

# 腸病毒71型 的台灣經驗

從流行病學及臨床到基礎科學的新視野

科技部台灣重要新興感染症研究  
計畫成果報告

# 序一

---

1998 年在毫無預警的情形下，台灣突然爆發了腸病毒 71 型的大流行，在全台造成了數萬人感染，數百位兒童及嬰幼兒發生重症，且超過 70 位重症兒童 / 嬰幼兒死亡，引發了極大的驚恐，隨後的 2000 年、2001 年及 2002 年，每年也都有二、三百的重症個案，數十人的死亡，因此，國內的衛生防疫單位、醫學界均投入極大的精神與資源針對此威脅國人生命健康的疾病進行了許多研究。

在疾病的了解與病人照護上，當年的疾病管制局與小兒感染症學界、小兒重症照護學界共同合作，訂定出了腸病毒重症照護的準則；對於疫情的監測及預防，疾病管制局與醫界也做了許多的努力，利用多種管道進行監測、通報，不只對臨床病例，也針對病毒進行監測及分析，使得後面年度對於疫情的掌握可以非常精準；此外，對於民眾與醫界的衛教宣導，也利用各種管道，包括媒體及各種場合的動態、靜態的宣導，各醫學會、醫院也進行了許多教育訓練活動等，使得醫界及一般民眾普遍認知腸病毒的傳播途徑、養成良好的衛生習慣、學校也能配合適時採取停班停課的措施等。經由多方的努力，使得在後面的年度裏腸病毒疫情通常可加以及時控制，也不再有大規模的死亡個案，比起亞洲許多其他國家而言，我們的腸病毒 71 型可說是獲得很好的控制，尤其是病人的醫療照護，更是超過其他國家，可以有很好治療效果、極低的死亡情形。

在這些良好的成果背後，其實是台灣醫界與學研界對腸病毒 71 型做了很多、很好的研究，因此不論是臨床的表現、疾病的傳播與流行病學、重症的致病機轉、實驗室的診斷、病毒的分析，甚至實驗動物

---

模式的建立、疫苗與治療藥物的研發，台灣的研究團隊都有很亮眼的表現，許多研究成果是領先其他國家的。這些背後是因為政府投入了不少的資源去支持這些研究與發展，科技部（以前的國科會）也投入不少的經費予以支持，包括「台灣重要新興感染症專案計畫」也將腸病毒列為重點補助的研究項目之一，因此國內的研究團隊及人員得以發揮他們的專長，在過去的 20 年中完成了許多研究及研發。「台灣重要新興感染症專案計畫」的工作小組經討論後，認為應該將台灣過去的成果以專書的方式呈現出來，以供國人了解，也可讓一般民眾藉此學習到腸病毒 71 型的相關知識，讓醫療照護人員更加清楚腸病毒 71 型在台灣的經驗，因此邀請國內在此領域的專家、研究團隊的領導人員共同撰寫本專書，以專業但又具科普的精神完成各章節的撰寫，相信經由本專書的出版，可以讓各界人士了解台灣對腸病毒 71 型的亮眼研究成果，對腸病毒 71 型有更深入的認識。

「台灣重要新興感染症研究計畫」共同主持人  
國立台灣大學醫學院 院長

張上淳

2019 年 4 月

## 序二

---

腸病毒適合在濕、熱的環境下生存與傳播，臺灣地處亞熱帶，全年都有感染個案發生，所以腸病毒感染症儼然已是台灣地區地方性的流行疾病之一；每年約自 3 月下旬疫情開始上升，於 5 月底至 6 月中達到高峰後，即緩慢降低，而後於 9 月份開學後再度出現一波流行。以年齡層分析，患者以 5 歲以下幼童居多，約佔所有重症病例 90%；在死亡病例方面，以 5 歲以下幼童最多。引起腸病毒感染併發重症之型別以腸病毒 71 型為主，一般腸病毒感染主要常見症狀為手足口病或疱疹性咽峽炎。

科技部（前身為國科會）有感於腸病毒傳染病對於國人幼童之健康及生命的威脅，自民國 99 年起，持續將腸病毒研究議題納入「臺灣重要新興感染症研究計畫」及「前瞻疫苗技術開發研究計畫」中接續推動，補助國內學、研界學者專家，從事包括致病機轉、免疫研究、最合適及新的治療方法研發等病毒學、臨床、免疫與流行病學領域等多面向的研究計畫，希望透過學術界的研究能量，探討腸病毒致病、傳染及與感染者免疫反應的學理基礎，期進一步找到可以用來治療腸病毒的最佳良策。經過多年的努力，國內在腸病毒的致病機轉研究、治療性疫苗的研發等方面都有具體且長足的進展。為了促進國人對腸病毒的瞭解，更聚焦於易造成重症的腸病毒 71 型感染議題，商請國立臺灣大學醫學院小兒科黃立民教授，號召國內腸病毒研究學有專精的專家，通力合作，編寫這本科普專書，從疫病的監測與防治發聲，導入流行病學與傳染、腸病毒多元面向致病機轉的剖析與探討及動物模式研究的探究，藥物治療與預防之研發策略，流行病學暨分子檢驗研究；本書末章，則以腸病毒 71 型研究的國際合作經驗分享，除與國際接軌

---

外，並將成功經驗拓展到其他東南亞國家。此正與政府發展新南向政策，以學術聯盟奠基，發展產業伙伴關係，達到雙贏之目標，不謀而合。

透過適當的管道，傳播正確的科學知識，接地氣，是科技部努力的方針之一，亦是支持本書出版的主要目的。將正確、有益的善知識，有系統且持續地傳遞予一般民眾，透過閱讀或參考使用，日積月累的吸收，繼而融入國人日常生活之中，將公民的科學素養向上提升與充實、內在化，即使在面臨重大事故時，也能藉由其本身之科學常識，經分析歸納後，採取必要的因應作為，而不至於舉措失當，無所適從；亦或人云亦云，莫衷一是時，可以有正確的思維判斷，阻絕以訛傳訛的謠言於耳外。

本書的內容豐富，編排由簡入深，一氣呵成，遣詞用字也儘量通俗化，雖是介紹專業知識的書籍，但避免讓讀者有不知所云的感覺；絕大部分的內容，都是國內學者專家過去十幾年來的研究成果結晶，彙集學理與知識於一書。本書的發行，相信對於增進國人對腸病毒疾病的瞭解，將有醍醐灌頂之功。如能詳讀本書，瞭解其精義，相信日後在面對腸病毒防治與應變，特別是對家有學齡前幼童的新手家長們，都應將獲益匪淺，功力倍增。

科技部 生命科學研究發展司 司長



書於科技部

民國一〇八年二月二十一日

# 目錄

序一	2
序二	4
作者名錄	7
第一章 我國腸病毒 71 型感染症的監測與防治	8
第二章 腸病毒 71 型之家庭內傳播、重症危險因子及中樞神經 感染之長期預後	28
第三章 腸病毒 71 型的致病機轉	42
第一節 腸病毒未來的預防及管控	43
第二節 腸病毒的轉譯調控	49
第三節 腸病毒 71 型感染細胞激素免疫致病機轉	58
第四節 腸病毒 71 型特異性之人類抗體分泌 B 細胞 反應內容	89
第五節 腸病毒 71 型分子流行病學演化對病毒致病 機轉和抗原特性的影響	101
第六節 利用小鼠模式探討淋巴細胞及細胞激素在 腸病毒七十一型感染所扮演的角色	130
第七節 腸病毒研究之實驗動物模式	139
第四章 腸病毒 71 型藥物治療與預防之研發策略	150
第一節 老藥新用提供抗腸病毒開發策略 - 合併蛋白酶抑制劑與干擾素對抗腸病毒 71	151
第二節 台灣自製腸病毒 71 型疫苗成功了?!	160
第五章 台灣腸病毒 71 型流行病學暨分子檢驗研究	174
第六章 腸病毒 71 型研究的國際合作經驗	192

## 作者名錄

---

- 劉定萍 衛生福利部疾病管制署疫情中心
- 張鑾英 國立臺灣大學醫學院附設醫院小兒部小兒感染科
- 施信如 長庚大學醫學生物技術暨檢驗學系 / 長庚大學醫學生物技術研究所
- 黃麗華 國立陽明大學微生物及免疫學研究所
- 王世敏 國立成功大學醫學院醫學系小兒學科 / 國立成功大學醫學院醫學系急診學科 /  
國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
- 劉清泉 國立成功大學醫學院醫學系小兒學科 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
- 黃冠穎 長庚醫療財團法人林口長庚醫院兒童感染科
- 黃聖文 財團法人國家衛生研究院國家蚊媒傳染病防治研究中心
- 王貞仁 國立成功大學醫學檢驗生物技術學系 / 國立成功大學醫學院附設醫院病理部 /  
財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 陳舜華 國立成功大學醫學院微生物暨免疫學研究所
- 王莉菽 國立成功大學醫學院微生物暨免疫學研究所
- 周彥宏 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 洪慧貞 財團法人國家衛生研究院生技與藥物研究所
- 徐祖安 財團法人國家衛生研究院生技與藥物研究所
- 江正榮 衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心
- 羅淑婷 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 鍾婉瑜 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 江百善 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 賈敏原 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 黃美椽 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 張文瓊 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 李敏西 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 陳雅燕 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 邱慕霖 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
- 郭方琳 財團法人國家衛生研究院感染症與疫苗研究所

(依章節前後順序排列)

## 第一章

# 我國腸病毒 71 型感染症的 監測與防治

劉定萍

我國於 1998 年腸病毒 71 型大流行之後投入大量資源，在監測診斷、臨床處置、民眾認知與跨部門動員防治上都有長足進步；致近十年腸病毒流行規模及相關重症死亡均大幅下降。

腸病毒感染為幼兒常見的傳染病。過去認為除了小兒麻痺病毒外，其他型別的腸病毒多造成輕症；直到 1998 年我國發生了腸病毒 71 型 (EV 71) 的大流行，國人才開始認識這個可能嚴重威脅幼兒健康的病毒，並投入資源進行相關的監測與防治工作。經過 20 年的努力，我國不管是在疫情監測、個案診斷及臨床處置，或是在提升照顧者認知、教保育機構動員及政府部門與醫界的合作防治上都有長足進步。相較於鄰近國家年年發生流行，我國近 10 年腸病毒 71 型的流行規模及相關之重症死亡已大幅下降，我國累積之寶貴經驗值得傳承並與國際共享。

### **全球腸病毒 71 型發生情形**

腸病毒 71 型係於 1969 年首度在美國加州發現 (Schmidt, 1974)；至 1972 年為止，四年間至少從 20 名發生中樞神經系統疾病的病患分離到該病毒。之後在全球包括澳洲 (1972-1973)、日本 (1972-1973)、瑞典 (1973) 等國至少造成 12 次大小不等的流行 (Landry, 1995)。其中 1975 年 5 至 9 月保加利亞爆發嬰兒類小兒麻痺症疫情，超過 25 名死亡個案與腸病毒 71 型相關 (Shindarov, 1979)；1978 年匈牙利流行個案達千人以上，造成 47 人死亡 (Nagy, 1982)；1997 年 4 月至 6 月馬來西亞砂拉越 (Sarawak) 至少 31 人死亡 (Chan, 2000)，為 1998 年以前國際間三次較大的腸病毒 71 型流行疫情。

1998 年我國爆發了前所未見的腸病毒 71 型大流行。1998 年 3 月起，定點醫師監測即發現手足口病及疱疹性咽峽炎病患有增加的情形 (Wu, 1999)；第一波疫情於 4 月快速增溫，6 月初達高峰，7 月底趨緩，對全國造成嚴重衝擊；9 月初第二波疫情以南台灣為主，於 10 月初達高峰。從當年 3 月 29 日至年底定點醫師共通報了近 13 萬名手足口病及疱疹性咽峽炎病患，推估實際病患應有 10 倍以上。405 名被歸為重症的個案以 5 歲以下幼兒為主，分布於全台各地；其中 78 名幼兒死

亡。檢體經培養檢出病毒的病患中，48.7% 輕症個案，75% 住院個案及 92% 死亡個案檢出腸病毒 71 型病毒 (Ho, 1999)。

1998 年之後亞太地區持續有腸病毒 71 型的流行疫情發生。中國大陸於 2007 年至 2008 年初爆發了多省份的腸病毒 71 型大流行，始於 2008 年 5 月將手足口病列入法定通報傳染病 (Xing, 2014)。2010 至 2012 年中國手足口病的通報率每 1,000 人年超過 1.2 例，報告病例之致死率約 0.03%。實驗室檢驗陽性病例中，45% 輕症、80% 重症及 93% 死亡病例檢出腸病毒 71 型病毒，與我國 1998 年大流行的觀察相近。

腸病毒流行的季節性則隨著緯度不同而有所差異。中國大陸北方及日本等亞太溫帶地區每年在 5 到 7 月發生一波手足口病的流行；亞熱帶地區如中國大陸南方、香港及我國則在晚春及秋季各有一波疫情；熱帶國家如泰國、越南、馬來西亞及新加坡的流行則無一定的季節性，全年都有散發性的病例發生 (Koh, 2016)。腸病毒 71 型的流行除了中國大陸為每年發生外，其他亞太地區國家多為每 3 到 4 年流行一次。

## 腸病毒監測系統

目前大部份亞洲國家已將腸病毒 71 型感染症列入例行性傳染病監測。多數國家係以手足口病 (Hand, Foot and Mouth Disease, HFMD) 做為監測標的，運用定點醫師監測 (Sentinel Physician Surveillance) 或要求醫護人員逐例通報以收集病例資訊，並透過實驗室監測或自確診病例分離病毒以取得病毒學資料；部份國家還會進一步要求通報併發重症個案 (香港、澳門) 及群聚感染 (香港、新加坡、中國大陸)。澳門除了手足口病，也將疱疹性咽峽炎 (herpangina) 列入腸病毒監測。我國於 1998 年大流行之後，陸續建置了多面向的監測系統，除了穩定

而持續地取得從輕症、住院、重症到死亡的疾病流行趨勢、群聚爆發情形及病毒型別外，更設法強化監測之代表性與即時性 (Jian, 2017)。

我國各項監測系統及監測結果詳細說明如下：

### **實驗室監測 (Laboratory surveillance)- 腸病毒**

有鑑於 1998 年腸病毒 71 型大流行初期，國內因缺乏相關病毒的診斷能力，無法及時偵測異常病原體之流行；流行期間中央主管機關的實驗室量能也不足以因應全國所需，因此在大流行之後，衛生署即積極佈建國內的病毒實驗室監測網絡。由於各醫學中心已有訓練有素的病毒檢驗人力，故採取委託合約實驗室的方式，選定醫學中心給予適當經費建置病毒實驗室軟硬體及聘僱人力；並劃定監測責任區，結合院外基層診所的採檢點收集檢體，送回合約實驗室檢驗，以即時偵測社區流行病毒之型別與波動，並避免僅對醫學中心病患採檢，僅以較嚴重病患為主，且可能延遲發現流行疫情之缺點。採檢點也對類流感病患採取檢體，進行流感流行趨勢及病毒型別、抗藥性的監測。

病毒合約實驗室係依據醫學中心的檢驗量能力及地理分布選定；採檢點醫師會針對有手足口病或疱疹性咽峽炎等疑似腸病毒感染、在發病第三病日內之個案採取咽喉拭子 (throat swab)，送至合約實驗室進行病毒分離，以取得社區流行之腸病毒分離株，對其進行克沙奇 (Coxsackievirus) A, B, 伊科病毒 (Echovirus) 及腸病毒 71 型等病毒型別鑑定，提供國內腸病毒流行重要的病毒學資訊。收集的病毒株也會送回疾病管制署腸病毒參考實驗室，做進一步的基因型別與抗原性鑑定，分析結果對於我國腸病毒 71 型疫苗研發及疫苗株選取極有幫助。

合約實驗室監測之優點為可取得社區中之流行株、收集病毒學相關資訊；但要選取足量且具有代表性的採檢點並不容易。加上病毒培養需要至少兩週的時間，常有時效性較差且代表性與敏感性不足的問題。疾病管制署為了克服這些問題，於 2013 年底在衛生福利部台灣

健康雲之防疫雲子計畫下，開始建置實驗室自動通報系統 (Laboratory Automated Reporting System, 以下簡稱 LARS)。

LARS 係依檢驗量及地理分布決定合作醫院，選定腸病毒及流感等 20 種非法定需逐案通報、但具重要性的傳染病，運用各醫院因應病患診斷所需的既有檢驗結果，建立資料自動上傳機制，即時進行病原體檢出狀況之監測分析；毋需額外採檢檢驗，即能獲得重要病原體的流行趨勢。疾病管制署自 2013 年起與國內各大醫院的檢驗、感染管制及資訊部門合作，完成資訊系統介接等基礎建設後，醫院即可即時自動上傳該等病原體之陽性件數及總檢驗量。除了傳統培養及血清學檢驗外，亦可收集到快篩試劑及聚合酶鏈反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 等快速檢驗的結果，故有檢體量大、時效性佳以及節省人力物力等資源之優點。截至 2018 年參加 LARS 的醫院已達到 66 家，包括 21 家醫學中心，推估已達到我國傳染病檢驗量能的 61% 以上，極具代表性。另外如腸病毒 71 型、68 型及 2018 年爆發之伊科病毒 11 型等較為嚴重、但個案數較少的流行疫情，LARS 也較合約實驗室監測更為敏感，可找出有病例之鄉鎮市區，協助地方衛生單位進一步調查並及早進行防治措施。

### **症候群監測 (Syndromic surveillance)- 手足口病與疱疹性咽峽炎**

有鑑於實驗室監測有需要採檢、成本較高且時效較慢的缺點，當年的衛生署檢疫總所於 1990 年建立了我國的定點醫師監測 (Sentinel Physician Surveillance) 系統 ( 陳, 2010)；每週以電訪或傳真回復各種重點症候群的就診狀況，除協助防疫單位了解疫情的趨勢波動，並採取細菌檢體送驗，協助釐清流行病原。初期定點醫師的選定，以內科、兒科及家醫科醫師為主，由縣市衛生局推薦病患求診數高且具代表性之開業醫師，經訪視篩選配合意願高者約 600 位，志願成為定點醫師。在 1997 年馬來西亞發生腸病毒 71 型流行之後，檢疫總所將手足口病

及疱疹性咽峽炎納入監測項目之中，得以於 1998 年國內發生大流行初期偵測到異常狀況，並收集相關疫情資訊。截至 2009 年底，全國定點醫師約 800 位，分布於全國 87% 鄉鎮市區，每週以網路 (14%)、傳真及電訪等方式回報各項監測疾病及總就醫人數，經換算為就醫人次百分比進行比較分析，以免受到每週回報定點數目或看診天數不同之影響。目前許多國家仍使用此一方式與指標進行腸病毒監測。

在 SARS 疫情之後，疾病管制署開始著手各項自動化監測系統的建置；其中即時疫情監測及預警系統 (Real-time Outbreak and Disease Surveillance, RODS) 係參考美國匹茲堡大學的研發設計，收集急診室就診個案的診斷碼，並且依所欲監測的症候群設計多種診斷碼的組合，偵測特定症候群即時的波動狀況並取得個案清單。該系統在我國自 2007 年上線，目前已有超過 175 家醫院的急診部門加入，涵蓋率達 85-90%；收集資料達全國急診量 97% 以上。9 成以上的合作醫院每小時上傳資料，因此即時性甚佳；除了針對腸病毒監測的手足口病及疱疹性咽峽炎外，目前 RODS 系統常規監測的項目尚包括類流感、腹瀉及紅眼症。

另一個兼具時效性及代表性，又能夠自動化的監測標的是健保資料。我國全民健保的涵蓋率已達 99.9% 以上；疾病管制署自 2008 年起與健保署合作，利用病人就診時，健保 IC 卡於診間即時上傳之資訊，取得每日符合特定診斷碼的就醫人次，了解國人因手足口病及疱疹性咽峽炎而急診、門診及住院的狀況。疾病管制署可於健保署收到醫事機構上傳資料後 2 日內取得特定疾病資料，為另一個即時且極具代表性的監測系統。

由於 RODS 及健保資料可透過資訊系統自動化收集更為即時且具代表性的資料，故經過 3 年的平行測試，我國定點醫師監測系統於 2009 年底功成身退。2017 年疾病管制署重新建置定點醫師系統，惟改為質性電訪，供熱心基層醫師提供第一線疫情觀察及政策建議。

## 法定傳染病通報 - 腸病毒併發重症

腸病毒感染多為輕症，可自行痊癒；但若併發重症，仍將造成個案極大的健康衝擊。重症雖然發生率不高，但常留下無法恢復之後遺症，甚至死亡。腸病毒 71 型為眾多腸病毒中，較易引起併發重症的病毒型別；若能早期介入，適當治療，現在雖尚無抗病毒藥劑可供使用，仍能有效減少死亡。我國於 1999 年 6 月將「傳染病防治條例」大幅增修為「傳染病防治法」時，把「腸病毒感染併發重症 (Enteroviruses Infection with Severe Complications, EVSC)」列為法定傳染病；目前列為第三類傳染病，任何個案符合下列任一個臨床條件，應於一週內完成通報：

- 一、出現典型的手足口病或疱疹性咽峽炎，同時有肌抽躍 (myoclonic jerks) 之症狀或併發腦炎、急性肢體麻痺症候群、急性肝炎、心肌炎、急性心肌病變、心肺衰竭等嚴重病例。
- 二、無手足口病或疱疹性咽峽炎，但出現呼吸道感染症狀，伴有腦幹腦炎或急性無力脊髓炎，懷疑為腸病毒感染導致者。
- 三、出生三個月內嬰兒，出現心肌炎、肝炎、腦炎、血小板下降、多發性器官衰竭等敗血症徵候，並排除細菌等其他常見病原感染者。通報個案經病歷審查，嚴重度符合臨床條件，且檢體腸病毒培養、腸病毒核酸檢測、或血清腸病毒 71 型 IgM 抗體任一陽性者，則可判定為腸病毒併發重症確定病例。

由於腸病毒重症個案之研判需合併臨床症狀及檢驗結果，通報後除立即採取檢體外，需調閱相關病歷資料，以利審查。此外，為釐清可能之感染來源，及時採取防治措施，防疫人員需針對通報個案進行疫情調查，內容包括發病過程、就醫情形、照顧者及同住者、潛伏期內活動情形等；確定個案需密切追蹤病況至出院為止，並於發病後 6 個月追蹤個案之復原狀況，以及是否留下後遺症，以建立相關資料庫，全面瞭解國內腸病毒重症個案之疾病負擔，提供後續疫苗效益評估及

訂定防治策略參考。

## **群聚通報**

由於腸病毒具高傳染力，除了可經由糞口、接觸傳染之外，也被證實可透過吸入帶有病毒的飛沫感染，故特別容易在嬰幼兒聚集的場所造成群聚疫情。群聚事件的即時通報可協助防疫人員及早介入，提供適當的防治措施，以防疫情進一步擴大、甚至引發重症病例，所以群聚疫情的通報與監測十分重要。

同一機構內，出現兩名以上疑似病例，且有人、時、地流行病學相關即屬群聚感染。由於腸病毒傳染特性，群聚事件屢見不鮮，考量實驗室及防疫人力負荷，重大群聚事件如發生於醫院診所嬰兒室、新生兒病房、托嬰中心、產後護理之家等場所，個案與相關接觸者為腸病毒感染併發重症高危險群者，始須進行通報及採檢。採檢對象及檢體種類於疾病管制署諮詢委員或防疫醫師，會同衛生局進行調查後，視實際情況決定；所採檢體則送疾病管制署參考實驗室檢驗。

至於發生於教保育機構如學校之疑似群聚事件，則由地方衛生局接受通報並逕行輔導相關防治措施。

## **學校監測**

監測學校傳染病的發生，可避免傳染病散佈至家庭及社區，並彌補主要以醫師為通報來源的可能缺失 (Thacker, 1998)。雖然發生於學校的疑似腸病毒聚集不屬於前述重症高危險群的重大群聚事件，但學童原本就是腸病毒感染的主要對象，學校監測可對於該年齡層腸病毒疫情發生狀況有所了解。此外，研究顯示學童為病毒的主要散播者，在校感染後可能會將病毒帶回家傳給家中弟妹；而此類型的傳播病毒劑量常有放大效應，更易造成幼兒併發重症。因此在建置學校傳染病監測系統之初，就已將腸病毒感染納入監測項目。

我國學校傳染病監測通報系統於 2001 年開始試辦，2002 年正式開始運作，以全國公立國小為對象，2004 年起採網路通報 ( 許，2005)；目前全國各縣市及 99% 的鄉鎮市區均有國小參加本監測系統。班級導師需在學童感染疑似手足口病或疱疹性咽峽炎等監測疾病時，在週報表上每日逐案登記學童生病原因及缺勤請假狀況，每週五繳交至健康中心，由校護統計彙整，並於隔週一上網登錄。疾管署除了每週統計資料，並周知參加學校、衛生局及教育局注意外，對於特殊疫情均進行調查與瞭解。

目前，我國學校監測每年腸病毒的流行趨勢多自 4 至 5 月開始流行，與症候群監測結果一致。

### **台灣腸病毒 71 型的流行病學**

我國每年都有腸病毒流行，屬於季節性傳染病。一般在 4 至 5 月份疫情開始上升，6 月中至 7 月初 (24-27 週) 達到高峰；暑假期間疫情稍緩，9 月開學後會有另一波流行，規模不等；疫情於氣候變冷後結束。2007 至 2018 年之流行趨勢如圖一及圖二所示。

腸病毒種類繁多，我國每年主要流行型別不盡相同；惟腸病毒 71 型於 20 年間有 16 個年季是引起當季重症的主要型別，且於 2000、2001、2002、2005、2008 及 2012 年之活躍度較高，造成較大規模重症或較多死亡個案，仍是我國腸病毒併發重症的首要病原。不過近年來我國感染腸病毒併發重症病例已大幅減少；相較於 1999-2008 年十年間有 7 年超過 50 例，5 年超過百例，2009-2018 年僅 2 年超過 50 例，1 年超過百例，且每年感染腸病毒 71 型死亡病例數更下降至 5 例以下。我國 1998 至 2018 年腸病毒併發重症病例數、社區流行及引起重症死亡之主要病毒型別分別如圖三及表一所示。

依往年經驗，由於易感宿主的累積，腸病毒 71 型約 3-4 年流行一

次。不過近年我國腸病毒 71 型流行的週期似有延長，造成重症的衝擊也明顯較小；究竟是民眾衛生觀念提升，相關單位公衛介入措施發生效果？或是自 1998 年大流行至今，腸病毒 71 型持續在社區活動流行，育齡婦女及照顧者可能多曾感染且持續有暴露，因此對幼兒形成群體免疫力？為收集實證資料，疾病管制署於 2017 年委託台灣大學進行我國社區腸病毒 71 型的血清流行病學調查，於不同地區及城鄉對高危險群 (0-6 歲) 及高傳播者 (中小學生及育齡婦女) 抽血並進行問卷調查。該研究共收集了 920 個個案，EV 71 血清陽性率在學齡前幼童極低：嬰兒為 10%，1 歲為 4%，2 歲及 3-5 歲均為 8%；國小學童陽性率則上升至 31%，國中生為 45%；育齡婦女為 80%，成年男性為 68%。影響成人 EV 71 抗體陽性的最重要因素，除年齡外為家中有小孩。居住區域、餵母乳、飲水來源等並未影響抗體陽性率。與 1997 及 1999 年台灣地區 EV 71 血清陽性率比較，2017 年 12 歲以下兒童及青少年之血清陽性率顯著較低 (張, 2017)。

### **疾病負擔與經濟衝擊**

腸病毒 71 型感染個案併發重症的比例雖然明顯高於其他腸病毒，不過其耗費之醫療費用似不如預期。分析 2006-2010 年全民健保申報資料、法定傳染病通報及合約實驗室監測資料，推估每年我國 5 歲以下嬰幼兒有 13.9%-38.4% 會因感染腸病毒就醫，其中 5.1%-8.8% 需要住院 (Liu, 2016)；與國外文獻推估亞洲國家腸病毒有症狀感染的平均住院率 6% 相似 (Koh, 2018)。我國感染腸病毒 71 型者只佔腸病毒整體醫療費用的 7.8%，但花費了 79.1% 的加護醫療 (ICU) 費用，與一般對腸病毒 71 型明顯較其他腸病毒型別容易併發重症的認知相符。

在社會成本方面，我國腸病毒感染每年平均需花費約 3,700 萬美金的非醫療費用，包括就醫交通費、照護者及病人早逝的生產力損失，

遠高於所需之醫療費用 ( 每年平均約 1,160 萬美金 ) 。主要原因為腸病毒輕症的高發生率造成照護者龐大的生產力損失。病人早逝的生產力損失每年約 80 萬美金，其中 96.3% 係因腸病毒 71 型所致。但是若從社會觀點整體分析，腸病毒 71 型感染所造成的經濟衝擊僅佔所有腸病毒的 7% (Liu, 2016) 。

## 防治策略

腸病毒目前並沒有特效藥及疫苗，故採取的防治策略係以公共衛生手段為主，主要是阻斷傳播鏈及降低傳播病毒量，以降低幼兒感染機會。最好的預防方法是大人小孩都要勤洗手、注意個人及環境衛生，避免出入公共場所及接觸病患，生病不上學。在公共衛生三段五級中有關重症及死亡的預防，則強調重症前兆的宣導與及時適當的醫療處置，因此重症責任醫院的建置亦為防治整備的重點之一。

## 加強個人衛生及洗手

腸病毒仍以吸入或食入含病毒之飛沫、口鼻分泌物或糞便為主要的傳播途徑，故加強個人衛生及洗手為最基本而有效的預防方法。研究顯示，在腸病毒 71 型流行時對家長進行兒童衛生行為的問卷調查，發現有症狀的兒童相對於控制組兒童有較低的衛生行為分數，間接證明學齡前兒童及其照顧者洗手及衛生習慣對感染腸病毒 71 型具有顯著的保護作用 (Ruan, 2011) 。

正確的洗手步驟為濕、搓、沖、捧、擦，大約需要 40-60 秒。洗手的時機包括吃東西前、跟小寶寶玩前、擤鼻涕後、上廁所後以及看病前後。每年 3 月腸病毒流行季尚未來臨，國小及幼托機構即會進行整備工作，確認廁所及餐廳洗手台放置肥皂、洗手乳及擦手紙、烘手機，給予幼兒可以養成良好洗手習慣，並落實正確洗手的環境；衛生

局會進行實地訪查督導。兒童餐廳或速食店也需提供並隨時補充相關之洗手設備。

由於腸病毒屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)，為一種沒有外套膜 (envelop) 的病毒，使用含酒精等成份之乾洗手液並無法有效殺滅腸病毒，故對於家長及照護者的宣導亦十分重要。

### **環境清消**

已知腸病毒 71 型在 90% 相對溼度下可在物體表面或環境中存活 3 天 (Wong, 2010)，在 4°C 可存活數週，冷凍下可存活數月以上。故幼托機構及公共場所之管理單位，對於幼兒時常接觸的物體表面（門把、課桌椅、餐桌、樓梯扶把）、玩具、遊樂設施、寢具及書本等，應定時進行重點性消毒；當家中有疑似感染之幼兒，家長亦需徹底消毒可能受污染之物品及表面。

腸病毒對酸及許多化學藥物具抵抗性，如抗微生物製劑、清潔劑、部分消毒劑及酒精，均無法殺死腸病毒。醛類、鹵素類消毒劑（如市售含氯漂白水）則可使腸病毒失去活性；一般環境消毒建議使用 500ppm 濃度之漂白水；針對病童分泌物、嘔吐物或排泄物污染之物品或表面，建議使用 1000ppm 之漂白水。清洗完畢的物體可移至戶外，接受陽光照射，陽光中的紫外線亦可降低病毒活性。

此外，腸病毒在 50°C 以上的環境很快就會失去活性，所以食物經過加熱處理，或將衣物浸泡熱水，都可減少腸病毒傳播；乾燥亦可降低腸病毒在室溫下存活的時間。

### **停課**

在沒有疫苗上市前，由於幼兒園及學校為已知幼兒密切接觸之場所，停課為阻絕腸病毒傳播的公共衛生防治措施之一。不過停課尚涉及家長需配合在家照顧幼兒，或尋找其他適當托育場所或保姆的問題；

為避免過度停課而耗損社會成本，「生病不上課」應該是預防幼托機構及學校發生流行更為可行而有效的防治方法。目前疾病管制署考量除腸病毒 71 型等特定病毒型別外，大多數腸病毒感染僅引起輕症，亦建議幼兒園、托嬰中心等學前教托育機構，在有列腸病毒重症群聚風險時，才採取停課措施：

- 一、疾病管制署已公布當年度發生腸病毒 71 型流行疫情時，當機構內同一班級在一週內有兩名以上（含兩名）幼童經醫師診斷為腸病毒感染時，該班級應停課 7 天。
- 二、當年度無腸病毒 71 型流行疫情，但機構所在的鄉鎮市區，當年度曾由疾病管制署公布有「腸病毒 71 型檢驗陽性個案」或「年齡在 3 個月以上的腸病毒感染併發重症個案」時，當機構內同一班級在一週內有兩名以上（含兩名）幼童經醫師診斷為腸病毒感染時，該班級應停課 7 天。
- 三、當機構內發生腸病毒 D68 型感染併發重症確定個案，該個案就讀之班級應停課 7 天。

除上述情形外，地方政府也可依據傳染病防治法第三十七條第一項第六款，衡酌其轄內的社會型態、托育資源及防疫需求，訂定符合轄內需求的停課標準，因此目前各縣市的停課標準並不完全一致。

國際間因腸病毒疫情要求學校停課的期間自 6 至 30 天不等，啟動條件也各有不同 (Kim, 2010; Chan, 2017)。至於實際上傳統的公衛介入措施對於腸病毒疫情的控制效果究竟如何？目前亞洲各國對於幼托機構的防治措施包括：定期查核及監測、加強個人及手部衛生、環境清消、隔離有症狀者、停課及衛教等。由於發生群聚之機構型態及採取措施的差異性相當大，很難評估個別介入措施之效果；以停課為例，認為無明顯效果及可有效減輕疫情的研究都有 (Ma, 2011; 段, 2016)。因此在缺乏實證證明防治作為效果的狀況下，疫情的嚴重度可能影響政府對於防治政策的選擇 (Siegel, 2017)。不過有系統性回顧研究發現：群

聚 24 小時內及時通報並介入的群聚疫情，其平均侵襲率明顯較延遲通報者為低 (4.0%, 3.1%-5.2% vs. 15.1%, 3.8-28.2%)(Chan, 2017)，可見機構與衛生單位間的良好溝通與合作，可有效降低病例發生率及疫情持續時間。

### **重症醫療照護**

有關腸病毒重症患者的治療，我國已建立完善的治療準則，包括「腸病毒 71 型感染併發重症臨床處置建議 (2014 年 10 月修訂)」、「新生兒腸病毒感染臨床處置建議 (2016 年 12 月修訂)」及「急性無力脊髓炎治療建議 (2018 年 2 月公布)」。

腸病毒重症多有前兆，若病患能及時獲得適當醫療處置，預後多能得到改善。惟除了加強宣導相關病徵及轉診時機，並每年對醫護人員進行教育訓練之外，仍需維運有能力提供兒科加護醫療的醫院。近年國內生育率下降，醫院投入兒科部門之人力及設備相對減少，部份縣市甚至無醫院聘有兒科專科醫師；加上國內約 3 至 4 年發生一次腸病毒 71 型的流行，住院醫師往往缺乏實際照護重症病患的經驗。因此，1998 年當時的衛生署防疫處即建立腸病毒重症後送醫院制度，疾病管制署於 2008 年更正式成立腸病毒重症醫療網及責任醫院，平時即盤點各縣市兒科加護醫療之量能，並在衛生福利部醫療發展基金的挹注下，協助部份縣市選定醫院維運兒科加護病房。該署每年年初與傳染病防治醫療網六區指揮官討論確認後，指定各縣市能夠配合提供加護醫療的醫院為腸病毒責任醫院；並自 2016 年起推動腸病毒醫療品質提升方案，於流行期前聘請醫界專家訪視輔導責任醫院，補助責任醫院辦理教育訓練，提升腸病毒重症個案之醫療品質。2018 年全國共計 75 家責任醫院分布於 22 縣市，與 8 家病毒性合約實驗室協力進行腸病毒重症病患的醫療照護。

在照護人力的經驗傳承上，相關醫學會每年在流行季前即以全國

醫護人員為對象，分區辦理幼兒及新生兒腸病毒感染的臨床處置教育訓練；疾病管制署並聘請邱南昌、遲景上、劉清泉及黃玉成等四位教授，分區提供各照護團隊相關之醫療建議。於有流行疫情的年份，各區更即時辦理病例討論會，分享相關的診察治療經驗。利用全民健保及法定傳染病通報系統資料進行之研究分析顯示，我國 2006 至 2010 年感染腸病毒之致死率為 0-7.1/10 萬有就醫病程 (Liu, 2016)，遠較國外文獻對亞洲推估的致死率 52.3 (24.4-92.7)/10 萬有症狀病程 (Koh, 2018) 為低。雖然我國腸病毒重症的病患仍不時發生，但近年來致死率已大幅降低；應與民眾對重症前兆的認識提升、腸病毒重症責任醫院及醫療網的建置、以及國內高品質的醫療服務與經驗傳承有關。

## 疫苗

中國大陸於 2016 年批准第一支腸病毒 71 型疫苗上市；截至 2018 年已有兩家國營藥廠，包括中國醫科院、國藥中生武漢，以及一家民營公司北京科興，完成腸病毒 EV 71 型疫苗研發並獲准上市，提供 6 個月至 6 歲兒童自費接種；針對腸病毒 71 型所引起的手足口病，臨床試驗顯示該疫苗可提供 5 歲以下幼兒 90% 的保護力 (Reed, 2016)。我國兩家民營疫苗廠在取得疾病管制署及國家衛生研究院研發成果之授權後，截至 2018 年 9 月，國光生技已進入第三期臨床試驗。有關腸病毒疫苗的研發，本書另有專章介紹，不再贅述。

由於尚無疫苗取得我國食品藥物管理署之藥品許可證，故政府暫未將預防接種運用於腸病毒 71 型感染之預防。

## 結語

二十年來我國投入大量資源，累積了對腸病毒 71 型感染的防治經驗，在疫情的預防與控制上已見成效。未來疫苗上市後在疾病預防扮演之角色，以及如何影響我國未來疫情走勢，為未來政府必須評估之重點。惟病原體與人類的戰爭未曾停歇，2014 及 2016 年美加及歐洲爆發急性無力脊髓炎 (acute flaccid myelitis, AFM) 的聚集流行，已證實與同時期發生的腸病毒 D68 型疫情有關 (Messacar, 2018)；雖然疫情未持續擴大，但由於臨床係以呼吸道症狀表現，早期無法與一般類流感病患區分，且發展為重症之過程亦無任何有效治療方法，引起國際高度重視。我國則於 2018 年發生伊科 11 型病毒的流行，造成 7 名新生兒死亡。腸病毒的防治工作還有很長的路要走，亟需政府及各界的全心投入，才能持續守護幼兒的健康。

## 誌謝

感謝疾病管制署郭宏偉副主任、陳秋美科長、王恩慈科長提供修正意見，林怡萱小姐協助文獻收集。

## 參考文獻

- Chan JH, Law CK, Hamblion E, Fung H, Rudge J. Best Practices to prevent transmission and control outbreaks of hand, foot, and mouth disease in childcare facilities: a systematic review. *Hong Kong Med J* 2017; 23(2):177-90.
- Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shieh SR. An epidemic of Enterovirus 71 infection in Taiwan. *NEJM* 1999; 341(13):929-35.
- Jian SW, Chen CM, Lee CY, Liu DP. Real-Time Surveillance of Infectious Diseases: Taiwan's Experience. *Health Security* 2017; 15(2):144-153. DOI: 10.1089/hs.2016.0107
- Kim KH. Enterovirus 71 infection: An experience in Korea, 2009. *Korean J Pediatr* 2010;53(5):616-22.
- Koh WM, Bogich T, Siegel K, Jin J, Chong EY, Tan CY, Chen MIC, Horby P, Cook AR. The epidemiology of hand, foot and mouth disease in Asia: A systematic review and analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2016;35(10):e285-99.
- Koh WM, Badaruddin H, La H, Chen MIC, Cook AR. Severity and burden of hand, foot and mouth disease in Asia: a modelling study. *BMJ Glob Health* 2018;3:e000442.
- Landry ML, Fonseca SNS, Cohen S, Bogue CY. Fatal enterovirus type 71 infection: rapid detection and diagnostic pitfalls. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:1095-100.
- Liu DP, Wang TA, Huang WT, Chang LY, Wang ET, Cheng SH, Yang MC. Disease burden of enterovirus infection in Taiwan: Implications for vaccination policy. *Vaccine* 2016;34(7):974-80.
- Ma E, Wong S, Wong C, Chuang SK, Tsang T. Effects of public health interventions in reducing transmission of hand, foot, and mouth disease. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(5):432-5.
- Messacar K, Asturias EJ, Hixon AM, Leer-Buter CV, Niesters HG, Tyler KL, Abzug MJ, Dominguez SR. Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis—evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect Dis* 2018;18:e239-47.
- Reed Z, Cardoso MJ. Status of research and development of vaccines for enterovirus 71. *Vaccine* 2016;34:2967-70.

Ruan F, Yang T, Ma H, Jin Y, Song S, Fontaine RE, Zhu BP. Risk factors for hand, foot, and mouth disease and herpangina and the preventive effect of hand-washing. *Pediatrics* 2011;127(4): e898-904.

Schmidt NJ, Lennette EG, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974;129:304-9.

Siegel K, Cook AR, La H. The impact of hand, foot and mouth disease control policies in Singapore: A qualitative analysis of public perceptions. *J Public Health Policy* 2017;38(2):271-87.

Thacker SB, Berkelman RL. Public health surveillance in the United States. *Epidemiol Rev* 1988;10:164-90.

Wong SS, Yip CC, Lau SK, Yuan KY. Human enterovirus 71 and hand, foot and mouth disease. *Epidemiol Infect* 2010;138:1071-89.

Wu TN, Tsai SF, Li SF, Lee TF, Huang TM, Wang ML, Hsu KH, Shen CY. Sentinel surveillance for Enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerging Infectious Diseases* 1999;5(3):458-60.

Xing W, Liao Q, Viboud C, Zhang J, Sun J, Wu JT, Chang Z, Liu F, Fang VJ, Zheng Y, Cowling BJ, Varma JK, Farrar JJ, Leung GM, Yu H. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–12: an epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2014;14:308–18.

陳奕禎、吳文超、顏哲傑。我國「定點醫師監視通報系統」成果回顧。疫情報導 2010 年 3 月 23 日 第 26 卷 第 6 期 81-86 頁

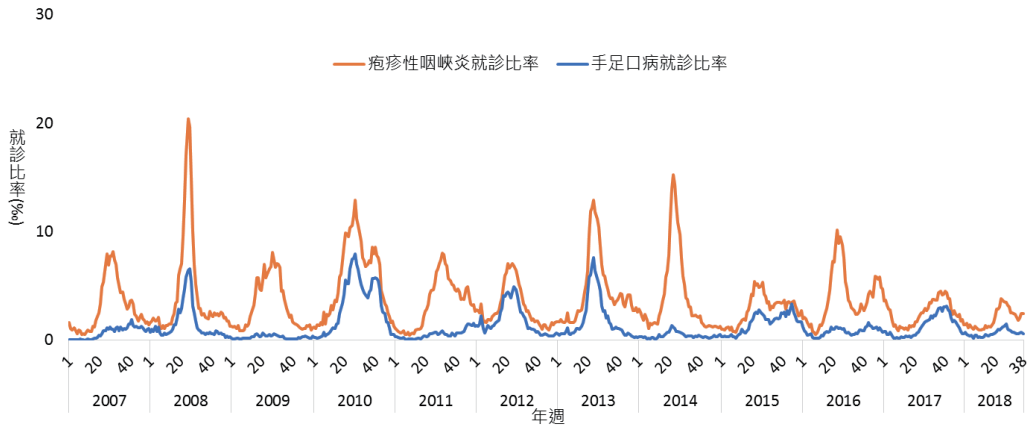
段利娜, 李剛, 劉鳳仁, 叶偉雄, 孫春雲。停課對托幼機構手足口病暴發疫情控制效果評價。中國學校衛生 2016;37(8):1203-4.

許甄晏、吳和生、黃子玫、李淑芳、周志浩。台灣地區學校傳染病監視通報系統沿革及現況。疫情報導 2005 年 3 月 25 日 第 21 卷第 3 期 151-165 頁

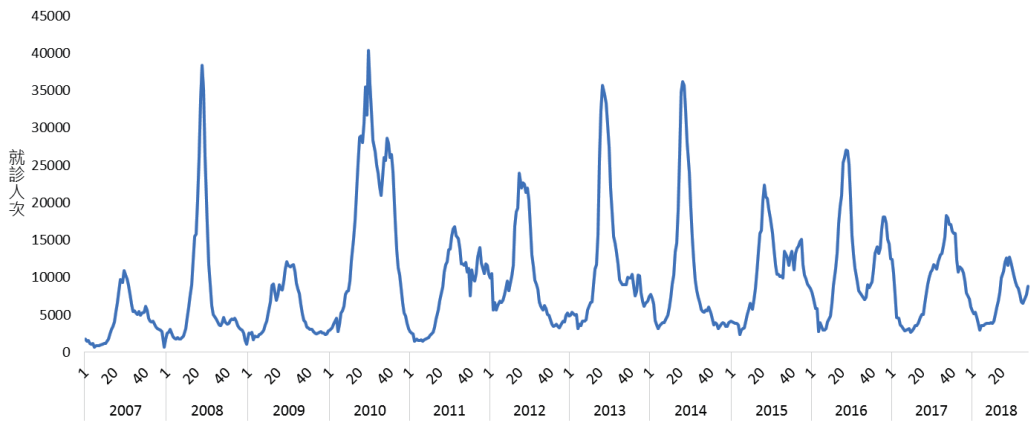
張鑾英、黃立民、李建德、方翠嫻、程愛凌、周佩萱、歐雪卿，台灣城鄉之社區腸病毒 71 型血清流行病學調查；衛生福利部疾病管制署 106 年委託科技研究計畫。計畫編號：MOHW106-CDC-C-114-000117.

衛生福利部疾病管制署。腸病毒感染併發重症。全球資訊網專業版。https://www.cdc.gov.tw/professional/Enterovirus

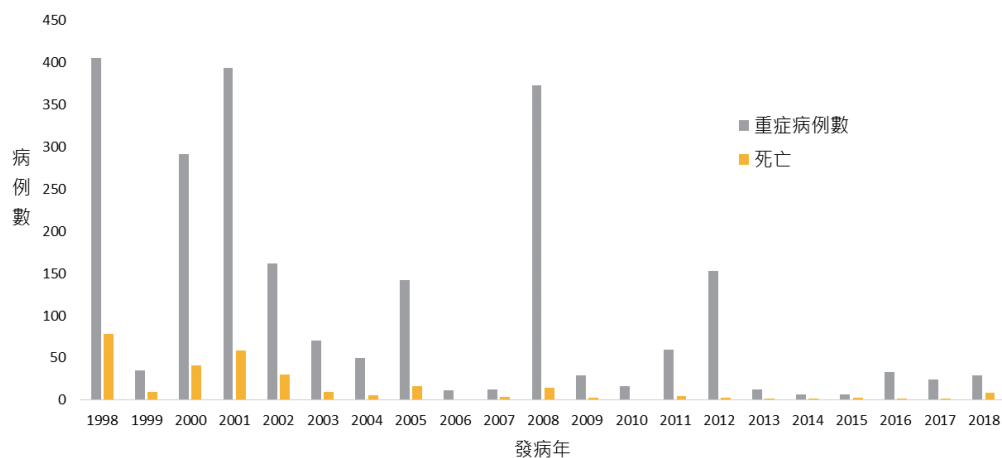
衛生福利部疾病管制署。傳染病統計資料查詢系統 (Taiwan National Infectious Disease Statistics System)。https://nidss.cdc.gov.tw



圖一 / 我國即時疫情監測及預警系統 (RODS) 手足口病及疱疹性咽峽炎急診就診病例百分比，2007 年至 2018 年第 38 週



圖二 / 我國全民健保因腸病毒門急診就診人次，2007 年至 2018 年第 38 週



圖三 / 我國腸病毒併發重症病例數，1998 年至 2018 年 9 月

表一 / 我國社區流行及引起重症死亡之主要病毒型別，1998 年至 2018 年 9 月

發病年	重症病例數	重症病例主要感染型別	死亡病例數	死亡病例主要感染型別	社區主要流行型別
1998	405	腸病毒 71 型	78	腸病毒 71 型	
1999	35	克沙奇 B3 型	9	克沙奇 B3 型	
2000	291	腸病毒 71 型	41	腸病毒 71 型	
2001	393	腸病毒 71 型	58	腸病毒 71 型	克沙奇 A16 型 腸病毒 71 型
2002	162	腸病毒 71 型	30	腸病毒 71 型	伊科病毒 6 型
2003	70	腸病毒 71 型	9	腸病毒 71 型	克沙奇 A16 型
2004	50	腸病毒 71 型	5	腸病毒 71 型	克沙奇 A4 型
2005	142	腸病毒 71 型	16	腸病毒 71 型	克沙奇 B3 型
2006	11	腸病毒 71 型	0	無	克沙奇 A2 型
2007	12	腸病毒 71 型	3	腸病毒 71 型	克沙奇 A6 型
2008	373	腸病毒 71 型	14	腸病毒 71 型	克沙奇 A2 型
2009	29	腸病毒 71 型	2	腸病毒 71 型	克沙奇 A6 型
2010	16	腸病毒 71 型	0	無	克沙奇 A16 型
2011	59	腸病毒 71 型	4	腸病毒 71 型	克沙奇 A10 型
2012	153	腸病毒 71 型	2	腸病毒 71 型	腸病毒 71 型
2013	12	腸病毒 71 型	1	伊科病毒 30 型	克沙奇 A6 型
2014	6	克沙奇 A 群	1	伊科病毒 11 型	克沙奇 A10 型
2015	6	克沙奇 B5 型	2	克沙奇 A16 型 及克沙奇 B5 型	克沙奇 A16 型
2016	33	腸病毒 71 型	1	腸病毒 71 型	克沙奇 A10 型
2017	24	腸病毒 D68 型	1	克沙奇 B3 型	克沙奇 A4, A6 型
2018 1-9 月	29	伊科病毒 11 型	8	伊科病毒 11 型	伊科病毒 11 型

## 第二章

# 腸病毒 71 型之家庭內傳播、 重症危險因子及中樞神經感染 之長期預後

張鑾英

了解腸病毒 71 型進入家庭以後的感染程度，並收集重症個案深入分析重症危險因子。以世代研究腸病毒 71 型中樞神經感染之長期預後，了解腸病毒造成的腦炎，對於神經功能長期的影響、情緒及智商的影響。

腸病毒 71 型首次在 1969 年由加州中一個腦炎的病人所培養出來 (1)，後來陸陸續續的才有文獻報告或大或小的流行，包括手口足症、咽峽炎、腦膜炎、腦炎、小腦炎或者是類小兒麻痺症候群，後來發現腸病毒 71 型也可造成許多小孩的死亡。由於小兒麻痺已逐漸被根除，腸病毒 71 型是目前最重要的腸病毒，它可造成小孩的死亡及嚴重的後遺症，茲介紹我們曾進行重要的流行病學、家庭內傳播、重症危險因子及中樞神經感染之長期預後等結果。

### **腸病毒 71 型之流行病學**

腸病毒 71 型在 1969 年於加州第一次被分離出來後 (1)，在 1998 年以前有三次比較大的流行，第一次 1975 年在保加利亞造成 44 個兒童死亡 (2)，1978 年在匈牙利則有 47 個兒童死亡 (3)，1997 年馬來西亞沙勞越島等有 31 個兒童死亡 (4)。之後，就在 1998 年台灣有大流行，約 78 個兒童死亡 (5)。除了保加利亞、匈牙利、馬來西亞、台灣等，比較多的死亡個案外，事實上其他國家亦曾流行，偶而有一些死亡個案，包括美國、瑞典、日本、中國大陸、香港、澳洲、新加坡、巴西等。而 2000 年、2001 年及 2002 年臺灣每年還是有約 30 至 50 位腸病毒重症死亡之病例 (6)。2000 年左右台灣疾管署與醫界共同制定了腸病毒重症處理綱要，加上急救加護醫療的進步，近年來台灣因腸病毒死亡的個案已大大降低，每年約略數個至十多位之間。從 2007 之後，因為病毒檢驗及監測方法的進步，中國大陸及東南亞 (尤其是越南) 也發現大的流行，2007 至 2012 間中國大陸每年因腸病毒死亡的個案可高達數百至近千名，顯示腸病毒 71 型在亞太地區是兒童非常重要的傳染病殺手 (6)。

在血清流行病學研究發現上，台灣在 1997 年所採樣的血清中，6 歲以上的人約有 60-70% 有腸病毒 71 型之中和抗體，所以有一半以

上已得過腸病毒 71 型 (7, 圖一)。新加坡也做血清流行病學調查, 1996-1997 年所採樣的血清發現小孩 5 歲以上或是大人有 50% 有腸病毒 71 型的抗體。巴西也做過血清流行病學調查, 發現 12-15 歲有 70% 腸病毒 71 型抗體。所以一半以上的人都曾感染過腸病毒 71 型, 只是輕重不一, 或者無症狀。

針對 1998 年腸病毒流行後, 至台灣北中南東共七縣市進行血清流行病學及問卷調查 (7), 各年齡層之死亡率與各年齡層流行前腸病毒 71 型抗體陽性率成負相關 ( $r=-0.82$ ,  $p=0.004$ ); 而各縣市小於三歲之死亡率與其流行後腸病毒 71 型抗體陽性率成正相關 ( $r=0.88$ ,  $p=0.02$ )。進一步作分析發現: 家中有兩個小於 6 歲小孩中, 若較大的小孩抗體陽性, 則另一位較小的小孩抗體陽性率為 56%; 若較大的小孩抗體陰性, 則另一位較小的小孩抗體陽性率僅 2.2% (matched odds ratio [OR] 10 [95% CI 3.4-29];  $p<0.001$ )。經逐步多變項邏輯回歸分析發現其他感染腸病毒 71 型重要的因素包括年齡較大 (adjusted OR 2.5 [95% CI 1.9-3.4])、上幼稚園 (adjusted OR 1.8 [95% CI 1.3-2.5])、家中小孩數目較多 (adjusted OR 1.4 [95% CI 1.1-1.7])、居住於鄉村 (adjusted OR 1.4 [95% CI 1.2-1.6])、接觸到手足口病 / 咽峽炎病患 (adjusted OR 1.6 [95% CI 1.2-2.1])。在腸病毒 71 型抗體陽性的 0.5 至 5.5 歲小孩中, 有 29% 曾有手足口病 / 咽峽炎之症狀, 感染後有症狀的比率隨年齡遞減。上述腸病毒 71 型之血清流行病學顯示托兒所、幼稚園 / 學校之間的傳播, 再傳回家庭, 是腸病毒 71 型流行之非常重要的因素。在腸病毒死亡率較高之地區其幼童腸病毒 71 型血清陽性率亦較高, 而家庭內及幼稚園內傳染為感染腸病毒 71 型及造成 1998 年大流行之重要因素。

### 腸病毒 71 型之家庭內傳播

大家都會問腸病毒 71 型是如何傳染? 腸病毒如何進入這個家裡?

其傳染源為何？大人也會得腸病毒 71 型嗎？大人得腸病毒 71 型會有症狀嗎？為了回答這些問題筆者在 2001 年至 2002 年間進行了腸病毒 71 型在家中傳染的研究<sup>(8)</sup>，我們主要的研究模式為懷疑腸病毒 71 型的個案，除了個案外也對家中所有的大人小孩做問卷調查，生病的小孩前後兩個月有無生病，還有採樣檢查包括喉嚨的病毒培養、抽血檢驗有無腸病毒的中和抗體或是急性抗體 (EV71 Ig M)，經過一個月後再採第二次抗體，這樣一共收了 177 個家庭。最後有 94 個家庭確認其家庭內有人得了腸病毒 71 型，我們從家庭中第一個個案 -- 所謂指標個案 (index case) 來追溯其傳染源，發現只有 47% 可以知道其傳染源為何：19% 來自於親戚、13% 來自於幼稚園同學、11% 來自於鄰居、4% 來自於朋友<sup>(8)</sup>。另外 53% 不知其傳染源者，其家中腸病毒 71 型是從何處來？進一步分析發現這 53% 中，有一半左右家裡有無症狀感染 (subclinical infection) 的大人，有可能由無症狀感染的大人將腸病毒 71 型帶進家裡，剩下的一半有可能是由家庭外無症狀的感染者所傳染。所以約略有一半由小孩之間傳播，四分之一由家裡有沒有症狀感染的大人帶回來，四分之一被家庭外沒有症狀的感染者所傳染。

腸病毒 71 型進入家中後發現其感染力相當高，有 84% 同住的兄弟姊妹或表、堂兄弟姊妹會受到腸病毒 71 型的感染，而且發現家裡的大人也會感染，父母的感染率 41%，祖父母 26%<sup>(8)</sup>。這些大人感染腸病毒 71 型以後會有那些症狀呢？53% 是沒有症狀，47% 有症狀：其中大部分是非特異性之上呼吸道感染、8% 有手足口病、9% 有類似咽喉炎的口腔潰瘍、一個沒有其他症狀的發燒的大人（某指標個案的媽媽）<sup>(8, 表一)</sup>。此位沒有其他症狀發燒的媽媽因疑似尿道感染而住院，但我們從其喉嚨拭子培養出腸病毒 71 型，其傳染途徑是接觸到沒症狀或有症狀感染者的口水、飛沫、糞便等，其感染力如此強是因為口水、飛沫很難隔絕，而肛門排泄期很長，病人病好了但是其腸道可排泄腸病毒達 8 星期之久，所以其傳染期很長，造就了腸病毒很難根絕及很

難預防的重要原因之一。另外腸病毒是一個不含套膜 (envelope) 的病毒，所以肥皂 (作用於 lipid envelope) 與酒精無法殺死它，要殺死它需加熱 56 度超過 30 分鐘或煮沸或紫外線或漂白水才夠力！

我們該注意，在高流行期間不只是小孩，大人也有可能帶腸病毒到家裡，家裡有小孩 (尤其 3 歲以下小孩的家庭)，不管大人、小孩都需要注意衛生習慣，另外在飲食習慣也要多注意，中國人習慣共食同一盤食物，可能因為如此藉由筷子的唾液、共用的餐盤、共食的食物而互相傳染，應該盡量去避免，特別注意這段時間的飲食及衛生習慣。

病人年齡大一點感染，大部分的人症狀很輕微，在疫苗還未發展出來前，應該把感染的年紀延後，不要讓 3 歲以下的小孩感染，可將危險性及嚴重性大大降低，所以呼籲家中有幼小孩童的家庭，要特別注意預防感染。

### **腸病毒 71 型之臨床症狀與重症危險因子**

就整個腸病毒而言，可造成的疾病有三個類型 -- 無症狀的感染、輕症及重症 (有併發症)。無症狀的感染：血清流行病學的研究告訴我們事實上小於六歲小孩感染到腸病毒，只有 29% 左右會引起手足口病或咽峽炎 (7)，所以可能一半以上的人是沒有症狀的。有症狀的人我們可分成幾個病程 (9)：第一階段病程沒有併發症，可能是手足口病、咽峽炎、喉嚨發炎、發燒、病毒疹，通常不發燒或微燒一至兩天，手掌、手肘、腳底、膝蓋、屁股會有小紅疹或小水疱 (圖二)、口腔黏膜有潰瘍，約 5 天到一周慢慢會好。有部份病人會進入第二階段 -- 有中樞神經併發症，疾病發生的第 2-5 天會有一些神經方面的症狀，除了發燒、手足口病、咽峽炎外，併發腦膜炎、腦炎、類小兒麻痺症候群或者是腦脊髓炎。這些小朋友除手足口病、咽峽炎、斷斷續續發燒超過 3 天，在睡覺時 (尤其是剛睡著時) 會有肌躍型抽搐、嘔吐、頭痛、哭鬧不安、

嗜睡等等。如果合併脊髓炎或類小兒麻痺症候群，小孩會有手腳肢體無力（引起手或腳無力，小孩突然不能走路不能舉手等等）合併肌腱神經反射下降。其核磁共振掃描會看到不正常的影像，大部分會在 T2-weighted image 看到 high signal intensity 的 lesions，腦炎病患主要異常的區域是在腦幹 dorsal part（圖三），而類小兒麻痺症候群病患異常是在脊髓（spinal cord）之前運動神經元（anterior horn）（圖四）。第三個階段最嚴重會導致心肺衰竭或是肺水腫，病患通常是在中樞神經有併發症幾個小時或 1-2 天以後發生冒冷汗、手腳冰冷、心跳變快，最後開始喘起來，為什麼會產生心肺衰竭？有幾個原因：依據我們之前的研究、病理解剖（10）、image study，主要是腦幹的 dorsal part（含 reticular formation），影響到掌管 vital organs 之神經細胞，如呼吸、心跳、血壓、自主神經等等 因為這個腦幹這部分的發炎引起自主神經的失調，再加上全身性的病毒感染，而引起交感神經過度興奮致心跳很快（達每分鐘 180 至 250 下），周邊血管收縮（vasoconstriction），最後影響到左心衰竭，心臟輸出率（ejection fraction）下降到 40-50%，如果心臟衰竭更厲害會導致導致 lung passive congestion 引起後續的肺水腫、肺出血及最後休克（3,4）。

經過分析 154 位腸病毒 71 型個案，發現中樞神經受侵犯的危險因子包含發燒，高燒超過 39°C，發燒超過 3 天，頭痛、嗜睡、嘔吐、抽筋及高血糖（大於 150mg/dL），再經多變項分析，發燒超過 3 天及嗜睡為最重要危險因子。將中樞神經受侵犯與肺水腫個案作分析比較，發現肢體無力、高血糖（大於 150mg/dL）及白血球過高（大於 17,500/mm<sup>3</sup>）是中樞神經受侵犯後發生肺水腫之危險因子，其中高血糖為最重要危險因子（95% CI 3-159, p=0.003）<sup>(9)</sup>。

在治療上會給不同階段小朋友不同的症狀治療，最後部份小朋友會有後遺症，一般而言類小兒麻痺症候群，在經過幾年以後約一半依舊會有肢體無力、萎縮、走路跑步有點跛，手無法舉高等後遺症（11, 12）。

最嚴重有心肺衰竭、肺出血、肺水腫的小朋友，急性期可能約有 30 至 40% 的死亡率，救起來的小朋友 20% 可完全恢復，但是大部份救起來的小朋友會有後遺症。

腸病毒 71 型中樞神經感染之長期預後：神經發展、認知功能及過動注意力之研究

為了瞭解腸病毒 71 型中樞神經感染之長期影響，我們對這些個案進行追蹤研究，研究成果已於 2007 年三月刊登在新英格蘭醫學期刊<sup>(12)</sup>。我們將 142 位有腸病毒 71 型中樞神經感染的孩童依嚴重度分成「無菌性腦膜炎」、「嚴重中樞神經感染」與「嚴重中樞神經感染合併心肺衰竭」三組，分別追蹤後續發展。我們發現無菌性腦膜炎病患都完全康復，53 位嚴重神經中樞感染的兒童有 10 位出現肢體無力併發萎縮，1 位出現顏面神經麻痺；嚴重中樞神經合併心肺衰竭的 28 位孩童有 7 位完全復原外，其他孩童則出現了肢體無力併發萎縮、吞嚥困難、顏面神經麻痺、抽筋，以及因缺氧引起的神經發展遲緩等問題；也就是說，一旦腸病毒 71 型侵犯到中樞神經中控制呼吸、心跳、血壓的腦幹部位，造成中樞神經損傷或缺氧極有可能造成嚴重後遺症，這些小朋友雖存活但會有吞嚥困難，無法自行吞嚥而需要鼻胃管餵食，另外睡覺時呼吸的能力不夠，需要氣切加呼吸器的幫忙。有些小朋友住在兒童呼吸照護中心已經數年的時間尚未復原，但也有部份經過數月或 1-2 年時間其呼吸及吞嚥功能慢慢恢復，而脫離鼻胃管餵食和呼吸器等而回家的兒童。在長期照護上這些有嚴重後遺症的小朋友需注意有否吸入性肺炎等合併症並需復健治療。

我們團隊還發現除生理神經上的問題外，腸病毒 71 型也會對孩童大腦學習、認知功能產生影響，例如發病年齡低於 2 歲的幼兒，上小學後的智商測驗分數比同齡者少十分。另外，以注意力不集中症候群

(ADHD) 所採用問卷柯能氏問卷 (Cohen's d) 父母及教師版本，認知之注意力不集中、過動及衝動性等注意力不集中指數皆比對照組來的偏高，在他們學前左右或小學時，有高達 20% 有此現象 (13)。注意力不足過動症 (ADHD)，我們推測應是腸病毒傷害到主管情緒控制的大腦邊緣系統的緣故，進一步功能性核磁共振掃描研究正在進行中。

## **未來展望**

目前有抗病毒的藥物正在發展，不過還在實驗室及動物實驗階段，目前已有 EV71 之轉殖鼠可提供藥物測試不錯之動物實驗，我們非常期待這些抗腸病毒藥物能進入臨床實驗，使得需要抗腸病毒的小朋友可用到這些藥物。

EV71 疫苗中國大陸已完成臨床試驗並且在大陸上市 (14,15)，台灣目前完成第二期將進入第三期臨床試驗，希望我們國人能順利完成有效而安全的 EV71 疫苗臨床試驗並上市，如此台灣兒童將不再受腸病毒 71 型之危害。

## 參考文獻

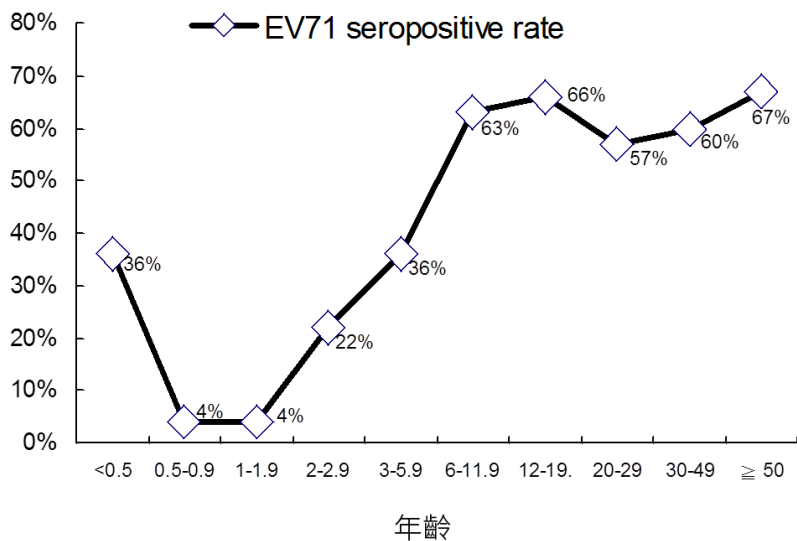
1. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974; 129 :304 –9.
2. Shindarov LM, Chumakov MP, Voroshilova MK, et al. Epidemiological, clinical and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1979; 23: 284-95.
3. Nagy G, Takatsy S, Kukan E, Mihaly I, Domok I. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol* 1982; 71: 217-27.
4. Chan LG, Parashar UD, Lye MS, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: Clinical and pathological characteristics of the disease. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 678-83.
5. Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med*. 1999; 341:929-35.
6. Lee MS and Chang LY. Development of Enterovirus 71 Vaccines. *Expert Review of Vaccines* 2010;9:149-156.
7. Chang LY, King CC, Hsu KH, et al. Risk factors of Enterovirus 71 infection and associated hand-foot-mouth-disease/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics* 2002;109:e88.
8. Chang LY, Tsao KC, Hsai SH, et al. Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *JAMA* 2004;291:222-7.
9. Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al. Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus 71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1999;354:1682-6.
10. Chang LY, Lin TY, Huang YC. Fulminant neurogenic pulmonary oedema with hand, foot and mouth disease. *Lancet* 1998;352:367-68.
11. Chang LY, Hsia SH, Wu CT, et al. Outcome of EV71 Infections with or without Stage-based Management, 1998 – 2002. *Ped Infect Dis J* 2004; 23:327-331.

12. Chang LY, Huang LM, Gau SF, Wu YY, Hsia SH, Fan TY, Lin KL, Huang YC, Lu CY, Lin TY. Neurodevelopment and Cognition in Children after Enterovirus 71 Infection. *N Engl J Med* 2007;356:1226-34.
13. Gau SF, Chang LY, Huang LM, Fan TY, Wu YY, Lin TY. Attention-deficit/hyperactivity-related symptoms among children with enterovirus 71 infection of the central nervous system. *Pediatrics* 2008;122:e452-e458.
14. Li R, Liu L, Mo Z, et al. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. *N Engl J Med*. 2014;370(9):829-37.
15. Zhu F, Xu W, Xia J, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N Engl J Med*. 27;370(9):818-28.

表一 / 大人感染腸病毒 71 型之後果

後果	個案數 (%) (N=87)
無症狀	46 (53%)
有症狀	41 (47%)
手足口病	7 (8%)
口腔潰瘍 (類似咽峽炎)	8 (9%)
非特異性發燒	1 (1%)
上呼吸道感染	18 (21%)
腸炎	2 (2%)
非特異性病毒疹	5 (6%)

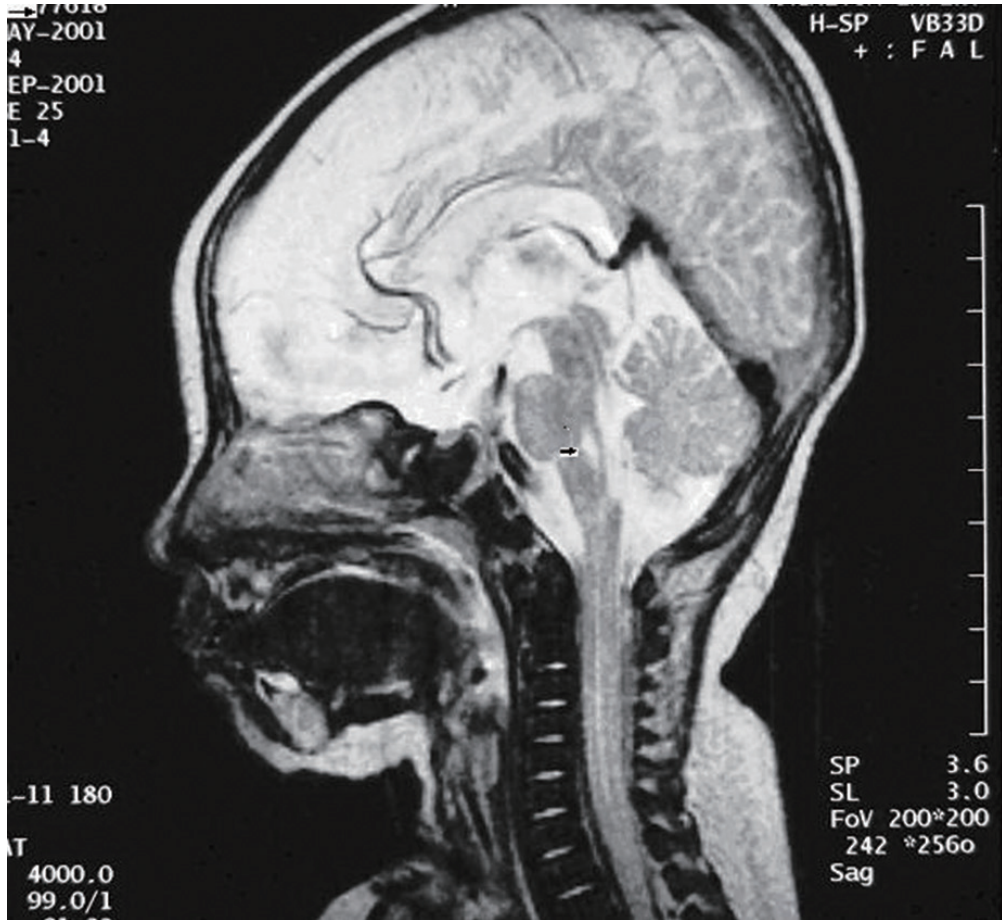
Ref: JAMA 2004;291:222.



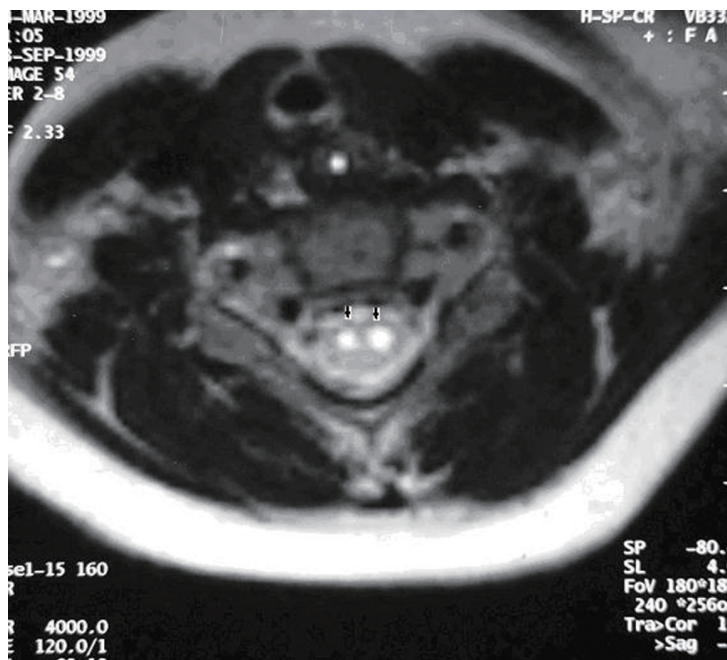
圖一 / 1997 年底腸病毒 71 型之血清流行病學。六個月以下應為母親抗體，小於三歲陽性率極低，但六歲以上已有約 60% 之陽性率。 Ref: Pediatrics 2002;109:e88.



圖二 / 手足口病之病毒疹，手掌 (上)、膝蓋及腳底 (中)、屁股 (下) 之小紅疹或小水疱



圖三 / 腦炎病患主要異常的區域是在腦幹 (箭號) dorsal part, sagittal view



圖四 / 類小兒麻痺症候群病患異常區域在脊髓 (spinal cord) 之前運動神經元 (anterior horn) (箭號)

### 第三章

## 腸病毒 71 型的致病機轉

## 第一節

---

# 腸病毒未來的預防及管控

---

施信如

開發更有效能同時檢驗出各種腸病毒的方法，有助於疫情的控制及提供病人治療的方針。另外發展多價疫苗對抗腸病毒感染也是未來預防腸病毒疫情的重要的方向。

## 1. 能否偵測所有的腸病毒藉以防止病毒的傳播以及幫助臨床上的診斷？

腸病毒屬現共有 14 個族 (species)，感染人類的腸病毒皆來自 A、B、C 及 D 族，目前為止腸病毒 E 到 L 族尚未被發現到感染人類。然而有些只感染動物的腸病毒所利用的受器 (receptor) 與能感染人類的腸病毒所使用的一樣，因此，以目前的證據並無法對感染動物的腸病毒能否跨越不同物種的藩籬進而感染人類下定論。

由於目前醫院常規實驗室皆是利用特定抗體進行免疫螢光染色或是特定的引子進行即時聚合酶鏈式反應 (real time-polymerase chain reaction assay, RT-PCR assay) 來檢測腸病毒，故以此方法僅能檢測出特定的腸病毒株。此外，腸病毒作為核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 病毒，擁有相當高的突變率及高重組速度，因此，若該腸病毒變異株較罕見或突變位置恰在設計的引子中間，便無法被檢測到。高通量定序 (high throughput screening, HTS) 也許能幫助找到較罕見的腸病毒甚至是目前仍未知的腸病毒。越來越多證據顯示持續性的非溶細胞腸病毒 (non-cytolytic enteroviruses) 感染可能會造成一些慢性疾病，例如糖尿病及心臟疾病。但能否偵測到這些只有非常低核糖核酸拷貝數 (RNA copy numbers) 的腸病毒仍是目前面臨到的挑戰。

由於較昂貴及操作上的複雜度，目前 HTS 並未被廣泛使用在檢測腸病毒上。此外，若核糖核酸的拷貝數過低使信雜比 (signal-to-noise ratio, SNR) 過低，將導致無法判斷究竟哪個是真正的病原。目前雖有些能濃縮病毒核糖核酸拷貝數的方法，像是透過核酸消化酶去除宿主的核酸和去除生物體中豐富的核糖體核糖核酸 (ribosomal RNA, rRNA)，然而這些方法都偏向消極。因此尚須發展出能增加檢測敏感

度的方法，將病毒的核糖核酸訊號從宿主檢體的核糖核酸訊號中分離出來。舉例來說，可針對目標區域（target region）的序列設計更多的探針（probes），而有些目標區域可能在腸病毒中具有相當的保留性，故可偵測到一些較罕見的病毒。這樣的方法可積極地從檢體中放大病毒的訊號，從而找出罕見或未知的腸病毒株。

## 2. 現行的監控系統是否能描繪出完整的現況？

自 1998 年腸病毒疫情爆發後，台灣建立了以實驗室為基礎的腸病毒感染監控系統。目前共有十二個病毒實驗室以傳統的方式（如病毒株分離，免疫螢光染色及即時聚合酶鏈式反應）來進行病毒篩檢。觀察自 1998 年腸病毒疫情爆發後，直到 2012 年，雖然主要的感染案例非腸病毒 71 型（enterovirus type 71），然而重症的病例中腸病毒 71 型的感染佔最大宗，即腸病毒 71 型是腸病毒中較有毒性的病毒株。直到 2017 年，隨著日本疫情的腳步，台灣的腸病毒 68 型（enterovirus type D68）的重症感染案例也變得較多；而今年，造成最多重症病例的則是伊科病毒 11 型（echovirus type 11）。

了解現在流行的腸病毒相當重要，團隊透過 HFSP (Human Frontier Science Program) 的計畫，進行病毒重組的分析，發現到現在所流行的腸病毒 71 型基因型 B 其實與克沙奇病毒 A 16 型（coxsackievirus type A16）進行了型別間重組（intertypic recombination）又與腸病毒 71 型基因型 C 進行了重組（intratypic recombination）使得現在流行的腸病毒 71 型帶有被置換了的 P3 區域，也許腸病毒 71 型被認為其毒性較過去變得較溫和，是因為其 P3 區域已被其他的腸病毒株替換的緣故。

在使用的病毒序列資料庫中，完整的腸病毒 71 型序列佔最多數，其次是克沙奇病毒 A 16 型，這可能也是為什麼團隊能發現現在流行的腸病毒其實是 71 型與克沙奇病毒 A 16 型的重組病毒株。若能有更多的病毒序列增加到資料庫中，也許就能找出更多的病毒重組序列，減少腸病毒監控中來自目前已知的病毒序列所造成的偏差（bias）。一些病毒株經鑑定雖是克沙奇病毒 A12 型（Coxsackievirus type A12）或克沙奇病毒 A6 型（Coxsackievirus type A6）但其 P3 卻是來自腸病毒 71 型，這樣的置換可能也影響了其毒性；尤其是近年來在克沙奇病毒 A 6 型的臨床案例上有些重症病例，因此了解這些病毒間的重組是相當重要的。

流感病毒有如 GISAID（global initiative on sharing all influenza data）這樣的組織，將所有流感病毒序列的資訊共享，藉以預測接下來可能會流行的流感病毒株。相信在未来，腸病毒研究的社群也能發展出關於分析流行的病毒株的網站（如 Nextstrain），幫助了解該病毒株的基因型，血清型或重組資訊等等。若能有更多腸病毒序列的資訊，將可把這些序列應用在機器學習（machine learning）上，透過分析，來幫助腸病毒感染的管控、預防以及治療。

### 3. 關於個體感染及新興腸病毒株感染的管理方針？

目前的病毒感染的管理方針，雖可將各個不同的感染階段及其對應治療列出，但一種腸病毒可能會引起相當不同的症狀，如腸病毒 71 型就能引起手足口症和腦膜炎。多種腸病毒也可能引起同一種症狀。因此還需致力於繼續發展更完善的病毒感染治療方案。另外，由於目前的治療是根據臨床上所判斷的病程決定，所以若產生新突變的病毒株並引起與以往不同的症狀都有可能導致臨床上判斷不一，此外，對於免疫不全的病人的治療方法也需加以規劃。

#### 4. 是否真有可能發展出廣效型的疫苗？

因為腸病毒是相當多種多樣的，所以發展廣效性腸病毒的疫苗相當困難。但針對特定的腸病毒，則較可能發展出有效的疫苗。目前在中國大陸已有三家公司所製造的疫苗都分別在 2015 ~ 2017 年取得腸病毒疫苗證照，也有幾家台灣的生技公司目前腸病毒疫苗已完成二期臨床試驗，雖然研發出廣效型疫苗還需待時日，但目前的疫苗就發現到針對腸病毒 71 型的疫苗，也可對克沙奇 A 16 型（coxsackievirus type A16），克沙奇 A 10 型（coxsackievirus type A10）及克沙奇 A 6 型（coxsackievirus type A10）等病毒產生保護力，這樣的多價疫苗離廣效型疫苗更近了。

雖然腸病毒 71 型病毒疫苗在使用上非常安全有效，但在疫苗製程上仍應改善品質。此外腸病毒 71 型病毒疫苗的普及率不及小兒麻痺病毒疫苗，因此替代性的治療方案也需繼續加以研究。

#### 5. 廣效型抗病毒藥物的開發以及替代性的療法和預防？

目前的抗腸病毒藥物多半是進行到細胞或是動物的實驗結果，而其中有些看起來相當確有潛力可以發展成適用於人類的抗病毒藥物，除去針對容易產生變異的病毒蛋白 VP 的抗病毒藥物，其他像是針對病毒蛋白 2C 及 3D 等等高度保留性基因的抗病毒藥物，則是較有前景的。此外，針對宿主因子（host factor）的腸病毒藥物雖然以往被認為較易產生副作用，但如能找到僅在受到腸病毒感染時才表達的宿主因子並針對其發展抗病毒藥物，則應較有安全性。團隊過往的研究中就有發現像這樣的宿主因子如一些核中的蛋白質及 small RNA 等。

另外團隊最近使用益生菌來作為病毒感染替代療法在小鼠上的實驗，也為替代療法提供了可行的線索。在餵食小鼠益生菌後再感染腸病毒，其感染症狀（disease score）和存活率（survival rate）上都有較好的表現。另並發現到這樣的結果是由於單核細胞趨化蛋白 -1（MCP-1）下降所導致的。也就是說益生菌能調節 MCP-1，使老鼠感染後較不嚴重。腸病毒的首要感染途徑就是通過腸胃道，日後更多的研究也許就能發展出一些益生菌，使腸胃道的菌相幫助提供一定的免疫能力來防止腸病毒感染或在其他器官中所造成的併發症。

目前尚須發展出能對病毒序列進行檢測的方法，也須建立能幫助監控病毒，提供更多資訊的網站，使科學家們彼此能交換研究結果，藉以更加了解新興腸病毒。除腸病毒 71 型感染外的，其他腸病毒感染的疾病管理方針也須建立，接下來也需發展出更多價的疫苗。而抗病毒藥物則需要更多的長期基礎研究，以找出真正可行的抗病毒藥物，利用調節腸胃道菌相的方式也或可作為替代型療法或預防的方式。

## 第二節

---

# 腸病毒的轉譯調控

---

黃麗華

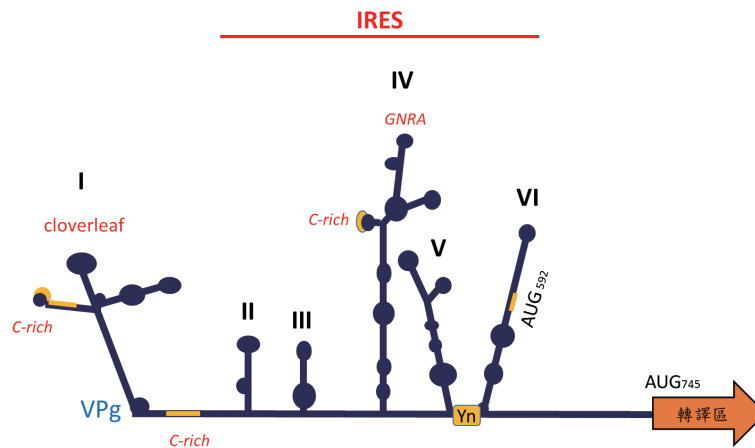
腸病毒 RNA 的 5' 端結合著 VPg 蛋白，故它無法使用一般細胞所常用的轉譯機制；相反地，在它的 5' 未轉譯區的 IRES 範圍內具有非常特殊的二級結構，可以吸引不少細胞因子過來結合，進而調控核糖體由 IRES 內部直接進入進行蛋白質的轉譯，而不需要由 5' 端掃描進入，稱為 IRES 倚賴型轉譯 (IRES-dependent translation)。這類會幫助 IRES 轉譯作用的細胞因子，稱為 ITAFs (IRES *trans*-acting factors)。病毒在細胞內面對眾多的細胞 mRNA 競爭轉譯資源的情況之下，這些 ITAFs 可能是病毒用來增強自己 IRES 轉譯效率戰勝細胞 mRNA 轉譯的重要工具，故對病毒生活史來說仍然是非常重要的。一經腸病毒感染，細胞在很短的時間內就會產生病變死亡，伴隨大量的病毒釋出。病毒究竟如何做到的呢？主要在於腸病毒能操控多方面的細胞功能，讓細胞失去基因表現的能力；同時，病毒又能挾持細胞內的大量資源供給自己的 IRES 轉譯之用。

轉譯作用是生物用以產生蛋白質的一種生化反應。有了蛋白質，細胞才能執行各種功能，生物體也才得以運作及生長；病毒的繁殖也是需要大量的蛋白質。腸病毒感染的時候，通常不會帶什麼酵素蛋白進入細胞，故進入細胞後的第一件事情就是立即進行轉譯作用以獲得足夠的各種病毒蛋白，例如複製酶等，然後才能開始複製病毒基因體。因此，轉譯步驟可說是腸病毒生活史中第一個重要的步驟，了解腸病毒轉譯步驟的調控，將有助於我們設計藥物來控制腸病毒的感染。腸病毒的轉譯作用是透過其 5' 端末轉譯區所形成的特殊二級結構所主導；這個區域稱之為”核糖體內入位” (IRES, internal ribosome entry site)。腸病毒感染細胞時會破壞細胞內的轉錄及轉譯等作用，致使細胞生長受到嚴重影響。此時，病毒即可搶奪細胞資源，並挾持諸多細胞因子為其所用，讓核糖體由 IRES 處進入病毒基因體進行非常有效率的轉譯作用，使得病毒能在很短的時間內迅速增殖。在本篇文章內，我將介紹核糖體內入位的特殊結構以及其功用。另外，我也將介紹腸病毒所使用的細胞因子 (我們稱之為 ITAFs, IRES *trans*-acting factors) 以及討論病毒如何操控細胞來讓自己的轉譯更為有效率。

## 一、 腸病毒之基因體 RNA 結構及病毒蛋白

腸病毒 (enterovirus) 隸屬於微小核糖核酸病毒科 (*Picornaviridae*)，它具有正股 RNA 基因體，病毒顆粒不具脂質套膜。不同於一般細胞內的 RNA 在 5' 端具有帽蓋 (Cap) 的結構，腸病毒的基因體 RNA 卻是帶有一個 VPg 蛋白，以共價鍵的方式連接在其 5' 端。腸病毒的基因體只具一個開放讀架 (open reading frame, ORF)，可做出一條約 2,300 個胺基酸左右的聚合蛋白 (polyprotein)。在開放讀架的 5' 端有一段很長的未轉譯區 (untranslated region, UTR)，約有 750 核苷酸長度，其內具有六個複雜的 stem-loop (SL) 結構區域 (圖一)。最

5' 端的 SL I 被稱之為 cloverleaf 區域，與病毒的複製息息相關。接下來的 SL (II-VI) 則是構成核糖體內入位 (internal ribosome entry site, IRES) 的主要範圍，它們參與在病毒 RNA 的轉譯功能。病毒基因體的 3' 端未轉譯區則具有一段小小的 poly(A) 尾巴。病毒基因體的 5' 及 3' 端平常會藉由一些細胞因子結合作用而前後連接在一起，如此比較有利於病毒的轉譯或複製的進行。



圖一 / 腸病毒的核糖體內入位 (IRES, internal ribosome entry site) 的結構圖

腸病毒所做出來的聚合蛋白會利用其自己的蛋白酶切割成 4 個結構蛋白及 7 個非結構蛋白。腸病毒具有兩個蛋白酶，一個是 2A，另一個是 3C。2A 是一個絲氨酸蛋白酶 (serine protease)，會切在病毒聚合蛋白中的結構蛋白與非結構蛋白交界處。除此之外，2A 也會將細胞中一個很重要的轉譯起始因子，eIF4G，切斷，進而抑制細胞的轉譯作用。3C 蛋白酶也是一個絲氨酸蛋白酶，它是負責病毒聚合蛋白中除了上述位置外之其他所有位置的切割。除此之外，細胞內一些轉錄因子也會被 3C 切割，造成細胞轉錄作用受到影響。故病毒藉由 2A 及 3C 的作用，會大大影響細胞的功能。非結構蛋白中的 2B 和它的前驅蛋白 2BC 被認為會改變宿主細胞膜的通透性，幫助病毒顆粒的釋放，且會抑制

細胞的分泌路徑。2C 則具有與膜結合並造成囊泡 (vesicle) 形成的功能，並也可結合到負股 RNA 的 3' 非轉譯區，參與調控病毒 RNA 的複製。3AB 為 3A 的前驅蛋白，可以將病毒複製時的複合體鑲嵌在囊泡 (vesicle) 膜上，幫助病毒複製的進行；同時 3A 也會干擾宿主細胞內蛋白質的運送及抑制蛋白質的分泌。3B 蛋白即為前述之 VPg，主要做為正、負股 RNA 複製時的引子。3CD 為 3C 與 3D 的前驅蛋白，具有蛋白酶但沒有聚合酶的活性。3D 蛋白為病毒的 RNA 聚合酶，是病毒複製複合體中的主要成員。

## 二、 腸病毒之核糖體內入位 (IRES) 的轉譯功能

細胞內的轉譯作用通常都是核糖體從 mRNA 的 5' 端的帽蓋 (Cap) 進入，再掃描至 AUG 起使碼的位置才開始轉譯，我們稱為 Cap 倚賴型轉譯 (Cap-dependent translation)。但由於腸病毒 RNA 的 5' 端結合著 VPg 蛋白，故它無法使用一般細胞所常用的轉譯機制；相反地，在它的 5' 末轉譯區的 IRES 範圍內具有非常特殊的二級結構 (圖一)，可以吸引不少細胞因子過來結合，進而調控核糖體由 IRES 內部直接進入進行蛋白質的轉譯，而不需要由 5' 端掃描進入，我們稱之為 IRES 倚賴型轉譯 (IRES-dependent translation)。腸病毒的 IRES 大約涵蓋 450 核苷酸左右的長度。在 IRES 的 3' 邊界處有一個非常重要的序列主題 (sequence motif)，Yn-Xm-AUG，它在大部分的微小核糖核酸病毒中都保守存在，顯示有其重要性。其中，Yn 代表胞嘧啶序列串 (n=8-10 個左右)，Xm 代表間隔 (m=18-20 個核苷酸)。這個序列主題中的 AUG 在腸病毒 71 型的 IRES 中，是位於第 592-594 核苷酸的地方，而且它是隱藏在 SL VI 的骨幹 (stem) 中 (圖一)。這個 AUG 絕大部分時候不會用來做為轉譯的起始點，但卻是大家公認的核糖體進入的位置。核糖體由此進入之後，通常還要再往下掃描約 150 核苷酸左右的長度，才由第 745 核苷酸位置的 AUG 開始轉譯。腸病毒這類的 IRES 是屬於第一類型。至於

其他的微小核糖核酸病毒的 IRES 還具有不同類型，其引導核糖體進入進行轉譯的模式也不太一樣，在這文章內我們只針對腸病毒的 IRES 進行介紹，暫不討論其他類型的 IRES。

腸病毒利用 IRES 進行轉譯的機制與 Cap 倚賴型轉譯有很大的不同。早期利用兔子網狀紅血球細胞萃取液進行試管內轉譯研究時就發現，腸病毒的 IRES 轉譯比起一般的 RNA 轉譯超級沒有效率。但若是在此萃取液中加入 HeLa 細胞萃取物時，則可以大大增加 IRES 的轉譯的效率，這個結果意指有一些重要的、來自 HeLa 細胞的細胞因子是可以幫助此類 IRES 的轉譯效率。後來再經由許多類似的實驗，再加上後來又利用細胞因子與 IRES RNA 結合的實驗，或是基因默化的實驗，科學家們陸陸續續發現了不少細胞因子參與在腸病毒 IRES 的轉譯作用。這類會幫助 IRES 轉譯作用的細胞因子，我們稱之為 ITAFs (IRES *trans*-acting factors)。相反地，也有一些細胞因子被發現具有抑制 IRES 轉譯的能力。這些參與在 IRES 轉譯功能的細胞因子，我們將在下節中再繼續介紹。

IRES 的二級結構 (圖一) 可能扮演重要的地標，做為不同 ITAFs 辨識的位置，並吸引其進來結合，這些 ITAFs 形成聚合物後進一步吸引核糖體由 Yn-Xm-AUG 處進入進行轉譯。例如上述的 Yn (胞嘧啶序列串) 就是胞嘧啶序列結合蛋白 (PTBP1, polypyrimidine tract binding protein 1) 辨識結合的位置；而在 cloverleaf 及 SL IV 有 C-rich 的區域，則是 PCBP2 (poly(rC) binding protein 2) 結合的位置。在 SL IV 區域內還有一個很重要的 GNRA 序列，它可能與遠距的 RNA 序列結合形成三級結構有關。除了 ITAFs 外，IRES 轉譯也需要一般常見的典型轉譯因子 (canonical translational factors)，例如被截斷的 eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF3, eIF2, eIF1A 等。而其中 eIF4A 及截斷的 eIF4G 就是結合到

SL V 的位置。之前的研究發現當這兩個因子結合到 SL V 的時候，會在 IRES 的 3' 邊界 Yn-Xm-AUG 附近造成結構上的改變，進而吸引核糖體進入 AUG 的位置。但核糖體要進入的 AUG<sub>592</sub> 平常都是隱藏於 SL VI 中，SL VI 二級結構的存在勢必阻礙核糖體接觸到 AUG。我們實驗室最近的研究結果發現 DDX3 這個 RNA 解螺旋酶可以幫助 SL VI 骨幹 (stem) 的解開，推測就是造成結構上的改變好讓核糖體得以順利進入，進而幫助 IRES 轉譯的效率。綜合以上所述，IRES 這些二級結構對於吸引核糖體進入，扮演很重要的角色；而細胞因子，或是穩定此二級結構或是打開二級結構，可能都有促進 IRES 轉譯能力的效果，端看此二級結構在 IRES 的哪個部位。因此，病毒 IRES RNA，加上眾多的 ITAFs 及典型轉譯因子所構成的巨大複合體，我們可稱之為 IRESomes，是造成 IRES 轉譯功能的重要組成，至於他們彼此之間的相互關係，很多是尚不清楚的。

### 三、參與在腸病毒 IRES 轉譯作用的一些重要調控因子

那究竟有哪些 ITAFs 可以幫助腸病毒 IRES 的轉譯功能呢？首推第一個就是上面所提過的 PTB1 (polypyrimidine track binding protein 1)。PTB1 是一個很好的 RNA chaperon (伴護)，可以幫助穩定 RNA 形成的環狀 (loop) 結構；此外，PTB1 與 eIF4G 共同結合在 SL V 上；PTB1 被認為可以穩固 IRES 的結構，因而使得 eIF4G 可以正確穩定的角度結合到 SL V，並使核糖體進入 AUG<sub>592</sub> 的位置，所以可以促進 IRES 的轉譯。第二個 ITAF 是 PCBP (poly(rC)-binding protein)。PCBP 有四種不同的亞型 (isoform)，其中 PCBP1 及 PCBP2 表現量較多，而 PCBP2 的角色又遠比 PCBP1 為顯著。PCBP2 增進 IRES 轉譯的效果被發現需要另一個細胞因子 (SRp20) 的幫忙才能達到，推測 SRp20 可能在吸引核糖體進入扮演很重要的角色。其他的 ITAFs 還包括早期所

發現，但尚不清楚其結合在 IRES 何處的 La 抗原，UNR，GARS，以及後來發現可結合到 SL II 的 hnRNP A1, Ago2, 及 HuR, 或結合到間格 (spacer) 區域的 FBP1 (far upstream element binding protein 1)，這些 ITAFs 都可促進 IRES 的轉譯效率，但其詳細機制則還不清楚。然而，最近有一個試管中實驗證明，在眾多 ITAFs 中，只有 PCBP2 在 43S 核糖體組裝成 48S 核糖體中是絕對需要的，且加入 PCBP2 於試管中實驗即可讓轉譯反應起始，至於其他的 ITAFs 對於 43S 核糖體組裝成 48S 核糖體或轉譯反應起始是不需要的。這樣的結果好像是說這些 ITAFs 對於轉譯作用的基本起始是不需要的，但其實並不代表在細胞內的轉譯作用也不需要這些 ITAFs，尤其病毒在細胞內面對眾多的細胞 mRNA 競爭轉譯資源的情況之下，這些 ITAFs 可能是病毒用來增強自己 IRES 轉譯效率戰勝細胞 mRNA 轉譯的重要工具，故對病毒生活史來說仍然是非常重要的。

其實，也有一些細胞因子被發現不是促進反而是抑制 IRES 的轉譯效率，例如 FBP2 及 AUF1 (又稱為 hnRNP D)，它們都具有結合到 SL II 的能力，進而抑制轉譯的效率。另外，經過泛素化的 FBP2 也會結合到間格 (spacer) 區域去阻礙 FBP1 結合至相同的區域，因而也可降低 IRES 的轉譯效率。對於這些抑制型的細胞因子，病毒還是有一些策略可以阻止這種抑制現象 (請見下節討論)。

#### **四、 腸病毒搶奪細胞資源並挾持細胞因子來促進自己的 IRES 轉譯效率**

一經腸病毒感染，細胞在很短的時間內就會產生病變死亡，伴隨大量的病毒釋出。病毒究竟如何做到的呢？主要在於腸病毒能操控多方面的細胞功能，讓細胞失去基因表現的能力；同時，病毒又能挾持

細胞內的大量資源供給自己的 IRES 轉譯之用。病毒操控細胞內功能包括下列幾種：第一，關閉宿主的轉譯，轉而支持自己的 IRES 轉譯。病毒 2A 蛋白酶一經做出，即可將轉譯起始因子 eIF4G 切斷，因而抑制細胞的轉譯作用。而切斷的 eIF4G 片段，反而提供病毒自己轉譯之用。而 3C 蛋白酶則會切割細胞內一些轉錄因子，造成細胞轉錄作用受到影響。2A 與 3C 蛋白酶合作之下，也可以切斷 PABP (polyA-binding protein)，這也會完全關掉宿主的轉譯作用，產生嚴重的細胞病變。

第二，藉由切割一些細胞內蛋白來減輕來自於細胞的抑制作用。例如細胞內的 AUF1 原本會結合在病毒 IRES RNA 的 SL II 區域上而抑制病毒 IRES 的轉譯作用。但經病毒 3C 蛋白酶切割過的 AUF1 就失去與 RNA 結合的能力，也同時失去抑制病毒 IRES 轉譯的能力。同樣地，3C 也會切割 G3BP (Ras-GAP SH3 domain binding protein)，使細胞無法產生壓力顆粒 (stress granules)，因而減輕細胞抑制病毒轉譯的能力。另外在病毒感染的情况下，FBP2 這個抑制型細胞因子也會被切割，其切下來之片段失去被泛素化的能力，同時也失去結合到間格 (spacer) 區域及抑制 IRES 轉譯的能力。

第三，病毒蛋白酶會切割核膜上一些 Nup 蛋白來破壞核膜孔洞複合體 (NPC, nuclear pore complex) 的組成及功能，或切掉某些核蛋白上之入核標記 (NLS, nuclear localization signal)，這些結果都會造成不少原本在核內的蛋白流入細胞質中，有些進而成為調控 IRES 轉譯之 ITAFs。例如原先位於細胞核的蛋白，如 hnRNP A1, AUF1, FBP1, FBP2, HuR 等，即因為腸病毒的感染而出現在細胞質中，對 IRES 轉譯具有調控的作用。另外，Sam68 蛋白則因為 3C 蛋白酶切割使其失去入核標記，故也流出來至細胞質，成為正向調控 IRES 轉譯的 ITAF。

## 五、結語

腸病毒是一隻很小的病毒，但是卻能在很短的時間內產生大量病毒，並對宿主細胞產生很大的傷害，最終造成細胞的死亡，其最重要的因素就是病毒能利用它的兩個蛋白酶，完全控制細胞的基因表現，改變細胞內多個反應及作用。病毒進而搶奪細胞資源為自己所用，並充分利用核內、核外的細胞因子使其 IRES 轉譯能在宿主細胞無法進行轉譯的情況之下，自己的轉譯卻能持續有效的進行，這主要都要歸功於 IRES 這種特異型式的轉譯機制，也意指這種機制對於病毒的繁殖是非常重要的。因此，充分了解參與在 IRES 轉譯的細胞因子以及其相關的調控機制，將有助於未來我們開發對抗腸病毒的藥物。

## 第三節

---

# 腸病毒 71 型感染細胞激素免疫致病機轉

---

王世敏 劉清泉

- 腸病毒 71 型感染會引起免疫反應與發炎反應導致疾病的併發症。
- 細胞激素與趨化因子在腸病毒 71 型腦幹腦炎的致病機轉扮演重要的角色。
- 中樞神經系統發炎反應和全身性發炎反應，在腸病毒 71 型感染併發肺水腫的致病機轉扮演不同的角色。
- 腸病毒 71 型感染併發自主神經系統失調和肺水腫病患給予靜脈注射免疫球蛋白和 milrinone 治療，可調整細胞激素反應和降低死亡率。

## 1. 背景

在體液性介質 (humoral mediators) 中，細胞激素 (cytokines) 參與了先天性 (innate) 及特定的免疫反應，並且在病毒感染的病態生理學上扮演角色 (Dinarello, 1997)。細胞激素是多效性 (pleiotropic) 的免疫傳訊物質 (messengers)，可由感染或其他刺激產生，也能促進發炎也能減緩發炎。在特定的反應中，細胞激素不僅能影響周邊的細胞，甚至能延伸至遠處的細胞。細胞激素具有自體分泌 (autocrine)、旁分泌 (paracrine) 或內分泌 (endocrine) 的作用方式，透過與受體 (receptor) 結合，並依不同的細胞激素和目標細胞的類型，能引起各式各樣的反應 (Tisoncik *et al.*, 2012)。全身性發炎反應症候群 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 是因感染細胞釋放促進發炎 (pro-inflammatory) 的調節物質和持續性的高細胞激素血症 (hypercytokinemia) 所導致。活化細胞激素網絡會增加血液中許多種細胞激素的表現，目前已被廣泛地認知。如在敗血症 (sepsis) 中，激烈細胞激素釋放，在人體的生理上形成免疫風暴，是一個典型的病況，可能進而形成多重器官衰竭 (Oda *et al.*, 2005)。例如：A 型鏈球菌或金黃色葡萄球菌感染併發的毒性休克症候群 (toxic shock syndrome) (Nakane *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2008)、某些病毒感染像是冠狀病毒 (coronavirus) 引起的嚴重急性呼吸道症候群 (severe acute respiratory syndrome, SARS)(Cameron *et al.*, 2008)、流感病毒 (Skoner *et al.*, 1999)、登革病毒 (Lei *et al.*, 2001) 及艾伯斯坦 - 巴爾病毒 (Epstein-Barr virus) 感染 (Canna *et al.*, 2012) 等。細胞激素反應的影響不只侷限於感染部位，也會強烈到足以引起全身性的反應，因而可能造成有生命威脅性的組織損害 (Nazinitsky & Rosentha, 2010)。

## 2. 腸病毒 71 型腦幹腦炎的臨床表現

人類腸病毒 71 型是屬於微小病毒科 (family *Picornaviridae*)，腸病毒屬 (genus *Enterovirus*) 的一員，由不具套膜 (envelope) 的外殼 (capsid) 包覆具有約 7500 個鹼基基因組所構成的單股正極性核糖核酸 (single stranded, positive-polarity RNA) 組成，直徑約 27~30 奈米 (Hsiung & Wang, 2000; McMinn, 2002)。腸病毒 71 型感染會造成多樣性的臨床症狀，大部分的感染個案是屬於無症狀感染，輕症則會以皮膚症狀像是手足口症 (hand-foot-and-mouth disease, HFMD) 及疱疹性咽峽炎 (herpangina) 來表現。然而，也可能發生威脅生命的神經學上的併發症，譬如腦幹腦炎 (brain stem encephalitis)，是臨床上最需要密切注意的 (Wang *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002)。腸病毒 71 型已被認定是具有高度神經趨性 (neurotropic) 的特性並且與多種神經系統疾病相關，例如：無菌性腦膜炎 (aseptic meningitis)、腦幹腦炎、腦脊髓炎 (encephalomyelitis)、急性無力肢體麻痺 (acute flaccid paralysis, AFP) 及感染後神經症候群 (post-infectious neurological syndromes)。在 1998 年腸病毒 71 型的大流行之後，臨床上發展出針對腸病毒 71 型腦幹腦炎嚴重度的臨床分級，藉此幫助診治腸病毒 71 型感染的病程與重症的病例的處理。在 2011 年世界衛生組織 (regional emerging disease intervention [REDI] center) 的手足口症臨床診治指引中，建議用此一臨床表徵分級疾病嚴重度 (Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009)。依疾病嚴重度，腸病毒 71 型腦幹腦炎被分為三個重要的臨床關鍵階段，包含「無併發症腦幹腦炎 (uncomplicated brain stem encephalitis)」、「自主神經系統失調 (autonomic nervous system dysfunction)」以及「肺水腫 (pulmonary edema)」(圖一)。其中「肺水腫」的死亡率高 (Ho *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Ooi *et al.*, 2010; Solomon *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014)，而且存活的患者會有長期的神經學上後遺症 (Huang *et al.*, 2016)。



圖一 / 腸病毒 71 型感染臨床疾病嚴重度分級

腸病毒 71 型腦幹腦炎是一持續性的動態疾病的系列變化。它可能是可逆的，因為在早期每一個臨床階段，都是疾病變化的轉捩點。透過臨床上將腦幹腦炎分級，來探討腦幹腦炎的致病機轉，並且發展出有效的方式照護病患。「腦幹腦炎」是定義為病患具有肌陣攣 (myoclonus)、步態不穩 (ataxia)、眼球震顫 (nystagmus)、動眼神經麻痺 (oculomotor palsies) 及延髓性麻痺 (bulbar palsy) 等特徵，可能會以不同的形式組合所發生的一種疾病，不一定有神經學影像上的證據。「自主神經系統失調」定義為出現冒冷汗、斑駁狀皮膚 (mottled skin)、心搏過速 (tachycardia)、呼吸急促 (tachypnea) 及高血壓等。「肺水腫」則定義為是在自主神經系統失調的階段之後，有心搏過速、呼吸急促、呼吸囉音 (rales) 及血色狀痰液 (frothy sputum) 的症狀，並且胸腔 X 光影像上看到是沒有心臟擴大 (cardiomegaly) 的兩側肺浸潤 (圖二)。

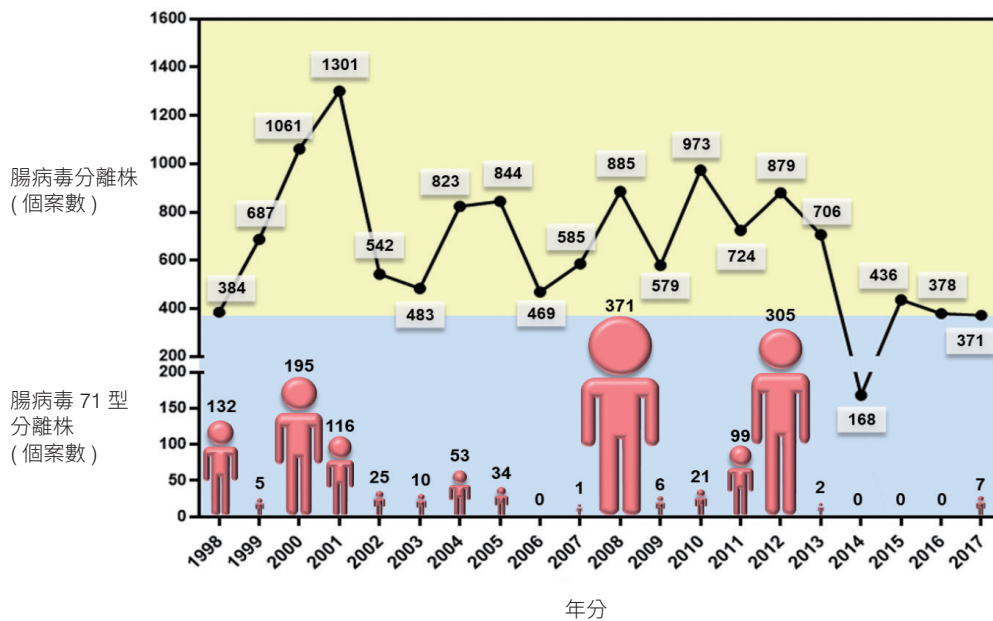


圖二 / 腸病毒 71 型感染病患，自主神經系統失調及肺水腫的臨床表徵：自主神經系統失調的病患表現嚴重的周邊血管收縮 (vasoconstriction)(左上)、心搏過速及體溫過高 (hyperthermia)(左下)。肺水腫病患的胸部 X 光片影像學上浸潤表現 (右上) 及顯現血色狀氣管抽取液 (右下)

腸病毒 71 型腦幹腦炎的臨床診斷若有所延誤，通常是在早期未能根據臨床症狀判斷出來。相對於其他血清型腸病毒患者，肌躍型抽搐 (myoclonic jerks) 在腸病毒 71 型患者身上更是常見的症狀，可以視為侵犯腦幹的早期的一個指標。腸病毒 71 型腦幹腦炎診斷的確立，在於必須診斷出一個或多個神經學徵兆，特別是肌躍型抽搐或肢體麻痺，並檢測疾病相關的生物指標，譬如：周邊血白血球數量、血小板數量、血糖、發炎細胞激素和趨化因子 (chemokines)、免疫細胞群分類和腦脊髓液分析等 (Lin et al., 2002; Chang et al., 1999; Wang et al., 2003; Lin et al., 2003; Wang et al., 2007; Wang et al., 2008)。

以 2008 年臺灣疫情爆發來說，經由病毒學及臨床上確診，有

238 例為嚴重病例，其中 41% 屬於「無併發症腦幹腦炎」，44% 屬於「自主神經系統失調」，15% 屬於「肺水腫」(Wang et al., 2012)。不同血清型的腸病毒，每年會在臺灣輪流或同時在社區流行。自 1998 年開始成功大學醫學院附設醫院病毒室分離的腸病毒及腸病毒 71 型臨床病毒株數量，如圖三所示。腸病毒 71 型在 1998、2000、2001、2008 及 2012 年的腸病毒流行中，為主要的流行血清型。



圖三 / 1998~2017 年，成功大學醫學院附設醫院病毒室腸病毒及腸病毒 71 型的分離株個案數

### 3. 腸病毒 71 型腦幹腦炎併發症的致病機轉

人體在抵抗病毒感染時，先天性及後天性免疫機制同樣重要。由先天性免疫系統提供第一道防線來抵抗病毒，經抗原呈現後活化後天性免疫反應，同時伴隨促進發炎細胞激素分泌。腸病毒 71 型感染引發肺水腫和肺出血的致病機轉，目前已有些重要的發現。腸病毒 71 型感染後，破壞位在延髓中間、腹側及尾部的血管收縮和呼吸中樞，導致

併發「自主神經系統失調」及「肺水腫」。與在小兒麻痺脊髓炎 (bulbar poliomyelitis) 的症狀相似，會高度活化交感神經系統 (sympathetic hyperactivity)，引發兒茶酚胺 (catecholamine) 大量產生，進而引起自主神經失調 (Wang *et al.*, 2003; Kao *et al.*, 2004)。大量釋出的兒茶酚胺類物質及強烈的中樞神經系統的發炎反應，會加劇細胞激素風暴 (cytokine storm) 和肺部血管通透性，因而造成「肺水腫」。兒茶酚胺類物質，是一種神經傳遞物質 (neurotransmitters)，如血中的腎上腺素 (epinephrine) 會影響免疫反應，並且在局部釋放的正腎上腺素 (norepinephrine) 也有其影響的能力 (Haskó *et al.*, 2001)。血中的正腎上腺素和腎上腺素在「自主神經系統失調」和「肺水腫」的腸病毒 71 型感染病患中，顯著地高於「無併發症腦幹腦炎」的病患。在細胞實驗中，發現人類肺腺癌上皮細胞 (A549)、人類橫紋肌肉瘤細胞 (RD)、人類神經母細胞 (SK-N-SH)、人類前骨髓球性血癌細胞 (HL-60)、人類急性單核球性血癌細胞 (THP-1)、人類 T 細胞類淋巴母細胞 (Jurkat) 及人類周邊單核細胞都會表現  $\alpha 1A$  型及  $\beta 2$  型腎上腺素受體 (adrenergic receptors)。當腸病毒 71 型感染後，再外加正腎上腺素或腎上腺素於 THP-1 及 Jurkat 時，其受感染細胞的比率會增加。若先給予  $\alpha$  型或  $\beta$  型阻斷劑，則能降低其感染細胞的比率。正腎上腺素及腎上腺素在腸病毒 71 型腦幹腦炎併發「自主神經系統失調」及「肺水腫」的致病機轉上扮演重要角色。此外，濃度 100 pg/ml 的正腎上腺素會增加受感染的周邊單核球產生 interleukin (IL)-6 (Liao *et al.*, 2015)。在局部釋放的神經內分泌的調節物質，會與在免疫細胞表現的特殊受體結合，在神經系統與免疫系統間做一有功能性的連結，來調控各種發炎反應，包含細胞激素的產生。過度的交感神經活化，在腸病毒 71 型腦幹腦炎發展成「肺水腫」致病機轉上，扮演極為重要的角色。

#### 4. 腸病毒 71 型感染全身性細胞激素反應

有越來越多的證據顯示，促進發炎及抗發炎細胞激素在腸病毒 71 型腦幹腦炎中扮演核心的角色。「肺水腫」可能是由腦幹損害和 ( 或 ) 釋放細胞激素及趨化素引起的全身性發炎反應症候群，因而造成肺血管通透性增加而導致的結果。因此，腸病毒 71 型肺水腫的臨床表現，是起因於高細胞激素血症和各種發炎調節物質有關的中樞神經系統發炎，造成的高度發炎症候群。有些文獻已經證明促進發炎細胞激素 (IL-6、tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 與腦幹腦炎併發肺水腫有關 (Lin *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003)。在「肺水腫」病患身上，發現血中的 IL-10、IL-13 和 interferon (IFN)- $\gamma$  顯著地上升 (Wang *et al.*, 2003)，而 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞和自然殺手細胞 (nature killer [NK] cells) 會顯著地減少。腸病毒 71 型腦幹腦炎的免疫致病機轉，可歸因於當 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞和自然殺手細胞減少時，可能讓特定細胞激素釋放。人類的 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1; CD162)，是一種表現在淋巴球細胞膜的唾液酸黏蛋白 (sialomucin)，已被證實是腸病毒 71 型感染的受體，主要的角色是參與淋巴球 (lymphocytes) 在內皮細胞 (endothelium) 上的早期發炎反應 (Nishimura *et al.*, 2009)。腸病毒 71 型與淋巴球的 PSGL-1 間的互動，可能引發發炎細胞激素，參與腦幹腦炎併發「肺水腫」 (Patel & Bergelson, 2009)。單核吞噬細胞是 IL-6 最重要的來源；然而 T 淋巴球、B 淋巴球及更多其他種類的細胞也會產生 IL-6 (Akira *et al.*, 1993)。在處於「肺水腫」初始階段的「自主神經系統失調」腸病毒 71 型感染的病患，發現血中 IL-6 顯著升高 (Wang *et al.*, 2006)。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  在「腦幹腦炎併發肺水腫」的死亡病患也顯著地高於沒有此併發症的病患。血中上升的 IL-6 可以代表是 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  生物作用的淨反應結果。且有研究顯示血中 IL-6 若大於 70 pg/ml，被認為是最佳預測「腸病毒 71 型腦幹腦炎併發肺水

腫」的指標之一 (Lin *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003)。

腸病毒 71 型感染會顯著地增加樹突細胞 (dendritic cells) 產生 IL-6 (Lin *et al.*, 2009)。先前的研究顯示，IL-6 和 T 細胞經由降低組織的病毒量，來降低感染老鼠的死亡率 (Lin *et al.*, 2009)。然而，亦有其他報導，發現若在開始出現臨床症狀後，於感染第 3 或第 6 天給予抗 IL-6 抗體 (anti-IL-6 antibody)，可成功地改善感染老鼠的存活率及疾病嚴重程度 (Khong *et al.*, 2011)。與未給予抗體的感染控制組比較，給予抗 IL-6 抗體的老鼠則呈現輕微組織受損、沒有脾臟萎縮 (splenic atrophy)，並且會增加 CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞及 B 細胞活化，明顯地提高 IL-10 在全身性的表現量。此外，經由抗 IL-6 抗體的保護作用與小腸的病毒量並沒有相關性。這些發現，對於腸病毒 71 型感染併發自主神經系統失調病患給予靜脈注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin, IVIG) 提供了正當的理由 (Lin *et al.*, 2009)。但是，若在感染的同時就給予抗 IL-6 抗體卻對老鼠反而有害。這代表 IL-6 的產生在感染的早期是有益，宿主能透過 IL-6 吸引各種免疫細胞引發抗病毒反應。然而，持續高量的 IL-6 則可能造成組織傷害及免疫病理變化。

IL-10 最初為 Th2 輔助細胞 (T helper cells)，能夠抑制 Th1 輔助細胞的細胞激素產生。也是一個重要且有多種生物作用的免疫調控細胞激素，在進行抗原呈現的過程，或抗原呈現發生之後即會產生，主要來源是單核球 / 巨噬細胞、樹突細胞、CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞及調節 T 細胞 (Duell *et al.*, 2012)。但是，IL-10 也可以同時阻礙病原清除及改善免疫病理變化。在不同的研究中，已證實很多人類病毒都能誘發 IL-10。IL-10 在腸病毒 71 型感染併發「肺水腫」病患中，顯著高於「自主神經系統失調」或「無併發症腦幹腦炎」的病患 (Wang *et al.*, 2003)。IL-10 的釋放與兒茶酚胺之間存在密切的關聯性 (Grilli *et al.*, 2000)。由交感神經活化刺激釋放的全身性 IL-10，在神經免疫學的機制中很重要，在創傷後或壓力下會導致免疫抑制 (immunodepression)。

先前研究發現 IL-10 的激增與免疫抑制取決於腦幹受侵犯的範圍及交感神經的活化 (Woiciechowsky *et al.*, 1998)。IL-10 可以在一些急性或慢性的神經病理狀況中被調控。這顯示 IL-10 在中樞神經系統的免疫調控功能上扮演角色。因此，「肺水腫」病患有全身性 IL-10 增加，似乎是病毒直接破壞腦幹引起持續性交感神經活化的結果。此外 IL-10 也會抑制多種促進發炎調節物質產生，包含 IL-1、IL-6、IL-8、顆粒性白血球聚落刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor)、TNF- $\alpha$ ，且會正向調控 IL-1 受體拮抗物 (antagonist) 的表現 (Duell *et al.*, 2012)。在一個腸病毒 71 型感染的動物研究中，抗 IL-6 治療會顯著地增加 IL-10/IL-6 的比例，這反映出抗 IL-6 的治療能正向調控 IL-10 產生。因此，提升 IL-10 可能幫助促進發炎及抗發炎細胞激素間的平衡，以及其後續的組織損害 (Khong *et al.*, 2011)。此外，急性呼吸窘迫症候群 (acute respiratory distress syndrome) 病患的支氣管肺泡沖洗液中，發現其中 IL-10 的量較低與其預後不佳相關 (Donnelly *et al.*, 1996)。而另一方面，經調控提高的 IL-10，藉由影響肺血管通透性，可能在肺水腫的疾病發展中具有保護的效果。因此在腸病毒 71 型的「肺水腫」致病機轉中，IL-10 可能是有一個雙面的角色 (Wang *et al.*, 2003)。

IFN- $\gamma$  在免疫反應對抗感染中扮演中心的角色。IFN- $\gamma$  是一種多效性細胞激素，由參與先天性免疫系統 (自然殺手細胞、 $\gamma\delta$  型 T 細胞) 及後天免疫系統 (CD8+ T 細胞、CD4+ Th1 輔助細胞) 的細胞分泌。感染時早期的 IFN- $\gamma$  源自於自然殺手細胞及  $\gamma\delta$  型 T 細胞 (Boehm *et al.*, 1997)。在「無併發症腦幹腦炎」及「肺水腫」病患的血中，皆可偵測到 IFN- $\gamma$  升高。並且，在「肺水腫」病患的動態分析中，顯示 IFN- $\gamma$  的增加是發生於 IL-10 產生的 24 小時之後。肺血管通透性增加在「肺水腫」的發生可能是關鍵性角色。IFN- $\gamma$  也可以提高血管通透性 (Martin *et al.*, 1988)。IFN- $\gamma$  調節的微血管滲出，是因為內皮細胞的障壁破壞所導致 (Corada *et al.*, 1999)。IL-10 也是一種細胞激素合成的抑制物，能

夠終止 IFN- $\gamma$  產生。然而，在「肺水腫」病患身上，IFN- $\gamma$  比 IL-10 更晚產生，這顯示 IFN- $\gamma$  在「肺水腫」的發展過程中應是重要的角色。AG129 是一種缺乏第 I 型及第 II 型的 IFN 受體的老鼠，對於經由腹腔或經口服感染非老鼠適應型的腸病毒 71 型病毒株，具有感受性，並且發現感染的 AG129 老鼠的 IFN- $\gamma$  有顯著地上升。然而，IFN 訊息傳遞有缺陷的老鼠，可能導致免疫反應的型態有部分補償性的改變，意味著這動物模式應無法精確地反應出在免疫健全病患身上的免疫致病機轉 (Khong *et al.*, 2012)。亦有人使用 IFN- $\gamma$  受體剔除的老鼠 (ifngr knockout mice) 來證實 IFN- $\gamma$  受體對於保護感染老鼠免於引發麻痺或死亡是重要的。IFN- $\gamma$  受體剔除老鼠只有缺乏 IFN- $\gamma$ ，而不缺乏 IFN- $\alpha$ ，而這樣的老鼠感染後，表現麻痺和死亡的比率約有 80%(Liao *et al.*, 2014)。與症狀輕微的病患相比，嚴重腸病毒 71 型感染併有「肺水腫」的病患，其周邊血中的淋巴球，包含自然殺手細胞、CD4+ T 細胞及 CD8+ T 細胞的數量都顯著降低 (Wang *et al.*, 2003)。然而，「無變化的自然殺手 T 細胞 (invariant nature killer T cells, iNKT cells)」是一種特殊的 T 細胞亞群，表達無變化的  $\alpha\beta$  型 T 細胞受體 (T cell receptor)，以及在自然殺手細胞上，常見於許多細胞表面標記。老鼠感染腸病毒 71 型後，自然殺手細胞和無變化的自然殺手 T 細胞皆會產生 IFN- $\gamma$ 。腸病毒 71 型感染，首先活化無變化的自然殺手 T 細胞，可能因此促使自然殺手細胞活化。並且經由無變化的自然殺手 T 細胞的影響，巨噬細胞會大量地產生 IFN- $\gamma$ (Zhu *et al.*, 2015)。

發炎調節物質的多型性 (polymorphsim) 與疾病嚴重度有關。比起手足口症且無併發症的病患，腦幹腦炎病患帶有 IFN- $\gamma$ +874 A 對偶基因 (allele) 和 IL-10-1082 A 對偶基因的頻率顯著較高 (Yang *et al.*, 2012)。在病毒感染或暴露在某些細菌時，巨噬細胞、自然殺手細胞、樹突細胞及纖維母細胞 (fibroblasts) 能產生第 I 型 IFN( $\alpha$  和  $\beta$ )。在早期誘發並活化第 I 型 IFN 的作用，使得細胞能抵抗病毒感染、抑制病毒

複製、防止病毒散佈至身體其他部位 (Samuel *et al.*, 2001)。一種名為 polyriboinosinic : polyribocytidylic acid [poly (I : C)] 的 IFN 誘導物 (inducer) 也能改善腸病毒 71 型感染的存活率且降低組織的病毒效價，也與血清中的 IFN- $\alpha$ 、樹突細胞的比例、老鼠脾臟的主要組織相容性複合體 II (major histocompatibility complex class II) 和 IFN- $\alpha$  等的表現量增加有相關性 (Liu *et al.*, 2005)。在動物研究的模式來說，第 I 型 IFN 是一種用以控制腸病毒 71 型感染的基本先天性防禦機制。

IL-13 是一種 Th2 細胞激素，主要由 Th2 極化的 CD4+ T 細胞產生，具有抗發炎及抑制單核球或巨噬細胞的細胞毒殺的能力 (de Vries *et al.*, 1999)。「肺水腫」的病患比起「無併發症腦幹腦炎」的病患，血中有較高的 IL-13 (Wang *et al.*, 2003)。先前報導，IL-13 的增加是受到內生性的 IL-4 影響，曾在氣喘及過敏性皮膚炎 (atopic dermatitis) 病患有關氣管過度反應 (airway hyper-responsiveness) 及黏液 (mucus) 時產生 (Brightling *et al.*, 2010)。血中的 IL-4 在不同嚴重度腸病毒 71 型感染病患間沒有明顯變化，但是 IL-13 則在「無併發症腦幹腦炎」、「自主神經系統失調」及「肺水腫」的病患皆持續性上升。雖然 IL-13 與 IL-4 有部分重疊的作用特性，但 IL-13 對於 Th-2 引發的發炎反應或許是更重要的調節物質。在研究肺部的實驗中，IL-13 單獨即可引起作用。在「肺水腫」致病機轉中，過度產生的 IL-13 會促使肺血管通透性增加 (Will-Karp, 2004)。進而，IL-13 能夠從血流中選擇性的匯集發炎細胞，並且誘發大量趨化因子表現 (Will-Karp, 2004)。在腸病毒 71 型感染老鼠腦部，且於感染第三天再給予外加 IL-6、IL-13 及 IFN- $\gamma$  可以引起輕微的「肺水腫」並且會加重其肺部異常。因此，血中 IL-13 增加與腸病毒 71 型重症有相關，IL-13 具有加成性的促進發炎反應並造成腦特定部位的損傷，可能是腸病毒 71 型感染發展成「肺水腫」的必需因子之一 (Huang *et al.*, 2011)。

表一 / 腸病毒 71 型感染病患間和正常控制組的血中細胞激素濃度表現

細胞激素	腸病毒71型感染病患			
	正常控制組 (n = 15)	無併發症腦幹腦炎 (n = 34)	自主神經系統失調 (n = 25)	肺水腫 (n = 14)
IL-4	3.8 ± 1.7 (4.1)	4.5 ± 3.2 (3.1)	3.2 ± 1.6 (2.6)	3.4 ± 3.0 (2.4)
IL-5	3.2 ± 1.5 (3.0)	3.5 ± 2.7 (2.7)	3.9 ± 3.2 (3.1)	6.9 ± 12.9 (2.1)
IL-10	10.3 ± 4.1 (9.1)	12.1 ± 18.8 (7.6)	12.8 ± 16.1 (7.3)	109.3 ± 149.9 (109.3) <sup>a, b</sup>
IL-2	2.3 ± 1.1 (2.4)	6.9 ± 3.7 (6.2)	4.3 ± 1.7 (3.4)	39.3 ± 95.8 (6.9)
TNF- $\alpha$	31.8 ± 46.5 (10.8)	39.1 ± 122.4 (8.05)	39.9 ± 74.2 (6.6)	12.5 ± 12.9 (5.4)
IFN- $\gamma$	41.5 ± 24.7 (32.6)	100.0 ± 193.1 (34.1)	18.5 ± 57.3 (25.3)	137.7 ± 149.7 (82.1) <sup>c</sup>
IL-13	96.0 ± 14.5 (95.4)	113.7 ± 39.8 (118.3)	137.0 ± 59.7 (116.6)	139.4 ± 83.7 (98.7) <sup>d</sup>

備註：每筆數值代表的是平均值 ± 標準差 (中位數)。<sup>a</sup>  $P < .005$  是與無併發症腦幹腦炎的統計結果；<sup>b</sup>  $P < .005$  是與自主神經系統失調的統計結果；<sup>c</sup>  $P < .05$  是與自主神經系統失調的統計結果；<sup>d</sup>  $P < .005$  是與無併發症腦幹腦炎的統計結果 (Wang *et al.*, 2003)。

趨化因子是一群小分子量蛋白 (8~12kD)，是白血球移動 (leukocyte migration) 的主要調節者，並且參與許多不同種類的細胞生長、分化及活化。趨化因子是經由作用於 G 蛋白偶聯受體家族 (G-protein-coupled serpentine receptors superfamily) 的特性，從其他細胞激素中區別出來。依照其功能被分類成體內平衡 (homeostatic)/ 基本型 ( 調控細胞發育 ) 或誘發型 ( 發炎性 )。趨化因子的特徵是表現 3~4 個保守半胱胺酸殘基 (conserved cysteine residues)，並且可依據 N 端 (terminal) 半胱胺酸殘基的位置再細分成 4 個家族，分別是 CC、CXC、CX3C 及 XC 家族 (Rot A & von Andrian, 2004)。

IL-8 被視為是種嗜中性球特異性趨化因子 (neutrophil-specific chemotactic factor)，後來則歸類為 CXC 趨化因子家族的成員。IL-8 的主要功能是活化並匯集嗜中性球到感染或受傷的部位 (Kunkel *et*

*al.*, 1991)。「自主神經系統失調」病患的血中 IL-8 高於「肺水腫」病患。IL-8 與其他細胞激素已被證實能引發肺部的通透性改變。在急性呼吸窘迫症候群的病患，IL-8 被認為是主要的嗜中性球趨化物 (chemoattractant)。急性呼吸窘迫症候群病患的肺水腫抽取液和肺泡沖洗液的 IL-8 含量，也與存活率與疾病嚴重程度相關，存活案例的 IL-8 含量低於死亡案例 (Baughman *et al.*, 1996)。這或許能解釋在「自主神經系統失調」和「肺水腫」的腸病毒 71 型病患，IL-8 上升的現象。在急性肺損傷的動物模式，中和 IL-8 能降低肺發炎的嚴重度和組織受損 (Sekido *et al.*, 1993)。有廣泛性肺水腫的兔子，若給予人類化的抗 IL-8 抗體能阻止嗜中性球浸潤於肺部，能減輕急性損傷症候群 (Bao *et al.*, 2010)。這個研究提供有關 IL-8 在腸病毒 71 型感染併發肺水腫致病機轉中扮演角色的重要訊息。在腸病毒 71 型腦幹腦炎的病童身上，IFN- $\gamma$  表現增加，於是 IFN- $\gamma$  誘發的物質像是 IFN- $\gamma$  誘發蛋白 -10 (CXCL10/IP-10)、被 IFN- $\gamma$  誘發的單核因子 (CXCL9/MIG) 及 IFN 誘導的 T 細胞  $\alpha$  趨化因子 (Interferon-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant) 也有研究。血中的 IP-10、單核球趨化蛋白 -1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 及 MIG，在「肺水腫」病患中有顯著地高於「無併發症腦幹腦炎」病患 (Wang *et al.*, 2008)。IP-10 被認為是種可以預測多種疾病嚴重程度的生物標記。IP-10 的表現也可以在急性肺部發炎時會被 IFN- $\gamma$  提升。這與先前發現在「肺水腫」病患血中的 IFN- $\gamma$  與 IP-10 含量增加的結果一致 (Wang *et al.*, 2003)。在系統性發炎反應中，MCP-1 也被提到，在急性呼吸窘迫症候群的病患，其血中 MCP-1 濃度會增加 (Puneet *et al.*, 2005)。這替當病程從腦幹腦炎發展成「肺水腫」時，MCP-1 的血中含量增加的現象提供了解釋。MIG 在病毒感染後的宿主防禦過程中扮演角色 (Salazar-Mather *et al.*, 2000)。「肺水腫」病患的 MIG 增加現象，支持有保護性的 MIG 能透過促進 Th1 反應，進而對宿主防禦有幫助的想法。在全身性過度表現的趨化因子的連鎖反應在腸病毒 71 型引起的

免疫反應中扮演重要的角色。已經存在於體內的抗體可能在控制病毒感染或著加劇疾病嚴重度上有重要的角色。在給予腸病毒 71 型感染前，先給予老鼠低於中和性 (subneutralizing) 的抗腸病毒 71 型免疫球蛋白 G(anti-EV71 IgG)，血清中會顯著地增加 IFN- $\gamma$  與 MCP-1(Chen et al., 2013)。這些發現顯示在小鼠的動物模式中，低於中和濃度的抗體能透過抗體依賴性免疫加強反應 (antibody-dependent enhancement, ADE) 的感染機制，可直接增加部分細胞激素和趨化因子產生。IL-17A 是一種促發炎細胞激素，在對抗微生物感的宿主防禦中扮演必要的角色，並與許多發炎的反應相關。腸病毒 71 感染病患的周邊單核球發現有 retinoic acid-related orphan receptor-gamma t (ROR $\gamma$ t) 的增加，且血清中的 IL-17 及 IL-23 濃度增加。此外，在腸病毒 71 型感染病患的血中 Th17 細胞出現的頻率 (frequencies) 有顯著地高於控制組 (Chen et al., 2012)

表二 / 腸病毒 71 型感染不同疾病嚴重度病患，其血中及腦脊髓液的趨化因子之表現

趨化因子	腸病毒71型感染病患						
	正常控制組 (n = 13)	無併發症腦幹腦炎 (n = 12)		自主神經系統失調 (n = 9)		肺水腫 (n = 10)	
	血漿	血漿	腦脊髓液	血漿	腦脊髓液	血漿	腦脊髓液
	595.2 (391.7-860.9)	1766.3 (503-4844.9)	1957.1 (1027.7-2500)	1917.3 (378-4236.4)	2167.2 (503.2-2500)	3306.3 <sup>a</sup> (600.8-5885.8)	2495.7 (2469.8-2500)
MCP-1	350.0 (100.8-574.9)	215.6 (80.3-333.4)	598.6 (168.7-1367.1)	221.7 (75.8-432.5)	177.6 <sup>c</sup> (12.7-470.7)	1099.4 <sup>ab</sup> (174.2-4528.8)	191.1 (48.5-507.7)
MIG	849.3 (373.8-1192.8)	1014.4 (443.9-2131.2)	276.7 (14.9-564.5)	567.6 (103.7-1101.5)	298.8 <sup>c</sup> (112-481.2)	1819.3 <sup>ab</sup> (743.8-3187)	1123.1 <sup>ab</sup> (595.8-2251.3)
RANTES	14000.6 (13205.1-15493.1)	13037.7 (2778.1-14593.1)	19.5 (4.6-91.5)	12843.0 (4109-14965.9)	38.7 (5.1-157.8)	13479.5 (10131.1-14593.3)	18.8 (3.8-34.7)
IL-8	108.3 (19.6-416.1)	156.4 (21.7-352.5)	530.7 (17.2-1672.8)	1536.5 (17.7-8979.7)	219.1 (34.5-666)	5205.3 <sup>ab</sup> (94.6-20825.1)	481.1 (68.8-1842.4)

備註：<sup>a</sup>  $P < .05$  是無併發症腦幹腦炎與肺水腫的統計結果；<sup>b</sup>  $P < .05$  是自主神經系統失調與肺水腫的統計結果；<sup>c</sup>  $P < .05$  是無併發症腦幹腦炎與自主神經系統失調的統計結果 (Wang et al., 2008)。

## 5. 腸病毒 71 型感染中樞神經系統細胞激素反應

在中樞神經系統中，細胞激素本來就會有基本的表現量。在正常情況下，中樞神經系統中，細胞表現的細胞激素會被高度地整合並且受到嚴謹的調控。然而，在某些病理的情況，可能會短暫地失調，導致細胞激素不當的產生。細胞激素分子的大小及親水性雖然相對上不能滲透血腦屏障 (blood-brain barrier, BBB)，但在腸病毒 71 型腦幹腦炎的病患其血腦屏障完整，反而使得細胞激素先在中樞神經系統內作用。針對腸病毒 71 型腦幹腦炎，而反應的活化神經發炎的連鎖反應，是受到促進發炎及抗發炎細胞激素和趨化因子調節，發炎調節物質的主要來源是腦細胞。

在腦脊髓液中，IL-6 含量與腸病毒 71 型感染涉及中樞神經系統之間的關係 (Lin *et al.*, 2003)，可發現腦脊髓液的 IL-6 濃度，在中樞神經系統受到侵犯的第一天或第二天期間顯著地升高。然而，腦脊髓液的 IL-6 濃度在不同的臨床症候群：「肺水腫」、腦炎且 (或) 類脊髓灰質炎症候群 (poliomyelitis-like syndrome) 及無菌性腦膜炎發生的急性期期間並沒有顯著的變化 (Lin *et al.*, 2003)。不過，另一研究則證實有「肺水腫」及「自主神經系統失調」的病童與「無併發症腦幹腦炎」的病童相比，腦脊髓液中 IL-6 的濃度顯著地提高 (Wang *et al.*, 2007)。腦脊髓液的 IL-6 濃度會因腸病毒 71 型感染的疾病嚴重程度增加而增加。由於腦脊髓液中的 IL-6 超過血中的濃度，因此腦脊髓液中的 IL-6 應源自於腦。這些研究顯示 IL-6 可能參與這猛暴快速的疾病進程。

腸病毒 71 型造成「自主神經系統失調」或「肺水腫」的病童，其腦脊髓液中 IFN- $\gamma$  高於「無併發症腦幹腦炎」或「伊科病毒腦膜炎」。這顯示 IFN- $\gamma$  主要反應於嚴重的腸病毒 71 型感染 (Wang *et al.*, 2007)。IFN- $\gamma$  在正常下並不會表現在腦實質 (parenchyma)。IFN- $\gamma$  會作用於星狀細胞 (astrocytes)，促進膠質細胞增生 (gliosis) 及發炎。感染時發炎能保護腦部，卻也加劇腦傷。IFN- $\gamma$  的產生似乎對中樞神經系統有不利

的影響 (Olsson *et al.*, 1994)。

IL-1 能活化微膠細胞 (microglia) 和血管內皮細胞，進而匯集周邊淋巴球，產生神經發炎反應。IL-1 $\beta$  上升只有在有「肺水腫」的腸病毒 71 型感染的病患腦脊髓液中被發現，卻沒有反應在血中 (Wang *et al.*, 2007)。有人於大鼠身上發現，在血中 IL-1 $\beta$  不增加的情況下，IL-1 $\beta$  的信使核糖核酸 (mRNA) 含量，會在腦中增加 (Hosoi *et al.*, 2000)。這些發現支持 IL-1 $\beta$  可能是為了反應嚴重腸病毒 71 型感染，而在腦中產生的想法。IL-1 也可以調控由胺類 (amines) 調節的神經傳遞，胺類物質則像是正腎上腺素或多巴胺 (dopamine)。藍斑核 (locus coeruleus) 的活動，是腦內最重要的正腎上腺素來源，活體微注射 IL-1 $\beta$  之後會增加正腎上腺素。這個反應則會被 IL-1 $\beta$  受體的拮抗劑阻斷 (Borsody & Weiss, 2002-2003)。這或許能解釋由「自主神經系統失調」進展到「肺水腫」病患，腦脊髓液的 IL-1 $\beta$  的增加。

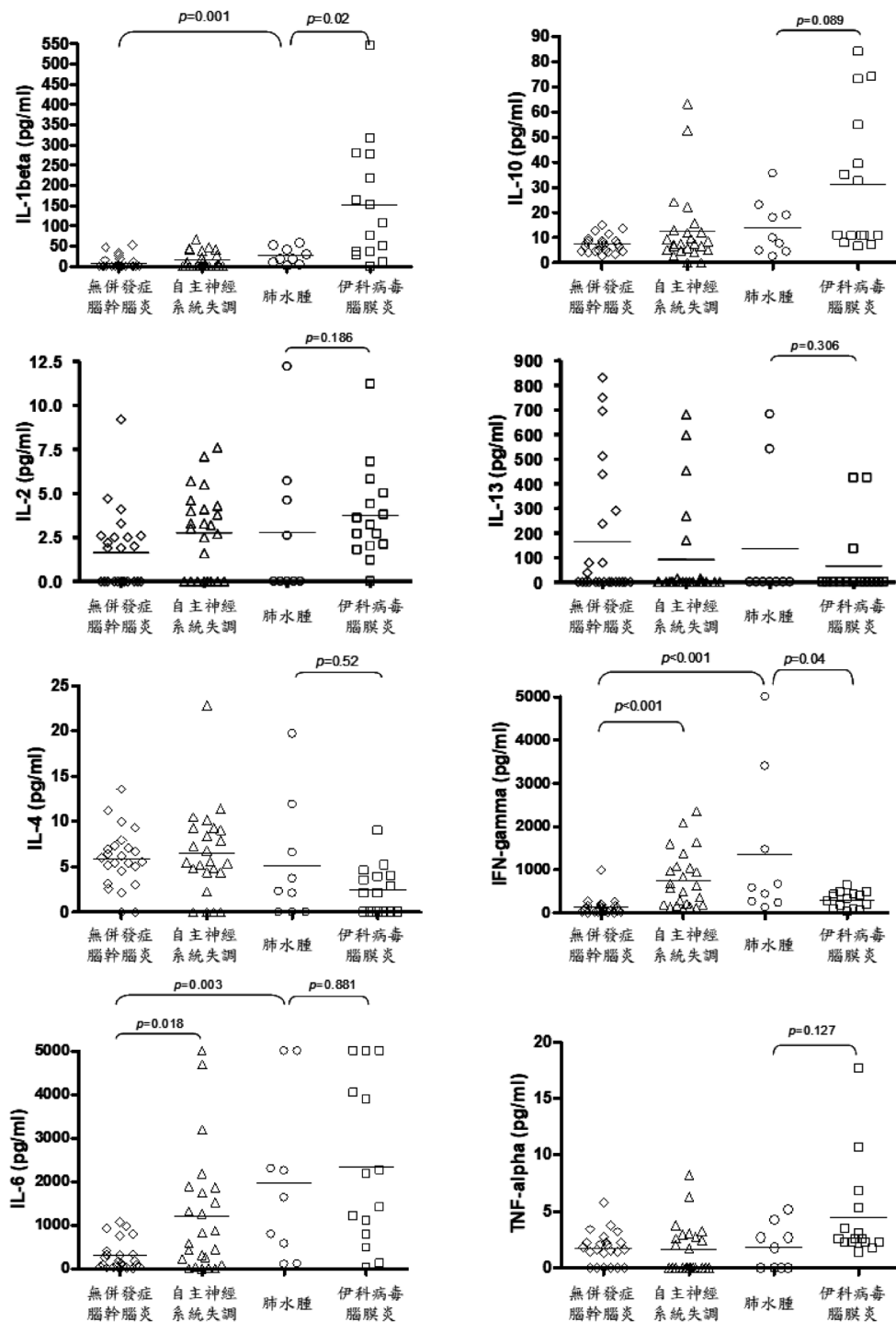
IP-10 跟它的受體：CXCR3 被認為在影響病理變化發展的物質中扮演重要角色，各別由中樞神經系統和浸潤於中樞神經系統的淋巴球表現，且只發生在有持續性中樞神經系統發炎的病患。也觀察到患有腸病毒腦膜炎的病患，其腦脊髓液中的 IP-10 濃度增加 (Lahrtz *et al.*, 1998)。IP-10 和 IL-8 在腸病毒 71 型腦幹腦炎病患的腦脊髓液中，顯著地高於控制組個案的血中濃度 (Wang *et al.*, 2008)。IP-10 顯著地表現於病毒性腦炎的老鼠的中樞神經系統 (Asensio & Campbell, 1997)。病毒感染後，在中樞神經系統中早期表現的 IP-10，對於開啟並維持有保護性的 Th1 免疫反應很重要，以大量產生的抗病毒細胞激素 -IFN- $\gamma$  為其特徵 (Asensio & Campbell, 1997; Hoffman *et al.*, 1999)。早期表現的 IP-10 似乎有助於將 Th1 T 淋巴細胞吸引至中樞神經系統，參與清除病毒。IP-10 缺乏則會顯著地降低老鼠的血清中 MIG 含量，以及腦中的 IFN- $\gamma$  和 CD8 T 細胞數量。IP-10 若沒有增加，則感染老鼠死亡率會增加 45%，並且伴隨降低組織對於病毒清除 (Shen *et al.*, 2013)。

腸病毒 71 型「肺水腫」病患的腦脊髓中 MIG 顯著高於「自主神經系統失調」及「無併發症腦幹腦炎」病患。MIG 的腦脊髓液 / 血漿比例有隨著疾病嚴重程度增加的趨勢 (Wang *et al.*, 2008)。在老鼠的腦內皮細胞的研究中，同時給予 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  會引發 MIG 產生 (Ghersa *et al.*, 2002)。在培養的老鼠星狀細胞和微膠細胞中，IFN- $\gamma$  能協同調控 IP-10 及 MIG (Carter *et al.*, 2007)。這可以支持先前的發現：「肺水腫」病患的腦脊髓液的 MIG 增加，可能與腦脊髓液中的 IL-1 $\beta$  及 IFN- $\gamma$  增加有關係。

## 6. 腸病毒 71 型感染的系統性免疫反應調節

靜脈注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin G, IVIG) 是一種多株 (polyclonal) 的免疫球蛋白，源自於大量混合的人類血清。靜脈注射免疫球蛋白不只被使用在無法自行進行有效免疫反應的免疫缺乏個體上當作替代性治療，對於自體免疫病患也能成為治療的選擇。靜脈注射免疫球蛋白已經被用於特定細菌或病毒感染疾病的治療療程，且其治療劑量高於替代性治療。靜脈注射免疫球蛋白治療的好處，在伴隨有系統性發炎免疫反應及器官受損的敗血症症候群的病患已被證實，推測是由於其抗發炎的作用 (Turgeon *et al.*, 2007)。目前認為的靜脈注射免疫球蛋白的作用機制能調控發炎反應，包含與 Fc 受體的交互作用、引發細胞凋亡 (apoptosis)、阻斷共同刺激分子 (co-stimulatory molecules)、干擾細胞激素網絡及中和致病的抗體 (Elovaara & Hietaharju, 2010)。

靜脈注射免疫球蛋白先前已經被預防性或治療性地用於對抗新生兒的腸病毒感染和免疫功能不全的宿主 (Abzug *et al.*, 1995)。在克沙奇病毒 (coxsackievirus) B3 感染引發心肌炎時，給予靜脈注射免疫球蛋白，能降低血中兒茶酚胺，因此，靜脈注射免疫球蛋白能透過調節交感神經活性，展現對心臟保護作用 (Kishimoto *et al.*, 2000)。另外，



圖四 / 腸病毒 71 感染不同疾病嚴重度病患及伊科病毒腦膜炎病患間，其腦脊髓液中各種細胞激素的表現 (Wang *et al.*, 2007)

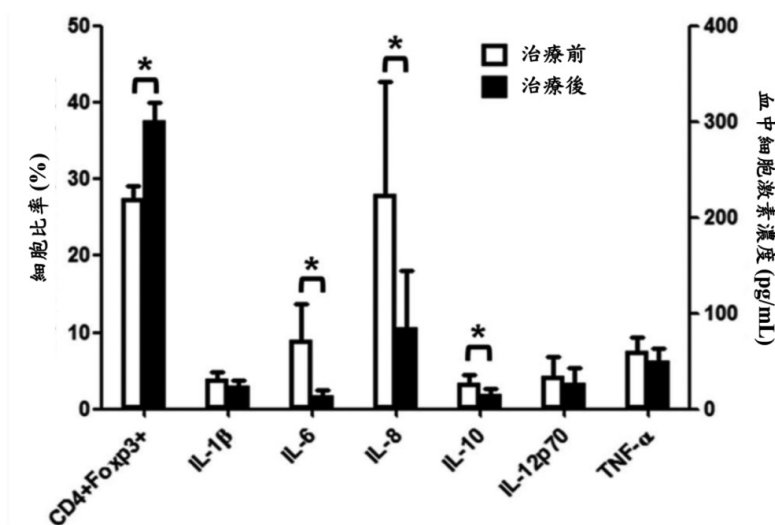
已經有足夠的證據顯示，細胞激素調節的嚴重全身性發炎反應與肺水腫有相關，且對於腸病毒 71 型腦幹腦炎病患會造成嚴重的結果 (Lin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007)。藉由靜脈注射免疫球蛋白調節細胞激素可以作為臨床治療的策略。研究證實「自主神經系統失調」和「肺水腫」病患給予靜脈注射免疫球蛋白之後，血中的 IL-6、IL-8、IL-10、IL-13 及 IFN- $\gamma$  皆會調降 (Wang *et al.*, 2006)。當病患在「自主神經系統失調」階段時，是接受靜脈注射免疫球蛋白治療的關鍵時刻。靜脈注射免疫球蛋白治療，是透過調節細胞激素風暴和降低交感神經的活性，使大部分病患獲得快速的改善，有更好的存活率，且會避免疾病惡化。

表三 / 腸病毒 71 型感染併發自主神經系統失調和肺水腫病患，給予靜脈注射免疫球蛋白前後，其血中細胞激素的變化

細胞激素 (pg/ml)	正常控制組 (n = 13)	自主神經系統失調 (n = 12)		肺水腫 (n = 10)	
		靜脈注射		靜脈注射	
		免疫球蛋白前	免疫球蛋白後	免疫球蛋白前	免疫球蛋白後
IL-1 $\beta$	7.5 $\pm$ 3.8	12.7 $\pm$ 21.2	7.0 $\pm$ 7.6	22.9 $\pm$ 15.8	20.1 $\pm$ 17.3
IL-6	64.9 $\pm$ 93.8	1520.4 $\pm$ 1369.3	58.4 $\pm$ 43.2 <sup>a</sup>	1816.4 $\pm$ 1097.1	101.5 $\pm$ 89.0 <sup>a</sup>
IL-8	324.0 $\pm$ 582	8355.4 $\pm$ 6467.0	1018.0 $\pm$ 587.1 <sup>a</sup>	2622.6 $\pm$ 2312.2	156.0 $\pm$ 82.8 <sup>a</sup>
IFN- $\gamma$	48.6 $\pm$ 24.8	24.4 $\pm$ 13.8	34.5 $\pm$ 25.0	170.3 $\pm$ 104.8	10.7 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>
TNF- $\alpha$	6.0 $\pm$ 6.5	9.7 $\pm$ 11.5	4.1 $\pm$ 4.5	3.8 $\pm$ 3.3	3.7 $\pm$ 2.9
IL-2	1.0 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 5.1	2.7 $\pm$ 5.3	3.4 $\pm$ 2.7	2.6 $\pm$ 2.1
IL-4	3.9 $\pm$ 2.1	3.5 $\pm$ 4.1	3.0 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 2.0
IL-5	3.1 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 3.8	2.9 $\pm$ 3.2	2.3 $\pm$ 1.8	2.4 $\pm$ 1.8
IL-10	5.8 $\pm$ 4.3	10.5 $\pm$ 9.1	7.3 $\pm$ 3.7	233.1 $\pm$ 188.9	12.9 $\pm$ 11.3 <sup>a</sup>
IL-13	65.6 $\pm$ 13.1	112.5 $\pm$ 33.6	105.0 $\pm$ 22.5	159.3 $\pm$ 80.2	79.1 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，統計方式為 Mann-Whitney Rank Sum Test (Wang *et al.*, 2006)。

過去未開始使用 milrinone 治療時期，腸病毒 71 型感染併發「肺水腫」病患的死亡率高達 80~90%，大部分的病患的死亡會發生在入院後的 6~12 小時之內。Milrinone 是聯吡啶磷酸雙酯酶 -3[bipyridine phosphodiesterase (PDE) III] 的抑制劑，同時具有促進心臟收縮 (inotropic) 及血管舒張 (vasodilation) 的特性。Milrinone 能增加心臟輸出量，且不會增加心肌過多氧氣的消耗，並且會降低全身血管阻力及肺微血管楔壓 (pulmonary capillary wedge pressure)(Shipley et al., 1996)。藉由細胞內的 PDE3 抑制環狀腺核苷單磷酸 (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP) 的分解可以減輕發炎、降低水腫形成、改善內皮細胞功能及導致肺血管舒張 (Hayashida et al., 1999)。Milrinone 對腸病毒 71 型引發「肺水腫」病患的治療效果的評估 (Wang et al., 2005)，發現給予 milrinone 治療比起未給予 milrinone 治療，有較低的死亡率。且交感神經性心搏過速、白血球及血小板數量也會降低。比起控制組，給予 milrinone 治療病患的血中 IL-13 也顯著降低。Milrinone 治療對於對腸病毒 71 型引發「肺水腫」病患的有效性已經在臨床研究中被證實 (Wang et al., 2005; Chi et al., 2013)。在嚴重的腸病毒 71 型感染，milrinone 不僅能增加 CD4+Foxp3+ 表現的比例，也能降低血中的細胞激素，像是 IL-6、IL-8 及 IL-10(圖四)。此外，比起手足口症或腦幹腦炎的病患，血中環狀腺核苷單磷酸在「自主神經系統失調」或「肺水腫」病患則顯著降低。然而，在 milrinone 治療之後，環狀腺核苷單磷酸含量會再回升 (Wang et al., 2014)。因此，milrinone 對於有生命威脅性的腸病毒 71 型感染，提供了有助益的治療方法 (Wang, 2016)。



圖五 / 腸病毒 71 型感染併發自主神經系統失調或肺水腫病患，milrinone 治療前後，其 CD4+Foxp3+ 細胞的比例及血中細胞激素的變化 (Wang et al., 2014)

## 7. 總結

對於腸病毒 71 型感染而言，在中樞神經系統及全身性系統中產生的發炎細胞激素及趨化因子，是一個獨特的免疫反應。由腸病毒 71 型感染的免疫細胞釋放的細胞激素及趨化因子，直接或間接地影響疾病嚴重度。靜脈注射免疫球蛋白和 milrinone 對於嚴重腸病毒 71 感染所引起的發炎反應是適當的治療方法。能夠控制細胞激素網絡的替代性療法已有實驗在進行探討。期望對於基本的機制及參與細胞激素產生的發炎訊息傳遞路徑能夠有更好的了解，才能更有助於治療腸病毒 71 型感染。

## 致謝

以上研究由台灣國科會計畫 (NSC 92-2314-B-006-078, 93-2314-B-006-063, 94-2314-B-006-064, NSC 95-2314-B-006-109, 96-2314-B-006-033-MY2, 98-2314-B-006-002-MY3, 101-2314-B-006-014-MY3)、台灣科技部計畫 (MOST 104-2321-B-006-016, MOST 105-2321-B-006-008, MOST 106-2321-B-006-002) 及國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心的經費支持。感謝廖郁婷小姐協助文書整理。

## 參考文獻

- Abzug MJ, Keyserling HL, Lee ML, Levin MJ, Rotbart HA. Neonatal enterovirus infection: virology, serology, and effects of immune globulin. *Clin Infect Dis* 1995;20:1201-1206.
- Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78.
- Asensio VC, Campbell IL. Chemokine gene expression in the brains of mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Virol* 1997;71:7832-7840.
- Bao Z, Ye Q, Gong W, Xiang Y, Wan H. Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury. *Int Immunopharmacol* 2010;10:259-263.
- Baughman RP, Gunther KL, Rashkin MC, Keeton DA, Pattishall EN. Changes in the inflammatory response of the lung during acute respiratory distress syndrome: prognostic indicators. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:76-81.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JL. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997;15:749-795.
- Borsody MK, Weiss JM. Alteration of locus coeruleus neuronal activity by interleukin-1 and the involvement of endogenous corticotrophin-releasing hormone. *Neuroimmunomodulation* 2002-2003;10:101-121.
- Brightling CE, Saha S, Hollins F. Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Exp Allergy* 2010;40:42-49.
- Cameron MJ, Bermejo-Martin JF, Danesh A, Muller MP, Kelvin DJ. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus Res* 2008;133:13-19.
- Canna SW, Behrens EM. Making sense of the cytokine storm: a conceptual framework for understanding, diagnosing, and treating hemophagocytic syndromes. *Pediatr Clin N Am* 2012;59:329-344.
- Carter SL, Müller M, Manders PM, Campbell IL. Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 2007;55:1728-1739.

Chang LY, Lin TY, Hsu KH, Huang YC, Lin KL, Hsueh C, Shih SR, Ning HC, Hwang MS, Wang HS, Lee CY. Clinical features and risk factors of pulmonary edema after enterovirus 71-related hand, foot, and mouth diseases. *Lancet* 1999;354:1682-1686.

Chen IC, Wang SM, Yu CK, Liu CC. Subneutralizing antibodies to enterovirus 71 induce antibody-dependent enhancement of infection in newborn mice. *Med Microbiol Immunol* 2013;202:259-265.

Chen J, Tong J, Liu H, Liu Y, Su Z, Wang S, Shi Y, Zheng D, Sandoghchian S, Geng J, Xu H. Increased frequency of Th17 cells in the peripheral blood of children infected with enterovirus 71. *J Med Virol* 2012;84:763-767.

Chi CY, Khanh TH, Thoa le PK, Tseng FC, Wang SM, Thinh le Q, Lin CC, Wu HC, Wang JR, Hung NT, Thuong TC, Chang CM, Su IJ, Liu CC. Milrinone therapy for enterovirus 71-induced pulmonary edema and/or neurogenic shock in children: a randomized controlled trial. *Crit Care Med* 2013;41:1754-1760.

Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9815-9820.

de Vries JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy and Clin Immunol* 1999;102:165-169.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997;112: suppl. 321S-329S.

Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fields of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996;125:191-196.

Duell BL, Tan CK, Carey AJ, Wu F, Cripps AW, Ulett GC. Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64:295-313.

Elovaara I, Hietaharju A. Can we face the challenge of expanding use of intravenous immunoglobulin in neurology? *Acta Neurol Scand* 2010;122:309-315.

Ghersa P, Gelati M, Colinge J, Feger G, Power C, Papoian R, Salmaggi A. MIG - differential gene expression in mouse brain endothelial cells. *Neuroreport* 2002;13:9-14.

Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischemic damage. *Eur J Neurosci* 2000;12:2265-2272.

Haskó G. Receptor-mediated interaction between the sympathetic nervous system and immune system in inflammation. *Neurochem Res* 2001;26:1039-1044.

Hayashida N, Tomoeda H, Oda T, Tayama E, Chihara S, Kawara T, Aoyagi S. Inhibitory effect of milrinone on cytokine production after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1661-1667.

Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shih SR. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med* 1999;341:929-935.

Hoffman LM, Fife BT, Begolka WS, Miller SD, KarpusWJ. Central nervous system chemokine expression during Theiler's virus-induced demyelinating disease. *J Neurovirol* 1999;5:635-642.

Hosoi T, Yasunobu O, Nomura Y. Electrical stimulation of afferent vagus nerve induce IL-1 $\beta$  expression in the brain and activates HPA axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279: R141-R147.

Hsiung GD, Wang JR. Enterovirus infection with special reference to enterovirus 71. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33:1-8.

Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, Yeh TF. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 1999;342:936-942.

Huang MC, Wang SM, Hsu YW, Lin HC, Chi CY, Liu CC. Long-term cognitive and motor deficits following enterovirus 71 brainstem encephalitis in children. *Pediatrics* 2006;118:e1785-e1788.

Huang SW, Lee YP, Hung YT, Lin CH, Chuang JI, Lei HY, Su IJ, Yu CK. Exogenous interleukin-6, interleukin-13, and interferon-gamma provoke pulmonary abnormality with mild edema in enterovirus 71-infected mice. *Respir Res* 2011;12:147.

Kao SJ, Yang FL, Hsu YH, Chen HI. Mechanism of fulminant pulmonary edema caused by enterovirus 71. *Clin Infect Dis* 2004;38:1784-1788.

Khong WX, Foo DG, Trasti SL, Tan EL, Alonso S. Sustained high levels of interleukin-6 contribute to the pathogenesis of enterovirus 71 in a neonate mouse model. *J Virol* 2011;85:3067-3076.

Khong WX, Yan B, Yeo H, Tan EL, Lee JJ, Ng JK, Chow VT, Alonso S. A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection. *J Virol* 2012;86:2121-2131.

Kishimoto C, Takamatsu N, Kawamata H, Shinohara H, Ochiai H. Immunoglobulin treatment ameliorates murine myocarditis associated with reduction of neurohumoral activity and improvement of extracellular matrix change. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1979-1984.

Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res* 1991;17:17-23.

Lahrtz F, Piali L, Spanaus KS, Seebach J, Fontana A. Chemokines and chemotaxis of leukocytes in infectious meningitis. *J Neuroimmunol* 1998;85:33-43.

Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus. *J Biomed Sci* 2001;8:377-388.

Liao CC, Liou AT, Chang YS, Wu SY, Chang CS, Lee CK, Kung JT, Tu PH, Yu YY, Lin CY, Lin JS, Shih C. Immunodeficient mouse models with different disease profiles by in vivo infection with the same clinical isolate of enterovirus 71. *J Virol* 2014;88:12485-12499.

Liao YT, Wang SM, Wang JR, Yu CK, Liu CC. Norepinephrine and epinephrine enhanced the infectivity of enterovirus 71. *PLoS One* 2015;10:e0135154.

Lin TY, Hsia SH, Huang YC, Wu CT, Chang LY. Proinflammatory cytokine reactions in enterovirus 71 infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis* 2003;36:269-274.

Lin TY, Chang LY, Hsia SH, Huang YC, Chiu CH, Hsueh C, Shih SR, Liu CC, Wu MH. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: Pathogenesis and management. *Clin Infect Dis* 2002;34:suppl 2. S52-S57.

- Lin TY, Chang LY, Huang YC, Hsu KH, Chiu CH, Yang KD. Different proinflammatory reactions in fatal and non-fatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy. *Acta Paediatr* 2002;91:632-635.
- Lin YW, Chang KC, Kao CM, Chang SP, Tung YY, and Chen SH. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads. *J Virol* 2009;83:6477-6483.
- Lin YW, Wang SW, Tung YY, Chen SH. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234:1166-1173.
- Liu ML, Lee YP, Wang YF, Lei HY, Liu CC, Wang SM, Su IJ, Wang JR, Yeh TM, Chen SH, Yu CK. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* 2005;86:3263-3269.
- Martin S, Maruta K, Burkart V, Gillis S, Kolb H. IL-1 and IFN-gamma increase vascular permeability. *Immunology* 1988;64:301-305.
- McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:91-107.
- Nakane A, Okamoto M, Asano M, Kohanawa M, Minagawa T. Endogenous gamma interferon, tumor necrosis factor, and interleukin-6 in *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Infect Immun* 1995;63:1165-1172.
- Nazinitsky A, Rosenthal KS. Cytokine storms: systemic disasters of infectious diseases. *Infect Dis Clin Pract* 2010;18:188-192.
- Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 2009;15:794-798.
- Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine* 2005;29:169-175.
- Olsson T, Kelic S, Edlund C, Bakhiet M, Höjeberg B, van der Meide PH, Ljungdahl A, Kristensson K. Neuronal interferon- $\gamma$  immunoreactive molecule bioactivities and purification. *Eur J Immunol* 1994;24:308-314.
- Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardoso MJ, Solomon T. Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. *Lancet neurol* 2010;9:1097-1105.

Patel KP, Bergelson JM. Receptors identified for hand, foot and mouth virus. *Nat Med* 2009;15:728-729.

Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288: L3-L15.

Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:891-928.

Salazar-Mather TP, Hamilton TA, Biron CA. A chemokine to cytokine to chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 2000;105:985-993.

Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:778-809.

Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993;365:654-657.

Shen FH, Tsai CC, Wang LC, Chang KC, Tung YY, Su IJ, Chen SH. Enterovirus 71 infection increases expression of interferon-gamma-inducible protein 10 which protects mice by reducing viral burden in multiple tissues. *J Gen Virol* 2013;94:1019-1027.

Shiple JB, Tolman D, Hastillo A, Hess ML. Milrinone: basic and clinical pharmacology and acute and chronic management. *Am J Med Sci* 1996;311:286-291.

Skoner DP, Gentile DA, Patel A, Doyle WJ. Evidence for cytokine mediation of disease expression in adults experimentally infected with influenza A virus. *J Infect Dis* 1999;180:10-14.

Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardoso MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010;10:778-790.

Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76:16-32.

Turgeon AF, Hutton B, Fergusson DA, McIntyre L, Tinmouth AA, Cameron DW, Hébert PC. Meta-analysis: intravenous immunoglobulin in critically ill adult patients with sepsis. *Ann Intern Med* 2007;146:193-203.

- Wang SM, Chen IC, Liao YT, Liu CC. The clinical correlation of regulatory T cells and cyclic adenosine monophosphate in enterovirus 71 infection. *PLoS One* 2014;9:e102025.
- Wang SM, Ho TS, Lin HC, Lei HY, Wang JR, Liu CC. Reemerging of enterovirus 71 in Taiwan: the age impact on disease severity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1219-1224.
- Wang SM, Liu CC. Enterovirus 71: epidemiology, pathogenesis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:735-742.
- Wang SM, Liu CC. Update of enterovirus 71: epidemiology, pathogenesis and vaccine. *Expert Rev Anti-Infect Ther* 2014;12:447-456.
- Wang SM, Ho TS, Shen CF, Liu CC. Enterovirus 71, one virus and many stories. *Pediatr Neonatol* 2008;49:113-115.
- Wang SM, Lei HY, Huang KJ, Wu JM, Wang JR, Yu CK, Su IJ, Liu CC. Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: the roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *J Infect Dis* 2003;188:564-570.
- Wang SM, Lei HY, Huang MC, Su LY, Lin HC, Yu CK, Wang JL, Liu CC. Modulation of cytokine production by intravenous immunoglobulin in patients with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Clin Virol* 2006;37:47-52.
- Wang SM, Lei HY, Huang MC, Wu JM, Chen CT, Wang JN, Wang JR, Liu CC. Therapeutic efficacy of milrinone in the management of enterovirus 71-induced pulmonary edema. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:219-223.
- Wang SM, Lei HY, Su LY, Wu JM, Yu CK, Wang JR, Liu CC. Cerebrospinal fluid cytokines in various severity of enterovirus 71 brainstem encephalitis and echovirus meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:677-682.
- Wang SM, Lei HY, Yu CK, Wang JR, Su IJ, Liu CC. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis. *J Infect Dis* 2008;198:1002-1006.
- Wang SM, Liu CC, Tseng HW, Wang JR, Huang CC, Chen YJ, Yang YJ, Lin SJ, Yeh TF. Clinical spectrum of enterovirus 71 infection of children in southern Taiwan, with an emphasis on the neurological complications. *Clin Infect Dis* 1999;29:184-190.

Wang SM, Lu IH, Lin YL, Lin YS, Wu JJ, Chuang WJ, Lin MT, Liu CC. The severity of *Streptococcus pyogenes* infections in children is significantly associated with plasma levels of inflammatory cytokines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61:165-169.

Wang SM. Milrinone in Enterovirus 71 Brain Stem Encephalitis. *Front Pharmacol*. 2016;7:82.

Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004;202:175-190.

Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk H, Döcke W. Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 1998;4:808-813.

Yang J, Zhao N, Su NL, Sun JL, Lv TG, Chen ZB. Association of interleukin 10 and interferon gamma gene polymorphisms with enterovirus 71 encephalitis in patients with hand, foot and mouth disease. *Scand J Infect Dis* 2012;44:465-469.

Zhu K, Yang J, Luo K, Yang C, Zhang N, Xu R, Chen J, Jin M, Xu B, Guo N, Wang J, Chen Z, Cui Y, Zhao H, Wang Y, Deng C, Bai L, Ge B, Qin CF, Shen H, Yang CF, Leng Q. TLR3 signaling in macrophages is indispensable for the protective immunity of invariant natural killer T cells against enterovirus 71 infection. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004613.

## 第四節

---

# 腸病毒 71 型特異性之人類抗體 分泌 B 細胞反應內容

---

黃冠穎

兒童感染腸病毒 71 型後，在週邊血液可以偵測到明顯的病毒特異性抗體分泌 B 細胞反應，該反應與血清中和抗體效價成顯著正相關，該 B 細胞所衍生之人類抗腸病毒 71 型單株抗體庫闡明了病毒外殼的抗原決定位，強效之人類單株抗體可能具有預防及治療病毒感染的潛能。

## 抗體分泌 B 細胞

在對抗病毒的適應性免疫反應裡，抗體分泌 B 細胞和記憶型 B 細胞是構成病毒特異性體液免疫的最主要免疫細胞族群，其中抗體分泌 B 細胞能即時且持續的分泌病毒特異性抗體，這些抗體構成對抗病毒的重要防線之一。抗體分泌 B 細胞一般而言係指漿細胞 Plasma cell 與漿母細胞 Plasmablast，漿細胞被認為是分化完畢且位於骨髓，黏膜或脾臟等組織，在小鼠模型，這些漿細胞能持續分泌抗體達 1 年以上 [1]。漿母細胞 Plasmablast 則是漿細胞的前身，在平常時期，人類週邊血液裡的抗體分泌 B 細胞頻率相當低，但在接觸病毒抗原後，我們可以在人類週邊血液發現明顯但短暫的病毒特異性漿母細胞群 [2-4]，若利用酶聯免疫斑點法 ELISpot assay 來測量該急性期的病毒特異性漿母細胞頻率，該漿母細胞頻率和血清抗體效價有顯著的正相關性，動物模型顯示這些病毒特異性漿母細胞有部分會持續分化為漿細胞，並遷移至上述組織 [5]。

在人類，B 細胞於淋巴器官分化發展成抗體分泌 B 細胞時，會高度表達 CD27 和 CD38 並逐漸失去 CD20 的表達 [6-8]。然而，目前尚無單一細胞表面指標可以完全的區分人類漿細胞和漿母細胞，原則上他們表面均帶有 CD19 且欠缺 CD20 [9-10]，但最近有證據顯示，有少數的週邊血液抗體分泌 B 細胞 [11] 或骨髓漿細胞已失去 CD19 的表達 [12, 13]；此外，亦有少數的抗體分泌 B 細胞的表面仍帶有 CD20 [14]。另外，B 細胞的表面 Immunoglobulin 在分化至最終期的漿細胞時會消失掉，我們過去發現約 40% 到 60% 的週邊血液抗體分泌 B 細胞已失去表面 Immunoglobulin 的表達 [15]。

## 感染腸病毒 71 型後之抗體分泌 B 細胞反應

抗體免疫在保護宿主對抗腸病毒 71 型上扮演重要的角色 [16-20]。雖然在血清學上可以偵測到明顯的腸病毒 71 型抗體效價，但仍不清楚

究竟這些抗體如何發揮中和病毒的功能，以及分泌這些抗體之病毒特異性 B 細胞的抗原辨識特異性、廣度、以及抗病毒功能為何。因此，在細胞及分子層次建立免疫分析平台有所必要。

在 2012 年的腸病毒 71 型流行時期，我們納入實驗室確診的感染兒童，他們平均年齡約  $4.0 \pm 2.6$  歲，年齡範圍包括 7 個月大的嬰兒至 14 歲的青少年，九成以上的納入兒童有發燒症狀，有三成六的納入兒童在急性期曾出現肌躍型抽搐 Myoclonic jerk、抽筋 Seizure、肢體無力 Limb weakness、或步態不穩 Unsteady gait 等症狀。在腸病毒 71 型的急性感染過程中，我們用酶聯免疫斑點法與流式細胞儀偵測到週邊血液裏相當比例的腸病毒 71 型特異性抗體分泌 B 細胞的生成，這個細胞反應平均達每百萬個週邊血液單核細胞  $491 \pm 569$  個病毒特異性 G 型抗體分泌、 $472 \pm 566$  個病毒特異性 M 型抗體分泌、和  $182 \pm 261$  個病毒特異性 A 型抗體分泌 B 細胞。這樣的病毒特異性抗體分泌 B 細胞頻率約占當時整個週邊血液抗體分泌 B 細胞的 2 成 6 [21]。

此外，該腸病毒 71 型特異性抗體分泌 B 細胞反應在症狀開始第 1 至 3 天即可在週邊血液偵測到，在第 4 至 7 天達到高峰，而到第 8 至 11 天時在週邊血液明顯降低但仍可觀察到，該細胞反應在不同時間點分別約為每百萬個週邊血液單核細胞中  $343 \pm 412$ ， $1539 \pm 980$ ，和  $80 \pm 99$  個病毒特異性抗體分泌 B 細胞。當疾病進入恢復期時，已無法用酶聯免疫斑點法在週邊血液偵測到該病毒特異性抗體分泌 B 細胞反應，如之前所述，在人類接觸病毒抗原後，這些新分化生成的病毒特異性抗體分泌 B 細胞的最終發展仍不明朗，目前推測很可能有部分已凋亡，亦有相當部分已遷移至骨髓和其他黏膜組織 [5, 21]。

這些病毒特異性抗體分泌 B 細胞會在細胞表面高度表達人類白血球抗原 HLA-DR，且在細胞內高度表達核蛋白 Ki-67，這兩種蛋白的表達說明了該細胞群是宿主接觸病毒抗原後最近增殖並分化發展而來 [7, 9, 21, 22]。若分析該群 B 細胞的免疫球蛋白變異區基因 Immunoglobulin

variable domain gene，常可觀察到相當比例的細胞克隆擴充現象 Clonal expansion[23]。以病毒特異性 G 型抗體分泌 B 細胞而言，我們也發現在大多數的感染兒童，該群 B 細胞的免疫球蛋白變異區基因經歷了體超突變 Somatic hypermutation 過程，這說明了生發中心反應 Germinal center reaction 對於這群 B 細胞的分化生成占了重要角色 [23-25]。

該病毒特異性抗體分泌 B 細胞頻率與急性期血清中和抗體效價成顯著正相關，我們推測這些細胞所分泌的抗體中，有相當比例具有中和病毒的功能，促成病患急性期的恢復以及扮演下次病毒接觸時的保護免疫角色。過去證據顯示週邊血液的抗體分泌 B 細胞在適當培養環境下每天約可分泌 10-30pg 的抗體，若以 3 歲以上腸病毒 71 型感染兒童而言，可在急性期偵測到每百萬個週邊血液單核細胞中約有 750 個病毒特異性 G 型抗體分泌 B 細胞，我們預期在該 B 細胞反應的高峰期，每天最多約可分泌 16 毫克的抗腸病毒 71 型 G 型抗體 [6, 21, 26]。

### 抗腸病毒 71 型人類單株抗體庫

B 細胞在早期發展過程中進行了免疫球蛋白 V(D)J 基因節段的重組 V(D)J Recombination，這樣的重組先發生在重鏈基因，接續發生在輕鏈基因 [27-29]。藉由 V(D)J 重組，人類 B 細胞免疫球蛋白變異區具備了  $10^9$  的多樣性潛能，而後在淋巴器官反應中心的體細胞超突變過程，將多樣性潛能擴增至  $10^{12}$  [30]，雖然目前已有高通量測序的技術，仍無法準確測量人類抗體株庫的廣泛性 [31]，但依這樣的 B 細胞免疫球蛋白發展潛能，理論上可建構多樣且具變化彈性的抗體株庫，以因應可能面對的眾多抗原。

血清學的研究已被廣泛使用在分析血液內多株抗體中和腸病毒 71 型的效價與廣度，然而，過去已存在的血清抗體則同時與新誘發生成

的抗體在血清學方法上發揮作用 [18-20]。如果希望了解在特定時間點於抗原接觸後，急性期所優勢發展生成的抗體反應內容，感染所誘發的病毒特異性抗體分泌 B 細胞群是目前的主要研究對象之一。

我們由腸病毒 71 型特異性抗體分泌 B 細胞去建構人類抗腸病毒 71 型單株抗體庫，進一步的在抗體株的層次去剖析個體的病毒特異性抗體反應，以及個體在急性感染後所誘發生成之中和抗體所辨識的病毒抗原決定位。藉由篩選抗體逃脫突變株 Escape mutant selection，並分析逃脫病毒之外殼基因關鍵突變點，該方法可以定義出中和抗體所專一性攻擊病毒的特定區域。因此，我們繪製了抗腸病毒 71 型中和抗體所辨識之病毒外殼抗原決定位圖譜 Epitope，包括峽谷北部邊緣區 Canyon northern rim、峽谷底部區 Canyon floor、峽谷南部邊緣區 Canyon southern rim、3 倍軸高原區 3-fold plateau、以及 2 倍軸高原區 2-fold plateau 等五大區域 [23]。這些抗原中和決定位 Neutralizing epitope 屬於構型抗原決定位 Conformational epitope，且在不同基因型別間的腸病毒 71 型相當保守 [23]，也說明了人類抗腸病毒 71 型中和抗體具備了廣泛辨識腸病毒 71 型基因型別間的能力。

腸病毒 71 型的蛋白質外殼是由其 4 個基因產物 VP1-4 所組成的。蛋白 VP1、VP2 和 VP3 表現在病毒外殼的外側，而 VP4 則深埋在內側 [32]。利用小鼠單株抗體，過去研究已標定出數個腸病毒 71 型外殼的線性抗原中和決定位 Linear neutralizing epitope，例如在 VP1 的 GH loop( 第 215-220 胺基酸序列 ) 上 [33-36]、在 VP2 的 EF loop( 第 141-146 胺基酸序列 ) 上 [37]、以及在 VP3 的 Knob 區域 [38-39]。其他研究也顯示小鼠單株抗體可專一性地辨識位於 VP1 的第 145 個胺基酸 [40]。由過去的研究內容看來，小鼠單株抗體的腸病毒 71 型辨識內容尚無法代表人類急性感染後所誘發生成之抗腸病毒 71 型中和抗體的抗原辨識內容。

## 強效之抗腸病毒 71 型人類單株抗體的藥物潛能

兒童感染腸病毒 71 型後若發病，除了發生手足口症或咽峽炎外，有可能演變成中樞神經的侵犯或導致心肺衰竭等重症 [18-20]。目前台灣尚無上市的腸病毒 71 型疫苗可供施打，臨床上亦欠缺抗腸病毒 71 型的藥物可供使用。過去個案經驗顯示，施打含抗腸病毒中和效價之免疫球蛋白可有效地治療無 G 型球蛋白患者之腸病毒重症 [41, 42]，這也間接說明了被動免疫治療、例如安全且有效之抗病毒人類單株抗體、有潛力成為臨床介入的新型選項之一 [43-45]。

過去研究已利用 Human scavenger receptor B2(hSCARB2) 基因轉殖鼠建立了腸病毒 71 型感染的動物模型，雖然該模型仍有感染周齡和特定攻毒病毒株的限制，該活體內感染模型可觀察到神經學症狀以及致死性感染的臨床表現，亦可進行肌肉和神經組織的病毒量測定 [46, 47]。我們發現具備中和能力的抗腸病毒 71 型人類單株抗體能在 hSCARB2 基因轉殖鼠模型有效地預防病毒感染所致的神經學重症、生長遲緩與死亡。未來進一步了解這些中和單株抗體的活體內效力內容，與最佳的抗體給予途徑、劑量和時間，對於未來設計抗腸病毒 71 型人類單株抗體的臨床試驗將相當重要。

## 結論

隨著對於急性病毒感染後所生成之病毒特異性抗體分泌 B 細胞反應內容以及所衍生之人類抗體株庫的分析，抗體免疫反應在人類對抗病毒時所扮演的角色將有更深一層的了解。人類 B 細胞反應與抗體株庫的分析平台未來也將在新一代疫苗的研發與評估上扮演重要角色。針對那些具備強效且跨病毒基因型中和能力的代表性抗腸病毒 71 型單株抗體，建立抗體片段與腸病毒 71 型外殼的晶體複合物 Fab-EV71 complex，並對晶體結構進行高分辨率的 X 光繞射分析，這些資料將會顯著地推進我們對於病毒感染與抗體中和作用之分子機制的了解。

## 參考文獻

1. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):133-4.
2. Kyu SY, Kobie J, Yang H, Zand MS, Topham DJ, Quataert SA, Sanz I, Lee FE. Frequencies of human influenza-specific antibody secreting cells or plasmablasts post vaccination from fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods*. 2009 Jan 1;340(1):42-7.
3. Huang KY, Li CK, Clutterbuck E, Chui C, Wilkinson T, Gilbert A, Oxford J, Lambkin-Williams R, Lin TY, McMichael AJ, Xu XN. Virus-specific antibody secreting cell, memory B-cell, and sero-antibody responses in the human influenza challenge model. *J Infect Dis*. 2014 May 1;209(9):1354-61.
4. Carter MJ, Mitchell RM, Meyer Sauteur PM, Kelly DF, Trück J. The Antibody-Secreting Cell Response to Infection: Kinetics and Clinical Applications. *Front Immunol*. 2017 Jun 1;8:630.
5. Roth K, Oehme L, Zehentmeier S, Zhang Y, Niesner R, Hauser AE. Tracking plasma cell differentiation and survival. *Cytometry A*. 2014 Jan;85(1):15-24.
6. Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D, Klein B. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*. 2009 Dec 10;114(25):5173-81.
7. Caraux A, Klein B, Paiva B, Bret C, Schmitz A, Fuhler GM, Bos NA, Johnsen HE, Orfao A, Perez-Andres M; Myeloma Stem Cell Network. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica*. 2010 Jun;95(6):1016-20.
8. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar;15(3):137-48.
9. Wrammert J, Smith K, Miller J, Langley WA, Kokko K, Larsen C, Zheng NY, Mays I, Garman L, Helms C, James J, Air GM, Capra JD, Ahmed R, Wilson PC. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature*. 2008 May 29;453(7195):667-71.

10. Ellebedy AH, Jackson KJ, Kissick HT, Nakaya HI, Davis CW, Roskin KM, McElroy AK, Oshansky CM, Elbein R, Thomas S, Lyon GM, Spiropoulou CF, Mehta AK, Thomas PG, Boyd SD, Ahmed R. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nat Immunol.* 2016 Oct;17(10):1226-34.
11. Arumugakani G, Stephenson SJ, Newton DJ, Rawstron A, Emery P, Doody GM, McGonagle D, Tooze RM. Early Emergence of CD19-Negative Human Antibody-Secreting Cells at the Plasmablast to Plasma Cell Transition. *J Immunol.* 2017 Jun 15;198(12):4618-4628.
12. Mei HE, Wirries I, Frölich D, Brisslert M, Giesecke C, Grün JR, Alexander T, Schmidt S, Luda K, Kühl AA, Engelmann R, Dürr M, Scheel T, Bokarewa M, Perka C, Radbruch A, Dörner T. A unique population of IgG-expressing plasma cells lacking CD19 is enriched in human bone marrow. *Blood.* 2015 Mar 12;125(11):1739-48.
13. Halliley JL, Tipton CM, Liesveld J, Rosenberg AF, Darce J, Gregoret IV, Popova L, Kaminiski D, Fucile CF, Albizua I, Kyu S, Chiang KY, Bradley KT, Burack R, Slifka M, Hammarlund E, Wu H, Zhao L, Walsh EE, Falsey AR, Randall TD, Cheung WC, Sanz I, Lee FE. Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity.* 2015 Jul 21;43(1):132-45.
14. Quách TD, Rodríguez-Zhurbenko N, Hopkins TJ, Guo X, Hernández AM, Li W, Rothstein TL. Distinctions among Circulating Antibody-Secreting Cell Populations, Including B-1 Cells, in Human Adult Peripheral Blood. *J Immunol.* 2016 Feb 1;196(3):1060-9.
15. Huang KY, Rijal P, Schimanski L, Powell TJ, Lin TY, McCauley JW, Daniels RS, Townsend AR. Focused antibody response to influenza linked to antigenic drift. *J Clin Invest.* 2015 Jul 1;125(7):2631-45.
16. Yu CK, Chen CC, Chen CL, Wang JR, Liu CC, Yan JJ, Su IJ. Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice. *J Biomed Sci.* 2000 Nov-Dec;7(6):523-8.
17. Lin YW, Chang KC, Kao CM, Chang SP, Tung YY, Chen SH. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads. *J Virol.* 2009 Jul;83(13):6477-83.

18. Chang LY, King CC, Hsu KH, Ning HC, Tsao KC, Li CC, Huang YC, Shih SR, Chiou ST, Chen PY, Chang HJ, Lin TY. Risk factors of enterovirus 71 infection and associated hand, foot, and mouth disease/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics*. 2002 Jun;109(6):e88.
19. Zhu FC, Meng FY, Li JX, Li XL, Mao QY, Tao H, Zhang YT, Yao X, Chu K, Chen QH, Hu YM, Wu X, Liu P, Zhu LY, Gao F, Jin H, Chen YJ, Dong YY, Liang YC, Shi NM, Ge HM, Liu L, Chen SG, Ai X, Zhang ZY, Ji YG, Luo FJ, Chen XQ, Zhang Y, Zhu LW, Liang ZL, Shen XL. Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2013 Jun 8;381(9882):2024-32.
20. Zhu F, Xu W, Xia J, Liang Z, Liu Y, Zhang X, Tan X, Wang L, Mao Q, Wu J, Hu Y, Ji T, Song L, Liang Q, Zhang B, Gao Q, Li J, Wang S, Hu Y, Gu S, Zhang J, Yao G, Gu J, Wang X, Zhou Y, Chen C, Zhang M, Cao M, Wang J, Wang H, Wang N. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N Engl J Med*. 2014 Feb 27;370(9):818-28.
21. Huang KY, Lin JJ, Chiu CH, Yang S, Tsao KC, Huang YC, Lin TY. A Potent Virus-Specific Antibody-Secreting Cell Response to Acute Enterovirus 71 Infection in Children. *J Infect Dis*. 2015 Sep 1;212(5):808-17.
22. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1614-21.
23. Huang KY, Chen MF, Huang YC, Shih SR, Chiu CH, Lin JJ, Wang JR, Tsao KC, Lin TY. Epitope-associated and specificity-focused features of EV71-neutralizing antibody repertoires from plasmablasts of infected children. *Nat Commun*. 2017 Oct 2;8(1):762.
24. Priyamvada L, Cho A, Onlamoon N, Zheng NY, Huang M, Kovalenkov Y, Chokephaibulkit K, Angkasekwinai N, Pattanapanyasat K, Ahmed R, Wilson PC, Wrammert J. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. *J Virol*. 2016 May 27;90(12):5574-85.

25. Zhang Y, Tech L, George LA, Acs A, Durrett RE, Hess H, Walker LSK, Tarlinton DM, Fletcher AL, Hauser AE, Toellner KM. Plasma cell output from germinal centers is regulated by signals from Tfh and stromal cells. *J Exp Med*. 2018 Apr 2;215(4):1227-1243.
26. He XS, Sasaki S, Narvaez CF, Zhang C, Liu H, Woo JC, Kemble GW, Dekker CL, Davis MM, Greenberg HB. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *J Immunol Methods*. 2011 Feb 28;365(1-2):67-75.
27. Talmage DW. Allergy and immunology. *Annu Rev Med*. 1957;8:239-56.
28. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci*. 1957;20:67-69.
29. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983 Apr 14;302(5909):575-81.
30. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® <http://www.imgt.org>.
31. Georgiou G, Ippolito GC, Beausang J, Busse CE, Wardemann H, Quake SR. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol*. 2014 Feb;32(2):158-68.
32. Wang X, Peng W, Ren J, Hu Z, Xu J, Lou Z, Li X, Yin W, Shen X, Porta C, Walter TS, Evans G, Axford D, Owen R, Rowlands DJ, Wang J, Stuart DI, Fry EE, Rao Z. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Mar 4;19(4):424-9.
33. Ku Z, Ye X, Shi J, Wang X, Liu Q, Huang Z. Single Neutralizing Monoclonal Antibodies Targeting the VP1 GH Loop of Enterovirus 71 Inhibit both Virus Attachment and Internalization during Viral Entry. *J Virol*. 2015 Dec;89(23):12084-95.
34. Ye X, Fan C, Ku Z, Zuo T, Kong L, Zhang C, Shi J, Liu Q, Chen T, Zhang Y, Jiang W, Zhang L, Huang Z, Cong Y. Structural Basis for Recognition of Human Enterovirus 71 by a Bivalent Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody. *PLoS Pathog*. 2016 Mar 3;12(3):e1005454.
35. Shingler KL, Cifuentes JO, Ashley RE, Makhov AM, Conway JF, Hafenstein S. The enterovirus 71 procapsid binds neutralizing antibodies and rescues virus infection in vitro. *J Virol*. 2015 Feb;89(3):1900-8.

36. Liu CC, Chou AH, Lien SP, Lin HY, Liu SJ, Chang JY, Guo MS, Chow YH, Yang WS, Chang KH, Sia C, Chong P. Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of Enterovirus 71. *Vaccine*. 2011 Jun 10;29(26):4362-72.
37. Xu L, He D, Li Z, Zheng J, Yang L, Yu M, Yu H, Chen Y, Que Y, Shih JW, Liu G, Zhang J, Zhao Q, Cheng T, Xia N. Protection against lethal enterovirus 71 challenge in mice by a recombinant vaccine candidate containing a broadly cross-neutralizing epitope within the VP2 EF loop. *Theranostics*. 2014 Feb 18;4(5):498-513.
38. Kiener TK, Jia Q, Meng T, Chow VT, Kwang J. A novel universal neutralizing monoclonal antibody against enterovirus 71 that targets the highly conserved "knob" region of VP3 protein. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 May 29;8(5):e2895.
39. Plevka P, Lim PY, Perera R, Cardoso J, Suksatu A, Kuhn RJ, Rossmann MG. Neutralizing antibodies can initiate genome release from human enterovirus 71. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 11;111(6):2134-9.
40. Lee H, Cifuentes JO, Ashley RE, Conway JF, Makhov AM, Tano Y, Shimizu H, Nishimura Y, Hafenstein S. A strain-specific epitope of enterovirus 71 identified by cryo-electron microscopy of the complex with fab from neutralizing antibody. *J Virol*. 2013 Nov;87(21):11363-70.
41. Mease PJ, Ochs HD, Wedgwood RJ. Successful treatment of echovirus meningoencephalitis and myositis-fasciitis with intravenous immune globulin therapy in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *N Engl J Med*. 1981 May 21;304(21):1278-81.
42. Bearden D, Collett M, Quan PL, Costa-Carvalho BT, Sullivan KE. Enteroviruses in X-Linked Agammaglobulinemia: Update on Epidemiology and Therapy. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016 Nov - Dec;4(6):1059-1065.
43. Crowe JE Jr. Principles of Broad and Potent Antiviral Human Antibodies: Insights for Vaccine Design. *Cell Host Microbe*. 2017 Aug 9;22(2):193-206.
44. Wu Y, Jiang S, Ying T. Single-Domain Antibodies As Therapeutics against Human Viral Diseases. *Front Immunol*. 2017 Dec 13;8:1802.
45. Jin Y, Lei C, Hu D, Dimitrov DS, Ying T. Human monoclonal antibodies as candidate therapeutics against emerging viruses. *Front Med*. 2017 Dec;11(4):462-470.

46. Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Sep 3;110(36):14753-8.
47. Lin YW, Yu SL, Shao HY, Lin HY, Liu CC, Hsiao KN, Chitra E, Tsou YL, Chang HW, Sia C, Chong P, Chow YH. Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71. *PLoS One*. 2013;8(2):e57591.

## 第五節

---

# 腸病毒 71 型分子流行病學演化對 病毒致病機轉和抗原特性的影響

---

黃聖文 王貞仁

在亞太地區，腸病毒 71 型近二十年來持續造成一波波的流行，主要流行的病毒株之基因型亦不斷轉變。本篇中，由腸病毒 71 型分子演化及基因變異切入，深入探討對腸病毒 71 型抗原特性及其毒力因子之意義及影響。

## 1. 腸病毒 71 型

人類腸病毒 71 型 (EV-71) 屬於微小 RNA 病毒科的腸病毒屬，此屬包括了腸病毒 A 到 H 與 J 型，其中腸病毒 A 到 D 型為感染人類的腸病毒，這些腸病毒的分類，主要是依據腸病毒的基因序列進行分型 (1, 2)，而腸病毒 71 型則是屬於其中的腸病毒 A 型。腸病毒 A 型之中，以腸病毒 71 型及克沙奇 A 16 型病毒為最常引起手足口症的兩型病毒，然而，兩者之間不同的是腸病毒 71 型會進一步地造成嚴重的神經性疾病，包括無菌性腦膜炎、腦幹腦炎、類小兒麻痺病毒後肢麻痺、肺出血、肺水腫休克與心臟失去功能。目前對於腸病毒 71 型的神經毒性因子目前仍無定見 (3)，至今已經有許多的腸病毒 71 型細胞受體被發現，包括 SCARB2 (scavenger receptor class B, member 2)(4)、PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (5)、annexin II (6)、nucleolin (7)、sialylated glycans (8)、vimentin (9)、heparan sulfate (10) 等，然而，這些細胞受體的發現仍無法排除其他的分子蛋白，如：病毒蛋白或其他的細胞受體對於腸病毒 71 型神經系統感染可能扮演角色 (8, 11)。

腸病毒 71 型如同其他的腸病毒相同，均為無套膜正股單股 RNA 病毒，殼體由 60 個殼體蛋白組成，其中 VP1 到 VP4 蛋白組成一個對稱的二十面體結構。殼體蛋白中，VP1 到 VP3 暴露在病毒殼體的表面，而 VP4 蛋白則是在病毒殼體的內側，在病毒殼体外側的 VP1 到 VP3 蛋白則影響細胞受體結合以及抗原特性。腸病毒的基因長度約為 7500 個核苷酸，由殼體蛋白所包裹。相較於細胞 RNA 的 5 端與端帽 (cap) 的結構鍵結，腸病毒 71 型的 RNA 之 5 端是利用病毒蛋白 3B 所形成的 VPg 蛋白所結合。當病毒感染細胞時，病毒 RNA 會從病毒顆粒釋放至細胞質中，之後病毒蛋白會經由細胞的轉譯起始因子結合至病毒 RNA 上，促使核糖體結合到位於病毒 RNA 的 5 端非轉譯區域中的內部核糖體進入位置 (internal ribosome entry site) 進行轉譯。RNA 進行轉譯時，會製造出一個大的聚合蛋白，此蛋白會被病毒蛋白酶進行切割，先形

成 P1、P2、P3 三個大型病毒蛋白，P1 蛋白為殼體蛋白 VP1 到 VP4 所組成，P2 與 P3 蛋白則分別為 2A 到 2C 以及 3A 到 3D 蛋白所組成。在小兒麻痺病毒的研究中已發現，2A 蛋白酶負責切割 P1 與 P2-P3 蛋白，而 3CD 蛋白酶則可以切割其他的區域，使得原本的大型蛋白變成成熟的病毒蛋白，這些成熟的殼體病毒蛋白將會組裝病毒顆粒，成熟的非結構性蛋白則負責病毒的複製、造成細胞凋亡、抑制細胞免疫、與關閉宿主基因轉譯。因此，病毒蛋白酶在病毒的複製過程中扮演重要的角色 (12)。

而腸病毒 71 型擁有兩個病毒蛋白酶 2A 與 3C，屬於非結構性蛋白，除了幫助病毒蛋白進行切割，2A 蛋白酶會在腸病毒 71 型感染時，切割宿主細胞的真核細胞起始因子 4G (eIF-4G)，關閉宿主的基因轉譯 (13)。同時，3C 蛋白酶則除了針對腸病毒的聚合蛋白進行切割，同時也會切割 retinoic acid-inducible gene I 蛋白 (RIG-I)，抑制細胞的第一型干擾素反應，促使病毒可以大量的進行複製 (14)。另外，這兩個病毒蛋白酶在細胞中表現時，均會造成細胞凋亡 (13, 15)，由此可知，他們在病毒的複製過程中扮演多種角色。由此可知，當這些不同的病毒蛋白在病毒的演化過程中產生突變，將可能改變病毒與細胞蛋白的複雜結構，進而影響到病毒的複製與致病機轉。

## 2. 腸病毒 71 型流行病學與分子演化

### a. 腸病毒 71 型分子流行病學

目前，世界衛生組織西太平洋分部已強調腸病毒 71 型的流行已經對於公共衛生產生嚴重的影響 (16)，並且認為，在未來將有更多的相關手足口症病例會出現。腸病毒 71 型的 BrCr 病毒株是在 1969 年時於美國從一位中樞神經系統感染的病患身上所分離 (17)，之後到了 1974 年，總計有 20 個病毒株自腦炎或腦膜炎的病患中分離培養出來。在 1970 年代，在美國、澳洲、日本、匈牙利、瑞典、法國與保加利亞均報告

有多次的手足口症流行 (17-26)。這些流行之中主要出現的症狀包括無菌性腦膜炎、腦幹腦炎、呼吸性疾病、腸胃炎、以及手足口症 (27)。針對神經系統感染的病患進行組織病理檢查時，可以發現在中腦、脊髓、腦幹的灰質有損傷 (23)，另外，將這些病毒接種到恆河猴時，也可以發現有四肢麻痺或無力與中樞神經系統的損傷 (28)。由此可知，此時腸病毒 71 型已具神經毒力。

1970 年代之後，在 1980 年代出現第二波大流行，主要的流行區域為亞洲、巴西、荷蘭與美國，這段時期仍可持續發現受感染的病患出現神經系統的疾病，這波流行持續到 1990 年代 (29-34)。第三波的腸病毒 71 型大流行則是在 1997 年後出現，相較於之前兩波的流行，第三波的流行出現更多的神經系統感染並且致死病例大量上升。首先，馬來西亞開始出現手足口症與疱疹性咽峽炎爆發流行，共有 31 例腦炎的死亡病例 (35)，並且在 2000 與 2003 年有另外兩次的手足口症流行爆發，其中腸病毒 71 均為主要的流行病毒 (36)。同時期在 1998 年，台灣也出現腸病毒 71 型的爆發，共造成 78 位兒童或嬰兒的死亡 (3)，隨後在 1999、2000、2001 年分別造成 1 位、25 位、26 位死亡病例 (37)，下一波流行則是在 2004 與 2005 年間各造成 5 位與 16 位死亡病例 (38)，隨後在 2008 年與 2012 年則有另外兩波流行，分別造成 14 例與 2 例死亡病例 (39)。此時期在日本，手足口症的流行爆發也分別出現在 1984、1987、1990、1997、2000 年，隨後在 2003 年出現一波大規模的爆發流行 (40)。在新加坡，2000 年與 2006 年則出現 2 波手足口症的大流行，而在這期間，腸病毒 71 型在 2001、2003、2005/2006 年均為主要的腸病毒血清型 (41-43)。在中國，腸病毒 71 型的病例數也持續的上升，在 2004 年首次被報告 (44)，之後到 2008 年時，影響的區域從中國南部，持續擴散到中部以及北部，如：安徽、山東、上海、與北京等地，在 2008 年，安徽省阜陽市出現了一波大型的手足口症疫情，造成 99 例重症與 13 例死亡病例 (45)，之後並在中國各地每年持續出現大規模

的手足口症疫情，其中重症的病例多為腸病毒 71 型。此外，其他國家也有出現手足口症疫情，包括 1999 年於澳洲 (46)、2005 年於越南 (47)、2006 年於汶萊 (48)、2007 年於印度 (49)、2007 年於荷蘭 (50) 以及丹麥 (51, 52)，因此，持續地監控腸病毒 71 型將有助於我們了解病毒在人群之間散播的流行病學趨勢，以及了解腸病毒 71 在全球演化的情形，評估是否會進一步在全球造成流行。

腸病毒 71 型會依據其 VP1 區域序列，分成不同的基因型，目前的分型已包括基因型 A 到 G 型 (53, 54)。1970 年於美國所分離的 BrCr-CA-70 病毒株為基因型 A 型，基因型 A 型之後直到 2008 年才在中國甘肅地區再次被發現 (53, 55)。相較之下，基因型 B 與 C 型則在 1970 與 1980 年代持續地在世界上循環傳播，基因型 D 與 G 型主要是在印度發現，而 E 與 F 型則是在非洲發現 (54)，然而，基因型 D-G 僅為零星的案例，並沒有在當地造成流行爆發。基因型 B 與 C 型各自可以細分為基因型 B0-B5 以及 C1-C5，在這些基因型中，基因型 C3 型僅在 2000 年於韓國出現 (56)，其他的基因型則在不同的國家或區域出現過。在 1970 年代，在美洲與歐洲的國家包括美國 (53)、荷蘭 (50)、保加利亞 (21)、匈牙利 (57) 主要是出現基因型 B1 型與 B2 型，在 1980 年代則是在日本、台灣、美國、荷蘭、澳洲流型基因型 B2 型 (38, 40, 50, 58)，之後基因型 C1 型出現，取代了原本主要的基因型 B2 型，成為 1980 到 1990 年代前期的主要基因型。

從 1997 年之後，出現了史上最大規模的腸病毒 71 大流行，這波流行在亞太地區造成數以百計的兒童死亡，根據分子演化分析的結果，在 1997 年有多個不同的基因型包括 C2、B3、B4 型分別在此區域的人群之間散播傳染 (表一)，相較於之前 1990 年代早期流行的基因型 B2 與 C1 型，基因差異較大的基因型 B3 與 C2 型取而代之，成為 1990 年代後期手足口症大流行時期的主要基因型。

此後，腸病毒 71 型開始受到各國的重視，並且開始監測各國的腸

病毒流行。首先，在 1990 年代後期第一個報告腸病毒 71 型出現重症病例的國家馬來西亞，在 1997 年即出現基因型 C1、C2、B3、B4 型，其中致死病例主要是 B3 型為主。於馬來西亞的沙勞越，在 2000 年與 2003 年，基因型 B4 型與 B5 型分別取代了 B3 型成為主要的基因型。在此期間，基因型 C1 型則持續地零星出現在馬來西亞的沙勞越地區<sup>(35)</sup>。

同一時期，新加坡在 2000 年與 2006 年也出現兩波大流行，在 1997~1999 年馬來西亞流行時，新加坡只有零型的基因型 B3、B4、C1 出現，此後，基因型 B4 型於 2000 年爆發了新加坡第一次大規模流行<sup>(59, 60)</sup>，之後，基因型 B4 型與 C1 型零星地出現，直到 2006 年第二次爆發，由基因型 B5 型取代 B4，成為主要的流行基因型<sup>(43)</sup>。

相較於馬來西亞、新加坡主要流行的基因型以 B 型為主，台灣流行的基因型則出現 B 型與 C 型交替出現的現象。在 1998 年，台灣出現了第一次大規模的爆發，共有 129,106 例重症病例，伴隨著 78 例死亡病例<sup>(3)</sup>，此次流行主要是基因型 C2 型伴隨著約 10% 的基因型 B4 型，雖然腸病毒 71 型的病例數在隔年快速的下降，然而到 2000、2001 年卻再次大量上升，主要流行的基因型在此時由 C2 型轉換成 B4 型<sup>(61)</sup>，之後，到 2004 年之前，台灣持續地出現基因型 B4 型，而到了 2004 與 2005 年，基因型 C4 型取代 B4 型成為主要的基因型<sup>(38, 62)</sup>，在經過 2006 與 2007 兩年較低的流行期，2008 年病例數再次大量上升<sup>(39)</sup>，而新的基因型 B5 成為主要的基因型，隨後，基因型 B5 再次於 2012 年於台灣造成大流行<sup>(63)</sup>，之後至 2018 年，僅有零星的基因型 C4 與 B5 型報告病例。而基因變異分析的結果，亦顯示當腸病毒 71 型的基因變異增加時，之後會伴隨著出現大流行，而在台灣之前的趨勢，每隔 2-5 年即有一波大流行發生<sup>(64)</sup>，而同時也出現基因型 B 與 C 型轉換，或是基因變異大量增加的情形。因此，在馬來西亞、新加坡則會出現不同基因型 B 型亞型的轉換，而在台灣則可以發現基因型 B 型與 C 型之間的轉換，這些基因型的轉換與腸病毒 71 的流行爆發有其關聯性。

而不同的基因型 B 型與 C 型間的轉換也在日本可以發現 (65)，在 1997 年日本也出現許多腸病毒 71 的重症病例，是以基因型 C2 型為主，在 2000 年時，日本兵庫縣與山形縣的流行病毒株則以 B4 為主 (66, 67)，之後，到了 2003 年時，前期的流行是以 C4 型為主，但到了當年 10 月時，新的基因型 B5 型則出現取代了 C4 型，由此可知，在日本，腸病毒 71 基因型 B 型與 C 型之間的轉換的趨勢與台灣相當類似 (67)。

然而，在一些國家，腸病毒 71 型的基因型則是僅有單一的基因型，如中國，基因型 C4 持續地在中國造成手足口症的流行，尤其在 2008 年造成一波大流行爆發 (44, 68)；在越南，基因型 C1 型、C4 型、C5 型持續的出現，其中 C5 型是主要造成 2005 年當地手足口症流行的基因型 (47)；在柬埔寨，2012 年基因型 C4 型則造成了一次流行爆發 (69)。在澳洲，基因型 B3 造成了 1999 年於伯斯的大流行，而之後陸續地可以發現基因型 B4、C1、C2、C4 型出現 (46, 58)；同一時期，在 2007 年於歐洲的荷蘭，基因型 C2 型造成了 58 個重症的住院病例 (50)。同年在丹麥則是基因型 B5 型造成 24 名幼兒因神經系統感染而住院 (52)；在俄國也有發現基因型 C1、C2、C4 型，其中 C1 與 C2 型與歐洲的病毒株相近，C4 型則與中國流行的病毒株相近 (70)。持續地追蹤腸病毒 71 型在歐洲的流行，可以發現除了在 2007 年與荷蘭 (50) 與丹麥 (52) 的爆發之外，其他的地區僅有零星的案例，主要仍以基因型 C1、C2 與 C4 型為主 (71)。因此，若要對腸病毒 71 型的基因演化以及基因型轉變與病毒流行之間的關係有更進一步的了解，便需要更深入地全面性地探討全球各國的腸病毒 71 型的流行狀況。

#### **b. 腸病毒 71 型基因演化所發生的突變位點多位於非結構蛋白區域**

由上述可知，不同的腸病毒 71 型基因型持續地在人群之間傳播，然而，腸病毒 71 型的基因型主要是根據殼體蛋白 VP1 基因序列進行分類，當我們針對不同的基因型的病毒基因全長序列進行分析時，卻可

以發現，在非結構性蛋白基因區域，在腸病毒的演化過程中，會累積許多的基因突變 (63)。在台灣，2008 年與 2012 年的流行，均是由基因型 B5 型為主要的基因型，然而，這兩年的病毒雖然在殼體蛋白區域的變異不大，但是在非結構性蛋白基因區域卻可以發現許多胺基酸的突變，相同的情況也在中國發現，持續在中國流行的基因型 C4 型病毒株，雖然殼體蛋白區域未見明顯演化，然而也可以在非結構性蛋白產生許多突變，這些非結構性蛋白的突變即有可能影響到病毒複製及在宿主之間的傳播。

### c. 腸病毒 71 型常見基因重組之現象

當不同的腸病毒 71 型同時感染一個宿主時，便有可能會在宿主體內進行基因重組，這個過程將可以快速增加病毒的基因變異 (72)，可以更快速地適應不同的環境。當我們針對不同的基因型的病毒基因全長序列進行基因重組分析時 (39, 73)，我們發現，在 1997 年之後於亞太地區造成大流行的基因型，均為基因重組的腸病毒，包括兩型為不同基因型之間的重組，以及兩型為不同血清型的基因重組 (圖一)。基因型 B3 型為 1997 年造成的馬來西亞大流行的基因型，分析結果顯示，其 5 端非轉譯區、3D 聚合酶、和 3 端非轉譯區，均為與克沙奇病毒 A16 型重組的新型病毒株。在 1998 年於台灣以及日本造成大流行的基因型 C2 型，則是腸病毒 71 型殼體蛋白基因與克沙奇 A8 型病毒非結構性蛋白基因重組的病毒，這兩型的病毒可發現於不同血清型腸病毒的基因重組現象。基因型 B4 型於 1997 年在馬來西亞以及新加坡出現零星案例，之後於 2000 年在台灣、日本、馬來西亞、新加坡造成手足口症的流行爆發，成為主要的基因型。相較於基因型 B3 與 C2 是由不同血清型的病毒基因重組合成，基因型 B4 則是基因型 B3 的 5 端非轉譯區與殼體蛋白基因與基因型 B2 的非結構性蛋白基因進行重組。基因型 C4 則是在日本與台灣分別造成 2003 年與 2004-2005 年的流行，隨後在 2008 年造成中國的手足口症爆發，基因型 C4 型可以發現其為基因型 C

型的殼體蛋白基因與 B 型部分非結構性蛋白區域的重組 (39, 74-76)，而其 3C-3D 基因區域也與克沙奇 A16 型病毒相似 (75, 76)。總結以上發現，當腸病毒 71 型出現突變或是基因重組時，便會具有潛力會改變病毒在人群中散播的適應性，進而造成另一波的流行。

### 3. 腸病毒 71 型分子演化與抗原特性的影響

為了研究是否腸病毒 71 型基因型的差異會影響病毒的抗原特性，有許多研究針對不同基因型之間的交叉反應進行探討，然而，不同的血清來源會影響到不同的結果，當以天竺鼠的免疫血清進行中和試驗時 (77)，可以發現由基因型 B2 型與 C1 型產生的抗血清，對於基因型 B2、B4、B5 型的病毒有較高的中和效價，相較之下，對基因型 A、C1、C2、C4 的效價則較低，因此，不同血清型之間的抗原特性具有某種程度的差異。而當使用兔子免疫血清進行中和試驗時 (78)，則是發現由基因型 B2 型產生的抗血清，對基因型 B0、B1、B2 型病毒有高中和效價，但對於 C1、C2、A 的效價則較低，然而由基因型 C1 型產生的抗血清，則可以中和基因型 A、B、C。雖然兩個研究之間的結果有所差異，這指出腸病毒 71 型不同基因型之間具有抗原特性的差異。在我們的研究中 (39)，則是以腸病毒 71 型的病患血清，針對 1998-2008 年間台灣流行的腸病毒 71 型病毒株，進行中和試驗，我們並建立了抗原地圖來定量分析腸病毒 71 型的抗原演化 (圖二)，我們發現，腸病毒 71 型的基因型 B4 與 B1 均屬於同一個抗原族群，基因型 C2、C4 型則屬於另一個抗原族群，然而，2008 年造成台灣大流行的基因型 B5 則是屬於第三個抗原族群，由此可知，基因型的改變，有可能會進一步造成抗原特性的改變，這些抗原特性改變可能會伴隨著病毒逃避人群的群體免疫，使得病毒在人群之間散播的能力增加，而快速散播造成流行，這個現象也可能可以解釋為什麼在台灣與日本，會看到腸病毒 71 型的主要基因型在 B 與 C 之間交替出現。

我們進一步利用反向基因體學的方法 (79)，探討造成基因型 B4 型與 B5 型之間抗原特性不同的原因，我們發現，這兩種基因型在殼體蛋白上僅有 VP1-98、VP1-145、VP1-164 三個位點的胺基酸序列有差異，當我們分別針對這三個位點進行單位點或多重位點突變，並研究突變病毒株的抗原特性時，我們發現，這三個位點都對於腸病毒 71 型的抗原特性有所貢獻 (圖三)，並且其中 VP1-98 與 VP1-145 兩個位點會影響到病毒結合細胞的能力，進而可能影響病毒的感染能力。我們也同時比較了這三個位點的蛋白結構，也發現當腸病毒 71 型產生這三個位點的突變時，會造成病毒蛋白 VP1 在胺基酸結構鍊的方向或構型轉變，進而影響到病毒與中和抗體或細胞受體結合的能力。

除此之外，我們的研究發現，藉由抗原地圖，可以看到基因型 B1/B4 型、B5 型、C 型分成三個不同的抗原群 (39)，當我們比較這三個抗原群之間的 VP1 序列時，我們發現基因型 B 型擁有 VP1-43E、VP1-58T、VP1-184T 與 VP1-240S 的特殊胺基酸位點，而基因型 C2 型則是擁有 VP1-22R、VP1-31D 與 VP1-249I 的特殊胺基酸位點，基因型 B5 型則擁有 VP1-164D，與 C 型較相似，因此，這些基因的改變，可能會造成不同基因型抗原特性的差異，雖然其他的殼體蛋白基因也有可能扮演重要角色，這仍需要更多的研究來確認。

#### 4. 腸病毒 71 型分子演化與致病機轉的關係

腸病毒 71 型病毒在每一次的複製時，都持續地演化，由於 RNA 病毒擁有低正確性的 RNA 聚合酶，因此每個複製循環都會造成很多突變產生，同時，病毒也會透過基因重組，不同的病毒突變快速地進行不同的組合，而病毒透過基因突變以及重組，產生高度的基因變異，這些基因變異將影響病毒的特性，如：病毒感染力或是致病機制。

### A. 腸病毒 71 型分子演化：正向選擇壓力 (Positive selection pressure)

腸病毒 71 型在演化的過程中，已有一些證據指出，病毒基因特別是 VP1 蛋白基因受到了演化的壓力而突變。許多研究已經發現，VP1 蛋白基因在一些特別的位置，基因突變伴隨著胺基酸突變的比率會有增加的現象，這些位點，我們認為是受到正向選擇壓力而引發的病毒基因演化 (80)。如在 Shi 等人的研究中，發現有四個 VP1 的位點的演化，包括在澳洲的病毒株發現的 VP1-58 位置，在馬來西亞病毒株發現的 VP1-98 位置、在馬來西亞、新加坡、台灣、美國病毒株發現的 VP1-145 位置、在美國病毒株發現的 VP1-241 位置 (81)。在我們的研究 (39) 與 Chan 等人的研究 (82)，也發現 VP1-98 與 VP1-145 的位置為正向選擇位點。另外，Tee 等人則針對不同基因型的病毒株進行相同的分析，發現基因型 B4、C1 型的 VP1-98 位置、基因型 B2、B3、B4、C1 型的 VP1-145 位置、基因型 B3 的 VP1-237 位置、基因型 B4 與 C2 的 VP1-241 位置也受到正向選擇的壓力 (64)。相較於 VP1 蛋白受到正向選擇壓力，其他非結構性蛋白包括 3D 聚合酶並未偵測到選擇壓力，由於 VP1 蛋白為殼體結構蛋白，暴露在病毒表面，因此我們認為，這些演化壓力的來源，可能與群體抗體免疫有關，造成病毒的演化。另外，研究也發現腸病毒 71 型不同基因型也會如流感病毒演化，進行”階梯式”的演化 (64)，這代表著病毒隨著時間持續地進行突變，這指出，腸病毒 71 型也應是與流感病毒相似，在群體免疫的正向選擇中，持續地演化基因，伴隨著抗原特性的演化。因此，這些受到正向選擇壓力的 VP1 蛋白位點，有可能是中和抗體所辨識的位置。

### B. 腸病毒 71 型致病機轉：

許多腸病毒 71 型毒力因子也在小鼠感染模式中被發現，以下依照病毒基因順序分述基因變異對於腸病毒 71 型致病機轉的影響。

**a. 五端非轉譯區 (5'UTR)**

在我們之前針對 5 端非轉譯區與殼體蛋白基因的研究中，發現 5 端非轉譯區的 158 位點，會藉由控制病毒的內部核糖體進入位置的轉譯能力，影響病毒的複製，並且在小鼠模式中，亦可發現此位點會影響病毒的毒力 (83)。

**b. VP1、VP2 殼體蛋白**

我們在另一研究發現，VP1-145 位置的突變，是主要影響病毒感染小鼠毒力的位點，而若同時伴隨著 VP2-149 位點的突變時，可以發現病毒對小鼠毒力會經由影響病毒的 RNA 複製能力而再增強 (84)。另一個研究也發現這兩個基因區域對於腸病毒 71 型的毒力扮演重要角色，這個研究發現 5'UTR-494、VP1-145、VP1-241 等三個位點會出現在小鼠適應病毒株上，對於小鼠毒力產生影響 (85)。除此之外，VP1-244 位點也被認為是決定感染干擾素缺失小鼠的病毒毒力因子，此位點會決定病毒是否能夠進入神經系統感染 (86)。

**c. 3C 蛋白酶、3D 聚合酶**

除了 5 端非轉譯區與 VP1 蛋白外，非結構性蛋白也被認為會影響病毒毒力。在基因重組部分，研究腸病毒 71 型在 1998 年台灣大爆發前後的病毒時，我們比較了 3D 聚合酶區域的基因序列 (87)，我們發現 1998 年的病毒與 1986 年的病毒之間，出現了一個 3D-T251I 的突變，這個突變位點可以改變基因型 C2 型的溫度感受性，對於 39.5°C 的高溫有較好的抗性，另外，3D-T251I 突變也增加了病毒的毒力，並且在受感染的小鼠可以觀察到較嚴重的症狀。有趣的是，我們也發現了這個 1998 年台灣基因型 C2 型病毒的非結構性蛋白基因區域為來自克沙奇病毒 A8 型病毒 (39)，分析克沙奇病毒 A8 型病毒基因，其 3D-251 的相對應位置為胺基酸 isoleucine，與 1998 年腸病毒 71 型 C2 型胺基酸位點 3D-251I 的序列一致。因此，我們相信基因型 C2 型是自克沙奇 A8

型病毒非結構蛋白基因重組而來，因此改變了腸病毒 71 型的溫度感受性，使得病毒能在高溫下生長，同時也增加了在宿主身上的毒力，因此，基因改變會影響病毒的感染能力以及致病機轉。此外，3C 蛋白酶的第 69 個位點可以藉由影響蛋白酶活性而影響毒力<sup>(88)</sup>、3D 聚合酶的第 64 個與第 264 個位點藉由影響病毒複製的正確性而影響毒力等<sup>(89, 90)</sup>，造成病毒毒力改變，由此可知，病毒在演化的過程中，可以藉由各種不同的機制，改變在宿主體內的感染能力與細胞趨性，造成不同的毒力。

#### d. 病毒準種 (quasispecies) 對病毒致病力之影響

最近的研究中，我們更發現了，腸病毒 71 型病毒準種 (quasispecies) 會幫助腸病毒 71 型病毒感染人體<sup>(91)</sup>(圖四)，侵犯中樞神經系統，進一步地引發重症。我們的研究指出，在 1998 年的腸病毒 71 型基因型 C2 型中，會同時擁有 VP1-31D 與 VP1-31G 兩種不同的變異病毒株，而 VP1-31D 的病毒在輕症病患所分離的病毒比例較高，VP1-31G 的病毒在重症病患所分離的病毒比例較高，當研究 VP1-31D 與 VP1-31G 病毒的複製速率時，我們也發現，VP1-31D 較適合在腸胃道細胞生長，並在腸胃道細胞的適應力也較佳，相反的，VP1-31G 則是在神經細胞的複製較快，適應力也較好，而在病理解剖的病患檢體所分離的病毒中，也發現在腸胃道的檢體 VP1-31D 的比例較高，但是 VP1-31G 的比例隨著病毒經由脊髓、腦幹等感染途徑上逐步增加，由此我們認為即使在同一病患體內，腸病毒 71 型仍帶有不同的病毒基因變異，這些基因變異，可以幫助病毒克服人體內的感染瓶頸，增加進入中樞神經系統，或是克服宿主免疫反應的能力。

## 5. 結論

在亞太地區，腸病毒 71 型的流行趨勢持續上升，並造成一波波

的流行，腸病毒的疫苗目前僅有在中國地區經過臨床試驗核可上市 (92, 93)，其他地區尚未有腸病毒 71 型的疫苗可以使用，因此，在製造腸病毒疫苗時，選用適當的免疫原以產生足夠的中和抗體對抗腸病毒 71 型便相當重要。首先，不同基因型的病毒持續受到群體免疫的正向選擇壓力而演化，因此，需要持續地監控是否主要流行的病毒產生變異。第二，在主要流行的病毒株中，不論是血清型間或是基因型間持續地轉變，就目前的研究已經知道有至少三種不同的抗原群，只選擇其中的一個病毒株當作疫苗株來製造疫苗，可能並無法提供全面性的保護力，因此，找尋不同腸病毒 71 型之間的一致性抗原表位 (epitope)，可能是一個更適合的方法來使接受疫苗者，產生具有中和不同病毒能力的中和抗體，使疫苗具有更廣效的保護能力。這些研究發現影響抗原性的特殊位置應在疫苗設計時列入考量。

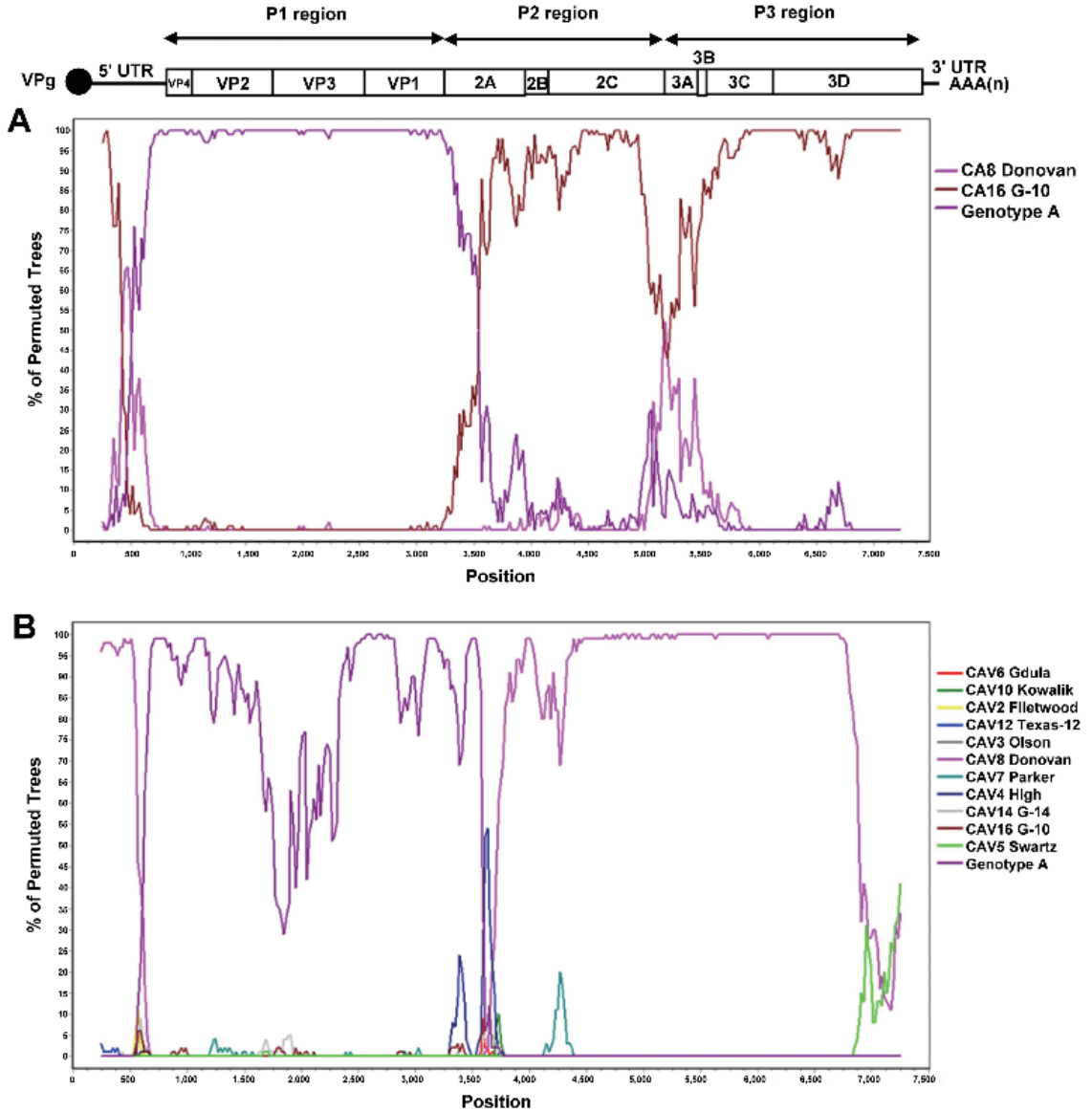
經由這些研究，我們對於腸病毒 71 型的流行與演化了解了更多，但是，未來仍需要持續地對於全基因序列演化進行監控，此外，病毒在自然界中的演化壓力選擇以及抗原性的改變，都應該在疫苗發展時考量這些因素。

表一 /1997-2014 年腸病毒 71 型全球流行之基因型

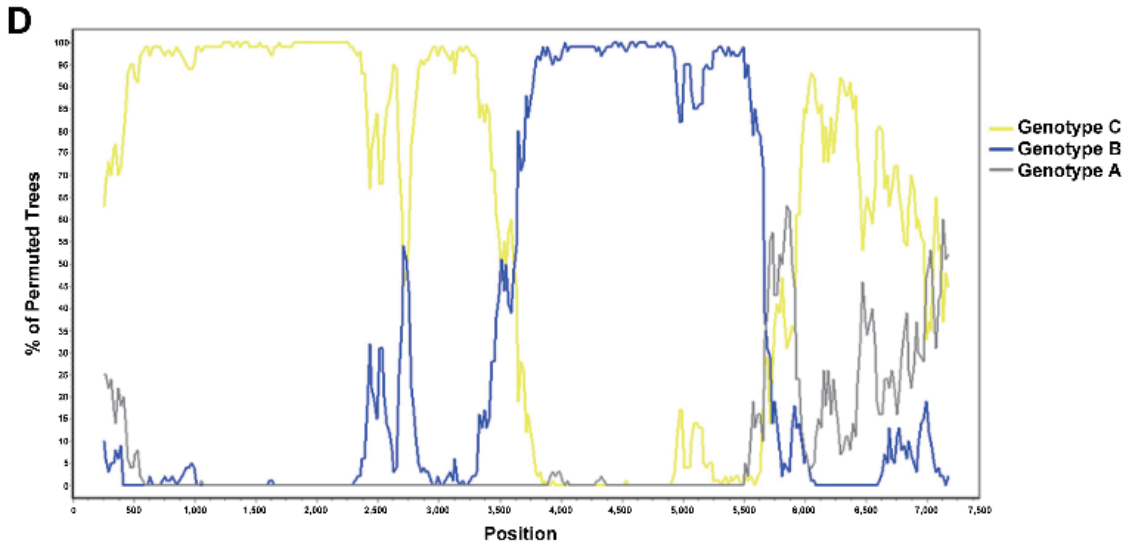
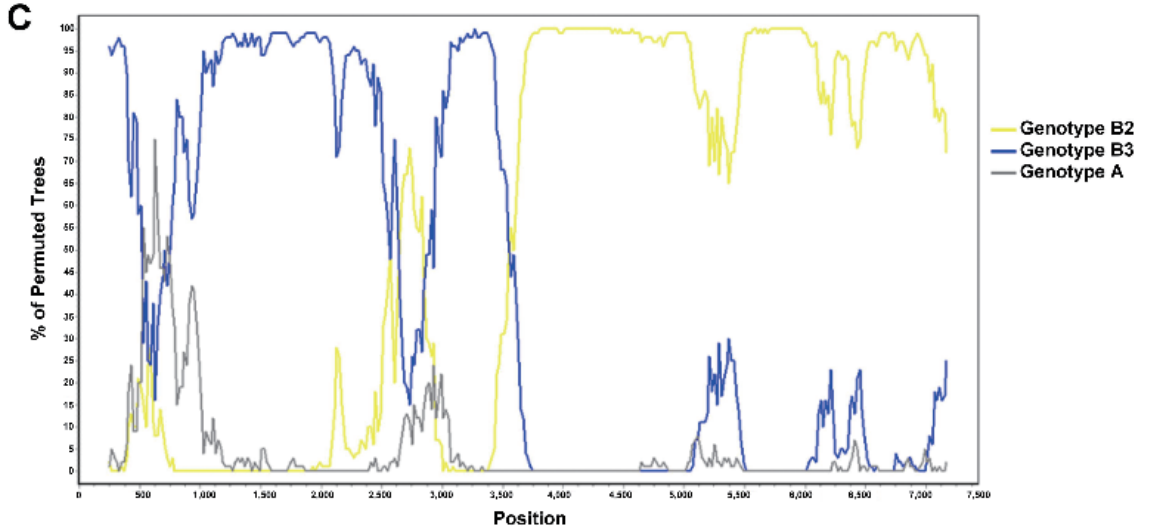
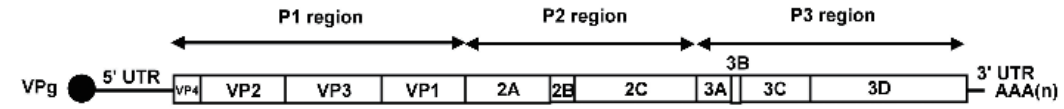
	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Malaysia	C1,C2, B3*,B4	C1	C1	B4,C1		C1	B5,C1		B5,C1	B5								
Singapore	B3,B4	B3,C1	B3	B4	B4	B4,C1				B5								
Taiwan		B4,C2	B4	B4	B4	B4,C4	B4,B5	C4	C4	C5	B5,C5	B5	B5	C4	C4	B5	C4	C4
Japan	C2, B3,B4	C2	C2	C2,B4	C2	B4,C2, C4	C4,B5	C4		C4	C4							
China		C4		C4	C4	C4	C4	C4			C4	A,C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4
Vietnam									C1,C4, C5							C4, B5, C5		
Australia		C2	B3,C2	B4,C1	B4,C1	C1	C1	C4										
Korea				C3					C4		C4		C1,C5	C4	C4	C4		
Netherlands	C1,C2		C2	C2	C1	C1,C2		C1,C2	C1,C2		C1,C2	C2						
UK		C1	C1,C2	C1	C1	C1		C1		C1,C2								
Norway						C1	C1											
Austria					C1	C1	C1	C4										
India													C1					
French																		
Cambodia																C4, B5		
Italy																		C2
Denmark																C4		C2
Russia					C1		C1			B5, C2		C1,C2, C4	C2,C4	C2,C4	C4	C4	C4	

\* 有底線註記者為當年主要流行之基因型

圖一 / 腸病毒 71 型常見基因重組現象

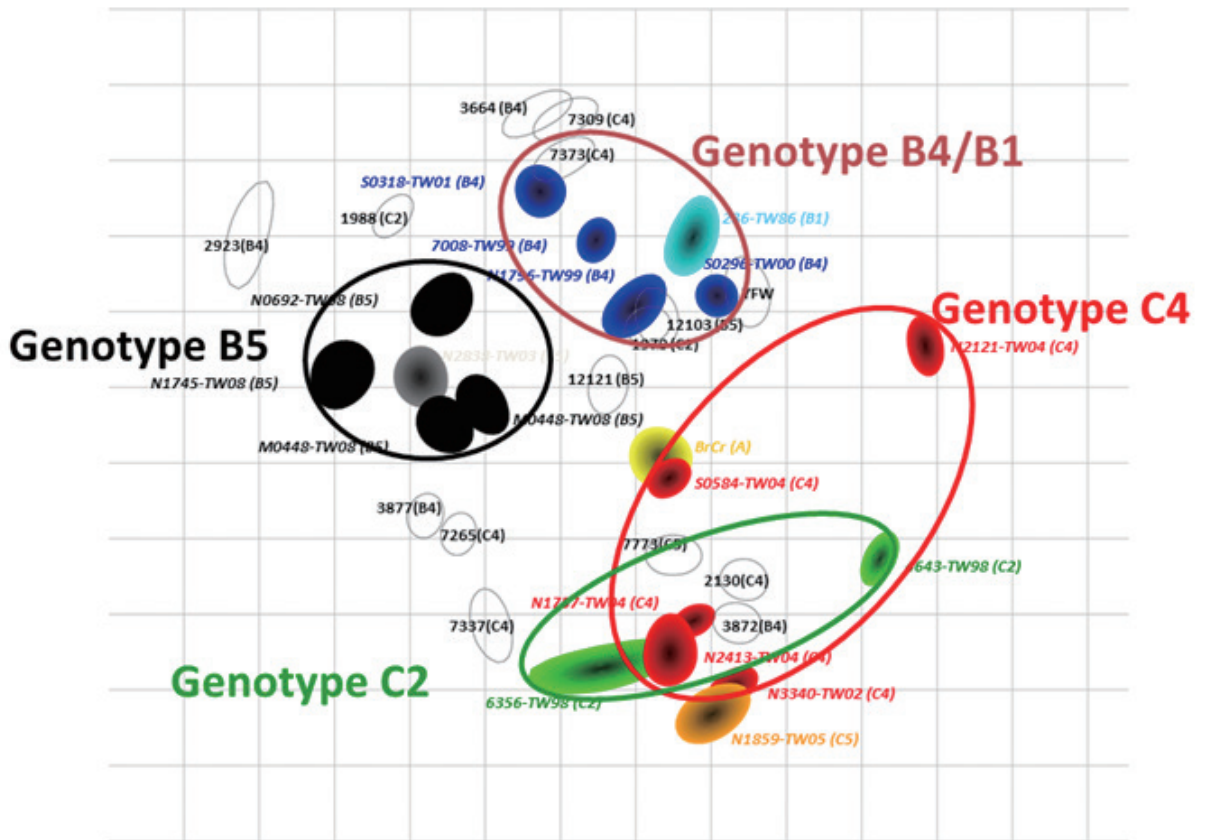


圖一 / 腸病毒 71 型常見基因重組現象 (續)



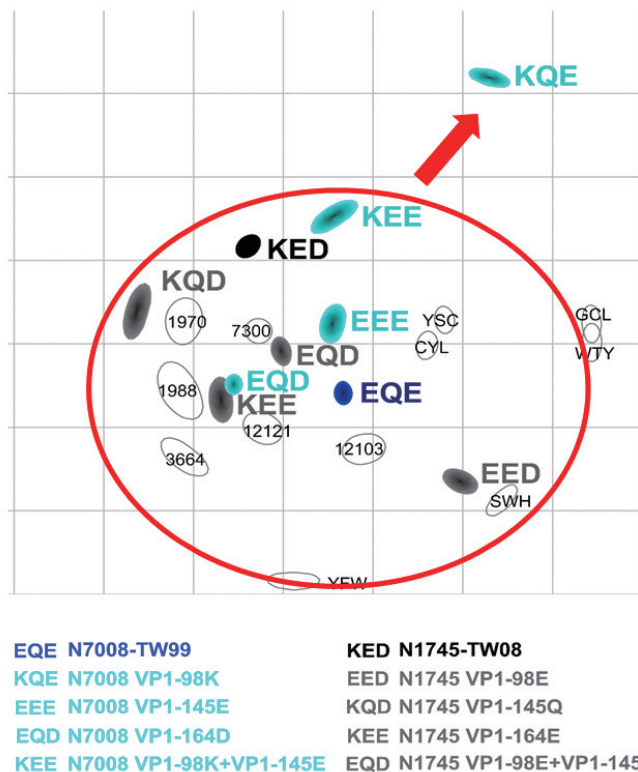
Window: 500bp, Step: 20 bp, GapStrip: on, Reps: 1000, Kimura (2-parameter), T/t: 10.0, Neighbor-Joining

腸病毒 71 型出現基因重組現象，包括 (A) 基因型 B3 型為腸病毒 71 型與克沙奇 A16 型重組；(B) 基因型 C2 型為腸病毒 71 型與克沙奇 A8 型重組；(C) 基因型 B4 型為基因型 B2 型與 B3 型重組；(D) 基因型 C4 型為基因型 B 與基因型 C 重組。Copyright © American Society for Microbiology, Huang et al. 2009 (39).



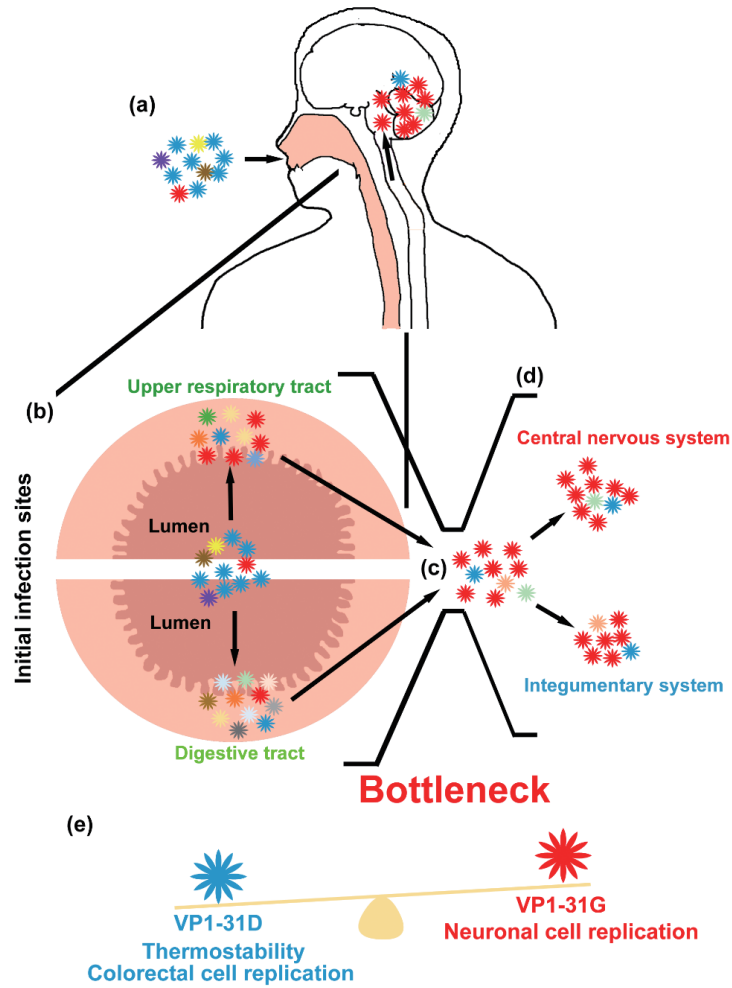
圖二 / 腸病毒 71 型抗原地圖

抗原地圖中不同顏色的文字與實心圓，分別標示與代表不同基因型的病毒株，可發現腸病毒 71 型的抗原特性分成三群 (空心橢圓之分群)，為基因型 B4/B1 型、基因型 B5 型、基因型 C2/C4 型。Copyright © American Society for Microbiology, Huang et al. 2009 (39).



圖三 / 腸病毒 71 型 VP1-98、VP1-145、VP1-164 位點突變影響抗原特性

不同的實心圓分別代表帶有不同 VP1-98、VP1-145、VP1-164 位點的病毒突變株，病毒標示三個英文字母則依序代表此病毒株於 VP1-98、VP1-145、VP1-164 三個位點的胺基酸序列，由此抗原地圖可以發現，KQE 病毒與其他的病毒抗原特性有明顯差異。若將 KQE 病毒與 EQE 病毒比較，可發現 VP1-K98E 突變影響抗原特性；將 KQE 病毒與 KEE 病毒比較，則發現 VP1-Q145E 突變影響抗原特性，另外，將 KQE 病毒與 KQD 病毒比較，則發現 VP1-E164D 突變影響抗原特性，由此可知，VP1-98、VP1-145、VP1-164 三個胺基酸序列會共同影響病毒抗原特性。Copyright © American Society for Microbiology, Huang et al. 2015 (79).



圖四 / 腸病毒 71 型人類體內病毒準種影響病毒侵犯神經系統之能力

(a) 當腸病毒 71 型感染人類宿主時，病毒的變異性很大，同時帶有 VP1-31D( 藍色 ) 與 VP1-31G( 紅色 ) 的病毒；(b) 病毒進入人體內後，會先在上呼吸道或是腸胃道進行複製；(c) 當病毒進入人體時，會遭遇到演化瓶頸，對病毒進行篩選；(d) 演化瓶頸的篩選讓 VP1-31G( 紅色 ) 的病毒成為感染中樞神經系統與皮膚系統的主要病毒；(e) 在體外實驗中也發現，VP1-31D 病毒有較好的溫度穩定性與在腸道細胞的複製能力，VP1-31G 病毒則在神經細胞複製較佳。Copyright © American Society for Microbiology, Huang et al. 2017 (91).

## 參考文獻

1. Pulli T, Koskimies P, Hyypia T. 1995. Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes. *Virology* **212**:30-38.
2. Brown BA, Pallansch MA. 1995. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res* **39**:195-205.
3. Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, Tsai SF, Wang JR, Shih SR. 1999. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* **341**:929-935.
4. Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, Takemura T, Koike S. 2009. Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. *Nat Med* **15**:798-801.
5. Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. 2009. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* **15**:794-797.
6. Yang SL, Chou YT, Wu CN, Ho MS. 2011. Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol* **85**:11809-11820.
7. Su PY, Wang YF, Huang SW, Lo YC, Wang YH, Wu SR, Shieh DB, Chen SH, Wang JR, Lai MD, Chang CF. 2015. Cell Surface Nucleolin Facilitates Enterovirus 71 Binding and Infection. *J Virol* **89**:4527-4538.
8. Yang B, Chuang H, Yang KD. 2009. Sialylated glycans as receptor and inhibitor of enterovirus 71 infection to DLD-1 intestinal cells. *Viol J* **6**:141.
9. Du N, Cong H, Tian H, Zhang H, Zhang W, Song L, Tien P. 2014. Cell surface vimentin is an attachment receptor for enterovirus 71. *J Virol* **88**:5816-5833.
10. Tan CW, Poh CL, Sam IC, Chan YF. 2013. Enterovirus 71 uses cell surface heparan sulfate glycosaminoglycan as an attachment receptor. *J Virol* **87**:611-620.
11. Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**:765-776.
12. Nicklin MJ, Krausslich HG, Toyoda H, Dunn JJ, Wimmer E. 1987. Poliovirus polypeptide precursors: expression in vitro and processing by exogenous 3C and 2A proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4002-4006.

13. Kuo RL, Kung SH, Hsu YY, Liu WT. 2002. Infection with enterovirus 71 or expression of its 2A protease induces apoptotic cell death. *J Gen Virol* **83**:1367-1376.
14. Lei X, Liu X, Ma Y, Sun Z, Yang Y, Jin Q, He B, Wang J. 2010. The 3C protein of enterovirus 71 inhibits RIG-I mediated IRF3 activation and Type I interferon responses. *J Virol* **84**:8051-61.
15. Li ML, Hsu TA, Chen TC, Chang SC, Lee JC, Chen CC, Stollar V, Shih SR. 2002. The 3C protease activity of enterovirus 71 induces human neural cell apoptosis. *Virology* **293**:386-395.
16. World Health Organization. 2009. Hand, foot and mouth disease a rising menace in Asia.
17. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. 1974. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* **129**:304-309.
18. Kennett ML, Birch CJ, Lewis FA, Yung AP, Locarnini SA, Gust ID. 1974. Enterovirus type 71 infection in Melbourne. *Bull World Health Organ* **51**:609-615.
19. Hagiwara A, Tagaya I, Yoneyama T. 1978. Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. *Intervirology* **9**:60-63.
20. Chumakov KM, Lavrova IK, Martianova LI, Korolev MB, Bashkirtsev VN, Voroshilova MK. 1979. Investigation of physicochemical properties of Bulgarian strain 258 of enterovirus type 71. Brief report. *Arch Virol* **60**:359-362.
21. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, Koroleva G, Vasilenko S, Brodvarova I, Nikolova M, Gyurova S, Gacheva M, Mitov G, Ninov N, Tsyika E, Robinson I, Frolova M, Bashkirtsev V, Martiyanova L, Rodin V. 1979. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* **60**:329-340.
22. Hagiwara A, Tagaya I, Komatsu T. 1979. Seroepidemiology of enterovirus 71 among healthy children near Tokyo. *Microbiol Immunol* **23**:121-124.

23. **Shindarov LM, Chumakov MP, Voroshilova MK, Bojinov S, Vasilenko SM, Iordanov I, Kirov ID, Kamenov E, Leshchinskaya EV, Mitov G, Robinson IA, Sivchev S, Staikov S.** 1979. Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **23**:284-295.
24. **Tagaya I, Takayama R, Hagiwara A.** 1981. A large-scale epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection in Japan in 1978. *Jpn J Med Sci Biol* **34**:191-196.
25. **Nagy G, Takatsy S, Kukan E, Mihaly I, Domok I.** 1982. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol* **71**:217-227.
26. **Blomberg J, Lycke E, Ahlfors K, Johnsson T, Wolontis S, von Zeipel G.** 1974. Letter: New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and-or hand, foot, and mouth disease. *Lancet* **2**:112.
27. **Chonmaitree T, Menegus MA, Schervish-Swierkosz EM, Schwalenstocker E.** 1981. Enterovirus 71 infection: report of an outbreak with two cases of paralysis and a review of the literature. *Pediatrics* **67**:489-493.
28. **Hashimoto I, Hagiwara A, Kodama H.** 1978. Neurovirulence in cynomolgus monkeys of enterovirus 71 isolated from a patient with hand, foot and mouth disease. *Arch Virol* **56**:257-261.
29. **Moses EB, Narian JP, Hatch MH, Yamauchi T.** 1987. Isolation of echovirus type 11 and enterovirus type 71 in a day care winter outbreak. *J Ark Med Soc* **83**:469-471.
30. **Samuda GM, Chang WK, Yeung CY, Tang PS.** 1987. Monoplegia caused by enterovirus 71: an outbreak in Hong Kong. *Pediatr Infect Dis J* **6**:206-208.
31. **Gilbert GL, Dickson KE, Waters MJ, Kennett ML, Land SA, Sneddon M.** 1988. Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement. *Pediatr Infect Dis J* **7**:484-488.
32. **Hayward JC, Gillespie SM, Kaplan KM, Packer R, Pallansch M, Plotkin S, Schonberger LB.** 1989. Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71. *Pediatr Infect Dis J* **8**:611-616.

33. da Silva EE, Fillipis AM, Schatzmayr HG, Cortes LC. 1990. Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **85**:131-132.
34. Takimoto S, Waldman EA, Moreira RC, Kok F, Pinheiro Fde P, Saes SG, Hatch M, de Souza DF, Carmona Rde C, Shout D, de Moraes JC, Costa AM. 1998. Enterovirus 71 infection and acute neurological disease among children in Brazil (1988-1990). *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**:25-28.
35. AbuBakar S, Chee HY, Al-Kobaisi MF, Xiaoshan J, Chua KB, Lam SK. 1999. Identification of enterovirus 71 isolates from an outbreak of hand, foot and mouth disease (HFMD) with fatal cases of encephalomyelitis in Malaysia. *Virus Res* **61**:1-9.
36. Podin Y, Gias EL, Ong F, Leong YW, Yee SF, Yusof MA, Perera D, Teo B, Wee TY, Yao SC, Yao SK, Kiyu A, Arif MT, Cardoso MJ. 2006. Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years. *BMC Public Health* **6**:180.
37. Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY, Lee CY. 2003. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg Infect Dis* **9**:291-293.
38. Lin KH, Hwang KP, Ke GM, Wang CF, Ke LY, Hsu YT, Tung YC, Chu PY, Chen BH, Chen HL, Kao CL, Wang JR, Eng HL, Wang SY, Hsu LC, Chen HY. 2006. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005: an emerging of subgenogroup C4 of EV71. *J Med Virol* **78**:254-262.
39. Huang SW, Hsu YW, Smith DJ, Kiang D, Tsai HP, Lin KH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Wang JR. 2009. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *J Clin Microbiol* **47**:3653-3662.
40. Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, Honzumi K, Kato A, Hiroshima T, Ishiko H, Suzuki H. 2006. Genetic diversity of enterovirus 71 associated with hand, foot and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003. *Pediatr Infect Dis J* **25**:691-694.
41. Chong CY, Chan KP, Shah VA, Ng WY, Lau G, Teo TE, Lai SH, Ling AE. 2003. Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases. *Acta Paediatr* **92**:1163-1169.

42. Shah VA, Chong CY, Chan KP, Ng W, Ling AE. 2003. Clinical characteristics of an outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* **32**:381-387.
43. Ang LW, Koh BK, Chan KP, Chua LT, James L, Goh KT. 2009. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007. *Ann Acad Med Singapore* **38**:106-112.
44. Yang F, Ren L, Xiong Z, Li J, Xiao Y, Zhao R, He Y, Bu G, Zhou S, Wang J, Qi J. 2009. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J Clin Microbiol* **47**:2351-2352.
45. Zhang Y, Zhu Z, Yang W, Ren J, Tan X, Wang Y, Mao N, Xu S, Zhu S, Cui A, Yan D, Li Q, Dong X, Zhang J, Zhao Y, Wan J, Feng Z, Sun J, Wang S, Li D, Xu W. 2010. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of Hand Foot and Mouth Disease in Fuyang city of China. *Virology* **7**:94.
46. McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, Davis S. 2001. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia. *Clin Infect Dis* **32**:236-242.
47. Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardosa MJ, McMinn PC. 2007. Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis* **13**:1733-1741.
48. AbuBakar S, Sam IC, Yusof J, Lim MK, Misbah S, MatRahim N, Hooi PS. 2009. Enterovirus 71 outbreak, Brunei. *Emerg Infect Dis* **15**:79-82.
49. Sarma N, Sarkar A, Mukherjee A, Ghosh A, Dhar S, Malakar R. 2009. Epidemic of hand, foot and mouth disease in West Bengal, India in August, 2007: a multicentric study. *Indian J Dermatol* **54**:26-30.
50. van der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, van der Avoort H, Dutch Working Group for Clinical V. 2009. Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol* **47**:2826-2833.
51. Fischer TK, Nielsen AY, Sydenham TV, Andersen PH, Andersen B, Midgley SE. 2014. Emergence of enterovirus 71 C4a in Denmark, 2009 to 2013. *Euro Surveill* **19**: pii: 20911.

52. **Badran SA, Midgley S, Andersen P, Bottiger B.** 2011. Clinical and virological features of enterovirus 71 infections in Denmark, 2005 to 2008. *Scand J Infect Dis* **43**:642-648.
53. **Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, Jr., Kennett ML, Pallansch MA.** 1999. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* **73**:9969-9975.
54. **Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairede A, Joffret ML, Deshpande JM, Dubot-Peres A, Heraud JM, de Lamballerie X, Delpeyroux F, Bailly JL.** 2014. Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PLoS One* **9**:e90624.
55. **Yu H, Chen W, Chang H, Tang R, Zhao J, Gan L, Liu B, Chen J, Wang M.** 2010. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes* **41**:1-4.
56. **Jee YM, Cheon DS, Kim K, Cho JH, Chung YS, Lee J, Lee SH, Park KS, Lee JH, Kim EC, Chung HJ, Kim DS, Yoon JD, Cho HW.** 2003. Genetic analysis of the VP1 region of human enterovirus 71 strains isolated in Korea during 2000. *Arch Virol* **148**:1735-1746.
57. **McMinn PC.** 2002. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* **26**:91-107.
58. **Sanders SA, Herrero LJ, McPhie K, Chow SS, Craig ME, Dwyer DE, Rawlinson W, McMinn PC.** 2006. Molecular epidemiology of enterovirus 71 over two decades in an Australian urban community. *Arch Virol* **151**:1003-1013.
59. **Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, Cho H, McMinn P.** 2003. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis* **9**:461-468.
60. **Chan KP, Goh KT, Chong CY, Teo ES, Lau G, Ling AE.** 2003. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerg Infect Dis* **9**:78-85.
61. **Wang JR, Tsai HP, Chen PF, Lai YJ, Yan JJ, Kiang D, Lin KH, Liu CC, Su IJ.** 2000. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998. II. Laboratory diagnosis and genetic analysis. *J Clin Virol* **17**:91-99.

62. Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, Yan JJ, Liu CC, Su IJ. 2002. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol* **40**:10-15.
63. Huang SW, Cheng HL, Hsieh HY, Chang CL, Tsai HP, Kuo PH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Wang JR. 2014. Mutations in the non-structural protein region contribute to intra-genotypic evolution of enterovirus 71. *J Biomed Sci* **21**:33.
64. Tee KK, Lam TT, Chan YF, Bible JM, Kamarulzaman A, Tong CY, Takebe Y, Pybus OG. 2010. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *J Virol* **84**:3339-3350.
65. Shimizu H, Utama A, Yoshii K, Yoshida H, Yoneyama T, Sinniah M, Yusof MA, Okuno Y, Okabe N, Shih SR, Chen HY, Wang GR, Kao CL, Chang KS, Miyamura T, Hagiwara A. 1999. Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. *Jpn J Infect Dis* **52**:12-15.
66. Fujimoto T, Chikahira M, Yoshida S, Ebira H, Hasegawa A, Totsuka A, Nishio O. 2002. Outbreak of central nervous system disease associated with hand, foot, and mouth disease in Japan during the summer of 2000: detection and molecular epidemiology of enterovirus 71. *Microbiol Immunol* **46**:621-627.
67. Mizuta K, Abiko C, Murata T, Matsuzaki Y, Itagaki T, Sanjoh K, Sakamoto M, Hongo S, Murayama S, Hayasaka K. 2005. Frequent importation of enterovirus 71 from surrounding countries into the local community of Yamagata, Japan, between 1998 and 2003. *J Clin Microbiol* **43**:6171-6175.
68. Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, Yan DM, Zhu SL, Wang DY, Ji F, Wang XJ, Gao YJ, Chen L, An HQ, Li DX, Wang SW, Xu AQ, Wang ZJ, Xu WB. 2009. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol* **44**:262-267.
69. Biswas T. 2012. Enterovirus 71 causes hand, foot and mouth disease outbreak in Cambodia. *Natl Med J India* **25**:316.

70. Akhmadishina LV, Ereemeeva TP, Trotsenko OE, Ivanova OE, Mikhailov MI, Lukashev AN. 2014. Seroepidemiology and molecular epidemiology of enterovirus 71 in Russia. *PLoS One* **9**:e97404.
71. Hassel C, Mirand A, Lukashev A, TerletskaiaLadwig E, Farkas A, Schuffenecker I, Diedrich S, Huemer HP, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Henquell C, Bailly JL. 2015. Transmission patterns of human enterovirus 71 to, from and among European countries, 2003 to 2013. *Euro Surveill* **20**:30005.
72. Lewis-Rogers N, Bendall ML, Crandall KA. 2009. Phylogenetic relationships and molecular adaptation dynamics of human rhinoviruses. *Mol Biol Evol* **26**:969-981.
73. Santti J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M. 1999. Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol* **73**:8741-8749.
74. Huang SC, Hsu YW, Wang HC, Huang SW, Kiang D, Tsai HP, Wang SM, Liu CC, Lin KH, Su IJ, Wang JR. 2008. Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005. *Virus Res* **131**:250-259.
75. Chan YF, AbuBakar S. 2006. Phylogenetic evidence for inter-typic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes. *BMC Microbiol* **6**:74.
76. Yip CC, Lau SK, Zhou B, Zhang MX, Tsoi HW, Chan KH, Chen XC, Woo PC, Yuen KY. 2010. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71. *Arch Virol* **155**:1413-1424.
77. Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T. 2009. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine* **27**:3153-3158.
78. Van der Sanden S, Van der Avoort H, Lemey P, Uslu G, Koopmans M. 2010. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses. *J Gen Virol* **91**:1949-1958.

79. Huang SW, Tai CH, Fonville JM, Lin CH, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Smith DJ, Wang JR. 2015. Mapping enterovirus A71 antigenic determinants from viral evolution. *J Virol* **89**:11500-6..
80. Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, Frankenberger EA, Griffith JP, Hecht HJ, Johnson JE, Kamer G, Luo M, Mosser AG, et al. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* **317**:145-153.
81. Shi W, Zhang Z, Dun A, Yu G, Zhuang D, Zhang Y, Zhu C. 2009. Positive Selection analysis of VP1 genes of worldwide human enterovirus 71 viruses. *Virologica Sinica* **24**:59-64.
82. Chen X, Zhang Q, Li J, Cao W, Zhang JX, Zhang L, Zhang W, Shao ZJ, Yan Y. 2010. Analysis of recombination and natural selection in human enterovirus 71. *Virology* **398**:251-261.
83. Yeh MT, Wang SW, Yu CK, Lin KH, Lei HY, Su IJ, Wang JR. 2011. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice. *PLoS One* **6**:e27082.
84. Huang SW, Wang YF, Yu CK, Su IJ, Wang JR. 2012. Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement. *Virology* **422**:132-143.
85. Chang CK, Wu SR, Chen YC, Lee KJ, Chung NH, Lu YJ, Yu SL, Liu CC, Chow YH. 2018. Mutations in VP1 and 5'-UTR affect enterovirus 71 virulence. *Sci Rep* **8**:6688.
86. Caine EA, Moncla LH, Ronderos MD, Friedrich TC, Osorio JE. 2016. A single mutation in the VP1 of enterovirus 71 is responsible for increased virulence and neurotropism in adult interferon-deficient mice. *J Virol* **90**:8592-8604.
87. Kung YH, Huang SW, Kuo PH, Kiang D, Ho MS, Liu CC, Yu CK, Su IJ, Wang JR. 2010. Introduction of a strong temperature-sensitive phenotype into enterovirus 71 by altering an amino acid of virus 3D polymerase. *Virology* **396**:1-9.
88. Li B, Yue Y, Zhang Y, Yuan Z, Li P, Song N, Lin W, Liu Y, Gu L, Meng H. 2017. A novel enterovirus 71 (EV71) virulence determinant: the 69th residue of 3C protease modulates pathogenicity. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:26.

89. **Sadeghipour S, McMinn PC.** 2013. A study of the virulence in mice of high copying fidelity variants of human enterovirus 71. *Virus Res* **176**:265-72.
90. **Sadeghipour S, Bek EJ, McMinn PC.** 2013. Ribavirin-resistant mutants of human enterovirus 71 express a high replication fidelity phenotype during growth in cell culture. *J Virol* **87**:1759-1769.
91. **Huang SW, Huang YH, Tsai HP, Kuo PH, Wang SM, Liu CC, Wang JR.** 2017. A selective bottleneck shapes the evolutionary mutant spectra of enterovirus A71 during viral dissemination in humans. *J Virol* **91**. pii: e01062-17.
92. **Hu Y, Zeng G, Chu K, Zhang J, Han W, Zhang Y, Li J, Zhu F.** 2018. Five-year immunity persistence following immunization with inactivated enterovirus 71 type (EV71) vaccine in healthy children: A further observation. *Hum Vaccin Immunother* **14**:1517-1523.
93. **Liu L, Mo Z, Liang Z, Zhang Y, Li R, Ong KC, Wong KT, Yang E, Che Y, Wang J, Dong C, Feng M, Pu J, Wang L, Liao Y, Jiang L, Tan SH, David P, Huang T, Zhou Z, Wang X, Xia J, Guo L, Wang L, Xie Z, Cui W, Mao Q, Liang Y, Zhao H, Na R, Cui P, Shi H, Wang J, Li Q.** 2015. Immunity and clinical efficacy of an inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy Chinese children: a report of further observations. *BMC Med* **13**:226.

## 第六節

---

# 利用小鼠模式探討淋巴細胞及細胞激素在腸病毒七十一型感染所扮演的角色

---

陳舜華 王莉菽

腸病毒七十一型感染在台灣造成嬰幼兒嚴重疾病已達二十年之久，仍需更多研究以了解病毒感染引起的免疫反應，及如何增加有益的免疫反應對抗病毒感染

腸病毒七十一型感染幼童，可引起嚴重的腦幹腦炎，併發心肺衰竭重症，導致患者死亡。全球在過去二、三十年，腸病毒七十一型的流行屢見不鮮，而其中在亞太地區更是頻繁爆發致死性流行。台灣最大規模、最嚴重的流行爆發於民國八十七年，造成超過十萬名幼兒感染，近五百名重症，及七十八例死亡 (1)，之後腸病毒七十一型經常在台灣引起致死性流行。在過去三十年間，雖然腸病毒七十一型感染全世界數以百萬計兒童，造成數以千計兒童死亡，但由於對於病毒的致病機制尚未釐清，目前仍缺乏有效的抗病毒藥物來控制致死性的流行。至今全球有多家公司著手研發抗腸病毒七十一型的疫苗，但目前僅在中國有疫苗上市，仍未對外銷售。

嬰兒及年幼孩童是腸病毒七十一型感染之高風險群，因此推論未成熟的免疫系統極可能與嬰幼兒感染的高發病率及死亡率有關。另外也發現，在臨床感染的重症患者，其周邊血液的淋巴細胞數目下降、CD4 T 與 CD8 T 淋巴細胞數目減少，以及細胞性免疫力缺乏。然而在某些臨床報告中卻觀察到不同的反現象，而有相反的論述，像是細胞性免疫力的增加與重症發生有關聯，因為在有嚴重後遺症與死亡患者的血液及腦脊髓液中出現高量白血球，其中又以淋巴細胞居多。在死亡患者的中樞神經系統不僅測到病毒，更發現大量的單核細胞浸潤。除此之外，一份臨床報告指出一位患者腦部出現自體免疫疾病 (opsomyoclonus syndrome) 的症狀 (2)，在這個案例中，當患者出現神經性病徵時，也偵測到高量的病毒抗體，而患者症狀經抗發炎藥物類固醇治療後，獲得改善，這些證據顯示免疫反應可能造成患者症狀。靜脈注射免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin; IVIG) 具有抗發炎的療效，用來注射免疫球蛋白來自人體，經常富含中和腸病毒的抗體，過去被用來治療其它腸病毒患者像是柯沙奇 B 型病毒 (coxsackievirus B virus) 與伊科病毒 (echovirus virus) 療效頗佳，目前台灣用它來治療感染腸病毒七十一型的重症患者。臨床觀察的現象無法定論患者的淋巴細胞與抗體究竟

是扮演保護或破壞的角色，因此需更多研究來討論這重要議題，才能決定疫苗是否能避免感染，在臨床上，要朝向增加或降低免疫力或來治療患者。

成大的研究人員，針對民國八十七年流行期間住院的案例，作出詳盡的臨床報導，並自病人分離出病毒株。欲更進一步研究病毒的致病機轉，需動物模式輔佐驗證，因小鼠取材容易，被廣泛用在病毒研究，但自病人分離出的七十一型腸病毒株不會在小鼠引起明顯的症狀，余俊強博士為了增加病毒在小鼠的致病性，以腹腔注射感染小鼠，數日後取出小鼠的腦組織，在人類細胞株繁殖病毒，而後再以獲得之病毒感染小鼠，重複上述步驟四次後，所得之病毒能在二週內幼齡小鼠誘發產生神經性的症狀，包括四肢癱瘓及腦炎，並導致死亡，成功的增加病毒於小鼠的神經毒力，建立可供研究之小鼠動物模式 (3)。我們也開始著手研究「宿主的免疫反應在病毒感染時所扮演的角色」，沒被病毒感染的人，其神經組織不會有淋巴細胞，而我們在感染腸病毒七十一型死亡患者的脊髓切片中偵測到有 B、CD4 T 及 CD8 T 三種淋巴細胞的浸潤，在小鼠活體的發現與人類患者類似，在感染後、宿主接近死亡時，其腦內有相當高量的病毒及淋巴細胞，血液中抗體的量也增加 (4)。為了研究淋巴細胞在感染時扮演的角色，我們使用缺乏淋巴細胞的小鼠，經由比較野生種小鼠與缺乏 B、CD4 T 或 CD8 T 淋巴細胞小鼠感染後的病理症狀發現，缺乏淋巴細胞的小鼠，其疾病進展、死亡率及組織病毒量均顯著高於野生種的小鼠，其中又以缺乏 B 細胞的小鼠最高。此外，不論在感染前或感染後給予缺乏 B 細胞小鼠中和病毒的抗體，都能有效降低其疾病嚴重性、致死率與組織病毒量。這些結果顯示感染引起的淋巴球細胞與抗體反應，能降低腸病毒七十一型在小鼠的感染。

我們在上述報告以高量的病毒感染小鼠 (4)，而當我們使用十至百倍低量病毒感染小鼠時 (5)，缺乏 B 細胞的小鼠，其疾病進展仍十分快

速，死亡率超過百分之九十，但大部分野生種的小鼠及缺乏 CD 4 T 細胞的小鼠在感染後卻無嚴重疾病的產生，超過百分之八十的小鼠能夠存活，缺乏 B 細胞小鼠，其組織中的病毒量顯著高於野生種小鼠及缺乏 CD 4 T 細胞的小鼠。缺乏 CD 4 T 細胞小鼠的抵抗力並不是因它的 CD 4 T 細胞的功能被其他免疫細胞所代償，因野生型小鼠在剔除其 CD 4 T 細胞情況下，也不易受病毒感染。這發現與先前認知「B 細胞需要 CD 4 T 細胞幫忙來製造保護性抗體」不一致。我們進一步研究發現，被感染之 CD4 T 細胞缺乏鼠仍會製造抗病毒的中和抗體，而將這抗體打到 B 細胞缺乏鼠，能降低感染小鼠的疾病進展、死亡率及組織病毒量。綜合上述兩篇報告 (4, 5)，在高量病毒感染下，B、CD4 T 及 CD8 T 三種細胞保護小鼠免於死亡，缺一不可。在低量病毒感染下，缺乏 CD4 T 淋巴細胞的小鼠仍能存活，這是因為 B 細胞有兩大類型，一類需要 CD 4 T 細胞活化才能製造保護性抗體，另一類則不需要，因此稱其為先天性 B 細胞 (innate B cell)，在低量病毒感染下，可能是小鼠的先天性 B 細胞產生抗體，降低感染小鼠的病毒量及死亡率，這些結果顯示 B 細胞與抗體在腸病毒七十一型的感染扮演保護的角色。

B、CD4 T 及 CD8 T 三種淋巴細胞在腸病毒七十一型感染時扮演保護的角色，而這三種細胞需經抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell) 刺激，才能活化、發揮功效，樹突狀細胞 (dendritic cell) 是主要的抗原呈現細胞。我們研究腸病毒七十一型與人類樹突狀細胞互動時發現 (6)，樹突狀細胞可被病毒感染並複製病毒，病毒感染樹突狀細胞有部分是透過細胞表面 DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin) 分子媒介進入細胞內。我們更進一步的分析發現，腸病毒七十一型感染會增加樹突狀細胞的存活及釋放細胞激素，包含介白素 -6 (interleukin-6)、介白素 -12 和腫瘤壞死因子 - alpha (tumor necrosis factor-alpha)，並且誘發 T 細胞增生。綜合上述結果，被腸病毒七十一型感染之樹突狀細胞有可能活化 T 細胞，產生保護性免疫力。

除了淋巴球，當我們身體細胞組織受到感染時，可分泌細胞激素 (cytokine)，在感染腸病毒七十一型的重症患者體內可偵測到許多種高量的細胞激素，包括第二型干擾素 gamma (type II interferon gamma)、介白素 -6、介白素 -13 和腫瘤壞死因子 -alpha，儼然似一場細胞激素風暴 (cytokine storm)，因此有些報告懷疑是否細胞激素風暴引起感染患者重症，因此建議以靜脈注射免疫球蛋白及類固醇來治療病人。余俊強博士發現，剔除小鼠兩種具抗病毒效果的細胞激素 (第一型干擾素 alpha 及 beta; type I interferon alpha and beta)，會使得小鼠在感染腸病毒七十一型後疾病惡化 (7)。除此之外，我們研究第二型干擾素 gamma 在腸病毒七十一型感染所扮演的角色，因為此細胞激素除了具有抑制病毒複製、保護感染細胞的功能，它也是一種促進免疫反應的激素 (proinflammatory cytokine)，可產生過度的免疫反應，造成組織傷害。第二型干擾素 gamma 在腸病毒七十一型感染所扮演的角色眾說紛紜，一篇報告指出，缺乏第一及第二型干擾素受體 (receptor) 小鼠比單缺乏第一型干擾素受體小鼠更容易被腸病毒七十一型感染，極可能第二型干擾素 gamma 扮演保護性的角色。但也有臨床報告指出感染腸病毒七十一型的重症患者，其第二型干擾素 gamma 基因具有多樣性 (gene polymorphism)。而另一個小鼠活體實驗報告指出，給予感染的小鼠三種細胞激素 (介白素 -6、介白素 -13 及第二型干擾素 gamma)，會引發小鼠產生肺水腫，與人類重症患者相似，暗示第二型干擾素 gamma 可能造成重症。

我們著手研究發現小鼠與人類患者相似，在感染後腦內會產生第二型干擾素 gamma (8)。為了研究此細胞激素在感染時扮演的角色，我們使用缺乏第二型干擾素 gamma 受體的小鼠，經由與野生種的小鼠比較，缺乏第二型干擾素 gamma 受體的小鼠在感染後，其疾病的進展、死亡率及組織病毒量均顯著高於野生種的小鼠。另外實驗的結果顯示，在細胞感染前給予第二型干擾素 gamma，可抑制病毒複製，但在細胞

感染後給予第二型干擾素 gamma，則無法抑制病毒繁殖。這是因為病毒感染後製造的病毒蛋白 2A 及 3D 可阻斷第二型干擾素 gamma 的訊息傳遞，使之無法發揮抗病毒功能。這篇報告指出第二型干擾素，可抑制病毒在細胞的複製，降低感染小鼠的疾病，但病毒也會製造蛋白，阻斷第二型干擾素 gamma 的訊息傳遞。

另一種促進免疫反應的激素 -- 介白素 -6 會活化 T 細胞，促進 B 細胞分泌抗體，它在其他病毒感染時扮演的角色十分爭議，我們研究介白素 -6 在腸病毒七十一型感染時所扮演的角色，主要是因為當感染患者腦脊髓液中之介白素 -6 的量高到 70 picogram/milliliter 時，通常伴隨重症的發生，所以有人建議用介白素 -6 的抑制劑 (pentoxifylline)、介白素 -6 抗體或類固醇來降低此細胞激素，希望能改善感染患者症狀。我們實驗結果顯示 (9)，腸病毒七十一型感染可短暫的增加小鼠血液及腦中介白素 -6 的量，此細胞激素的多寡與病毒的量成正相關。缺乏介白素 -6 的小鼠、或以抗體去除介白素 -6 的小鼠，在腸病毒七十一型感染後，其疾病的進展、死亡率、組織病毒量及脊髓損傷均顯著高於野生種的小鼠，介白素 -6 會增加小鼠感染組織中 CD4 T 及 B 淋巴細胞的數目，和血液內中和病毒抗體的量。我們的研究顯示介白素 -6 在腸病毒七十一型感染時具保護角色，所以臨床不應該以降低介白素 -6 的方法來治療感染患者。

我們身體細胞組織受到感染時，可分泌趨化因子 (chemokine) 吸引白血球到感染組織，抑制病毒複製，也可能造成組織傷害。趨化因子有許多種，它們與白血球具有某種程度的專一性，不同的趨化因子會吸引不同的白血球。腸病毒七十一型感染的患者，其血液與腦脊髓液有高量的趨化因子，包括 IP-10 (interferon gamma-inducible protein-10/CXCL10) 及 Mig (monokine induced by gamma interferon)，這兩種趨化因子主要由第二型干擾素 gamma 刺激細胞產生，在腸病毒七十一型感染的重症患者中，又以 IP-10 的增加量最顯著。感染患者的組織會出

現白血球，但沒有太多研究趨化因子與腸病毒七十一型感染的互動，這些趨化因子是由何種細胞產生？由什麼刺激引起？吸引白血球種類為何？扮演保護或使疾病惡化的角色？我們針對 IP-10 所作的報告結果顯示 (10)，腸病毒七十一型感染可增加小鼠血液與腦中 IP-10 的量，組織中 IP-10 與病毒的量成正相關，腦部神經細胞會產生 IP-10。細胞實驗顯示，第二型干擾素 gamma 及腸病毒七十一型不會刺激神經細胞產生 IP-10，反而是第一型干擾素 alpha 及 beta 才會刺激神經細胞產生 IP-10。與野生種的小鼠比較，缺乏 IP-10 的小鼠感染過後有較高的死亡率，清除組織病毒的速率較慢，IP-10 本身不會抑制病毒的複製，而是藉由增加腦部的第二型干擾素 gamma、Mig 及 CD8 T 淋巴細胞的數目，清除組織的病毒。總而言之，我們報告顯示，小鼠在病毒感染後產生第一型干擾素 alpha 及 beta，刺激腦部神經細胞產生 IP-10，增加第二型干擾素 gamma、Mig 及 CD8 T 淋巴細胞的量，進而降低小鼠組織的病毒量及死亡率。

截至目前為止，我們的報告顯示腸病毒七十一型感染會增加下列反應：(B、CD4 T 及 CD8 T) 淋巴細胞、抗體、細胞激素 (第一及第二型干擾素、介白素 -6) 及趨化因子 (IP-10) 來幫助宿主清除病毒，這樣的結果與之前一篇臨床報導指出，使用類固醇可改善一位腸病毒七十一型感染患者的症狀相違背 (2)。後來中國的一篇臨床報導研究 134 感染患者指出，使用類固醇，像是 dexamethasone 會促使症狀惡化 (11)，而其中的機制待釐清。我們實驗的小鼠，感染十二天後死亡情況達到穩定，不再變化，為了測試不同時期給予小鼠 dexamethasone 對感染的影響 (12)，我們以低量病毒感染小鼠，在感染後第一、三、四、八天開始給予小鼠藥物，感染後第一、三天給予藥物或不給藥物小鼠的死亡率分別是百分之九十、五十及十，感染後第四、八天給予藥物，不會增加感染小鼠的死亡率。感染後第一天給予藥物的小鼠，其疾病進展及組織病毒量均顯著高於不給藥的小鼠。此外我們模擬感染患者剛發病、

有發燒症狀，到診所看病，獲得三天短期的藥物治療，在小鼠感染後一至四天給予藥物，這樣的療程會增加感染小鼠的死亡率高達四倍，也增加感染小鼠的疾病進展及組織病毒量。我們也測試類固醇治療是否能改善重症感染患者的症狀，以近十倍高量的病毒感染小鼠，感染後第一天給予藥物的小鼠，其死亡率顯著高於不給藥的小鼠，感染後第四天給予藥物的小鼠，其死亡率與不給藥的小鼠相近。Dexamethasone 會造成 B、CD4 T 及 CD8 T 三種淋巴細胞凋亡 (apoptosis)，淋巴器官萎縮，是透過降低淋巴細胞中抗凋亡分子 Bcl-xL 的表現，此外也會減少血液及腦中介白素 -6 和 IP-10 的量。總而言之，我們報告顯示，在感染早期給予小鼠 dexamethasone，會使感染患者疾病加重，在感染晚期給予藥物並無法改善感染患者的症狀。

截至目前為止，我們利用小鼠模式探討 B、CD4 T 及 CD8 T 淋巴細胞研究顯示三種淋巴細胞在腸病毒七十一型感染具保護功能，因此將來可以疫苗保護未被感染的人，避免爆發致死性流行，使用中和病毒的抗體治療感染患者，降低重病及死亡的發生。細胞激素 (第一及第二型干擾素、介白素 -6) 扮演保護角色，趨化因子 (IP-10) 透過增加二型干擾素及 CD8 T 淋巴細胞，降低小鼠感染，但這並不代表所有的免疫因子均具保護的功能，因我們尚未發表的結果顯示，有一種近年才被發現、鮮少為人知其功能的細胞激素，竟透過降低第二型干擾素使感染小鼠疾病惡化，因此仍需更多的研究探討免疫因子在腸病毒七十一型感染所扮演的角色。

## 參考文獻

1. Ho M et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N. Engl. J. Med.* 341: 929–935, 1999.
2. McMinn, P et al. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia. *Clin. Infect. Dis.* 32: 236–242, 2001.
3. Wang YF et al. A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection. *J. Virol.* 78: 7916-24, 2004.
4. Lin YW et al. Lymphocyte and antibody responses reduce enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads. *J. Virol.* 83: 6477-6483, 2009.
5. Wang LC et al. CD4 T-cell-independent antibody response reduces EV 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads. *Clin. Dev. Immunol.* vol. 2012, Article ID 580696, 9 pages, 2012. doi:10.1155/2012/580696
6. Lin YW et al. Enterovirus 71 infection of human dendritic cells. *Exp. Bio. Med.* 234: 1166-1173, 2009.
7. Liu ML et al. Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *J. Gen. Virol.* 86: 3263-9, 2005.
8. Wang LC et al. Enterovirus 71 proteins 2A and 3D antagonize the antiviral activity of IFN- $\gamma$  via signaling attenuation *J. Virol.* 89 (14) 7028-7037, 2015.
9. Wang LC et al. Suppression of interleukin-6 increases enterovirus A71 lethality in mice. *J. Biomed. Sci.* 24:94, 2017. DOI 10.1186/s12929-017-0401-5
10. Shen FH et al. Enterovirus 71 infection increases expression of interferon-gamma-inducible protein 10 which protects mice by recruiting lymphocytes to reduce viral burden in multiple organs. *J. Gen. Virol.* 94: 1019-1027, 2013.
11. Ma H et al. Glucocorticoid and pyrazolone treatment of acute fever is a risk factor for critical and life-threatening human enterovirus71 infection during an outbreak in China. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29:524–529, 2008.
12. Shen FH et al. Early dexamethasone treatment exacerbates enterovirus 71 infection in mice. *Virology* 464-465: 218–227, 2014.

## 第七節

---

# 腸病毒研究之實驗動物模式 Experimental animal model for enterovirus study

---

周彥宏

發展腸病毒實驗動物模式暨在腸病毒感染時可以完整模擬腸病毒引起的嬰幼兒手足口疾病病程，是研究腸病毒引起的病理機轉進而發現及篩選治療或預防腸病毒感染之藥物或疫苗研發的重要方法。目前針對已發展的腸病毒實驗動物模式詳述其特點及運用。

## 前言

近十七年來，腸病毒包括腸病毒 71 型及克沙奇病毒在亞太區域幾個國家爆發了十數次大流行 [14]，一般主要常見症狀為：發燒、手足口病 (Hand-Foot-Mouth Disease, HFMD) 或疱疹性咽峽炎 (Herpangina)；除此之外，已知該病毒是會侵入人體神經系統、導致幼童發生嚴重神經性疾病如腦膜炎、肢體麻痺與神經性肺水腫等重症、甚至造成死亡。針對腸病毒來研發相關預防及治療藥物產品，動物模組的建立顯得非常重要，有合適的動物模組才方便我們了解腸病毒 71 型及克沙奇病毒感染所造成的神經病變機轉過程、才能在動物實驗階段了解到投入的藥物及疫苗是否真的治療或阻擋了病毒的影響、用來評估病毒毒力受藥物及疫苗影響後是否真有降低效果。只是腸病毒 71 型所屬的病毒種屬 picornaviridae 與 poliovirus 一樣，天然的宿主極少、目前僅知只有人類一種，它在啮齒動物身上沒有感染受器，就是我們常用的實驗動物小鼠 / 大鼠是不會被腸病毒感染，更別說在牠們身上觀察症狀，所以早期是沒有小鼠模組來研究腸病毒。在 1990 年晚期因爆發十數次大流行、面對疫情急迫，科學家們開始建立腸病毒 71 型的動物模組 [26]，主要是以非人類之靈長類動物來當作腸病毒感染的研究對象 [17, 18, 27]，以評估病毒感染之早期病徵及後來影響神經系統之病毒含量。但基於人道立場及經濟效益的考量，靈長類動物它無法被廣泛應用於學術界；就實驗結果而論，針對腸病毒 71 型造成的神經病變所能看到的成效也有限，因此影響腸病毒治療的發展。後來衍生出幾種不同的方式發展腸病毒感染小鼠動物模組，包括了馴化腸病毒、在一般小鼠或免疫不全鼠進行試驗。雖然這些數據勉強可以提供部份訊息來發展治療與預防這病程、仍無法完全代表在人類身上的疾病模式。隨著日本科學家發現了人類被腸病毒感染的受器 PSGL-1 及 SCARB2 後，腸病毒的感染機轉陸續被討論 [10]；同時，以該受器建立的基因轉殖鼠也陸續被發表 [11, 20]。這成為近十年來腸病毒防治發展上最重大的發現之一，因為它

不僅可以用來研究病毒與宿主之間的互動關係，同時更是發展抗病毒藥物及疫苗進入臨床試驗前期一個很重要的測試指標。

### **腸病毒 71 型感染在人體的臨床病徵**

想建立腸病毒動物模組，首先要了解它在人類身上引發何種症狀。

與其它腸病毒感染相似，腸病毒 71 型會引起：持續性高燒、腹瀉、紅疹、無菌性腦膜炎、腦炎…輕微症狀一般不具致命危險。類似呼吸道感染或出現皮膚症徵，例如手口足病及疱疹性咽峽炎。

手足口病之後，令家長們擔心的是「腸病毒急重症案例」，它很有機會發生更嚴重的症狀…神經相關病徵：如腦膜炎、腦幹腦炎、自主神經系統癱瘓、造成肌肉損傷有類似小兒麻痺的肌肉癱瘓症狀、與神經性肺水腫 [15, 16, 21-22]。這些病徵代表的是致命風險及醫療上極大的挑戰。

也因此腸病毒疫苗發展很快 [表二]，亞太國家對於腸病毒的治療與防治愈來愈重視，台灣現在亦有腸病毒疫苗研究發展，目前有二家公司分別進行臨床試驗並已於臨床試驗二期成功、臨床試驗三期數據即將完成，所收集到的人體血清也會回到動物模組來檢測對各株腸病毒的中和抗體效價反應及保護效力分析。

### **腸病毒 71 型的動物模組發展史**

動物模組最基本的要求就是要能有類似人類受感染後的所有病徵。以此類推，我們需要在動物模組上面見到的是：「手口足病」（皮膚病徵）、「肺水腫」（呼吸相關病徵）、類小兒麻痺症狀（四肢肌肉及行動力）、腦炎（所有神經系統組織病理上的改變）。依動物模組發展的時間順序討論：

## I. 使用「非人類之靈長類動物」：

- A. Cynomolgus monkeys 食蟹猴
- B. Rhesus monkeys 恆河猴
- C. Green monkeys 綠猴

為何最早會選用靈長類研究腸病毒的理由和登革熱 / 日本腦炎病毒一樣，它們都沒有小鼠動物模組，簡單說明就是這些病毒是感染人類、但是不會感染小鼠，大家逼不得已只好找跟人類血緣相近的非人類靈長類動物試試。以上三種都可以被腸病毒 71 型感染，也都會出現部份腸病毒 71 型感染的典型症狀，但不見得能全都出現神經病變或呼吸衰竭的病徵。

食蟹猴 Cynomolgus monkeys 可以出現手足口病、在唇邊可以發現病徵 [19-20]，但看不見中樞神經系統病徵 [23]、也不全有肺水腫病況 [19-20]。相較於食蟹猴，恆河猴 Rhesus monkeys 的表現就相對好些，在成年猴身上可以觀察到手足口症病徵 [24]、亦有些許神經系統病變，但是在胰臟、脾臟它也有病毒的蓄積 [25]，這與人類病徵不太相同。

以投入非人類靈長類實驗動物使用加上照護資源所需要的人力物力，和動物身上可以觀察到的病徵訊息相較之下：就投報率來看，這樣的動物模組的確不是上上之選。這也是為何後來科學家們仍是想發展小鼠動物模組一個很重要的動機。

## II. 小鼠 - 馴化 模組 [28-29] / 免疫缺陷鼠 NOD/SCID mice [30]：

2013 年腸病毒基因轉殖鼠問世之前，沒有選用非人類靈長類實驗動物的研究團隊，多半選用的就是此類實驗動物模組。在此「馴化」指的是：馴化病毒！過去已知只是腸病毒 71 型所屬的病毒種屬 picornaviridae 與 poliovirus 一樣都可以感染到剛出生的仔鼠內（成鼠完全無法被感染），所以此法主要是將腸病毒 71 型放入剛出生仔鼠體內進行感染 / 數日後收集病毒、取出的病毒再用來感染剛出生的仔鼠 /

再收集病毒，如此反覆四次，便成為小鼠馴化腸病毒株（EV71-MP4），若反覆二十六次便稱為 EV71-MP-26M，再轉至小鼠細胞 / 例如 CHO 細胞培養，就是 CHO-adapted EV71-26M 病毒。這樣的腸病毒 71 型可用來感染小鼠，並且觀察相關病徵。但在生物學的角度上來看，這樣的病原體是經過基因變異甚至是刻意篩選的結果，所觀察到的動物病徵，所引發的機轉不見得與臨床病毒株一樣，已失去動物模組想要「擬真」的目的。

### III. 基因轉殖鼠：

A. PSGL-1

B. SCARB2

日本科學家找到以上二種腸病毒 71 型感染人類所需要的受器，於是各界科學家 / 包含本實驗室便透過基因工程技術將這二個基因送到小鼠胚胎，使其發育成基因轉殖鼠，讓小鼠全身細胞能各自帶有這兩種受器。

針對這兩種基因轉殖鼠進行腸病毒 71 型的感染，我們觀察到 SCARB2 基因轉殖鼠在感染後會有類似人類受到腸病毒 71 型感染的重症病徵，包括了呼吸困難 / 小鼠氣喘、手口足病 / 小鼠皮膚有皮屑、神經病變 / 小鼠癱瘓不良於行、最嚴重發生死亡 [11]。同時克沙奇病毒 A16 型研究也發現是利用 SCARB2 為感染細胞的受器。當克沙奇病毒 A16 型感染 SCARB2 基因轉殖鼠也會引起類似腸病毒 71 型感染引起的重症病徵 [11]。

這樣的現象讓腸病毒 71 型及克沙奇病毒之單價或多價疫苗及藥物發展邁入新的里程碑，因為可以小鼠繁殖效率及單次執行實驗的族群數遠大過用非人類靈長類動物、照護成本更相對低廉許多。重點是明顯病徵的實驗結果，可以讓我們清楚判讀所研發出來的藥物及疫苗是否可以達到保護效力。

## 腸病毒疫苗過去發展之過程與未來展望

近年來腸病毒 71 型疫苗的研發方向主要有二大類：一是完整病毒為主，二是僅表現部份病毒蛋白，或是形成完整病毒顆粒、或是只有病毒外殼片段。完整病毒發展之方向有：減毒疫苗 (Live-attenuated virus)、死毒疫苗 (Inactivated whole-virion)；僅表現部份病毒蛋白則有：基因重組蛋白疫苗 (Recombinant VP1 protein)、DNA 疫苗 (VP1 DNA)、基因轉殖植物 (transgenic plant)、細菌載體疫苗 (Bacteria vector)、胜肽疫苗 (Synthetic peptide) 與似病毒粒子疫苗 (Virus-like particle) 等 [3, 5, 8, 9, 12, 13]。

目前完成臨床試驗的疫苗，是參考小兒麻痺疫苗的研發經驗，選擇發展以去活化完整病毒顆粒之死毒疫苗 [6]。自 2007 年到 2011 年間國家衛生研究院疫苗研發中心（現編制內建於感染疫苗研究所內）建立了符合國際規範之 cGMP 生物製劑廠及具有疫苗產製專業技術之團隊，發展細胞培養製程生產符合 PIC/S cGMP 國際規範疫苗成品，促使腸病毒 71 型疫苗進入第一期人體臨床試驗，為我國完全自行從實驗室研發至進入人體臨床試驗之自製疫苗，同時技轉予國光生技，目前已知完成第二期人體臨床試驗，現正針對所採集之檢體完成後續檢測。

手足口病過去一直認為是受腸病毒 71 型感染而已，但現有的公衛數據表示，克沙奇病毒亦是造成手足口病的主要感染性病原之一。未來一劑疫苗可以預防多種感染病原的多價型疫苗會是發展主流。因此，本實驗室也研發重組腺病毒載體表現似病毒顆粒疫苗 (Ad-VLP) 成為預防腸病毒及克沙奇病毒感染的多價型疫苗 [7, 12]。

無論何種形式腸病毒疫苗，如果能在合適的動物模組內驗證該疫苗能產生有效中和抑制病毒之抗體，進行後續人體臨床試驗所要承擔失敗風險的機率就會降低許多。

## 動物模組應用與討論

從 1998 年的大流行後，衛生署疾病管制局自 1999 年起於臺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 [1]。依據我國歷年監測資料顯示，幼童為感染併發重症及死亡之高危險群體，重症致死率約在 3.8% 至 25.7% 之間。藉由病例的與相關資訊的分析，流行病學家進而推測約每 3-4 年可能會出現一次的大流行，並亦發現臺灣每次所流行之腸病毒 71 型有基因亞型上的變化，因此腸病毒 71 型病毒疫苗與合適動物模組之研究發展格外受到重視。

用來研究腸病毒 71 型病徵機轉 / 發表在國際期刊的相關應用案例在表一 [1] 說明各類模組如一天大 ICR 仔鼠感染馴化腸病毒株，免疫缺陷鼠 NOD/SCID mice 感染馴化腸病毒株，AG129 鼠缺乏 IFN- $\alpha/\beta$  接受體感染野生腸病毒株，或 PSGL-1 基因轉殖鼠野生腸病毒株等，我們發現以 SCARB2 基因轉殖鼠進行攻毒，所需要的病毒量遠低於其它動物模組，清楚展現動物模組「擬真」之功能，在實驗基因轉殖小鼠身上我們看到腸病毒 71 型感染重症時會發生的「皮膚病變」、「肌肉病變」及「死亡」。

這個動物模組不僅可供疫苗測試、藥物效用測試，我們實驗室意外的發現它也可用於判讀病毒株的毒力。對於各家產出的腸病毒，即便是同一病毒株，也會因為宿主細胞的不同而產生基因變異、進而影響毒力表現（數據尚未發表）。這項發現提醒我們腸病毒 71 型的變異性很大，毒力有機會降低，當然也有相對機率變大。而這樣的動物模組未來也許有機會協助我們應對流行病學家推測約每 3-4 年可能出現一次因基因亞型變化而引發的大流行。

表一 / 驗證腸病毒疫苗之動物模式 [31]

模型	ICR小鼠	NOD/SCID 小鼠	AG129小鼠	hPSGL-1小鼠	hSCARB2小鼠
可感染病毒株	小鼠馴化株 (MP4)	小鼠馴化株 (MP4)	非小鼠馴化株	小鼠馴化株 (MP10)	臨床分離株
接受體來源	小鼠	小鼠	小鼠	小鼠	人
症狀	肢體麻痺和死亡	肢體麻痺	天花相似性神經性症狀	肢體麻痺	手足口病, 肢體麻痺和死亡

摘錄感染控制雜誌 中華民國 104 年 12 月第二十五卷六期, NHRI-IV 劉家齊博士

表二 / 不同病毒標之物之福馬林去活性腸病毒疫苗在人體試驗進程

機構	製造流程		臨床試驗			臨床試驗註冊編號
	細胞株和EV71亞基因型	製程	EV71抗原劑量, µg	疫苗施打對象年齡 (人數)	進度	
國家衛生研究院 (台灣)	Vero 和EV71 B4	GMP檢測 滾瓶培養, 無血清 顆粒色層分析	5, 10	成人24-43年(60)	臨床I期完成	NCT01268787
Sinovac Biotech Co. Ltd.(中國)	Vero 和EV71 C4a	FY7VP5 生物反應器培養, 無血清 顆粒色層分析	0.25, 0.5, 1	成人, 小孩 (>5年)	臨床I期完成	NCT01273246
			1	小孩 (18-60月)	臨床II期完成	NCT01273233
			1	小孩 (6-35月)(10245)	臨床III期完成	NCT01507857
北京 Vigoo Biological Co. Ltd.(中國)	Vero 和EV71 C4a	H07 生物反應器培養, 無血清 顆粒色層分析	0.4, 0.8, 1.6	成人, 小孩 (>5年)	臨床I期完成	NCT01313715
			0.8	小孩 (18-60月)	臨床II期完成	NCT01399853
			0.8	小孩 (6-35月)(10077)	臨床III期完成	NCT01508247
CAMS (中國)	Human dploid KMB-17 和 EV71 C4a	生物反應器培養, 無血清 顆粒色層分析	0.25	成人, 小孩 (>5年)	臨床I期完成	NCT01391494
				小孩 (18-60月)	臨床II期完成	NCT01512706
				小孩 (6-71月)(12000)	臨床III期完成	
Inviragen (新加坡)	Vero 和EV71 B2	生物反應器培養, 無血清 顆粒色層分析	0.6, 3	成人(36)	臨床I期完成	NCT01376479

CAMS: Chinese Academy of Medical Sciences

## 參考文獻

1. World Health Organization Western Pacific Region. A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth.
2. US CDC. Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0759\\_article](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0759_article)
3. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al: Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010;10:778-90.
4. Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairede A, et al: Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PLoS One* 2014;9:e90624.
5. Chong P, Hsieh SY, Liu CC, et al: Production of EV71 vaccine candidates. *Hum Vaccines Immunother* 2012;8:1-9.
6. Liu CC, Chow YH, Chong P, et al: Prospect and challenges for the development of multivalent vaccines against hand, foot and mouth diseases. *Vaccine* 2014;6:177-82.
7. Chong P, Guo MS, Lin FHY Lin, et al: Immunological and biochemical characterization of coxsackie virus A16 viral particles. *PLoS One* 2012;7:e49973.
8. Cai Y1, Ku Z1, Liu Q, et al: A combination vaccine comprising of inactivated enterovirus 71 and coxsackievirus A16 elicits balanced protective immunity against both viruses. *Vaccine* 2014;32:2406-12.
9. Lyu Ke, He YL, Li HY, et al. Crystal Structures of Yeast-Produced Enterovirus 71 and Enterovirus 71/Coxsackievirus A16 Chimeric Virus-Like Particles Provide the Structural Basis for Novel Vaccine Design against Hand-Foot-and-Mouth Disease. *J Virol* 2015;89:6196-208.
10. Lin HY, Yang YT, Yu SL, et al: Caveolar endocytosis is required for human PSGL-1-mediated enterovirus 71 infection. *J Virol.* 2013 Aug;87(16):9064-76.
11. Lin YW, Yu SL, Shao HY, et al: Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71. *PLoSOne* 2013;8:e57591. 284

12. Tsou YL, Lin YW, Shao HY, et al: Recombinant adeno-vaccine expressing enterovirus 71-like particles against hand, foot, and mouth disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Apr 9;9(4):e0003692.
13. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al: In *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press; 2005:757–778.
14. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH: An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974, 129:304–309.
15. Melnick JL: The discovery of the enteroviruses and the classification of poliovirus among them. *Biologicals* 1993, 21:305–309.
16. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, et al: Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* 1979, 60:329–340.
17. Zheng ZM, Zhang JH, Zhu WP, et al: Isolation of enterovirus type 71 from the vesicle fluid of an adult patient with hand-foot-mouth disease in China. *Virol Sin* 1989, 4:375–382.
18. Hashimoto I, Hagiwara A, Kodama H: Neurovirulence in cynomolgus monkeys of enterovirus 71 isolated from a patient with hand, foot and mouth disease. *Arch Virol* 1978, 56:257–261.
19. Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, et al: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol* 2004, 85:2981–2989.
20. Chang LY, Lin TY, Hsu KH, et al: Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1999, 354:1682–1686.
21. Ho M: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Infect* 2000, 33:205–216.
22. Arita M, Shimizu H, Nagata N, et al: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 2005, 86:1391–1401.

23. Arita M, Nagata N, Iwata N, et al: An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 2007, 81:9386–9395.
24. Zhang Y, Cui W, Liu L, et al: Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in rhesus monkeys. *Lab Invest* 2011, 91:1337–1350.
25. Chen H, Zhang Y, Yang E, et al: The effect of enterovirus 71 immunization on neuropathogenesis and protein expression profiles in the thalamus of infected rhesus neonates. *Virology* 2012, 432:417–426.
26. Chen YC, Yu CK, Wang YF, et al: A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *J Gen Virol* 2004, 85:69–77.
27. Hashimoto I, Hagiwara A: Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982, 8:149–156.
28. Yu CK, Chen CC, Chen CL, et al: Neutralizing antibody provided protection against enterovirus type 71 lethal challenge in neonatal mice. *J Biomed Sci* 2000, 7:523–528.
29. Khong WX, Yan B, Yeo H, et al: A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection. *J Virol* 2012, 86:2121–2131.
30. Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H: Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol* 2008, 82:1787–1797.
31. 劉家齊。台灣腸病毒 71 型疫苗發展。感染控制雜誌 中華民國 104 年 12 月第二十五卷六期。

## 第四章

# 腸病毒 71 型藥物治療與 預防之研發策略

## 第一節

---

# 老藥新用提供抗腸病毒開發策略 - 合併蛋白酶抑制劑與干擾素對抗 腸病毒 71

---

洪慧貞 徐祖安

知己知彼，剖悉病毒與宿主先天免疫系統如何彼此牽動，運用網絡藥理學概念；合併干擾素與抗病毒藥物之老藥新用，將有助於提供新興病毒開發藥物捷徑。

面臨腸病毒大爆發，我們選擇從“了解病毒”下手，剖悉病毒與宿主免疫系統交互作用；揪出關鍵主角之一為病毒蛋白酶，結合生物資訊分析預測與功能驗證，並確認干擾素訊息傳遞鏈上蛋白質受蛋白酶切割，進而影響初始功能。團隊基於網絡藥理學概念，提出老藥新用合併干擾素與蛋白酶抑制劑進行抗腸病毒治療藥物開發，此研究模式有助於提供新興病毒研究，提供抗病毒藥物開發捷徑。

### 抗腸病毒藥物開發緣起

2004 年正值七月盛夏，各媒體強力報導著腸病毒預防與注意事項宣導短片，隨著腸病毒感染重症個案與幼稚園停課不斷攀升，許多家長由於學校腸病毒停課，導致家長必須停班照顧小孩，彰顯腸病毒是社會公共衛生議題，急需政府與生技產業投入一起解決。故研發腸病毒 71 型藥物為當時的台灣重點衛生政策，國內科學家與醫學研究均投注大量人力以積極開發藥物。當時，長庚大學醫學生物學系施信如博士（現為特聘研究員）與國家衛生研究院生藥所徐祖安博士，積極組成跨領域藥物研發團隊，以解決當時面臨問題。因腸病毒為 RNA 病毒具高變異特性，並無有效治療之藥物。自 1998 年腸病毒 71 型嚴重大爆發後，分別於 2000、2001 年與 2004 年均有病例產生，年年籠罩於腸病毒的威脅，但因當時腸病毒藥物經濟規模對藥廠不具吸引力，針對兒童疾病的新藥於臨床受試者設定，更加深研發困難度。研究團隊面臨的考驗是開發新藥為耗時且須大量資金挹注的科學工作 [1]，這項龐大艱鉅的藥物開發計畫刻不容緩，該如何有效率進行？以何種策略面對多變腸病毒？更成為當時科學家們聚焦話題。

### 知己知彼百戰百勝

在一次藥物開發研究團隊的腦力激盪會議中，施博士提出何不了解了病毒與宿主作用機制，探究病毒可能弱點再加以擊破？腸病毒屬

於小 RNA 病毒，該類型病毒複製過程會先進行轉錄作用產生多重蛋白，藉病毒本身蛋白酶水解多重蛋白成具功能性的蛋白質，引發病毒於宿主之致病機制。病毒蛋白酶猶如一刀兩刃，切割有助於組裝病毒元件，亦破壞宿主細胞內蛋白質，干擾細胞正常免疫反應與生理作用。於是，團隊基於過去針對腸病毒與宿主研究基礎，鎖定病毒蛋白酶於感染過程中扮演關鍵性角色。

腸病毒帶有 3C 蛋白酶與 2A 蛋白酶，被歸類於半胱氨酸蛋白酶。團隊在探索病毒蛋白酶對免疫系統機制影響中發現，過去文獻已有許多類似的病毒免疫逃脫機制被報導，更說明病毒蛋白酶除提供病毒完成複製外，亦快速阻斷宿主細胞轉錄與轉譯作用之案例。黃質病毒科中的 C 型肝炎為一個典型的實例 [2, 3]，病毒的 NS3/4A 絲氨酸蛋白酶可切割含有  $\beta$  型干擾素 (IFN  $\beta$ ) 的免疫細胞受體，而導致活化的訊息傳遞受抑制，病毒藉此獲得免疫逃脫機會。然而於同樣具有蛋白酶之腸病毒少有報導，當時相關文獻指出 3C 蛋白酶主要是分解宿主細胞內轉錄相關之蛋白質，而影響細胞內的轉錄作用；此外 2A 蛋白酶被發現分解轉譯過程與細胞骨架的蛋白質，抑制宿主細胞轉譯作用與細胞動態結構。故施博士實驗室即鎖定以病毒蛋白酶與宿主之交互作用，作為團隊主要探索標的方向。

過去，小 RNA 抗病毒藥物開發以病毒複製不同階段作為標的，由最前期的病毒附著階段，核酸進行早期轉錄及轉譯作用生成新病毒蛋白，病毒蛋白質切割完成病毒組裝，病毒組裝後成熟釋出，涵蓋病毒在宿主細胞內引發的不同訊息傳遞鏈，每個病毒複製階段均有藥物開發計畫在進行。當時，針對鼻病毒外殼蛋白開發具抑制脫殼作用的 Pleconaril 抗病毒劑最具潛力，該藥物於 2002 年臨床試驗階段極為轟動，但其對婦女造成副作用而停止相關試驗；後續該藥物由 AntiVirus Therapeutics Inc. 開發，直至 2012 年才以孤兒藥方式申請進行 Enterovirus 臨床試驗二期，當時該藥物仍為研究相對多的，但於國內少有臨床相關經驗。

## 干擾素於腸病毒感染還有干擾病毒效果嗎？

開發藥物的冗長與不確定性，一直以來讓科學家們傷透腦筋。故團隊試著從老藥已完成 phase II 或 III 臨床試驗的試驗用藥尋找可能答案。我們與研究團隊討論出一個有趣的方向，為何不能以廣效性抗病毒活性的干擾素（interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ）抑制腸病毒的複製？作為腦力激盪主題。更嘗試與台大醫院張鑾英醫師進行討論，張醫師當時接手多個重症病童案例，當時尚無干擾素成功使用於治療小兒腸病毒的感染案例，採行免疫球蛋白（intravenous immunoglobulin, IVIG）之支持性療法為主。經由相關討論仍無法獲得有利的解釋，顯見於小兒身上的免疫反應尚需更多實驗數據支持該療法。病毒進入宿主後，啟動宿主免疫反應對抗病毒，宿主免疫反應下的不同訊息傳遞鏈，該選誰做為研究標的？由不同細胞株培養腸病毒結果，顯示病毒的產量有明顯差異。團隊推測病毒為複製與生存，均具有拮抗干擾宿主細胞內 IFN- $\alpha$ / $\beta$  的抗病毒機制。因而研究病毒與宿主細胞內 IFN- $\alpha$ / $\beta$  關係，將有助於我們釐清病毒如何於宿主中引發致病性的重要因素之一。

以病毒進入後面對的第一線宿主細胞內 IFN- $\alpha$ / $\beta$  訊息傳遞為主軸，了解感染過程中是否有病毒蛋白干擾免疫系統？許多問題尚待我們挖掘。於是研究團隊成員透過一連串的推敲，收集相關證據並規劃可行的實驗。利用干擾素測試腸病毒引發細胞病變影響，結果顯示干擾素無法完全中和病毒引發的細胞病變現象。並且以腦心肌炎病毒（Encephalomyocarditis virus; EMCV）當作對照組，實驗結果顯示於病毒的感染過程添加低濃度干擾素，可有效抑制病毒複製 [4]。經過相關實驗結果發現，腸病毒複製會降低受干擾素調控的下游基因表現，因而再進一步探討病毒可能對抗宿主細胞之作用機轉。

同步比對施老師實驗室研究團隊曾以 cDNA microarray 分析，經由腸病毒感染後宿主基因表現情形 [5]，發現有關干擾素調節之相關蛋白質於早期感染時期表現量為增加狀態，而隨著感染時間增加而使表

現量降低。團隊更有信心相信當時實驗成果，腸病毒可能存在某種對抗 IFN 訊息傳遞，於病毒的複製過程同步破壞免疫系統。這結果更點出了病毒與宿主間可能存在複雜的致病機轉，腸病毒面對宿主免疫攻擊，病毒本身表現的蛋白酶很可能就存在協助病毒生成，與另一方面為摧毀宿主抵抗功能。

### 藉助生物資訊輔助預測 3C 腸病毒蛋白酶標的

團隊審慎的考量快速可行之研究方法，期望由其中找出蛋白酶之可能的受質。參考 1996 年 Blom 等人利用 NetPicoRNA 資料庫生物資訊學的方法分析 [6]，預測病毒蛋白酶的切割受質及其切割受質位點。以第一型干擾素之訊息傳遞途徑上蛋白質為研究目標，推測腸病毒的 2A 及 3C 病毒蛋白酶，可能抑制或阻斷干擾素之作用。於國家生物技術資訊中心 (NCBI) 的線上人類孟德爾遺傳資訊資料庫 (OMIM) 中，篩選出 330 個與干擾素相關的蛋白質，再利用 NetPicoRNA 分析網站預測是否為 2A 或 3C 蛋白酶的可能切割受質。由預測分析結果中得知，有 158 個干擾素相關蛋白質可能具有 3C 蛋白酶的切割位點、有 19 個干擾素相關蛋白質可能具有 2A 蛋白酶的切割位點；其中共有 16 個可能切割受質同時具有 2A 與 3C 蛋白酶的切割位點。

我們分別建立 *in vitro* 分析方法，逐步拼貼可能證據。結果顯示干擾素轉錄調控因子 -9 (interferon regulatory factor-9; IRF9) 為 3C 蛋白酶之切割受質，該調控因子與第一型干擾素抗病毒機制相關，於病毒感染活化訊息傳遞後，可正向調控下游與其他蛋白形成的複合物，進而生產更多干擾素。我們的研究顯示，腸病毒蛋白酶破壞 IRF9 功能，破壞干擾素訊息傳遞。過去，Barnard 等學者相關文獻指出，人類乳突病毒 (HPV16) 的致癌蛋白 E7 可抑制 IRF9 進入細胞核作用，無法形成與 IFN 刺激表現因子 (ISGF3) 複合物形成，造成宿主細胞無法有效啟動對抗病毒機制，或許能解釋為何腸病毒可輕易躲開宿主細胞的抗病毒

機制。然而，由於引發免疫訊息傳遞途徑上的蛋白質眾多，仍待一一挖掘，以獲得更深入研究的大發現。

### 以網絡藥理學概念合併干擾素與蛋白酶抑制劑

團隊雖解開病毒蛋白酶與宿主內細胞作用標的，最終仍期望尋求快速藥物開發可能的捷徑。徐博士以曾在默克藥廠經驗給予團隊明確方向，英國鄧迪大學生命科學學院生物化學與藥物所霍普金斯教授 (Andrew L. Hopkins) 提出「網絡藥理學 (Network Pharmacology)」的概念，藥物可作用於多個目標蛋白質，其多重功能串連不同的訊息傳遞鏈，有助於提供治療上的協同加成效果，刊載在自然 (Nature) 等其他具高影響力期刊。以老藥新適應症 (old drugs new indication) 或合併正開發中既有不同藥物，合併多個不同靶點進行治療為藥物開發另類選擇。諾貝爾獎藥理學家 James Black 博士提出「自舊藥開始研究為開發新藥最有效的方法」，該概念建立在以既有藥物可提供藥物動力學與安全性之研究證據，借助該優勢降低研發成本，於藥物研究確認藥效後，即可開發新的投藥途徑或新劑型。大幅降低開發風險與成本，藉由評估新定位 (reposition)、以新劑型 (reformulation) 或是合併不同藥物組合 (combination)，已有多個老藥新用藉由這樣的古典方法得到新發現 (如圖一)。

	Mode	Market Approval	Patent Expiry	Company	Brand Name	Approach	Target	Therapeutic Area	Formulation Group	Indication
Drug Repurposing	Repositioning	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	Reformulation	✓	✓	✓	✓				✓	
	Combination	✓	✓	✓						✓

圖一 / 藥物重新定位涵蓋範圍與考量因子。

(source: IEK 情報網老藥新用開發生技藥物新藍海 2016/06/28 [7]。)

團隊成員開始廣泛收集藥物合併組合案例，評估有助於對抗新興病毒感染疾病。由於蛋白酶切割 IRF9 研究成果，促使我們評估蛋白酶抑制劑與 IFN $\alpha$  合併組合之抗病毒效果。Rupintrivir 為 Agouron Pharmaceuticals Inc. 針對引發普通感冒的鼻病毒所開發病毒 3C 蛋白酶抑制劑，後來該藥廠已被輝瑞大藥廠 (Pfizer Inc.) 併購。Rupintrivir 於開發時期曾進行二期臨床試驗，但因對鼻病毒抗病毒成效不佳而終止試驗。Rupintrivir 被報導可有效抑制腸病毒之 3C 蛋白酶 [8]，其可有效中和腸病毒。我們嘗試以不同濃度 Rupintrivir 與干擾素組合，評估抑制病毒所引發的細胞病變現象為協同加乘 (synergistic)、加成 (additive) 或拮抗 (antagonistic)。結果顯示兩種藥物的合併呈現劑量依隨效應 (dose-dependent manner)，相較於單獨使用，合併兩者使用具加乘效果，有助於抑制病毒感染引發細胞病變現象。由於 IFN- $\alpha$  為臨床用藥，而 Rupintrivir 曾於人體臨床試驗中證實為安全的實驗用藥，此項研究成果將提供腸病毒藥物治療可能之捷徑。相關實驗成果發表於 2011 年的 *Journal of Infectious Diseases* (2011;203(12):1784-90)[9]，文章於刊載後目前已被引用近 50 次，後續腸病毒感染於宿主免疫調控機制之逃脫與對抗機制相關研究，仍在持續進行中。

## 結語

目前對抗腸病毒疫苗在臨床二期進行中，藥物開發仍是未完待續的課題 [10]。由於 RNA 新興病毒的多變，抗病毒藥物開發與疫苗更是刻不容緩。研究團隊對抗病毒從”了解病毒”下手，由於對病毒與宿主細胞間的交互作用，抽絲剝繭獲取可能解決病毒感染途徑。然而病毒藉由不同策略躲開免疫系統抗病毒機制，如何妥善運用現有已開發藥物，因應病毒變異與創造可能的合併藥物效益，期最大化現有藥物的

可能性，面對新興病毒來臨風暴，運用老藥新用思維不失為藥物發展的捷徑，將有機會創造屬於新興病毒藥物開發新藍海。

## 致謝

感謝科技部、衛福部及國衛院的經費補助，林口長庚醫院施信如教授提供相關建議與討論，工研院生醫所王翔靖副研究員（前長庚施信如教授之研究團隊）共同參與研究。

## 參考文獻

1. Bleicher, K.H., et al., *Hit and lead generation: beyond high-throughput screening*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 369-78.
2. Breiman, A., et al., *Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3969-78.
3. Li, K., et al., *Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2992-7.
4. Morrison, J.M. and V.R. Racaniello, *Proteinase 2Apro is essential for enterovirus replication in type I interferon-treated cells*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4412-22.
5. Shih, S.R., et al., *Identification of genes involved in the host response to enterovirus 71 infection*. J Neurovirol, 2004. **10**(5): p. 293-304.
6. Blom, N., et al., *Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: discovering cellular targets by neural networks*. Protein Sci, 1996. **5**(11): p. 2203-16.
7. 洪慧貞, 徐祖安, 老藥新用開發生技藥物新藍海. IEK 情報網, 2016.
8. Lu, G., et al., *Enterovirus 71 and coxsackievirus A16 3C proteases: binding to rupintrivir and their substrates and anti-hand, foot, and mouth disease virus drug design*. J Virol, 2011. **85**(19): p. 10319-31.
9. Hung, H.C., et al., *Synergistic inhibition of enterovirus 71 replication by interferon and rupintrivir*. J Infect Dis, 2011. **203**(12): p. 1784-90.
10. Yi, E.J., et al., *Enterovirus 71 infection and vaccines*. Clin Exp Vaccine Res, 2017. **6**(1): p. 4-14.

## 第二節

---

# 台灣自製腸病毒 71 型疫苗成功了？！

---

江正榮

重大疫情創造出國人第一個開發自製「B4-E59」腸病毒 71 型疫苗。前輩的遠見與努力所建立基礎，加上政府大力支持的經費，才有機會結合不同的人才與團隊，共同為台灣的生技產業努力奮鬥，雖然在未被看好的環境，憑藉著是一股熱誠與不服輸得心理，現自製疫苗已進入臨床試驗三期，雖仍差最後一哩路，還請大家多給予鼓勵，相信腸病毒 71 型疫苗能為台灣生技產業開創出劃時代的指標性意義。

一次重大疫情，帶給了重大變革的契機，相對也創造了大好機會。身為台灣自行開發之腸病毒 71 型疫苗發明人之一的我，如今見證疫苗進展到臨床試驗三期，回溯這將近 20 年的時間，實在是憂喜參半。在國內沒有妥善規劃與整合的環境下，許多個別不同時間的事件、政策、計畫甚至成果，造成各種有形或無形的阻力與挫折，真的是歷經天時、地利、人和，才會創造出此令人驚艷的成果。

腸病毒 71 型疫苗開發期間，我最常聽到人家說：「只要有錢就可以買得到，為何自己要開發？」在這段漫長的研發時間中，只要爆發疫情，就批評疫苗進度太慢、病毒培養力價太差、台灣能力比不上國際疫苗大廠等。在所有批評、指教與問題中，我印象最深刻是一位大陸專家，問我「為何選擇 B4 基因型」，我當時沒有準備好答案，只回答當時台灣流行的基因型是以 B4 為主，事實上背後篩選疫苗株的過程，也是一段複雜的故事。

2001 年，我的團隊開始從本土分離之 9 株腸病毒 71 型 (1998 和 2000 年) 病毒，與何美鄉教授實驗室產生之適應株 YN3(1998 年流行的 Neu strain) 等共 10 株中篩選疫苗候選株，其主要篩選條件，為病毒在非洲綠猴腎細胞能夠培養至少力價為 6.5 (TCID<sub>50</sub>) 以上，且相互間的交叉中和抗體力價均高，當時篩選出 3 株疫苗候選株。2003 年再與 2002 年 6 株分離株作交叉中和抗體試驗比較，最終確認疫苗候選株為「B4-E59」。

當初為了證實 E59 是具寬廣性的中和抗體反應，發現 1998-2005 年 36 株腸病毒分離株中，E59 在老鼠所產生之抗血清中和效價可達 1:40 以上只佔 15 株 (41.67%) 尤其是針對 2004、2005 年的 C4 基因型病毒皆低於 1:40，這結果有點令人擔憂。但免子試驗方面，疫苗株 (E59)

所產生之抗血清中和效價可達 1:40 以上則佔了 29 株 (80.56%)。往後猴子抗血清的抗體力價證實也能順利中和其他不同基因型腸病毒。當初也另外篩選出一支 C4 基因型的後備疫苗候選株 E36，此病毒株以活毒靜脈免疫免子後之血清對 36 株腸病毒 71 型分離株所得的抗體中和效價，皆高於之前篩選出的原型疫苗株 E59，產生之抗血清中和效價可達 1:40 以上則佔 35 株 (97.2%)。

### 多年型計畫的支持

首先要感謝前輩的遠見和執著，提出疫苗相關之長遠計畫，由於下列計畫的支援，才有機會建立病毒性疫苗量產技術開發的儀器與設施，和周邊相關軟硬體支援系統（例如：疾管局（疾病管制局簡稱；疾病管制署前身）血清疫苗研製中心四樓-病毒性疫苗開發區與國衛院（國家衛生研究院簡稱）生物製劑先導工廠），並成為產研之間的橋樑。當然還有相關產製技術平台、原始生物材料和檢驗方法與流程的傳承。

台灣病毒性疫苗開發起源於 1998 年預防醫學研究所（疾病管制局前身）洪其璧所長提出之「人用疫苗自製計畫」，該計畫經多次修正，最終行政院核定計畫之主要目標是分階段興建研發為主、生產為輔之「生物製劑先導工廠」，內容包括：加強本土性及特殊性疫苗研發工作，使政府疫苗廠從生產技術研發與技術移轉方面，帶動民間產業發展，有效整合國內公、民營疫苗廠，妥善運用有限的人力與資源，並視民間能力與意願，階段性轉移疫苗生產與研發技術予民間。該計畫前期最重要的成果就是 1997 至 2003 年，廖明一博士帶領包括李淑英、周如文、江正榮、連偉成等四位博士，建立完整先進細胞培養日本腦炎疫苗生產與檢驗系統，包括：細胞培養病毒 (40L)、病毒純化量產技術平台、免疫抗原性和 DNA 之含量檢測、疫苗佐劑劑型等，和小白鼠、兔子及靈長類動物模式。前人所建立之病毒性疫苗開發技術平台，帶

給未來腸病毒 71 型疫苗開發，有明確的方向與指引。

另一個新開發疫苗必備的生物材料，就是培養非洲綠猴腎細胞 (Vero cell)。目前已上市疫苗產品大都採用非洲綠猴腎細胞當作培養基質，疾管局血清疫苗研製中心也於 1999 年從美國 ATCC 引進該細胞，作為培養日本腦炎病毒的基質，並建立一個母細胞種庫 (master cell bank, MCB) 及工作細胞種庫 (working cell bank, WCB)。然而國內並無相關認證機構可以進行安全性檢測，在一個偶然機會，經由醫藥查驗中心的同仁介紹一國外檢測機構，經由香港商安瑪西亞股份有限公司當媒介，簽訂合約協助將相關檢體運送至此機構檢驗。

於是在 2002 年 3 月初，我們將非洲綠猴腎細胞母細胞種庫送至英國 Q-One Biotech Ltd (BioRelience) 進行 21 項檢測，18 項通過檢測，並沒有細菌和病毒之汙染，也沒有證據顯示疾管局所製備之非洲綠猴腎細胞會造成腫瘤形成，且細胞指紋圖譜和標準品相同，雖然細胞染色體有些微受損情況，但瑕不掩瑜，仍於標準範圍容許範圍之內。後來國衛院、國光公司、基亞疫苗 (現為高端疫苗) 生產之腸病毒 71 型疫苗，皆由此安全之細胞庫分讓進而繁殖病毒所得。由於是第一次將細胞輸出國外檢測，各單位無相關經驗且無標準操作流程，都必須經過一番溝通與協商，打通國貿局、關稅局、農委會防檢局與林務局等，才慢慢建立各單位的單一窗口與標準申請輸出流程。往後國內廠商也都蕭規曹隨，遵循相關流程，得以快速順利完成出口進行相關檢測。

接續下一棒的國家型計畫，是 2007-2011 由疾病管制局與國家衛生研究院共同執行國科會 (科技部前身) 之「台灣人用疫苗研發 (含量產技術) 計畫」，本計畫緣起於流感疫苗自製計畫，隔年為強化疫苗研發基礎、因應新興傳染病突發緊急疫情、落實政府發展疫苗產業

政策，目的為整合國內有限資源與人才，建立國家疫苗研發團隊。此計畫挹注經費於四項重要疫苗研發：流感、細胞培養腸病毒 71 型、細胞培養日本腦炎病毒及 B 群腦膜炎球菌，目標為五年內完成 H5N1 流感疫苗、EV71 腸病毒疫苗、B 型流行性腦脊髓膜炎重組次單元疫苗及日本腦炎疫苗等四種疫苗之第一或二期臨床試驗。

正因為此計畫在國衛院先導工廠正式運作之下，挹注經費繼續支持腸病毒 71 型疫苗的研發，我們才能於 2008 年完成細胞庫與病毒庫製備；2009 年製備臨床用疫苗和建立檢驗分析方法；2010 年完成所有細胞庫與病毒庫之安全性檢測、致癌性測試和動物毒理試驗；2010 年 10 月取得第一期人體臨床試驗許可證，台大醫院及台北榮民總醫院共同執行 60 位 20~60 歲健康成年人第一期人體臨床試驗，臨床試驗結果資料顯示安全性良好，並能引發顯著的中和病毒抗體。

### **台灣疫苗產業大環境和周邊支援系統的建立**

疾病管制局於 2001 年 8 月 8 日曾召開「腸病毒 71 型疫苗研發」現況說明與產業界合作開發座談會，邀請產官學三方面共同研究討論，並公開徵求國內外廠商共同合作以加速腸病毒疫苗開發，希望經由廠商主導，疾管局提供必要之協助的方式，以加速疫苗之開發工作。當初會議參與廠商包括台灣安萬特藥品股份有限公司、永欣生物醫藥公司、美商惠氏藥廠（亞洲）股份有限公司台灣分公司、美商默沙東藥廠股份有限公司台灣分公司、荷商史克美占遠東股份有限公司台灣分公司、國光生物科技股份有限公司、創意疫苗科技股份有限公司、環宇生物科技股份有限公司、環球基因生物科技股份有限公司等 9 家，但提出計畫書只有三家。

疾管局依據廠商所提出之疫苗開發企劃書，原本評選出國光生物科技股份有限公司為優先合作廠商，但當時衛生署政策決定，自 2003

年 7 月 1 日起，疾管局生物製劑相關業務，改委由國衛院經營管理。國光公司考量市場需求與成本效益，且腸病毒 71 型疫苗技術尚未完備等情況下，腸病毒 71 型疫苗先轉由與國衛院合作接續開發，俟技術更趨成熟後再轉民間。因此，與國光公司的民間合作開發案暫告一段落，當然與產業界的交流也沉寂。

2010 年基亞生技成立疫苗事業處，台灣疫苗市場亦出現了良性競爭。2011 年疾病管制局因應防疫所需，結合政府與產業界的資源，持續擴展本局建立之腸病毒 71 型疫苗產製技術平台，並利用不同基因型之疫苗株，開發更具潛力之腸病毒 71 型疫苗。當時召開腸病毒 71 型疫苗合作開發案說明會，計有國光生物科技股份有限公司與基亞科技股份有現公司公司提出合作開發計畫書，經過評審，疾管局於 2011 年 11 月 1 日二度與國光公司簽訂「腸病毒 71 型疫苗合作研究開發計畫合約」，為避免與國光公司 2011 年 9 月簽訂「無血清細胞培養腸病毒 71 型疫苗相關技術」技術授權合約衝突，該項開發計畫以疾管局篩選出之 C4 基因型為本計畫疫苗候選株。由於滾動瓶培養方式 (roller bottle technology) 需要密集的勞力才能完成，此技術比較難以將生產規模放大，故進一步發展 TideCell 振盪式生物反應器和無血清製程等量產技術平台，開發一個效率更高、量產更大，以及更為簡便的產製平台。

2011 年 9 月 21 日國衛院、疾管局與國光公司簽訂無血清細胞培養腸病毒 71 型疫苗相關技術技術授權合約 (3 方合約)，2013 年 4 月 10 日補簽訂腸病毒 EV71 疫苗第 1 期臨床試驗相關資料技術授權合約 (3 方合約，已於 2011 年 10 月 26 日核准執行)，同一日國衛院、疾管局與基亞公司也簽訂無血清細胞培養腸病毒 71 型疫苗相關技術技術授權合約 (3 方合約)，2013 年 6 月 28 日補簽訂腸病毒 EV71 疫苗第 1 期臨

床試驗相關資料技術授權合約 (3 方合約，已於 2011 年 10 月 26 日核准執行)。國內兩家廠商開始進行相關產製與檢驗技術之建立，也使國內疫苗產業更加受到注意。

國光生技旗下子公司安特羅生技，2016 和 2018 年在台灣分別完成 2 件腸病毒 71 型疫苗第二期臨床試驗。2018 年 4 月獲食品藥物管理署 (TFDA) 核准第三期臨床試驗計畫書審查 (IND)，6 月分別在台灣大學附設醫院、中國醫藥大學附設醫院、台北榮民總醫院、林口長庚紀念醫院、台中榮民總醫院、彰化基督教醫院和台灣大學附設醫院新竹分院等 7 家大型醫院同步進行臨床試驗，預計共招募 1276 位幼兒，2019 年第 2 季將於越南進入第三期臨床試驗，預計越南收案人數約 2700 人。

高端疫苗（前基亞疫苗）於 2017 年 7 月 28 日取得 TFDA 核准在臺執行第三期臨床試驗，預計 2019 年上半年在台啟動收案，約 1200 人，同時申請取得越南主管機關衛福部技術局第一階段核准作業，預計 2019 年在越南執行第三期多國多中心臨床試驗，預計收案 2400 人左右。

### **疫苗產業相關軟硬體的建立**

疾管局血清疫苗研製中心因為從事生物製劑生產，具備動物實驗相關設施與管理室，因此從事動物實驗對我們來說十分方便，不管是老鼠、兔子都能快速有效率的取得，快速了解每批疫苗的中和抗體力價與一致性，並且能有效篩選出疫苗是否具備交叉中和的特性。當時缺乏疫苗保護效價測試的動物模式，很幸運的是，當時該中心收養了多隻台灣獼猴，且接種疫苗猴子產生之中和抗體力價也能有效中和 C4 基因型病毒，使腸病毒 71 型只有一種血清型的理論更進一步證實。2007

年日本 Arita M 與新加坡 Damian Guang Foo 等學者以猴子或小鼠研究也發現，經免疫 EV71 後的猴子或小鼠所取得之血清抗體，可以成功的中和各種 EV71 基因型（A，B1，B4，C2，C4）病毒，證實單一病毒株的中和抗體，可能有交叉中和其他基因型病毒株的能力，進而歸納出腸病毒 71 型只有一種血清型。

台灣獼猴數量眾多且當時是保育類動物，也有潛力成為靈長類實驗動物，然而台灣以靈長類為動物模式的實驗寥寥可數，相關的試驗設施也不完備。有鑑於此，淡水家畜衛生試驗所除進一步建構靈長類試驗設施外，也利用已有的靈長類動物進行生醫實驗。國衛院有機會與該所合作進行猴子實驗，使腸病毒 71 型疫苗臨床前動物試驗結果更加完備，並增添開發之腸病毒 71 型疫苗為真正有效疫苗之信心。

2001 年財團法人生物技術開發中心藥物發展組毒理試驗室，協助疾管局血清疫苗研製中心，利用大鼠來測試新開發細胞培養日本腦炎疫苗的亞急性毒性測試，並給予有認證的檢驗報告，帶給國衛院為新開發之腸病毒 71 型疫苗進行毒性試驗時，一份非常有用的參考依據。爾後國衛院之毒理測試，轉由臨床前試驗服務獲得全國認證基金會 (TAF) 認證且實驗動物中心獲得國際實驗動物認證協會 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International；AAALAC) 認證通過的進階公司執行，慶幸台灣已具有認證且具國際水準的機構，讓台灣生技產業開發進度更向前邁進一大步。

## 政策的轉變與合適開發環境的配合

除了人用疫苗自製計畫研發經費的支持，開發環境與人員的訓

練與經驗極為重要。疾病管制局血清疫苗研製中心 1988 年 6 月通過 GMP 認證，成為政府第一家 GMP 藥廠。2004 年 6 月 29 日，血清疫苗研製中心通過查驗，完成藥品全面實施確校作業。在此制度之下，所有參與開發人員都是以產品化的方向考量與進行，並接受有關 CMP 相關訓練課程，使未來實驗與量產級開發之間的鴻溝降低且能快速解決。2003 年 2 月疾管局與國衛院簽訂「行政院衛生署疾病管制局與財團法人國家衛生研究院技術合作契約」，與 2005 年 12 月簽訂之「行政院衛生署疾病管制局與財團法人國家衛生研究院生物製劑生產技術及研發合作契約」。

國衛院在先導工廠尚未完成建立運作之初，派駐人員至疾病管制局血清疫苗研製中心，學習在 cGMP 的環境下進行實務操作及長期重複作業，以期達到技術純熟，符合 GMP 的要求。經過三年的訓練，能快速銜接至生物製劑先導工廠的運作並為未來產品生產奠定良好的基礎。另外 2004 年疾管局將原先血清疫苗研製中心 4 樓，改建成符合 GMP 精神之病毒性疫苗開發區，在疾管局研發人員的指導與國衛院新進人員的合作之下，建立包括 20 公升以上之試量產系統、膠體層析病毒純化系統、病毒不活化劑量與期程、佐劑選擇與吸附條件、動物免疫方式與期程、抗原抗體檢測系統、製程與檢驗方式等方法，陸續生產至少 20 批 20 公升的病毒原液，接著大部分的開發人員陸續轉任至國衛院疫苗研發中心，2007 年正式連續製造出製造出容量為 20 公升的病毒 3 批次，這些病毒都是以旋轉瓶 (roller bottle) 培養技術進行培養。2008 年 3 月疾管局與國衛院簽訂「細胞培養腸病毒 71 型疫苗產製技術授權」，由國衛院承接疾管局的 B4 基因型腸病毒 71 型病毒疫苗先期研究成果，在國衛院先導工廠進行後續製程開發、疫苗檢測方法與疫苗規格等研究。

2001 年 11 月，李前署長明亮召開之有關衛生署疾病管制局興建「生物製劑先導工廠」相關問題會議，會議結論明示：應先將國家衛生研究院、疾病管制局血清疫苗研製中心及國防醫學院預防醫學研究所之研究資源加以有效整合，再尋適當場所，作為建廠基地，未來之先導工廠，將朝財團法人形式運作，隸屬於國家衛生研究院，使其營運更具彈性。2003 年 1 月，行政院原則同意「人用疫苗自製計畫」移由國家衛生研究院負責規劃執行。2003 年 6 月成立國家衛生研究院疫苗研發中心，聘請學有專精及具產業經驗之莊再成博士擔任主任，領導研究團隊。2007 年 7 月完成廠房硬體工程，並於 2008 年 9 月取得工廠登記證，於 2008 年 12 月底完成場房設施與儀器設備之 cGMP 確效作業，2009 年起正式營運，開發及生產本土需求的生物製劑。

國衛院所有在疾管局工廠進行開發之人員，幾乎都轉換至先導工廠進一步建立量產製程與檢驗系統，不論人才與技術上的銜接皆算順利，並於 2010 年進行第一期疫苗臨床試驗，以及 2013-2016 年協助國內疫苗廠製造臨床試驗用疫苗。

### **法規諮詢機制的建立**

與法規單位建立滾動式審查機制，源起於流感疫苗自製計畫，2008 年委託財團法人醫藥品查驗中心朱夢麟特聘研究員和高純琇副執行長執行之建立「台灣人用疫苗研發（含量產技術）計畫」臨床試驗之法規諮詢及輔導機制，其主要目標就是提供 H5N1 流感疫苗、細胞培養日本腦炎疫苗、腸病毒 71 型疫苗及 B 型流行性腦脊髓膜炎重組次單元疫苗，四項人用疫苗產品研發相關的法規諮詢及輔導。

此輔導機制針對四項疫苗產品之特定研發議題，建立問題導向之

「人用疫苗產品諮詢及溝通會議」制度，研擬人用疫苗產品（病毒製成疫苗、基因重組製成疫苗）早期臨床試驗所需之臨床前審查清單／簡明考量。藉由此計畫，法規單位才能了解腸病毒 71 型疫苗研發進度與結果，並幫助研發單位能早期與法規單位諮詢，得到建議與問題解套。光是在 2000 年，就至少有 10 次以上的諮詢。另外，2010 年藥品查驗中心也召開了腸病毒 71 型疫苗專家諮詢會議，針對該中心草擬之「腸病毒 71 型疫苗之臨床前審查重點及考量」和「腸病毒 71 型臨床前試驗設計參考要點」進行討論與修正，期望未來腸病毒 71 型疫苗技轉廠商諮詢皆能遵循同樣模式且雙方容易達成共識，減少許多申請所遭遇到的困難。

### 成果的心路歷程與期許

第一次將腸病毒 71 型疫苗研發成果對外發表，是 2003 年 12 月與國衛院疫苗中心莊再成主任，參加冷泉港實驗室（Cold Spring Harbor Laboratory）於美國紐約所舉辦之第三屆「冷泉港冬季生物技術研討會（The Third Cold Spring Harbor Winter Biotechnology Conference）」，以海報方式發表「腸病毒 71 型疫苗研發成果」。但此次研討會主題偏重於以分子生物技術製備疫苗，許多報告太偏學術研究，對我們未來追求以產品化的觀念無法得到共鳴，加上我們的研發成果多琢磨於傳統技術的應用，所以無法得到更多的迴響與建議。

第二次對外發表，是 2008 年 9 月赴新加坡參加亞太地區手足口病會議論壇報告，根據報告內容，我國仍領先新加坡的 Sing Vax 公司和中國 Sinovac Biotech。然而 Sinovac Biotech 不僅與中國 CDC 合作，且具有研發、製造與銷售經驗，加上大陸法規單位的配合，當時就覺得該公司有可能比台灣更快進入臨床試驗。

2010 年 9 月第三次對外發表，則是至上海參加「海峽兩岸腸病毒研討會」，我引述 2008 年 John Modlin 博士在新英格蘭醫學雜誌的話作為開場白：「100 年前小兒麻痺疫情在世界不同地點小規模爆發，鮮人注意，結果後來造成歐美大流行，無數兒童枉死。腸病毒 71 型會重演歷史嗎？東南亞的地區性流行有朝一日也會殃及歐美嗎？無人可以正確預測。然而，可以斷言的是，今日吾人若不先作準備，必定為後人譏笑愚蠢。」

然而會議結束之後，我發現我國研發進度不再領先，大陸有三個企業提出 IND 新藥申請，其中速度最快的是國藥集團 2010 年 3 月份即提出，且已與法規單位開會討論並完成補件二次，只等待最後臨床試驗之批准。2016 年大陸中國醫科院、國藥中生武漢二家國營藥廠與民營的北京科興，推出腸病毒 71 型疫苗上市，7 年的時間就將我國領先的地位超越，別人的成功加上國內的批評身為研發人的我，感到相當失落與不服氣。

我國自發生疫情即認知必須開始做準備，雖然都是各自努力，無法統合為共同目標勇往直前，且每過一段時間就有批評，但仍有人和相關單位願意付出與協助，最後終於讓我們將大家努力的成果統合起來。雖然曾經從領先至落後，至少讓我國新開發的疫苗有一個比較好的結果，且將進入臨床試驗三期，在我國生技產業發展合作史上，可說具有劃時代的指標性意義。一路上感謝許多無名英雄，現雖仍差最後一段路，還請大家多給予鼓勵。另外值得驕傲的是，腸病毒 71 型疫苗的開發研究，培養出許多優秀人才，不僅成為國衛院生物製劑先導工廠的中間份子，甚至有些人再轉戰至業界，為疫苗產業注入許多新活力，也為我國生技產業帶來新希望。

## 參考資料

1. 百年榮耀，世紀傳承 -1909~2014 台灣百年公立疫苗製造史編者 / 作者：衛生福利部疾病管制署 出版機關：衛生福利部疾病管制署 出版日期：2014 年 12 月
2. Foo DGW, Alonso S, Phoon MC, Ramachandran NP, Chow VTK, Poh CL. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res* 2007;125:61-8.
3. Foo DGW, Alonso S, Chow VTK, Poh CL. 2007 Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide *Microbes and Infection* 9, 1299-1306.
4. Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, et al. 2007 An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol.* 81:9386-95.
5. 環球生技月刊 國光子公司 安特羅執行國產腸病毒疫苗三期臨床試驗 作者：彭梓涵 日期：2018/07/06
6. www.genetingo.com 高端疫苗設立越南子公司，預計今年下半年在台灣及越南兩地執行腸病毒 71 型疫苗第三期臨床試驗 作者：Genet 日期：2018/07/30
7. John F. Modlin Enterovirus Déjà VuN *Engl J Med* 2007; 356:1204-1205

## 第二節 台灣自製腸病毒 71 型疫苗成功了？！

## 第五章

# 台灣腸病毒 71 型流行病學暨 分子檢驗研究

羅淑婷 鍾婉瑜 江百善 賈敏原 黃美棕 張文瓊 李敏西

2008 年與 2012 年台灣發生 EV71 大流行，國衛院與長庚兒童醫院合作執行世代研究發現：嬰幼兒的母體中和抗體到 6 個月大消失殆盡，然後 EV71 感染率開始迅速增加，因此疫苗開發對象應針對 6 個月大以下嬰幼兒。近 2 年 EV-D68 與伊科病毒 11 型成為腸病毒重症主要血清型，新型分子檢測法 (CODEHOP) 能快速正確檢驗腸病毒血清型別，值得推廣應用在腸病毒偵測。

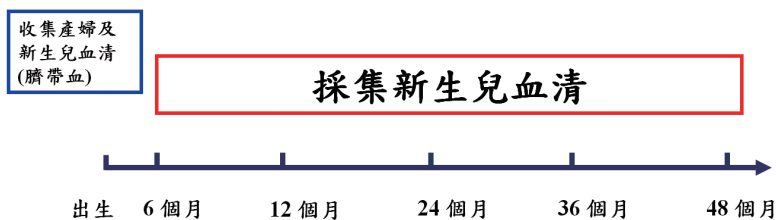
## 壹、台灣腸病毒 71 型 (EV71) 流行病學世代研究

腸病毒可區分成 100 種以上血清型，主要感染對象為嬰幼兒，EV71 於 1969 年在美國加州首次被分離出來，自此，全世界陸續偵測到此病毒的流行。感染 EV71 的幼兒大部分呈現輕微症狀，如手足口症，少數有神經與心肺器官的併發症 (Bible et al 2007, Schmidt et al 1974)。近期的研究結果指出 EV71 感染引發的中樞神經系統併發症會造成運動統合及智能障礙 (Chang et al 2007, Huang et al 2006)。全世界 EV71 有兩種流行型態：1) 輕度流行伴隨少數中樞神經病變的病例與低致死率；2) 重度流行伴隨多數中樞神經病變的病例與高致死率 (Shindarov et al 1979)。EV71 重度流行的事件有：1975 年的保加利亞大流行伴隨 44 例死亡 (Nagy et al 1982)、1978 年的匈牙利大流行伴隨 45 例死亡 (Chan et al 2000)、1997 年的馬來西亞大流行伴隨 29 例死亡 (Ho et al 1999)、1998 年的台灣大流行伴隨 78 例死亡 (Chan et al 2003)、2000 年的新加坡大流行伴隨 5 例死亡 (Zhang et al 2009)，在 2007-2009 年間，中國更發生了超過 100 例死亡的流行疫情 (Lee & Chang 2010, Lin et al 2003, WHO 2008)。台灣自 1998 年發生嚴重的全國性 EV71 疫情以來，又分別於 2000-2001 年、2004-2005 年、2008-2009 年及 2012 年陸續發生大流行 (Chang et al 2002, Chang et al 2004, Chen et al 2007, Huang et al 2008, Huang et al 2009, Kung et al 2007, Lee et al 2010, Lin et al 2006, Luo et al 2009, Tseng et al 2007)。國家衛生研究院 (簡稱國衛院) 與林口長庚醫院產科 (趙安祥主任) 及長庚兒童醫院 (林奏延院長及林瑞瑩主任) 合作，從 2006 年開始執行「EV71 流行病學世代研究」7 年追蹤計畫，其研究成果可區分為四部分如下：

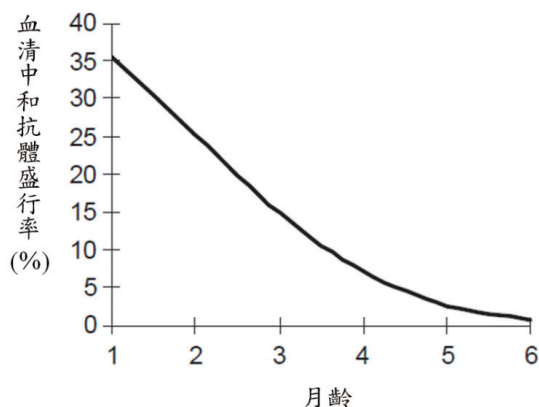
- 一、台灣嬰兒體內 EV71 母體抗體的衰退速率
- 二、2008 年台灣 EV71 流行其臨床、病毒學與血清學上的特徵
- 三、台灣嬰幼兒 EV71 年齡別發生率
- 四、台灣 EV71 分子流行病學與病毒抗原演化分析

## 一、台灣嬰兒體內 EV71 母體抗體的衰退速率

台灣鄉村地區的 EV71 血清中和抗體陽性率顯著高於都市地區。因此，本研究選擇北台灣高生產率的林口長庚醫院為研究地點，收集 307 名產婦與其新生兒臍帶血的血清檢體，並於 6 個月大、12 個月大、24 個月大、36 個月大及 48 個月大時持續追蹤採集幼兒血清，測量 EV71 血清中和抗體 (圖一)。新生兒出生時血清中和抗體陽性率為 51%，到 6 個月大時只有 4 名幼兒是抗體陽性，其中 1 名幼兒中和抗體效價明顯高於出生時的抗體效價，代表是該名幼兒受到自然感染後產生的抗體，扣除該名自然感染幼童後，利用數理模式估算出 EV71 母體抗體半衰期為 42 天，進一步利用常態分佈函數預測幼童在 1 個月大時、2 個月大時、3 個月大時、4 個月大時、5 個月大時及 6 個月大時，血清中和抗體陽性率依序為 35%、25%、14%、7%、3% 及 1% (圖二)(Luo et al 2009)。



圖一 / 新生兒世代追蹤研究設計



圖二 / EV71 母體中和抗體在新生兒 1 至 6 個月大的血清盛行率 (Luo et al 2009)

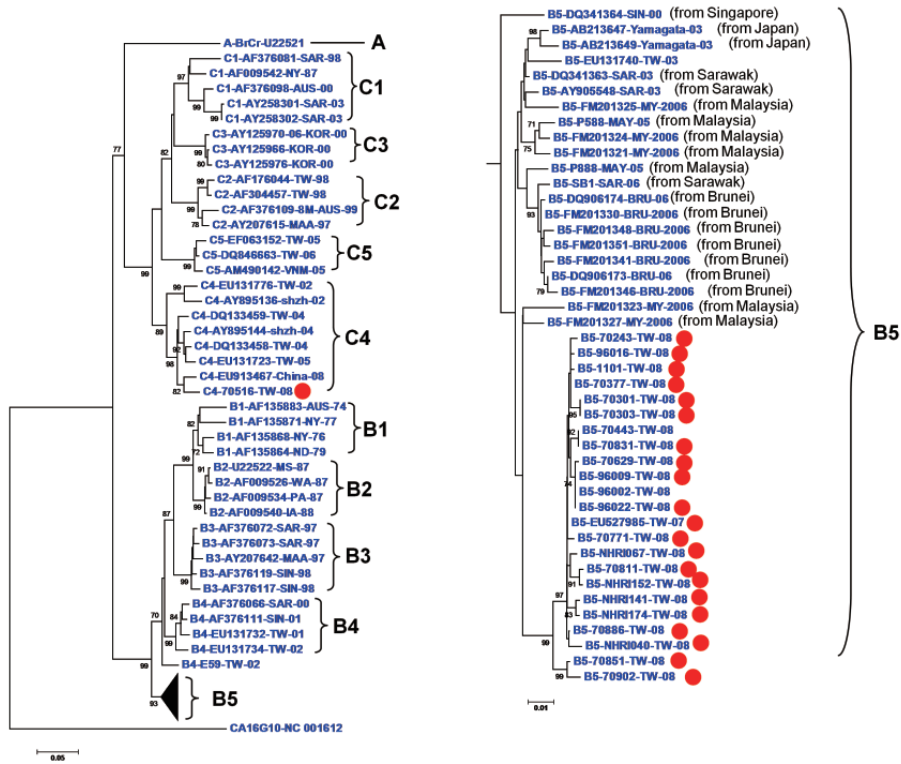
## 二、2008 年台灣 EV71 流行其臨床、病毒學與血清學上的特徵

在台灣，不同基因型 (C2、B4、C4) 的 EV71 流行株分別造成了 1998、2000-2001、2004-2005 的大流行。2008 年台灣再度發生全國性的 EV71 疫情，回溯分析林口長庚兒童醫院 2008 年共有 585 例腸病毒住院病例，其中主要的血清型為克沙奇 A2(CVA2)202 例，其次為 EV71 共 111 例。在這 111 個住院病例中，21 例 (19%) 產生併發症，包含 1 個併發腦炎及心肺衰竭的死亡病例，相較於同年其他非 71 型腸病毒僅低於 5% 的併發症發生率，EV71 住院病例的併發症發生率顯著較高 (表一)。分離自住院病例與新生兒世代的 22 株 EV71 病毒，根據基因親緣分析，其中 21 株為 B5 基因型，其基因序列近似於東南亞流行的病毒株，其餘 1 株為 C4 基因型，其基因序列近似於中國流行的病毒株 (圖三)。

表一 / 2008 年長庚兒童醫院腸病毒住院病例的臨床症狀 (Lee et al 2010)

臨床症狀	腸病毒 71 型 (N=111)	克沙奇病毒 A2 (N=202)	其他腸病毒 *
	n (%)	n (%)	n (%)
無併發症的病例	90 (81)	200 (99)	258 (94)
疱疹性咽峽炎	18	164	117
手足口症	69	11	26
玫瑰疹、發燒、上呼吸道感染	3	25	115
有併發症的病例	21 (19)	2 (1)	17 (6)
無菌性腦膜炎	0	0	0
手足口症 + 無菌性腦膜炎	1	0	14
疱疹性咽峽炎 + 腦炎	5	1	0
手足口症 + 腦炎	6	0	0
手足口症 + 類小兒麻痺症狀	3	0	0
手足口症 + 急性心臟衰竭	2	0	0
手足口症 + 腦炎 + 心肺衰竭	4	0	0
其他	0	1	3

\*克沙奇病毒 A4、A5、A6、A9、A10、A16、B1、B4、B5，伊科病毒 4 型、9 型、30 型，及尚無法鑑別血清型的腸病毒



圖三 / 2008 年 EV71 基因演化樹分析 ( 圓圈標記的是 2008 年分離的病毒株 ) (Lee et al 2010)

### 三、台灣嬰幼兒 EV71 年齡別發生率

2008-2009 年台灣再度發生全國性的 EV71 大流行，累計至 2013 年底，在 6 個月大、12 個月大、24 個月大及 36 個月大回診個案數分別有 307 位、391 位、294 位及 66 位幼兒回診。各年齡層追蹤率分別為 73%、67%、55% 及 51%。幼兒感染 EV71 年齡別發生率隨著年齡增加而上升，EV71 年齡別發生率在 0-6 個月大、7-12 個月大、13-24 個月大及 25-36 個月大依序為每 100 人年 1.71、4.09、5.74 及 4.97 ( 表二 )，進一步計算 EV71 累積發生率在 6 個月大、12 個月大、24 個月大及 36 個月大分別為每 0.65%、2.05%、6.46% 及 15.15% ( 表三 )。

2012-2013 年台灣再度發生全國性的 EV71 大流行，累計至 2013 年底，在 6 個月大、12 個月大、24 個月大、36 個月大、48 個月大、60 個月大及 72 個月大回診個案數分別有 562 位、504 位、435 位、360 位、321 位、269 位及 179 位幼兒回診，累積發生率在這些年齡分別為 1.07%、2.14%、5.88%、9.40%、13.80%、28.00% 及 32.03%，此外，我們也根據血清中和抗體效價的變化偵測到重覆感染 EV71 的個案，他們皆未出現腸病毒症狀 (Lee et al 2012)。

表二 / 2008-2009 年北台灣幼兒 EV71 的年齡別發生率 (Lee et al 2012)

年齡 (月)	追蹤人數 (人月)	感染人數			發生率 <sup>#</sup> (95% 信賴區間 <sup>§</sup> )
		有症狀	無症狀 <sup>*</sup>	總數	
0-6	307 (1407)	0	2	2	1.71 (0.21, 6.16)
7-12	391 (2052)	5	2	7	4.09 (1.65, 8.43)
13-24	294 (3343)	13	3	16	5.74 (3.28, 9.33)
25-36	66 (724)	2	1	3	4.97 (1.03, 14.53)
總數		20	8	28	

\* 無症狀感染定義為未呈現臨床症狀者且 EV 71 血清中和抗體陽轉

<sup>#</sup> 每 100 人年；<sup>§</sup> 95% 信賴區間是以 Poisson distribution 計算

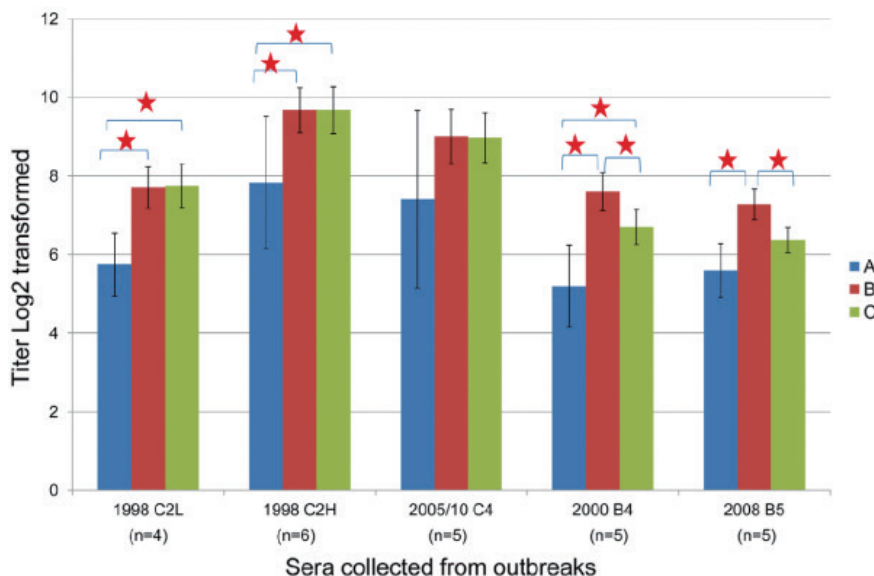
表三 / 2008-2009 年北台灣幼兒 EV71 的累積發生率 (Lee et al 2012)

採血年齡 (月)	幼兒追蹤 人數	各年齡層感染人數 (月)					發生率 <sup>*</sup> (95% 信賴區間 <sup>#</sup> )
		0-6	7-12	13-24	25-36	總數	
6	307	2				2	0.65 (0.08, 2.33)
12	391	1	7			8	2.05 (0.89, 3.99)
24	294		3	16		19	6.46 (3.94, 9.91)
36	66			7	3	10	15.15 (7.51, 26.10)

\* 每 100 人；<sup>#</sup> 95% 信賴區間是以二項式精確分佈計算

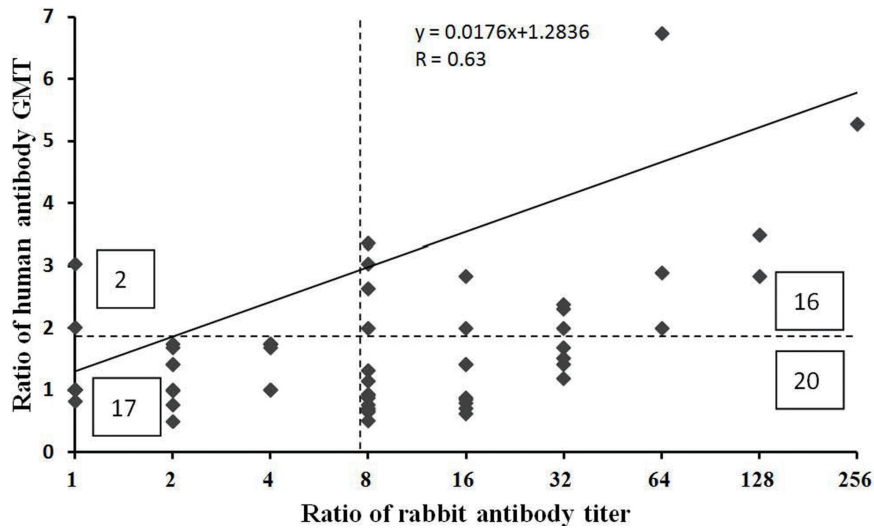
#### 四、台灣 EV71 分子流行病學與病毒抗原演化分析

EV71 可區分為 3 種主要基因群 (A、B 及 C) 與 11 種基因型 (A、B1-B5 及 C1-C5)。這些基因型是否有抗原性差異並不清楚，而抗原性差異與疫苗株選擇密切相關，因此，我們收集 1998 年、2000 年、2005 年、2008 年與 2010 年的 EV71 病例的血清進行交叉中和抗體檢測來評估抗原差異 (圖四)，檢驗結果發現基因群 B 與 C 之間的抗原差異不大，但此兩群病毒與基因型 A 病毒的抗原差異有 4 倍以上的差距，並且發現 5 個胺基酸位點突變 (VP2 中的 N143D; VP1 中的 K18R, H116Y, D167E, 及 S275A) 可能與抗原變異有關，對於未來 EV71 病毒偵測提供更精確的資訊 (Huang et al 2013)。



圖四 / 1998-2008 年 EV71 病例的血清交叉中和抗體檢測分布 (Huang et al 2013)

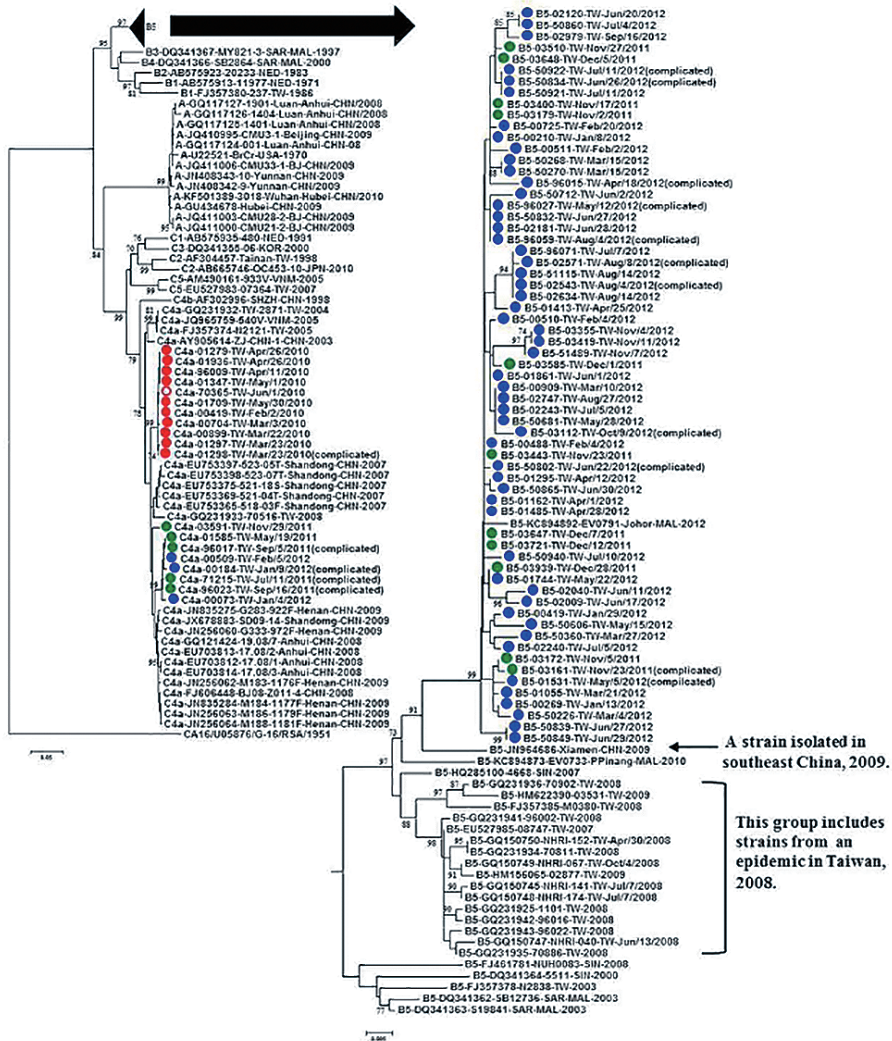
由於幼童血清不易收集且難度高，因此有必要建立適宜的動物模式來監測腸病毒抗原性變異。我們利用純化的活病毒來免疫兔子，並收集兔子的抗血清，進行交叉中和抗體，發現兔子的交叉中和抗體反應與幼兒的交叉中和抗體反應相似。圖五顯示兔子的血清中和抗體反應有 8 倍以上的差異時，可以當作篩選抗原變異株的標準。



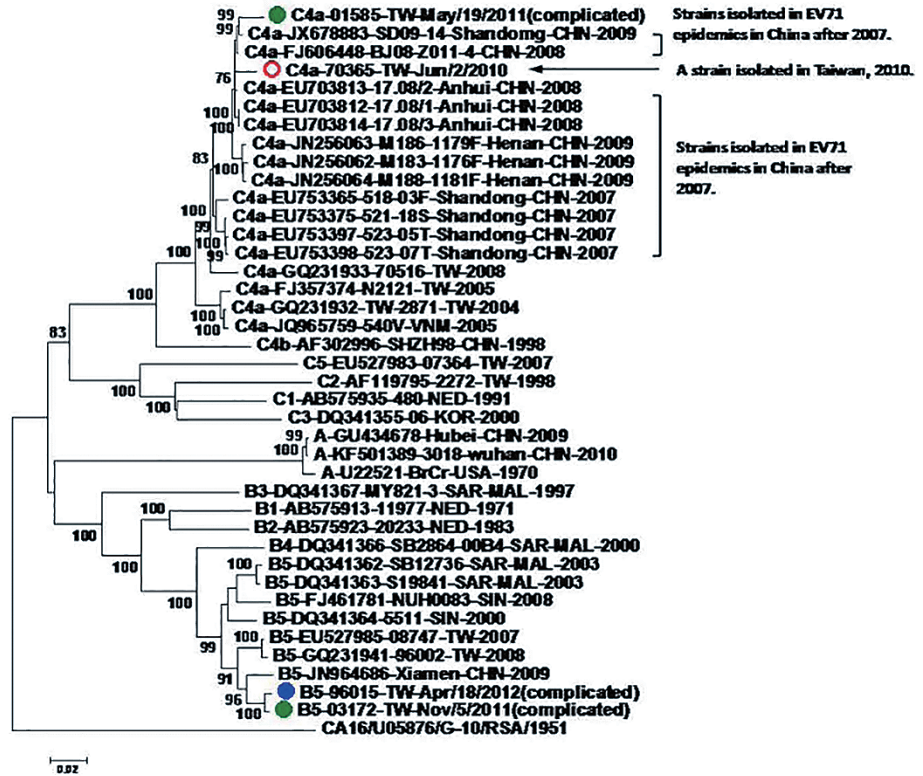
圖五 / 兔子與人類的 EV71 血清抗體效價的相關性 (Chia et al 2014)

台灣在 2008-2009 年發生 EV71 大流行，主要基因型為 B5，2012 年又發生 EV71 大流行，為了明瞭 2010-2012 年 EV71 基因及抗原演化，我們在林口長庚兒童醫院收集住院病例分離的 EV71 病毒株，2010 - 2012 年分別有 10、16 與 99 株，其中 82 株完成 EV71 基因檢測，17 株為 C4a 基因型與 65 株為 B5 基因型，2010 及 2011 年以 C4a 病毒為主，B5 病毒於 2011 年下半年出現，然後於 2012 年造成大流行。VP1 基因親緣分析顯示：1) 2010-2012 年分離的 C4a 病毒可分成 2 群，可能來自中國不同地區；2) 2012 年的 B5 病毒與 2008-2009 年台灣流行的 B5 病毒已有明顯差異，反而與東南亞及中國廈門 2009-2012 年流行的 B5 病毒較為相似 (圖六)。為了明瞭此波流行的 B5 及 C4a 病毒株是否有抗原性差異，我們收集 20 名感染 B5 病毒及 10 名感染 C4a 病毒的幼兒的血清檢測交叉中和抗體反應，結果顯現此波流行的 B5 及 C4a 病毒株彼此間沒有顯著抗原差異，因此應有交叉保護力，至於為何 C4a 病毒先傳進台灣卻未造成大流行，值得進一步研究。此外，綜合過去 20 年 EV71 病毒在台灣基因演化發現，每次大流行都是外來的病毒所引起，腸病毒防治需加強國際疫情掌握，包括病毒血清型及基因型 (Luo et al 2015)。

(A)



(B)



圖六 / EV71 基因演化樹分析 (A)VP1 基因分析結果 (B) 全基因分析結果 (紅、綠及藍圓圈標記的分別是 2010、2011 及 2012 年分離的病毒株)(Luo et al 2015)

## 貳、利用新型分子檢測法進行腸病毒偵測

腸病毒檢驗方法包括：抗原檢測、分子核酸檢測及血清抗體檢測三大類，其優缺點請見表四。目前坊間最常使用的傳統檢測腸病毒以及分型的方法為病毒分離及免疫螢光法 (Virus isolation/immunofluorescence assay, VI-IFA)，傳統檢測需要準備多種細胞株及單株抗體，且要耗時 7-14 天才能完成，消耗大量人力，財力以及時間，所以在急性爆發期無法提供快速的檢驗報告。目前開發快速檢測腸病毒的方法，主要是利用反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 增殖 5' NTR 基因的分子檢測，可應用在住院病人及門診病人上，和傳統 VI-IFA 方法相比，可節省時間且靈敏度更高，但只能針對少數血清型別 (表四)。除此之外，美國疾管中心 (CDC) 已發展一個新型的分子檢測方法 - 保留簡併性雜交寡核苷酸引子 (COnsensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer, CODEHOP)，可以同時檢測和鑑定所有的腸病毒血清型。此外，CODEHOP 可以擴增腸病毒序列中具有高度變異性的 VP1 基因而不侷限於 5'NTR 保守區域，因此相較於以往的分子檢測法，更有效率的鑑別腸病毒的血清型 (Nix et al 2006)。為了比較上述三種檢驗方法 (VI-IFA、5'NTR-RT-PCR 及 VP1-CODEHOP) 在臨床檢體的檢驗效果，本研究室收集 110 例疑似腸病毒的喉嚨拭子進行檢測，此三種方法各有優缺點，個別方法無法當作黃金標準，因此我們以此三種方法的共識決 (兩種以上的方法，其結果一致者) 當作黃金標準，計算個別檢驗方法的正確率 (agreement)，結果顯示 VP1-CODEHOP 的正確率最高 (96%)，其次為 VI-IFA (89%) 及 5'NTR-RT-PCR (88%) (Chiang et al 2012)。

表四 / 比較實驗室腸病毒檢驗方法 (引自鍾婉瑜等 2017 感染控制雜誌)

方法	優點	缺點
Virus isolation/IFA	提供病毒做進一步分析	低靈敏度；耗時；需要專業人力； 需要儲備多型單株抗體
RT-PCR	靈敏度高；節省時間	需要專業人力；不同血清型需設計 不同引子；只能檢測少數血清型
CODEHOP RT-PCR	靈敏度高；節省時間： 可同時檢測所有血清型	需要專業人力；需要定序
Serology: neutralizing antibody	靈敏度高；特異性高	需要專業人力；需要配對血清
Serology IgM	快速診斷	偽陽性高；發病前三天高偽陰性； 不易同時檢測不同血清型

反轉錄聚合酶連鎖反應 RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction

為了進一步評估 VP1-CODEHOP 是否可作為常規腸病毒偵測的檢驗工具，我們檢測了 431 例幼兒腸病毒疑似病例的喉嚨拭子，這些幼兒參與國衛院與長庚兒童醫院進行的嬰幼兒世代追蹤研究，VI-IFA 及 VP1-CODEHOP 的陽性率分別為 48% 及 58% (表五)，再度證實 VP1-CODEHOP 比較敏感，此外我們也針對兩種方法檢驗血清型不一致的個案以血清中和抗體檢驗來進一步確認，結果也證實 VP1-CODEHOP 有較佳準確度 (Chung et al 2016)。

表五 / 2008-2012 年比較兩種腸病毒檢測方法的陽性率 (引自鍾婉瑜等 2017 感染控制雜誌)

病例發病及其喉嚨拭子 採檢年度	VI -IFA n/N (%)	VP1 -CODEHOP n/N (%)
2008	18/61 (29.5)	22/61 (36.1)
2009	21/49 (42.9)	26/49 (53.1)
2010	89/160 (55.6)	112/160 (70.0)
2011	40/86 (46.5)	47/86 (54.7)
2012	40/75 (53.3)	43/75 (57.3)
總計	208/431 (48.3)	250/431 (58.0)

目前台灣預防腸病毒重症的相關策略主要是勤洗手及幼兒園停課，2010-2013 年期間台灣地區每年約有 3,000~6,000 個班級停課，以防止腸病毒流行 (表六)，令人驚訝的是，2010 年和 2013 年僅僅發現了零星偶發的腸病毒相關的重症病例，但在這兩年之內，停課了 5,000 多個班級，5-7 天的停課可能會對一個雙薪家庭造成嚴重的困擾，並對社會造成負擔。最近世界衛生組織 (WHO) 已正式推薦 VP1-CODEHOP 為腸病毒偵測的工具 (WHO 2015)，根據本研究室的經驗，VP1-CODEHOP 可進一步應用於判斷停課時間長短的依據，目前 VP1-CODEHOP 可於一般具常規設備的分生實驗室完成檢測，其單次材料成本低於 20 美元，與每年因不必要的停課而引起的直接和間接社會成本相比，VP1-CODEHOP 決策平台可能是具有成本效益的工具 (鍾婉瑜等 2017 感染控制雜誌)。

表六 / 台灣 2010-2013 年腸病毒停課統計 (引自鍾婉瑜等 2017 感染控制雜誌)

年代	重症病例 *	EV71重症病例 *	疾管署合約實驗室腸病毒病例	疾管署合約實驗室EV71確診病例	停課班級數
2010	16	12 (75%)	2,636	51 (1.9%)	5,857
2011	59	59 (100%)	2,172	349 (16.1%)	3,114
2012	153	144 (94%)	1,744	923 (52.9%)	6,033
2013	12	6 (50%)	1,454	22 (1.5%)	5,736

資料來源：台灣衛生福利部疾病管制署。

\* 不同年分所使用的檢驗方法不盡相同，實驗數據僅供參考

### 叁、結語

EV71 仍持續威脅亞洲地區幼兒的健康，基於公共衛生上的重要性，研發 EV71 疫苗已成為東南亞國家的首要衛生政策。國衛院與林口長庚醫院長達 7 年以上合作關係，成功建立北台灣 EV71 流行學病與分子流行病學資料庫平台，並且提供台灣與其他國家 EV71 疫苗開發與臨床試驗的參考。

台灣於 1998 年發生 EV71 大流行，死亡病例高達 78 例，從此 EV71 每 3-4 年造成一次大流行，是台灣造成腸病毒重症的主要病毒，但近 2 年來此流行型態已改變，2017 年的主要腸病毒重症是由腸病毒 D68 引起 (12 例)，2018 年至 8 月初的主要腸病毒重症是由伊科病毒 11 型引起，此病毒已造成 10 例重症，包括 7 名新生兒死亡病例，這是前所未見的疫情，不可輕忽。目前腸病毒防治的主要工具是宣導勤洗手加上托兒所及幼稚園停課，此停課措施是 1998 年 EV71 大流行時所設立，因當時病毒檢驗曠日廢時，因此針對同一班在一週內有 2 名手足口症或皰疹性咽峽炎病例，該班停課一週，無需根據病毒型別檢驗結果，這樣的策略在 EV71 大流行時可能有必要，但在非 EV71 流行期是過度反應，增加社會成本，而對於腸病毒 D68 及伊科病毒 11 型的防治效果似乎也不理想，因此腸病毒防治需與時俱進，建議引進以下新技術及新策略：1) 世衛組織已於 2015 年的小兒麻痺偵測指引建議引進新型分子檢測技術 (VP1-CODEHOP) 做為檢驗腸病毒血清型的方法，國衛院曾與林口長庚醫院合作進行腸病毒偵測證實其有效性，因此，疾管署應爭取預算全面推廣此方法；2) 目前腸病毒的停課措施缺乏科學佐證，應搭配分子檢驗技術制定更精準及符合成本效益的措施；3) 坊間很多乾洗手或洗手液宣稱有抗腸病毒效果，因國內缺乏人用抗病毒洗手液的檢驗方法，很多洗手液只是依據環境消毒用品檢驗方法，就

宣稱抗腸病毒效果，食藥署應制定洗手液抗病毒檢驗方法讓業者有所遵循；4) 在這個國際旅遊無阻的年代，新型腸病毒可由國外傳入然後造成流行，台灣如何保護原本人數不高且珍貴的嬰幼兒，防疫單位需積極進行國際合作收集腸病毒血清型及基因型的資料，才能迅速掌握疫情，制定有效防治措施；5) 防疫檢驗試劑及疫苗開發是國家安全的一環，但又充滿不確定性及法規高度管制，需透過產官學的積極合作，才能成功 (李敏西 2018)。

致謝：感謝科技部、衛福部及國衛院的經費補助，林口長庚醫院林奏延院長、曹國倩主任、趙安祥主任及林瑞瑩主任協助北台灣嬰幼兒世代研究，中研院何美鄉研究員及台大張鑾英教授提供腸病毒病例血清。

## 參考文獻

- Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, Tong CY. 2007. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications. *Rev Med Virol* 17: 371-9
- Chan KP, Goh KT, Chong CY, Teo ES, Lau G, Ling AE. 2003. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerging infectious diseases* 9: 78-85
- Chan LG, Parashar UD, Lye MS, Ong FG, Zaki SR, et al. 2000. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31: 678-83
- Chang LY, Huang LM, Gau SS, Wu YY, Hsia SH, et al. 2007. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection. *The New England journal of medicine* 356: 1226-34
- Chang LY, King CC, Hsu KH, Ning HC, Tsao KC, et al. 2002. Risk factors of enterovirus 71 infection and associated hand, foot, and mouth disease/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics* 109: e88
- Chang LY, Tsao KC, Hsia SH, Shih SR, Huang CG, et al. 2004. Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *Jama* 291: 222-7
- Chen SC, Chang HL, Yan TR, Cheng YT, Chen KT. 2007. An eight-year study of epidemiologic features of enterovirus 71 infection in Taiwan. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77: 188-91
- Chia MY, Chung WY, Chiang PS, Chien YS, Ho MS, Lee MS. 2014. Monitoring antigenic variations of enterovirus 71: implications for virus surveillance and vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3044
- Chiang PS, Huang ML, Luo ST, Lin TY, Tsao KC, Lee MS. 2012. Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS One* 7: e48269
- Chung WY, Chiang PS, Luo ST, Lin TY, Tsao KC, Lee MS. 2016. A Molecular Approach Applied to Enteroviruses Surveillance in Northern Taiwan, 2008-2012. *PLoS One* 11: e0167532

- Ho M, Chen ER, Hsu KH, Twu SJ, Chen KT, et al. 1999. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *The New England journal of medicine* 341: 929-35
- Huang MC, Wang SM, Hsu YW, Lin HC, Chi CY, Liu CC. 2006. Long-term cognitive and motor deficits after enterovirus 71 brainstem encephalitis in children. *Pediatrics* 118: e1785-8
- Huang ML, Chiang PS, Chia MY, Luo ST, Chang LY, et al. 2013. Cross-reactive neutralizing antibody responses to enterovirus 71 infections in young children: implications for vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2067
- Huang SC, Hsu YW, Wang HC, Huang SW, Kiang D, et al. 2008. Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005. *Virus research* 131: 250-9
- Huang SW, Hsu YW, Smith DJ, Kiang D, Tsai HP, et al. 2009. Reemergence of enterovirus 71 in 2008 in taiwan: dynamics of genetic and antigenic evolution from 1998 to 2008. *Journal of clinical microbiology* 47: 3653-62
- Kung SH, Wang SF, Huang CW, Hsu CC, Liu HF, Yang JY. 2007. Genetic and antigenic analyses of enterovirus 71 isolates in Taiwan during 1998-2005. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13: 782-7
- Lee MS, Chang LY. 2010. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert review of vaccines* 9: 149-56
- Lee MS, Chiang PS, Luo ST, Huang ML, Liou GY, et al. 2012. Incidence rates of enterovirus 71 infections in young children during a nationwide epidemic in Taiwan, 2008-09. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1476
- Lee MS, Lin TY, Chiang PS, Li WC, Luo ST, et al. 2010. An investigation of epidemic enterovirus 71 infection in Taiwan, 2008: clinical, virologic, and serologic features. *Pediatr Infect Dis J* 29: 1030-4
- Lin KH, Hwang KP, Ke GM, Wang CF, Ke LY, et al. 2006. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005: an emerging of subgenogroup C4 of EV71. *Journal of medical virology* 78: 254-62
- Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY, Lee CY. 2003. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerging infectious diseases* 9: 291-3

- Luo ST, Chiang PS, Chao AS, Liou GY, Lin R, et al. 2009. Enterovirus 71 maternal antibodies in infants, Taiwan. *Emerging infectious diseases* 15: 581-4
- Luo ST, Chiang PS, Chung WY, Chia MY, Tsao KC, et al. 2015. Reemergence of enterovirus 71 epidemic in northern Taiwan, 2012. *PLoS One* 10: e0116322
- Nagy G, Takatsy S, Kukan E, Mihaly I, Domok I. 1982. Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Archives of virology* 71: 217-27
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 44: 2698-704
- Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. 1974. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 129: 304-9
- Shindarov LM, Chumakov MP, Voroshilova MK, Bojinov S, Vasilenko SM, et al. 1979. Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology* 23: 284-95
- Tseng FC, Huang HC, Chi CY, Lin TL, Liu CC, et al. 2007. Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: analysis of sentinel physician surveillance data. *Journal of medical virology* 79: 1850-60
- WHO. 2008. Enterovirus, China. *Wkly Epidemiol Rec*:
- WHO. 2015. Enterovirus surveillance guidelines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio *Eradication Initiative*.
- Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, Yan DM, Zhu SL, et al. 2009. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 44: 262-7
- 李敏西 . 2018. 腸病毒防治需與時俱進 . 蘋果日報 : 2018 年 8 月 13 日。
- 鍾婉瑜、李敏西 (2016) 。 利用新型分子檢測法進行腸病毒偵測 。 感染控制雜誌 27(6):267-274 。

## 第六章

# 腸病毒 71 型研究的國際合作經驗

鍾婉瑜 陳雅燕 羅淑婷 邱慕霖 張文瓊 郭方琳 李敏西

2005 年越南發生腸病毒 71 型 (EV71) 大流行，國衛院與胡志明市第一兒童醫院 (CH1) 於 2006 年開始腸病毒研究國際合作，協助 CH1 成功建立臨床病毒檢驗室並順利運轉至今，2017 年國衛院進而成立【亞太腸病毒偵測網絡】，將胡志明市成功經驗拓展到其他東南亞國家。

## 壹、越南腸病毒研究

越南於 1980 年代開始實施「革新政策」，法國巴斯德研究所、英國牛津大學及美國疾病管制局等全球重要傳染病研究單位，陸續與越南建立研究合作關係，國家衛生研究院感染症與疫苗研究所（簡稱國衛院感疫所）蘇益仁特聘研究員是國際知名的淋巴癌及人類疱疹病毒第四型（EB 病毒）專家，他在 2000 年參加國際研討會時認識了胡志明市醫藥大學的 Nguyen Thi Khen 教授，Khen 教授在胡志明市第一兒童醫院（Children's Hospital No. 1, CH1）發現不少小兒淋巴癌病例，此病常與 EB 病毒有關，因此 Khen 教授邀請蘇教授到胡志明市參訪交流，開啟國衛院與 CH1 的國際合作序幕。2005 年胡志明市發生腸病毒 71 型（EV71）大流行，在蘇教授積極推動下，2006 年國衛院與 CH1 針對 EB 病毒相關噬血症候群及腸病毒進行國際合作，成立「病毒實驗室」，陸續進行「人類疱疹病毒之相關噬血症候群」、「EV71 重症 Milrinone 臨床試驗」及「EV71 流行病學」研究，期間也進行研究人員教育訓練，雙方維持長達 10 年以上良好的合作關係，在此介紹國衛院在越南從事腸病毒研究的相關經驗及成果，希望達到拋磚引玉的效果，推廣亞太腸病毒偵測網絡於東南亞地區。

### 一、建立腸病毒檢驗室

2003 年越南南部（簡稱南越）首次發現 EV71，2005 年爆發 EV71 大流行後，負責南越防疫的胡志明市巴斯德研究所開始建立腸病毒檢驗系統，發現胡志明市陸續每年有 EV71 的散發個案（Van Tu et al. 2007）。國衛院原本與 CH1 的國際合作是以 EB 病毒為主，有鑑於 2005 年南越發生 EV71 大流行，因此 2006 年開始進行腸病毒研究，當時 CH1 未有臨床病毒檢驗室與設備，無法進行細胞培養與分子檢驗技術，2006 年國衛院同意 CH1 派遣 2 名醫檢師至本所（成大院區）及成大醫

院病毒室學習腸病毒分子檢測。為進一步協助 CH1 建立腸病毒分離能力，2008 年國衛院同意 CH1 派遣微生物檢驗室主任 (Le Quoc Thinh) 及醫檢師來台受訓。2009 年 11 月 12 日成立「病毒實驗室」並舉行開幕儀式及研討會，此病毒室持續運作至今 (齊嘉鈺、蘇益仁 2011)。

## 二、 腸病毒重症 Milrinone 臨床試驗

EV71 重症會引發嚴重的腦幹腦炎併發肺水腫 (分類為腸病毒臨床第二、三期) 甚至死亡，國衛院齊嘉鈺醫師曾在台灣的先導型研究發現 Milrinone 藥物可有效降低重症死亡率，於是 2007 年 6 月至 2010 年 3 月在 CH1 進行 milrinone 藥物在 EV71 重症的臨床試驗，臨床試驗結果顯示，相對於未使用 milrinone 的對照組，以該藥物治療可以明顯地降低重症死亡率。此結果呼應了在台灣以 milrinone 治療腸病毒重症的效果，此成果已於 2013 年發表在國際知名期刊 (Meyer 2013)。

## 三、 南越腸病毒流行病學研究

南越於 2011 年再度爆發 EV71 大流行時，CH1 針對 148 例手足口症進行腸病毒分離檢測，有 65 例 (43%) 腸病毒分離為陽性，其中 36 例為 EV71。國衛院進一步針對其中 18 株 EV71 病毒進行 VP1 全基因定序及親緣分析，發現 C4a 及 C5 基因型各佔 94% 及 6%，而 C4a 病毒與中國流行的病毒相似，C5 病毒與 2005 年越南流行的病毒相似，進一步針對 2 株 C4a 病毒及 1 株 C5 病毒進行全基因體親緣分析，結果與上述 VP1 基因親緣分析相似，發現有基因重組的現象。此 3 株完成基因體定序的越南病毒株進一步與台灣收集的幼童抗血清進行抗原性分析，並未發現抗原變異，此成果於 2013 年發表在國際知名期刊 (Thoa le et al. 2013)。

2011 年大流行後，國衛院進一步與 CH1 合作執行「建立以醫院為基礎的腸病毒偵測系統」計畫，協助 CH1 建立腸病毒偵測系統，明瞭南越腸病毒分子流行病學與病毒抗原演化，針對手足口症住院幼童採集二支喉頭拭子，一支在 CH1 進行腸病毒分離，另一支運送至台灣進行分子檢測。研究結果發現 2012-2016 年共收案 2022 例，CH1 腸病毒分離陽性率為 29.5%，國衛院腸病毒分子檢測 (COncensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer, CODEHOP) 陽性率為 62.0% (表一)。因此，未來進行 EV71 疫苗保護力臨床試驗時，應以分子檢測來確診腸病毒疑似病例。

表一 / 2012-2016 年越南第一兒童醫院病毒分離與分子檢測 (CODEHOP) 結果

Year	Virus isolation (CH1, Vietnam)		CODEHOP (NHRI, Taiwan)	
	No. tested	Positive %	No. tested	Positive %
2012	409	19.3	409	65.0
2013	412	42.0	412	54.9
2014	521	23.0	521	59.5
2015	356	35.1	356	65.7
2016	324	30.6	324	67.0
Total	2,022	29.5	2,022	62.0

CH1 受限於只使用三種抗體來鑑定腸病毒血清型 (CVA16、EV71 及非專一性 EV)，而分子檢測加上基因定序可鑑定所有腸病毒血清型及基因型，表二腸病毒血清型別分布顯示 2013 及 2016 年爆發 EV71 大流行，其他常見血清型為 CVA6、CVA10、及 CVA16，此資料將有助於腸病毒多價型疫苗開發。根據 VP1 基因親緣分析，2012 年胡志明市 EV71 流行株的主要基因型為 C4a，可能經由中國傳播至越南，2013-2016 年 EV71 流行株的主要基因型為 B5，此 B5 基因型可能從南亞傳播而來。除了針對手足口症住院幼童進行腸病毒研究外，我們也收集非腸病毒

住院的幼童的剩餘血清來進行 EV71 血清中和抗體盛行率調查，結果顯示 5 歲以下的幼童 EV71 血清中和抗體陽性率為 24-62%，明顯高於台灣的幼童，代表越南幼童感染 EV71 的年齡比台灣幼童還早，非常適合進行第三期 EV71 疫苗臨床試驗來證明疫苗臨床保護力。

表二 / 2012-2016 年越南胡志明市第一兒童醫院住院幼童腸病毒血清型別分布

Year	Top 1	Top 2	Top 3
2012	CVA6	EV71	CVA16
2013	EV71	CVA10	CVA6
2014	CVA6	CVA10	CVA16
2015	CVA6	CVA16	EV71
2016	EV71	CVA10	CVA16
Total	CVA6	EV71	CVA10

為了與越南胡志明市第一兒童醫院建立良好合作關係，國衛院團隊每年至少訪問 CH1 兩次，因胡志明市巴斯德研究所 (Pasteur Institute of Ho Chi Min City, PI-HCMC) 負責南越數省的防疫工作，直接隸屬於衛生部管轄，國衛院團隊訪問 CH1 時也會順道參訪 PI-HCMC，經過多次交流，2016 年 5 月國衛院與 PI-HCMC 簽署合作備忘錄 (MOU)，進行腸病毒相關研究。PI-HCMC 設立於 1891 年，是法國巴斯德研究所在海外設立的第一個研究所，越南獨立後 PI-HCMC 成為越南政府機構，類似台灣衛生福利部疾病管制署角色，負責南越的疾病防疫及疫苗開發。國衛院與疾管署合作開發的 EV71 疫苗已以非專屬授權技轉給國內二家疫苗廠完成第二期臨床試驗，而進行第三期臨床試驗證明臨床效益時，最好選擇疾病高流行區才能事半功倍，透過國衛院在胡志明市收集的流行病學資料，已成功說服國內二家疫苗廠在台灣及越南執行多國多中心臨床試驗，目前此二家廠商正與 PI-HCMC 積極洽商中。由於國衛院在越南長期佈局及國際合作成果豐碩，國衛院順利於 2017 年獲得行政院旗艦計畫經費補助 4 年，執行「建立亞太疫苗及血清研發中心」。

## 貳、建立亞太腸病毒偵測網絡

東南亞國家傳染病及熱帶疾病盛行，開發疫苗及抗血清是傳染病及熱帶疾病防治的利器，配合政府「新南向醫衛合作與產業鏈發展旗艦計畫」，國衛院 2017 年執行旗艦計畫「建立亞太疫苗及血清研發中心」，其中一項子計畫為【建立亞太腸病毒偵測網絡並輔導廠商進行跨國疫苗臨床試驗】，預期將與越南長期建立之合作模式，積極拓展至柬埔寨及馬來西亞等國家，整合產官學界資源，協助國內疫苗產業拓展東南亞市場。2011 年世界衛生組織 (WHO) 西太平洋辦公室 (Western Pacific Regional Office, WPRO) 設立手足口症偵測系統，但是所收集的資料並不完整，並且存在不少缺點包括：1) 上傳腸病毒資料的文件格式不一致；2) 亞洲地區只有日本、韓國、新加坡、越南、中國、香港及澳門參與，然而柬埔寨、馬來西亞和台灣卻未參與；3) 雙週報未呈現實驗室診斷技術和腸病毒血清型，無法明瞭腸病毒血清型別的流行趨勢；4) 自 2018 年 9 月起停止更新。

為彌補 WHO-WPRO 資料的不完整，2017 年國衛院感疫所啟動旗艦計畫「建立亞太疫苗及血清研發中心」，其中子計畫【建立亞太腸病毒偵測網絡並輔導廠商進行跨國疫苗臨床試驗】，即藉由成立亞太腸病毒偵測網絡 (Asia-Pacific Network for Enterovirus Surveillance, APNES)，收集東南亞地區腸病毒流行病學資料，提供國內腸病毒疫苗開發參考。從 1997 年起 EV71 已陸續在馬來西亞、新加坡、台灣、越南、中國、汶萊及柬埔寨造成大規模流行及死亡病例，根據小兒麻痺病毒防治經驗，疫苗接種是最經濟有效的防治方法。目前有七家疫苗廠已進行 EV71 疫苗臨床試驗，其中三家在中國、二家在台灣、新加坡及馬來西亞各一家，目前中國三家疫苗廠已取得上市許可，開始在中國自費市場販賣，因產量有限，近期內並無到國外取得上市許可的規劃，因此其他 EV71 流行國家必須自力更生才能有疫苗可用，最有效的策略

是這些國家應建立合作網絡，才能加速完成臨床試驗，取得上市許可。在這些國家中以越南、馬來西亞及柬埔寨的新生兒數較多且 EV71 流行幅度較大 (表三)。因此，國衛院於 2017 年 10 月舉辦「腸病毒偵測與疫苗開發」國際研習會，並同時成立 APNES，第一年成員有越南胡志明市第一兒童醫院、越南胡志明市巴斯德研究所、柬埔寨巴斯德研究所、馬來西亞馬來亞大學及馬來西亞砂勞越大學及台灣國衛院。

表三 / 亞洲發生 EV71 大流行的國家及其新生兒數

Asia Pacific Country with EV71 Outbreaks	Number of Birth in 2010~2013
Taiwan	794,359 (198K/year)
China	92,667,000 (23M/year)
Vietnam	7,137,000 (1.78M/year)
Malaysia	2,614,000 (650K/year)
Cambodia	1,941,000 (480K/year)
Hong Kong SAR	338,000 (85K/year)
Singapore	266,000 (65K/year)
Brunei	33,000 (8.3K/year)
Macao SAR	28,000 (7k/year)
Total Number of Birth	105,818,359 (26.5M/year)

(資料來源：United Nations: DESA / Population Division  
<https://population.un.org/wpp/Download/SpecialAggregates/Ecological/>)

APNES 成員中，越南胡志明市第一兒童醫院與台灣已長期合作並發表相關研究成果，越南現有人口數約 1 億，每年新生兒約 170 萬，從歷年研究資料可知，越南腸病毒發生率高於台灣，被感染兒童年齡相較台灣兒童低，流行病學特徵與台灣相似。除了越南之外，柬埔寨與馬來西亞亦是 EV71 高發生率的國家，該國家兒童出生率高且為腸病毒流行地區，正可彌補台灣目前新生兒人數逐年減少且 EV71 發生率逐年降低，難以單獨完成腸病毒疫苗第三期臨床試驗的窘境。

柬埔寨巴斯德研究所 (Institut Pasteur de Cambodge, IPC)，1953 年由法國巴斯德研究所在金邊設立，生產動物疫苗，後續又生產人用狂犬病疫苗和天花疫苗；1975-1979 年間赤棉佔領柬埔寨，IPC 的建築及設備都被摧毀，直到 1986-1994 年才進行重建。目前柬埔寨人口數約 1 千 6 百萬，每年新生兒人數約 48 萬，2012 年曾爆發 EV71 大流行造成 54 例幼童重症甚至死亡，經 IPC 檢驗發現致病原是 EV71(C4 基因型)，調查該年腸病毒爆發後的 EV71 血清抗體盛行率和疾病風險因子，進一步分析 2000-2011 年 2-15 歲住院孩童的血清抗體盛行率，結果發現 EV71 總血清抗體盛行率為 88.8% (表四)，已發表的研究亦指出 EV71 大流行應自 2001 年就開始 (Horwood et al. 2016)。

表四 / 2000-2011 年柬埔寨隨機抽樣 2-15 歲孩童的 EV71 血清中和抗體盛行率 (Horwood et al. 2016)

Quadrant	No. participants (% of dataset)	Overall seroprevalence no. (%)
Northwest	535 (31.3)	488 (91.2)
Northeast	76 (4.4)	64 (84.2)
Southwest	314 (18.4)	271 (86.3)
Southeast	782 (45.8)	693 (88.6)
All	1,707 (100)	<b>1,516 (88.8)</b>

位處熱帶地區的馬來西亞總人口數約 3 千 1 百萬，每年新生兒人數約 65 萬，馬來西亞的手足口症 (Hand-Foot-and-Mouth Disease, HFMD) 發生率以砂勞越州為最高；吉隆坡 (雪蘭莪州) 發生率居次，手足口症發生率和氣溫相關，氣溫高發生率也高，馬來西亞通常 3 月開始發現病例，5-6 月為高峰期，學齡前孩童是高風險族群，2 歲以下幼童 HFMD 發生率最高，隨年齡增長而降低，7-12 歲孩童的發生率最低。1997 年爆發 EV71 大流行，造成 41 例幼童死亡，之後週期性的每隔 2-4

年大流行，位於馬來西亞砂勞越每 3 年出現一次大流行；EV71 過去流行的基因型包括 C1, C2, B2、B3, B4, B5，2003 年之後只剩下 B5 為主 (Herrero et al. 2003; Chua and Kasri 2011)。

為輔導國內廠商盡速完成腸病毒 EV71 疫苗第三期臨床試驗，國衛院團隊陸續召開產官學座談會、「腸病毒偵測及疫苗開發專家會議」、「腸病毒偵測及疫苗開發國際研討會」、「建立亞太腸病毒偵測網絡 (APNES)」，整合產官學合作資源，建置 APNES 網站 (網址：<http://enterovirus.nhri.org.tw/>)，經過實地考察及專家會議評估合適臨床試驗地點 (陳雅燕等，2018)，建議應優先考慮越南與馬來西亞。此外，2018 年國衛院舉辦「臺越腸病毒疫苗法規研習會」，邀請台越產官學代表進行雙邊法規介紹，加強台灣與越南對執行腸病毒疫苗臨床試驗經驗交流，目前國內二家疫苗廠已決定在台灣及越南執行多國多中心第三期臨床試驗，目前正與越南衛生部及 PI-HCMC 積極洽商中，加速取得 EV71 疫苗上市許可，進而拓展國際市場。

致謝：感謝行政院旗艦計畫、科技部、衛福部及國衛院的經費補助，蘇益仁教授、王貞仁教授及齊嘉鈺醫師的實驗室協助開啟越南胡志明市第一兒童醫院合作計畫。經費來源：行政院旗艦計畫：建立亞太疫苗及血清研發中心 (計畫編號：MOST 106-3114-Y404-002; 子計畫代號：0609-IVCDC05)。

## 參考文獻

- Chua, K. B., and A. R. Kasri. 2011. 'Hand foot and mouth disease due to enterovirus 71 in Malaysia', *Virologica Sinica*, 26: 221-8.
- Herrero, L. J., C. S. Lee, R. J. Hurrellbrink, B. H. Chua, K. B. Chua, and P. C. McMinn. 2003. 'Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000', *Arch Virol*, 148: 1369-85.
- Horwood, P. F., A. Andronico, A. Tarantola, H. Salje, V. Duong, C. Mey, S. Ly, P. Dussart, S. Cauchemez, and P. Buchy. 2016. 'Seroepidemiology of Human Enterovirus 71 Infection among Children, Cambodia', *Emerg Infect Dis*, 22: 92-5.
- Meyer, S. 2013. 'Milrinone: some (medicolegal) thoughts beyond contractility, lusitropy, and cardiac output', *Crit Care Med*, 41: e390-1.
- Thoa le, P. K., P. S. Chiang, T. H. Khanh, S. T. Luo, T. N. Dan, Y. F. Wang, T. C. Thuong, W. Y. Chung, N. T. Hung, J. R. Wang, N. T. Nhan le, Q. Thinh le, I. J. Su, T. D. Dung, and M. S. Lee. 2013. 'Genetic and antigenic characterization of enterovirus 71 in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2011', *PLoS One*, 8: e69895.
- Van Tu, P., N. T. T. Thao, D. Perera, K. H. Truong, N. T. K. Tien, T. C. Thuong, O. M. How, M. J. Cardosa, and P. C. McMinn. 2007. 'Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005', *Emerg Infect Dis*, 13: 1733-41.
- 齊嘉鈺、蘇益仁。2011。我們的足跡。羅秀容等編輯，財團法人國家衛生研究院
- 陳雅燕、羅淑婷、林奏延、李敏西。2018。越南疫苗產業考察心得。台灣醫界 618;11:1-3.

腸病毒 71 型的台灣經驗：從流行病學及臨床到  
基礎科學的新視野：科技部台灣重要新興感染症  
研究計畫成果報告 / 王世敏等著 . -- 初版 . -- 臺北  
市：科技部生科司臺灣重要新興感染症辦公室，  
2019.04

面；公分

ISBN 978-986-05-8895-8(平裝)

1. 腸病毒

412.471

108004955

# 腸病毒71型 的台灣經驗

從流行病學及臨床到基礎科學的新視野  
科技部台灣重要新興感染症研究計畫成果報告

**發行者** 科技部

**出版者** 科技部生科司台灣重要新興感染症研究計畫辦公室  
台北市和平東路二段 106 號 02-2737-7992

**著者** 王世敏、王貞仁、王莉菽、江正榮、江百善、李敏西、周彥宏、  
邱慕霖、施信如、洪慧貞、徐祖安、郭方琳、黃美棕、黃冠穎、  
陳舜華、陳雅燕、黃聖文、黃麗華、張文瓊、張鑾英、賈敏原、  
劉定萍、劉清泉、鍾婉瑜、羅淑婷 (依姓氏筆畫排序)

**執行編輯** 黃立民、張鑾英 國立臺灣大學醫學院附設醫院小兒部小兒感染科

**封面圖片提供** 郭品樺 國立成功大學醫學院附設醫院病理部

**美術編輯** 翰堂設計事業有限公司 / 伍健昌、李宜玟

**出版日期** 2019 年 4 月初版



