實驗老鼠產生良好保護性的優點，使 DNA 疫苗能對肺結核高危險群之免疫低下嬰幼兒提供比 BCG 疫苗更安全的製劑。

結核疫苗測試之實驗方法

雖然動物模式與人類結核病之間的有效性及關聯性至今仍不清楚，但是如果沒有動物模式之安全性及免疫基因性的資料，任何一種疫苗均無法讓人安心使用。因此動物模式仍是目前篩檢所有新發展疫苗之有效性最合適的方法，但如何選擇最被認可的疫苗來進行臨床試驗仍是一個複雜的問題。

由於動物實驗測試的結果會受實驗計畫中細節的改變所影響，因此在發表的抗結核疫苗動物實驗中，許多爭論點均是圍繞在不同的測試方法與人類自然獲得疾病以及其保護性免疫能力之間的關聯性。目前認為篩檢新疫苗最好的動物實驗方法為 DonSmith[15]等人所發展，其作法是在 Middlebrook chamber 中以類似人類感染途徑的通氣性接種法(aerosol inoculum)來免疫老鼠或天竺鼠，其途徑、劑量、疫苗接種數目、及接種到反應的間隔時間，則因測試疫苗之不同而異。控制組通常包括 BCG 疫苗接種之動物(此仍然為標準對照組)，以及只接種生理食鹽水或空白質體(empty plasmid)的動物組。

在疫苗注射三個月後，將實驗動物、注射生理食鹽水之動物與其他的控制組以通氣暴露(aerosol challenge)於低劑量的結核分枝桿菌毒性菌株。即以 50-100 CFU 的結核分枝桿菌 Erdman strain (或 H37Rv strain)在 Middlebrook chamber 中直接打入實驗老鼠的肺中(天竺鼠則用 5-10 CFU)，抗性的獲得程度則在四到六週(約 30 天)後將肺及脾臟磨碎接種於 Middlebrook 7H11 agar 上來測定細菌量。在接種者與控制組之間生長數目四倍或四倍以上的降低，則認為有統計學上的意義。每一測試組中會存留少部分的老鼠 12 個月來評估不同疫苗組之間存活率的長短。

結核疫苗發展之相關規範

要成功的發展出新的結核疫苗，在臨床試驗開始前必須注意到一些必要條件，包括疫苗型態、測試族群之年齡與疾病狀態，以及治療或結果選擇之合理性。除了評估新疫苗的免疫活性及有效性外，最重要的還是其安全性。而動物實驗中之前臨床試驗亦必須小心的評估其免疫能力的相互關係，以便用於預估人類測試族群對疫苗的保護性反應。

前臨床試驗一旦完成，則必須藉疫苗製造商以 GMP(good manufacturing practices)來產生足夠的疫苗，使疫苗的提供流暢。在生產任何疫苗之前，必須先製備疫苗的 master seed，並保存於超低溫狀態；同時製備操作菌株(working seed)來生產疫苗。詳細的產品與品質報告以及穩定性測試的結果，必須匯送到具有公信力之衛生機構，作為開始人體試驗前之再調查及評估。對大多數的研究而言，人體試驗必需包含 BCG 疫苗注射組，以便於比較 BCG 疫苗注射組與測試疫苗注射組之間反應的差異。

結 論

動物實驗雖然能提供疫苗的安全性、免疫活性及有效性，但卻沒有任何的單一動物模式能複製出人類的免疫反應，尤其是長效型的免疫保護反應；因此選擇一個新的且更具保護性的疫苗將是延續數十年長而耗費的過程。所以最重要的是全世界不論是開發中國家或工業化國家所有參與之政府、科學家、疫苗製造商及醫療工作人員的共同合作，才能達到控制結核病的最終目標。

表一 目前發展中的結核桿菌疫苗

1. 活性減毒疫苗

基因重組型

a. 快速生長菌型

含結核分枝桿菌基因的 r*Mycobacterium smegmatis* (或 *M. vaccae*, *M. microti*)

b. BCG 型

含結核分枝桿菌基因的 rBCG

含細胞激素基因的 rBCG

營養缺陷型 (auxotrophs)

a. BCG 營養缺陷型 (Leu⁻, Lys⁻)

b. H37Rv 營養缺陷型 (Leu⁻, Lys⁻, Pur⁻)

c. 基因突變型 (genetic mutants)

2. 次單位疫苗 (subunit vaccine)

結核分枝桿菌或 BCG 培養過濾蛋白質 Ag85B, 45kDa, ESAT-6

合成胜肽

免疫輔佐劑

3. 免疫治療性疫苗

加熱殺死的 *M. vaccae*

4. DNA 疫苗 (DNA vaccines)

含結核桿菌蛋白質的 DNA 疫苗

— 65kDa hsp, Ag85A & B, ESAT-6, MPT-64, KatG

DNA 混劑 (雞尾酒)

(參考自參考文獻 [14])

參考文獻

1. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A: Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ* 1994; 72: 213-20.
2. Center for Disease Control and Prevention. Development of new vaccines for tuberculosis: recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET). 1998; 47(RR-13): 1-6.
3. Jacobs WR: Advances in mycobacterial genetics: new promises for old diseases. *Immunobiology* 1992; 184: 147-56.
4. Ginsberg AM: A proposed national strategy for tuberculosis vaccine development. *Clin Infect Dis* 2000; 30(suppl): S233-42.
5. Fine PE: The BCG story: lessons from past and implications for the future. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (suppl): S353-9.
6. Wiegshaus E, Balasubramanian V, Smith DW: Immunity to tuberculosis from the perspective of pathogenesis. *Infect Immun* 1989; 57:3671-6.
7. Rodeigues L, Smith PG: Tuberculosis in developing countries and methods for its control. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 739.
8. Orme IM, Belisle JT: Vaccine development: after the flood. *Trends Microbiol* 1999; 7: 394-95.
9. McMurray DN, Collins FM, Pannenberg AM, et al: Pathogenesis of experimental tuberculosis in animal models. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 215: 157-80.
10. Orme IM: New vaccines against tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13:169-82.
11. McAdam RA, Weisbrod TR, Martin J, et al: In vivo growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon mutagenesis. *Infect Immun* 1995; 63: 1004-12.
12. Andersen P: Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* 1994; 62: 2536-44.
13. Li Z, Howard A, Kelley C, et al: Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to TPA-signal sequences. *Infect Immun* 1994; 67: 4780-6.
14. Collins FM: New generation tuberculosis vaccines. *Clin Microbiol Newsletter* 2001; 23: 17-23.

15. Wiegand EH, Smith DW: Experimental models for study of immunity to tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci* 1968; 154: 194-9.