



■ 劉家齊

# 腸病毒 71 型疫苗 的研發

1998 年腸病毒 71 型的大流行造成許多孩童死亡，學術界開始展開基礎研究，政府也為了國人健康整合相關單位投入研究資源，並經由科技部與衛生福利部計畫的執行，發展完全由台灣自行研發的腸病毒 71 型疫苗。



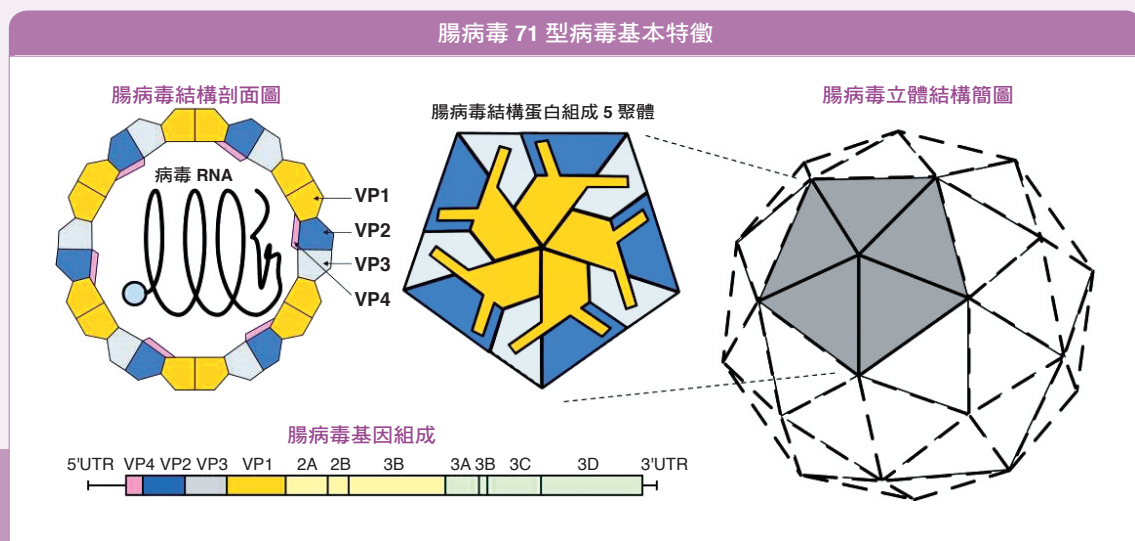
台灣於 1998 年爆發一場感染孩童的大規模流行病，造成 78 件孩童死亡的案例，引起社會大眾對流行疾病的重視。由何曼德院士所主持的台灣腸病毒流行疾病研究團隊，鑑定出這次造成孩童致死的病原體主要是腸病毒 71 型病毒。一般腸病毒感染孩童主要常見的症狀是發燒、手足口症或疱疹性咽峽炎，很可能導致孩童發生嚴重神經性疾病如腦膜炎、肢體麻痺、神經性肺水腫等的重症，嚴重時甚至造成死亡。

台灣過去二十多年來已有數次的腸病毒 71 型大流行，並出現數起重症導致死亡的案例。回顧全世界的腸病毒疫情，許多國家都有疫情與病例報導，但近年亞洲各國如越南及中國大陸都陸續有大規模的流行疫情，並有不少重症死亡案例。世界衛生組織也注意到腸病毒對幼童的威脅，頒布臨床診斷指引與開始建立全球疫情資訊。

從 1998 年的腸病毒 71 型大流行後，政府設立疾病管制局（現為疾病管制署）

以達到防疫體系事權統一，並於台灣各地成立病毒性感染症合約實驗室，逐步建立起各種疾病的監測與統計系統，長期地記錄腸病毒 71 型的病例與相關資訊。依據歷年監測資料，5 歲以下幼童是感染併發重症及死亡的高危險群體。藉由病例與相關資訊的分析，也發現流行的腸病毒 71 型有基因亞型上的變化，因此腸病毒 71 型病毒疫苗的發展格外受到重視。

基於保障國人健康與國家防疫需求，台灣的腸病毒 71 型疫苗研發經由行政院核定「人用疫苗自製計畫」（後改名為「台灣人用疫苗研發（含量產技術）計畫」）的挹注，並利用該計畫建置的符合國際 GMP 標準（PIC/S GMP）生物製劑廠，整合國家衛生研究院與疾病管制署的資源，從實驗室學術研究、量產技術的開發到人體臨床試驗的執行，最後由台灣的生技公司承接後續的上市製造。



腸病毒病毒基因具有 4 個結構蛋白與 7 個非結構蛋白，病毒遺傳物質是 RNA，4 個結構蛋白組成正二十面體把 RNA 包裹於內。

## 腸病毒 71 型病毒特徵

腸病毒屬於小 RNA 病毒科，是一群病毒的總稱。在早期已知可感染人類而被分類的腸病毒，有小兒麻痺病毒共 3 型（1 ~ 3 型）、克沙奇病毒含 23 種 A 型（A1 ~ A22 型、A24 型）及 6 種 B 型（B1 ~ B6 型）、伊科病毒共 30 型（1 ~ 33 型，但 8、10 及 28 型除外）及腸病毒（68、71 型 ~）等六十餘型。

近年來又陸續發現多種腸病毒型別，依據基因序列分析結果重新歸類，感染人類可區分為腸病毒 A、B、C、D 型，其中腸病毒 71 型被歸類於腸病毒 A 型。腸病毒 71 型進一步區分為 A、B、C、D、E、F 六種基因型，目前主要流行的是 B 與 C 基因型，這二種基因型再細分為 B1 ~ B5 與 C1 ~ C5 基因亞型。

腸病毒 71 型的遺傳物質是一條單鏈正股核糖核酸（RNA），大小約有 7,450 個鹼基對。由 VP1 至 VP4 四種病毒蛋白組成的外殼包覆遺傳物質，並以正二十面體的形式組成病毒顆粒。當病毒顆粒接觸細胞表面特定的受器後，會釋放包裹的遺傳物質進入細胞質中，開始病毒複製的過程。

病毒的遺傳物質被轉譯出一條多蛋白胜肽，而核糖核酸前後未被轉譯的區域稱為 5' 端與 3' 端非轉譯區（UTR）。病毒多蛋白胜肽經特定病毒蛋白切割後，形成組成外殼的結構蛋白 VP0、VP1、VP3，以及非結構蛋白 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D。在非結構蛋白對病毒複製的過程中，進行多蛋白分子切割、遺傳物質複製等重要功能。結構蛋白 VP0、VP1、VP3 會以 VP1 為頂點形成五聚體（pentamer），再由 12 個五聚體形成正二十面體。

當包裹新合成的病毒 RNA 遺傳物質形成病毒顆粒後，結構蛋白 VP0 會進一步切

割成 VP2 與 VP4。細胞破裂後會釋放出成熟的病毒顆粒，再感染更多的細胞。因此發展疫苗的目標是促使人體的免疫系統能產生具中和能力的抗體，以阻止病毒感染細胞進行複製繁殖，並被免疫系統清除。

## 疫苗研發方向

行政院國家科學委員會（現為科技部）與行政院衛生署（現為衛生福利部）在 1998 年腸病毒 71 型大流行後，提供台灣學術界研究資源推動腸病毒 71 型各項的基礎研究。過去二十年來研發腸病毒 71 型疫苗是針對結構蛋白為主進行疫苗的研發，發展的方向有：減毒疫苗、死毒疫苗、基因重組蛋白疫苗、DNA 疫苗、基因轉殖植物、合成胜肽疫苗、似病毒粒子疫苗、細菌載體疫苗、病毒載體疫苗等。

各種研發類型的疫苗各有其優點，主要是表現全部或部分的結構蛋白促使免疫系統誘發出中和抗體。其中以去活化腸病毒 71 型疫苗進展最快，最早進入人體臨床試驗階段。

## 疫苗的研發歷程

由於腸病毒 71 型疫苗是新型孩童疫苗，參考小兒麻痺疫苗的研發經驗，學術界以小鼠、大鼠、兔子、猴子等實驗動物進行實驗後，普遍認為完整病毒顆粒能誘發較佳的免疫能力，因此政府單位以去活化完整病毒顆粒的死毒疫苗作為基礎的疫苗進行發展。

疾管署疫苗中心自 2002 年開始腸病毒疫苗量產純化與檢驗系統的研究，從收集的許多病毒株進行動物試驗，比較不同病毒株誘發交叉中和抗體的能力，進而篩選出適當的腸病毒 71 型疫苗候選株 EV71 — E59 病毒株。利用猴腎細胞培養 E59 疫苗候選株，使用液相層析法純化回收病毒顆粒，





國家衛生研究院建構的國際 GMP 標準 (PIC / S GMP) 生物製劑廠設施外觀、內部與工作人員。

並以甲醛去活化後，經兔子的實驗證明其具有交叉保護能力，開發出原型疫苗株產製相關技術。

國家衛生研究院於 2003 年成立疫苗研發中心，並建構 cGMP 生物製劑廠，以期連結上游學術研發及下游業界產品化的角色，建置本土性疫苗研發與供應、緊急備用疫苗製造、提供疫苗研發技術與成果給廠商等重要功能。於 2007 年由國衛院疫苗中心承接疾管署疫苗中心的研發成果，執行台灣人用疫苗研發計畫，開始後續的製程開發、疫苗檢測方法與疫苗規格的研究，並使用無血清細胞培養病毒製程，以避免可能來自動物血清的汙染，同時可提高純化過程的純度。

在 2008 年底，完成符合 cGMP 規範的生物製劑廠，包含各項設備的裝置與人員教育訓練。疫苗生產所使用的細胞庫與病毒庫為符合國際標準，並確定是安全且無遭受汙染，委託國際專業檢驗公司進行檢驗的確效作業，耗時近二年的時間證明其具安全且無致癌性。2009 年 cGMP 生物製劑廠正式營運後，開始進行腸病毒 71 型臨床試驗用疫苗批次生產的工作，於 2014 年取得 PIC / S GMP 認證。

國衛院疫苗中心與疾管署疫苗中心共同開發出以無血清猴腎細胞培養腸病毒 71 型病毒，經去活化後製備全病毒粒子的死毒疫苗：EV71vac 防腸毒（去活化腸病毒 71 型疫苗）。在製程上使用產業界已成熟的滾動轉瓶培養，並以無血清培養基培養猴腎細胞，當猴腎細胞長滿轉瓶後便進行疫苗株的接種。經過 6 天的培養後，收穫病毒液進行濃縮，並使用液相層析法純化出病毒顆粒。純化後的病毒顆粒使用甲醛去活化後，製備出病毒疫苗原液。

病毒疫苗原液需經實驗動物測試確認具有免疫性後，才能與人用鋁鹽佐劑 (AlPO<sub>4</sub>) 混合，進行無菌充填以完成疫苗的生產流程。整個生產的流程中由品管部門檢驗，並由品保部門查驗確保各項生產與檢驗步驟都符合規範，最終由政府法規單位檢驗合格後疫苗成品始能放行。

在申請人體試驗臨床試驗前，臨床試驗用疫苗還需完成臨床前毒理試驗。這個試驗委託國內生技公司進行，選擇大鼠與兔子注射三劑二倍劑量的疫苗後觀察是否具有毒性，結果顯示在期間內並無實驗動物死亡且觀察不具有急毒性。在衍生研究上，與清華大學生技所研究微載體培養

### 滾動轉瓶培養製程

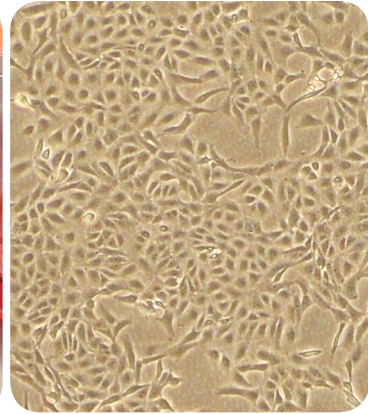
滾動轉瓶培養箱



拋棄式轉瓶



猴腎細胞



利用拋棄式轉瓶以無血清培養基培養猴腎細胞，可以視所需疫苗產量擴增轉瓶數量，當猴腎細胞長滿轉瓶後便進行病毒疫苗株的接種。



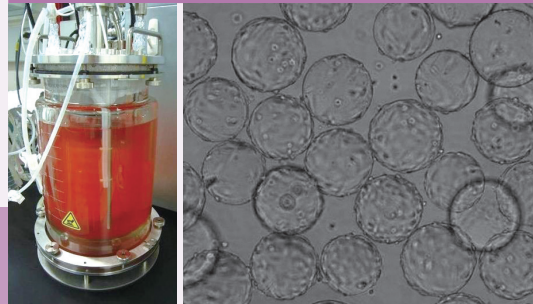
病毒疫苗原液與人用鋁鹽佐劑混合後，進行無菌充填所完成的疫苗成品外觀。疫苗成品需經適當的標示與包裝，冷藏於低溫環境。

製程，與成功大學醫學院研究病毒特性，與農委會淡水家畜試驗所完成猴子試驗，國衛院也自行開發出基因轉殖鼠建立攻毒模式，這些研究提供國內廠商在後續疫苗量產與檢驗上重要的資訊。

### 疫苗的人體臨床試驗

臨床試驗用疫苗製備完成後，於 2010 年向行政院衛生署食品藥物管理局（現為

### 微載體生物反應器培養製程



利用微載體使得猴腎細胞貼附並生長的特性，可以運用生物反應器進行懸浮培養，當猴腎細胞長滿微載體後便進行病毒疫苗株的接種，目前產業界已可操作單批次 200 公升的產量。圖中是實驗室等級 5 公升的槽體，微載體上已有許多猴腎細胞貼附。

衛生福利部食品藥物管理署）申請人體試驗。由於腸病毒 71 型疫苗是新型疫苗，審查過程基於安全的考量非常慎重，醫藥品查驗中心與藥物審議委員會諮詢各領域的專家學者檢視所有相關資料，並召開多次的討論會議，最後於 10 月獲得第一期人體臨床試驗許可證。

第一期臨床試驗由台北榮民總醫院與臺灣大學醫學院附設醫院共同合作，試驗

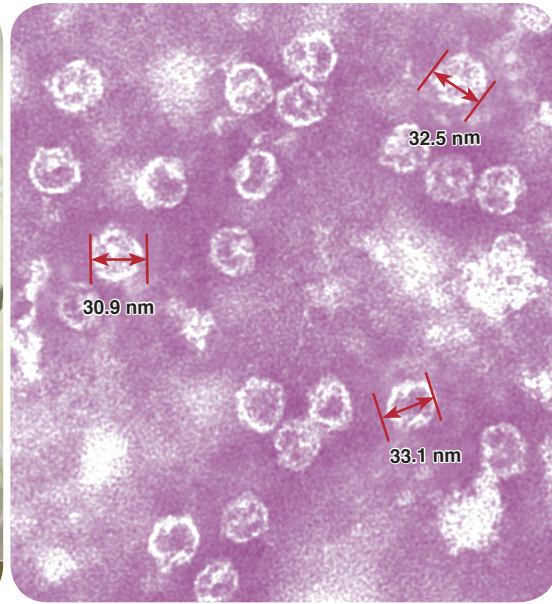


## 液相層析法純化病毒顆粒

液相層析純化系統



純化後的病毒顆粒



利用液相層析法能分離出不同大小蛋白質的原理，把濃縮後的上清病毒液注入層析管柱後，可以分離並純化出完整病毒顆粒。在電子顯微鏡的觀察下，腸病毒大小為 30 ~ 35 奈米。

著重安全性的考量，因此第一期臨床試驗受試者招募 60 位 20 至 60 歲健康成人，受試者需接種二劑疫苗且試驗設計分為二個階段。第一階段 10 位受試者在台北榮民總醫院進行，於 12 月開始第 1 位受試者接種低劑量疫苗。確認安全後才請第 2、3 位受試者接種疫苗，然後再請 7 位受試者接種疫苗。

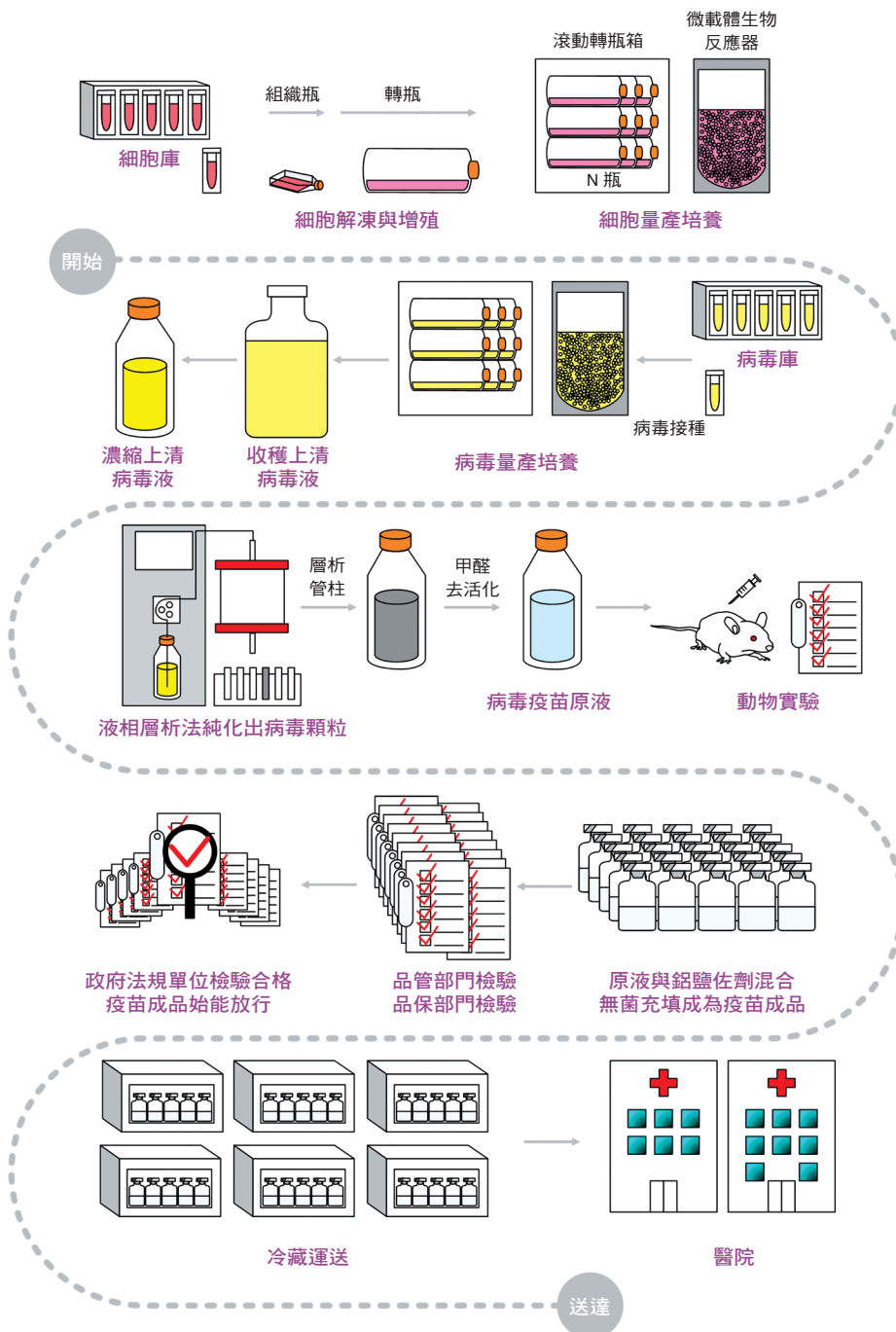
如此謹慎的步驟，於 2011 年 6 月完成第一階段 10 人臨床試驗。10 位受試者的資料再由評估委員會判斷安全性良好，才進行第二階段 50 位受試者的試驗。2012 年 3 月完成所有受試者疫苗施打，並持續觀察受試者至 2012 年 9 月。臨床試驗的資料顯示疫苗安全性良好，大部分的受試者接種後都會引發顯著的抗體，並中和大多數其他不同基因亞型病毒株。

台灣的生技公司於 2013 年承接國衛院與疾管署所完成的細胞株、疫苗株、產製技術、檢驗技術與第一期臨床試驗成果後，展開後續的量產製造與第二期人體臨床試驗。第二期試驗針對 3 至 6 歲以及 2 至 35 個月大的幼童，基於安全採逐步降低年齡層施打疫苗進行評估。中國醫藥大學附設醫院、長庚紀念醫院與馬偕紀念醫院新加入參與第二期臨床試驗，形成多中心共同合作臨床試驗的模式。

第二期臨床試驗的結果，呈現 2 個月至 11 歲的嬰兒和兒童接種疫苗後可達到顯著的血清保護作用。第三期人體臨床試驗已在 2018 年展開多中心與多國的臨床試驗，目前即將收案完成，預期將於 2020 年完成試驗結果分析。

研發新型醫藥產品需多年的準備與投入，回顧 20 年來的研發成果，  
腸病毒 71 型疫苗是我國由官方、學術、醫界與產業多方合作的典範。

去活化腸病毒 71 型疫苗簡要生產流程



從細胞庫解凍一管猴腎細胞開始，細胞便以無血清培養基持續培養增殖至單批次生產的數量。從病毒庫解凍一管病毒株，接種至單批次培養的細胞後量產病毒。待病毒大量產出後，便收穫上清病毒液。除去細胞雜質與濃縮上清病毒液後，以較小體積注入層析管柱純化出病毒顆粒。純化後的病毒顆粒使用甲醛去活化後，製備出病毒疫苗原液。病毒疫苗原液需經實驗動物測試確認具有免疫性後，才能與人用鋁鹽佐劑混合，進行無菌充填以完成疫苗成品的生產流程。經品管部門檢驗與品保部門查驗合格，最終由政府法規單位檢驗合格後，疫苗成品始能放行運送至醫院藥局。疫苗成品需經醫師指示方可使用。

未來疫苗成品上市後，  
可預防腸病毒 71 型病毒對孩童的傷害並帶給家長們安心，  
減輕醫院醫療負荷。

從研究結果得知，腸病毒 71 型疫苗只能預防腸病毒 71 型病毒的手足口症，無法預防克沙奇病毒所造成的手足口症。學術界已開始研究克沙奇病毒疫苗，並朝向多價疫苗的組合，以期發展出廣泛預防孩童手足口症的腸病毒疫苗。

## 發展近況

先前國際上並無腸病毒 71 型疫苗的法規準則，我國醫藥法規單位採取嚴謹的態度建立疫苗審查的相關法規與準則。台灣的腸病毒 71 型疫苗開發以國際規格與全球市場為考量，研發生產設施與原料管理都符合 PIC / S GMP 規範，並經我國食品藥物管理署依國際規範審核，與醫藥品查驗中心草擬出腸病毒 71 型疫苗審查參考要點的法規指引。

人體臨床試驗追求安全、品質、嚴謹、正確，須考量長遠的發展並符合國際規範。基於醫學倫理與人權考量，臨床試驗設計以追求受試者安全與試驗品質為核心價值，因此以最嚴謹的方式執行臨床試驗。

從流行病學的資料得知，近年亞洲各國都有數次的流行，尤其中國大陸與越南出現許多重症死亡病例，且觀察到病毒的基因亞型持續變化。在腸病毒 71 型疫苗的發展上，新加坡與中國大陸也陸續完成人體臨床試驗。新加坡只完成第一期臨床試驗就未持續發展，而中國大陸已有 3 家生技公司完成第三期臨床試驗。中國大陸開發的考量是快速符合大陸本身市場，研發相關資訊並不明朗，其醫藥法規單位採取一次批准第一期至第三期臨床試驗的方式進行。

中國大陸在 2015 年底至 2016 年讓當地 3 家生技公司取得藥證，只於中國大陸當地銷售與施打當地孩童。雖然中國大陸發展迅速，然而 2018 年中國大陸出現假疫苗風暴，這提醒我們疫苗品質與生命安全是最重要的價值，我國仍以最嚴謹的態度依國際標準逐步進行疫苗研發。

## 未來展望

去活化腸病毒 71 型疫苗是台灣完全自行從實驗室研發至進入人體臨床試驗的自製兒童疫苗。研發新型醫藥產品需多年的準備與投入，回顧 20 年來的研發成果，這疫苗是我國由官方、學術、醫界與產業多方合作的典範。

我國現能研發符合 PIC / S GMP 規格疫苗量產製程與生產設施，政府挹注資源給學術界提升基礎研究，醫藥法規單位建立新型病毒疫苗研發的法規諮詢及輔導機制，本國的生技公司已具有製造、執行並完成人體臨床試驗的經驗。未來疫苗成品上市後，可預防腸病毒 71 型病毒對孩童的傷害並帶給家長們安心，減輕醫院醫療負荷。就產業發展而言，這也是第一項由我國完全自行研發成功的兒童疫苗，具有實質的指標意義。

劉家齊

財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所