

新型流感新知與國際訊息

~ 反轉基因法之改良及中國大陸首度報告人類病例

(資料期間: 11/01~11/30)

作者: 劉定萍

衛生署疾病管制局第一組

中國大陸首度報告人類病例

在連續傳出十餘處爆發家禽新疫情,以及多名病患發生疑似禽流感症狀後,中國衛生部 11 月 16 日於新華社網站宣布確認 2 名人類禽流感病例及 1 名疑似病例,後者隨後亦經實驗室確認。

中國十一月份陸續有湖北、安徽、山西、新疆、雲南、西藏等省份傳出家禽疫情,加上先前的遼寧、湖南及內蒙古,疫情十分嚴重,所以世界各國對於中國遲未報告任何人類病例抱持相當疑慮,各種未經證實傳言不斷(請參考下一則報導)。加上稍早一名湖南 12 歲女童因肺炎及呼吸窘迫症候群死亡,症狀與禽流感極為相似,惟中國官方一再否認,並表示確定檢驗陰性;經世界衛生組織介入調查,發現該名個案採取之檢體不符標準,欲再行採檢卻發現遺體已遭火化,故無法確認是否為禽流感病例。

中國官方首批報告的病例,1 例為來自湖南之 9 歲男童,即為上述女童之弟弟,另 2 例均為來自安徽之女性雞農,分別為 24 及 35 歲,不幸均已死亡。

12 月 7 日及 8 日中國又分別報告一名新病例,包括廣西一名 10 歲女童,目前肺炎住院中;以及遼寧一名 31 歲女性。累計中國共報告 5 名病例,其中 2 人死亡。全球自 2003 年底東南亞發生 H5N1 疫情以來,截至 12 月 12 日共有 137 名病例,70 人死亡。

世衛專家澄清媒體報導其批評中國隱瞞疫情並非事實

根據德國媒體報導，流感專家田代真人（Masato Tashiro）博士在馬堡大學（the University of Marburg）的演講中指出，中國大陸至少已有 300 人死於禽流感，3000 人在檢疫當中，但該國仍在隱瞞疫情。該篇報導立即被 ProMed 所引述（Avian influenza, human - East Asia (180): China, RFI [20051123.3399](#)）。

田代博士為日本國立感染症研究所病毒第三部部長，亦為世衛組織日本流感參考實驗室的主任，多次奉世衛組織要求到各疫區去協助調查，故本篇報導立即引起各界高度重視，本局也立即去函向博士求證。田代博士隨後在 ProMed 發表聲明澄清（Avian influenza, human - East Asia (182): China [20051124.3405](#)），同時亦於科學期刊的訪談中再次說明（*Science*, 2 Dec 2005, 310:1409）。

田代博士表示，他並未接受任何德國媒體的採訪，雖然的確有消息來源顯示中國大陸有 200 多名禽流感人類死亡病例，但事後均未獲得證實。世衛組織所採計的病例報告必須經由實驗室檢驗確認，而這些傳言均沒有此類科學證據佐證。他並不認為在 SARS 疫情之後，中國大陸會有隱瞞疫情的行為，但在包括中國在內的許多東南亞國家，由於缺乏健全的疾病監測系統，所以普遍有病例低報的情形，國際社會應予以協助。

其實目前在網際網路上也有許多有關中國大陸疫情的傳言，甚至還有依省份統計病例數的報表。在未獲得進一步證實之前，仍不宜輕信及引用。

中國政府宣布將為全國 140 億雞隻施打禽流感疫苗

非常巧合地，在 11 月 16 日第一次宣布確認禽流感人類病例的前一天，中國農業部宣布將對全中國所有的家禽施打禽流感疫苗。

中國最近成立了一個國家禽流感任務小組，並投入 2 億 4 千七百萬美金來獎勵通報疫情者及補償農民的損失。全中國的家禽約 140 億（*Nature*

期刊的估計；*Science* 期刊則估計 50 億)，許多專家質疑全數家禽施打疫苗的可行性，不過依中國在 SARS 期間的防疫表現，雖然遲來了，但效率卻令人印象深刻。中國農業部官員表示，2004 年時中國即已接種 60%、約 80 億隻家禽，且當時已達到在流行地區有效控制疫情的效果；聯合國糧農組織（the UN Food and Agriculture Organization, FAO）駐中國官員亦認為，部份地區可由公安及軍人進行協助，而且中國有 10 個疫苗廠，每年可產製 150 億劑動物疫苗，必要時甚至可擴充至二倍產能，所以在疫苗的需求量上也沒有問題。

目前實施家禽疫苗接種政策者以香港經驗最為成功。香港使用 H5N2 病毒製造的疫苗，在進行例行性監測採檢時，才得以和 H5N1 野生株病毒加以區隔，並在接種疫苗的群體中放養未接種的「哨兵雞」，以做為是否有野生株 H5N1 病毒侵入的指標。越南目前接受國際的資助，正在進行家禽的疫苗接種計畫，不過他們使用的是 H5N1 的疫苗株，故實驗室需要更高難度的檢驗方法來分辨監測結果；中國可能也將使用 H5N1 的動物疫苗。

不過國際專家仍提醒，在大量生產疫苗之際更應注意疫苗的品管，否則施打後將無任何效果；而後續的生物保全（biosecurity）更是重要，管理自由放牧的家禽不與野鳥及其他禽畜接觸，加強監測通報及實驗室能力，多管齊下疫苗政策才能得以奏效。

改良反轉基因法（reverse genetics）以加速疫苗產製

An improved reverse genetics system for influenza A virus generation and its implications for vaccine production.

Gabriele Neumann, Ken Fujii, Yoichiro Kino, and Yoshihiro Kawaoka
PNAS 2005 102: 16825-16829

由於反轉基因（reverse genetics）技術的發明，使得流感疫苗的製造有了重大進展。過去在選擇疫苗株時，即使已根據病毒分子演化及抗原性變

化找出下一季的主要流行株，仍需考量該病毒株是否可在雞胚蛋生長良好，才能大量複製以製造疫苗；若經過重重過程馴化仍效果不佳，只有忍痛捨棄。前幾季流行的 H3N2 福建株遲至流行第二年才被選為疫苗株，就是最好的例子。在禽流感流行後問題更大，由於這些病毒本身即對禽鳥類有極大毒性，故接種後立刻就將雞胚蛋殺死，完全無法收集病毒抗原來製作疫苗。這個瓶頸直到應用反轉基因法才得以突破。

反轉基因技術可自由選殖來自不同流感病毒的八條基因，再加以組裝成一個完整的病毒，重組的病毒仍具有複製能力並可表現病毒的生物特性。原理是先將八條 RNA 基因以反轉錄反應(reverse transcription)做成 cDNA，並將具有致病性的 HA 切割位點序列加以修改，各別選殖於八個質體(plasmid)之中；接著選取疫苗株的 HA 及 NA 二條基因（因其與抗原性最有關聯性），另外六條基因則可選殖來自在雞蛋生長良好病毒株的基因（目前多使用 A/PR/8/34 病毒株的基因，簡稱為 PR8）。原始的設計必須再加上能提供 3 個病毒聚合酶次單元及核蛋白質（nucleoprotein NP）的另外 4 個質體，以開始病毒複製及轉錄，故加上提供 8 條 RNA 的質體總共是 12 個質體，將之送入同一個細胞中組合成完整的病毒，理想中的疫苗株於是大功告成。此一技術後來經過美國 Hoffmann 及 Webster 博士的改良，在質體中病毒 cDNA 的兩端各放入 RNA polymerase I 及 RNA polymerase II 的啟動子（promotor），使其能同時轉錄病毒的 RNA（vRNA）及 mRNA，故現在只需要 8 個質體包含 8 條病毒基因即可完成此一工程。一般而言，從設計到選殖到組成正確的病毒株，順利的話至少約需一至二個月，對於沒有經驗的實驗室則可能花費將近一年。

美國 Wisconsin-Medison 大學及日本東京大學的研究團隊即著眼於此，希望能改良現有的反轉基因法，使其更為簡便快速；他們把目標放在將質體送進細胞的步驟。由於使用製造人類疫苗的細胞株（如 Vero cells）進行轉染（即指將質體送入細胞的步驟，transfection）時的效率並不好，作者

試著將原應置於 8 個質體中，用以合成病毒 RNA 的 RNA polymerase I transcription cassettes 放到同一個質體中，另外二個質體則分別置入提供 8 條病毒 RNA 的基因片斷，及用以表現病毒聚合酶蛋白質的 RNA polymerase II transcription cassettes。由於此一設計大幅減少了質體的數目，故在 Vero cell 中合成病毒的效率較傳統方法也相對提高。

雖然有專家評論，生產疫苗最耗時的步驟其實是疫苗株病毒在雞胚蛋生長複製及後續的臨床試驗，不過這項研究仍幫助整個時程縮短了數週的時間，尤其其反轉基因方法學的改良，以及其原創性的巧思，相信國內外的病毒學及分子生物學家都可得到啟發，並應用於以反轉基因技術將質體送入真核細胞的相關研究上。

肺泡細胞的免疫反應在 H5N1 病毒感染時大幅增加

Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells

M CW Chan, C Y Cheung, W H Chui, G SW Tsao, J M Nicholls, Y O Chan, R WY Chan, H T Long, L LM Poon, Y Guan, J SM Peiris

Respiratory Research 2005, 6:135 (11 November 2005)

爲什麼禽流感如此致命？致病機轉爲何？香港大學的 Malik Peiris 博士早已是聞名國際的禽流感專家，在過去的研究中，他的團隊已指出受到 H5N1 病毒感染的病患，血清中的 IP-10 濃度異常的高；在實驗室中以初代人類巨噬細胞（primary human macrophage）進行研究，則顯示與季節性 H1N1 病毒相比，1997 年 H5N1 病毒（A/Hong Kong/483/97）爲前發炎細胞激素（pro-inflammatory cytokines，如 tumor necrosis factor- α ）及化學激素（chemokines，如 IP-10, interferon- gamma-inducible protein-10）有力的誘發劑（inducer），一般認爲細胞激素失去調控能力在 H5N1 的致病機轉上扮演著重要的角色。由於呼吸道上皮細胞爲流感病毒複製的最初標的，故他最新發

表的這篇論文進一步研究了 H5N1 病毒在這些細胞內誘發細胞激素的狀況。

本研究使用定量反轉錄聚合酶反應 (RT-PCR) 及酵素免疫分析法 (ELISA) 比較 H5N1 病毒 (包括 A/HK/483/97, A/Vietnam/1194/04, A/Vietnam/3046/04) 及 H1N1 病毒在人類肺泡及支氣管上皮細胞引發的免疫反應, 包括細胞激素及化學激素基因的表現量: 受到一般季節性 H1N1 流感病毒感染時, IP-10 會達到每釐升 200 picogram; 但若是感染 H5N1 流感病毒, IP-10 的量會上升到 2,000 picogram, 也就是增加 10 倍。除了 IP-10, H5N1 病毒在這些細胞中對於 interferon beta, RANTES (可調控 T 細胞之活化) 及 interleukin 6 (IL-6) 都比 H1N1 有更強的誘發能力。若單純就不同 H5N1 病毒株的作用進行比較, 最近來自越南的病毒株比 97 年香港株為更強的 IP-10 誘發劑。

日內瓦 H5N1 病毒防治策略國際會議

Meeting Seeks Global Consensus highlights global disparities
Science, 18 November 2005; 310: 1103.

11 月 7-9 日世界衛生組織、聯合國糧農組織 (the UN Food and Agriculture Organization, FAO)、世界動物衛生組織 (OIE) 及世界銀行 (the World Bank) 在日內瓦世衛總部召開國際會議, 討論 H5N1 病毒在禽畜及可能發生人類流感大流行的控制策略, 共有超過 110 個國家, 400 多位動物及人類衛生學者、資深政府官員、經濟學家及工商業界代表與會, 100 名以上記者前往採訪。討論主題為如何推動各國建立自己的因應計畫, 並補強兩大策略: 對抗 H5N1 病毒以侷限家禽損失及人類暴露, 並對流感大流行進行準備。

會議中各國對如何防止疫情進一步擴散及減少大流行衝擊達成共識, 包括組成快速因應小組, 及加強實驗室能量以擴展藥物與疫苗的研究。世界銀行估計大流行將造成至少 8 千億美元之損失, 故希望能建立 10 億美元之基金進行因應。不過會中包括馬來西亞及肯亞代表都提及抗病毒藥劑太貴及難

以取得的問題，雖然羅氏藥廠表示將給予開發中國家藥價折扣（每劑美金 12 元，已開發國家 15 元），但顯然仍嫌不足；世衛組織流感主管 Margaret Chan 目前正代表某些國家與羅氏就藥價及採購量進行協商中。

在疫苗生產方面，世衛組織代表 Klaus Stöhr 表示稍早有八家疫苗廠已承諾將全力研製大流行疫苗，幾年內全球即可能在大流行開始八個月內生產 18 億劑的疫苗，但到時候那些非生產國的公民能夠取得這些疫苗則還是一個問題。

本會議我國由疾管局郭旭崧局長、中研院何美鄉副研究員及台大醫學院張上淳教授代表參加。

美國的流感大流行防治計畫

Pandemic or not, experts welcome Bush flu plan

Science, 11 November 2005; 310: 952

美國總統布希 11 月提出了一個 71 億美元的流感大流行防治計畫，主要內容包括：

1. 細胞培養疫苗之研製：預算 28 億美金。目標為在 2010 年前完成能量建置，期能在大流行來臨後 6 個月內提供所有美國人以細胞培養方法製造之新疫苗。所需數量一共是 6 億劑，一人兩劑。
2. 購買目前傳統方法製造之流感疫苗：15 億美金。由二家疫苗廠以現有疫苗株製造實驗性疫苗，預計於 2009 年完成 4 千萬劑（2 千萬人份）；同時並進行相關立法工作，以利需用時可即時施打於人體。
3. 儲備抗病毒藥劑：10 億美金。採購 25% 人口數之克流感（Tamiflu）及瑞樂沙（Relenza）。
4. 新抗病毒藥劑及疫苗之研發：8 億美金

最新國際動物疫情

- 科威特 11 月 2 日依當地例行性禽流感監測作業採集二隻私人豢養紅鶴檢體，發現其中之一呈現 H5N1 病毒抗體陽性，由於採集地臨近海邊，認為可能係受到候鳥傳染。
- 加拿大二隻死亡野鴨檢出 H5N1 病毒，經進一步檢驗判定為低病原性，且其內部與致病力相關之六條基因與目前引發東南亞疫情之病毒株並不相同，故認定威脅性不大。