

腸病毒 71 型疫苗的回顧

腸病毒 71 型病毒 (enterovirus 71, EV71) 與克沙奇病毒 (coxsackievirus A16, CVA 16) 是導致全世界爆發手足口症的主要病原體，特別是在亞洲，造成嚴重的醫療與社經影響。在中國、台灣及新加坡研發的腸病毒疫苗中，福馬林去活化的疫苗 [Formalin-inactivated EV71 vaccines (FI-EV71 vaccine)] 經由人體試驗發現，可以誘發對抗目前在亞洲流行的腸病毒 71 型足量的中和抗體，並且證實相當安全。在中國，由三個針對 6~60 個月的小孩且已經進入第三期人體試驗的研究指出，FI-EV71 疫苗所誘發的抗體足以保護大於 90% 的小孩免於得到腸病毒 71 型感染，大於 80% 的小孩免於因腸病毒 71 型感染後造成嚴重疾病，不過這些疫苗都無法同時預防小孩得到克沙奇病毒 A16 型 (CVA 16) 的感染。

在這篇文章中，作者回顧了一些有關 EV71 型疫苗在製作時會遇到的相關問題，包括腸病毒的臨床流行病學、當病毒產生抗原移型 (antigenic shift) 時疫苗是否具有交互保護力、疫苗病毒株的選擇、標準化動物模式以利效價測試以及符合成本效益的疫

苗製造等等。

我們所熟知的手足口症及咽峽炎是腸病毒感染常見的臨床症狀，手足口症主要症狀有發燒、在手腳掌及臀部等處起紅疹或是水泡、在口內造成會疼痛的潰瘍，一般來說病程通常為自限性，但是傳染力相當強，傳染途徑是經由口咽分泌物的接觸傳染或是糞口傳染，在腸病毒的致病原中特別要提到 EV71，因為 EV71 會造成嚴重的中樞神經併發症導致死亡或神經學後遺症，包括非細菌性腦膜炎、小腦不平衡、小兒麻痺樣肢體麻痺、急性腦幹腦炎、猛爆性神經性肺水腫等問題，因此，當 EV71 爆發疫情時將會造成醫療單位及幼兒照顧系統嚴重的恐慌和影響，由於沒有有效治療藥物，研發有效的 EV71 疫苗會是亞洲地區重要的國家政策。

EV71 是一種 RNA 病毒，屬於 Picornaviridae family 中的 A 型人類腸病毒，其中製造蛋白質的部分可分成三區 (P1、P2、P3)，P1 可製造四種病毒結構蛋白 (VP1-VP4)，VP1、VP2 與 VP3 為病毒表面蛋白，與宿主接受器結合及免疫反應有關。VP1 在病毒辨識之中為主要

抗原角色，據研究，EV71 主要是利用兩種受體去感染人類，這兩種受體為 hSCARB2 及 PSGL-1 (human scavenger receptor class B, member 2、P-selectin glycoprotein ligand 1)。

在臨床與分子流行病學的觀點來看，EV71 在 1969 年首度在加州分離出來，之後造成世界各地大小流行感染。EV71 只有一種血清型，但根據 VP1 可分為三種基因型 (A、B、C)，基因型 A 僅有原型株，基因型 B 和基因型 C 都有五種基因亞型 (B1-B5, C1-C5)，不過在之後的研究發現，紐西蘭鑑定出 B0 基因型，而 C4 基因亞型又可再分為 C4a 與 C4b 兩種。最近又多鑑定出三種基因型，分別為印度 D 基因型及兩種非洲基因型 (E、F)，如此可知 EV71 基因的多樣性！但是到目前為止並沒有發現哪一種基因型會造成比較嚴重的疾病表現。EV71 感染全年度都可能發生，但在夏天發生率最高，季節的分布與周期循環 (約 2~4 年會有一次大流行) 因不同國家而有不同，由於每個國家對於手足口症的定義、病例蒐集、資料分析與檢驗室檢查方式均不盡相同，所以疾病流行狀況其實可能被低估了。

EV71 的 A 基因型在 2008 年時曾再度出現在中國，而基因型 B、C 則是自 1970 年代開始就一直同時存在於全世界，並且造成疫情爆發與許多中樞神經併發症案例。當嚴重中樞神經併發症發生時，死亡率也會跟著

提高，例如在 1975 年於保加利亞發生大量小兒麻痺樣併發症和 1978 年於匈牙利發生大量急性腦膜腦炎併發症時，死亡率也隨之提高。而 1990 年之後，各國因手足口症疫情爆發造成中樞神經併發症與死亡案例再度傳出，包括了奧地利、澳洲、法國、德國、希臘、匈牙利、挪威、英國和美國等國。EV71 造成最嚴重流行地為亞洲-太平洋地區，包括了澳洲、中國、香港、日本、馬來西亞、新加坡、台灣和越南。第一次爆發 EV71 疫情時間為 1997 年，發生在馬來西亞，在當時造成 41 名小孩死亡，主要原因是因為感染了具有神經毒性的 B3、B4、C1、C2 基因型。在新加坡，總共七年的統計顯示，30% 造成手足口症的主因為 EV71，在 2008 年爆發流行的基因亞型分別為 B5 和 C2 這兩種。日本的研究顯示，在 1990 年代晚期至 2013 年期間，爆發手足口症合併嚴重神經併發症以及咽峽炎的主因是下列四種基因型：B4、B5、C2、C4。台灣的疾管署統計資料顯示，從 2000 年後每年手足口症及咽峽炎的病例數為 93,000 至 140,000 人，自 2000 年至 2009 年的台灣統計顯示，EV71 佔了 A 型人類腸病毒感染的 21%，其中 82% 有嚴重併發症。在 1998 年，EV71 疫情爆發造成 150 萬人感染並且導致 78 人死亡，而造成這次嚴重的 EV71 感染疫情的主要基因亞型為 C2 與 B4，之後也有幾波小的流行疫情，致病主要

基因型也不相同。中國大陸方面，自 2008 至 2012 年間有超過 700 萬人感染手足口症，其中 2,457 人死亡。一開始最嚴重的一波疫情爆發為 2009 年，當年造成 110 萬人感染，353 人死亡，之後逐年增加，自 2010 年至 2011 年有超過 150 萬人感染，27,000 人有神經併發症，905 人死亡。另外，在越南 2011 年及哥倫比亞 2012 年也造成了嚴重流行疫情及相關死亡案例。

EV71 大約每 2~4 年會造成一次大流行，通常每次大流行時都是由某一種基因型或基因亞型所主導，但是，其他分型或是不可預知的基因型/基因亞型常常可能發生。在中國大陸可以發現 C4 基因型一直存在並且持續有基因漂變 (drift)。在馬來西亞，發現 B 基因型的轉變為：1997~2000 年為 B3 轉變成 B4，2000~2003 年為 B4 轉變成 B5。接下來在台灣則觀察到了不同基因之間的基因移型 (shift)，由 C2 轉變成 B4，然後由 C4 轉變成 B5。在流行期間，不同類腸病毒型別間的重組也被觀察到：在台灣曾發生 EV71 型之中 B 與 C 基因型的重組；在中國大陸曾發生 EV71 的 C2 基因亞型與克沙奇 A16 病毒 (CVA16) 的重組；此外，在 1998 年造成日本與台灣腸病毒大流行是由 EV71 型之中 C2 基因亞型與克沙奇 A16 病毒 (CVA16) 重組後發展出來的 B4 基因亞型所主導。C4a 基因亞型可能是由 EV71 型之

中 B 與 C 基因型以及克沙奇 A16 病毒 (CVA16) 重組之後發展出來的型別。幾乎每一次手足口症大流行都與 EV71 基因轉換有關。因此，持續監測抗原漂變、移型或是基因轉變對疾病的控制與疫苗設計是相當重要的。

在 EV71 疫苗研發方面，研發方向很多，主要是針對結構蛋白來研發疫苗，發展的方向有：減毒活性疫苗 (live attenuated virus)、不活化全病毒疫苗 (inactivated whole virion vaccine)、基因重組疫苗 (recombinant VP1 protein vaccine)、DNA 疫苗 (VP1 DNA vaccine)、基因轉殖疫苗 (transgenic plant vaccine)、細菌載體疫苗 (bacteria vector vaccine)、胜肽疫苗 (synthetic peptide vaccine) 與似病毒粒子疫苗 (virus like particle vaccine) 等等。

由於只有 formalin-inactivated (FI) EV71 virion 這種死毒疫苗比較能在動物實驗中誘發出令人滿意的交互中和抗體，因此這種疫苗在經濟成本及市場接受度的考量下被選擇做為臨床發展的方向。

目前有五種腸病毒 71 型不活化病毒疫苗在快速發展中，台灣國家衛生研究院疫苗研發中心生產的疫苗，針對 B4 為主研發出來的疫苗，並且在 2010 年進行第一期人體試驗，目前第一期人體試驗完成，在試驗中發現，只要注射一劑 5 μg 或是 10 μg 的疫苗劑量就足以誘發足夠的免疫抗體 (geometric mean titer GMT:

210)，在受試者之中可以發現 100% 產生抗體，並且可以誘發高量病毒中和抗體，同時針對 B1、B5、C4a 也有 85% 的保護力，但是針對 C4b 與 CVA16 只能誘發 20% 的弱保護力，而針對非典型的 C2 型則完全沒有任何保護力。

新加坡研發的疫苗（名稱：Inviragen，製造商為 Takeda Pharmaceuticals Co Ltd），是針對 B2 為主研發出來的疫苗，目前第一期人體試驗完成，接種劑量為 0.6 μg 或是 3 μg ，可誘發出來的抗體在第 0 與 28 天幾何平均值分別為 323 及 452。

中國大陸研發的疫苗有三家，分別為 Sinovac Biotech Co Ltd, Beijing Vigoo Biological Co Ltd, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS)，主要是針對 C4 為主研發出來的疫苗，但三種疫苗各自獨立研發，並且都已經完成了第三期人體試驗，這些健康的受試者有超過 30,000 人，年紀分佈在 6 個月到 35 個月，接種兩劑間隔 28 天的疫苗或是安慰劑，在試驗中發現，這三種疫苗都相當安全，最常見的副作用為注射部位紅腫或疼痛，但通常在 24~72 小時後會消失，另外是發燒。其他較嚴重的副作用非常少見而且與對照組相比並沒有差異性。Vigoo 疫苗針對腸病毒 71 型所導致的手足口症具有超過九成保護力，而因為腸病毒 71 型所導致的嚴重疾病則具有超過八成保護力。Sinovac 疫苗針對腸病

毒 71 型所導致的疾病具有 89.3% 保護力，CAMS 的疫苗在接種兩劑後，在受試者之中可以發現 100% 產生抗體，所誘發出來的抗體幾何平均值是 170.6，疫苗針對腸病毒 71 型所導致的疾病具有 97.4% 保護力。中國大陸所製造針對 C4 為主研發出來的疫苗，都可以避免因腸病毒 71 型感染所造成的住院。Vigoo 與 Sinovac 疫苗對腸病毒 71 型的某些基因型與基因亞型具有交互保護力 (B4, B5, C2, C5)。另外，有些小孩因為過去可能早已感染過不同型別的腸病毒 71 型病毒，這些人體內的抗體並不會干擾疫苗產生新的抗體。不過，這些疫苗都無法針對克沙奇 A16 病毒產生抗體。還有一件值得注意的事是，雖然受試者在 6 個月後體內的抗體下降一半，但是仍然具有保護力。在中國第三期人體試驗中發現，其實只需要 1/16 的試驗抗體濃度就可以針對腸病毒 71 型導致的手足口症具有保護力。儘管不同的實驗病毒株與製程，這三種疫苗在臨床試驗中都看得出具有相當一致性與有效性，何時上市則不得而知。

不論是針對 C4 或 B4 基因型研發的疫苗，都對目前流行的腸病毒 71 型具有保護力，但台灣研發的 B4 基因型疫苗卻對非典型的 C2 型別沒有保護力。此外，雖然克沙奇 A16 病毒 (CVA16) 是每年造成手足口症的主因，但是目前研發出來的五種 EV71 疫苗都沒有辦法針對 CVA16 產

生交互保護力。所以，就算接種現在研發的疫苗，也沒辦法減少每年的手足口症患者數量。因此，目前也往研發同時能預防這兩種病毒感染的疫苗方向發展 (bivalent FI-EV 71/FI-CVA16)。由於基因重組可能會產生新的病毒株造成疫情爆發，所以當 EV71 型疫苗開始接種時，應該要有多國的實驗共同來評估疫苗有效性，看看是否單價疫苗具有能對抗當時流行的腸病毒 71 型病毒的能力。目前亞洲國家並沒有針對 A 型腸病毒監視系統作整合，在未來如果想要評估新研發的腸病毒疫苗有效性，全世界的腸病毒監視系統必須像世界衛生組織監視每年流感一樣建立起來。

在第三期人體試驗之中可以清楚的知道，雖然所誘發的抗體具有不同基因型別的交叉保護力，但是在 6 個月後抗體就消失一半，因此也讓人想了解，這樣的抗體濃度是否同樣具有交叉保護力。在自然感染中所誘發的抗體也會隨著時間快速下降，或許也是造成每 2~4 年就有一波新的腸病毒 71 型大流行的主因。由於在一年之後再接種一劑疫苗可以誘發出超過十倍的中和抗體，所以在 18~24 個月後會建議再接種一劑疫苗以產生更長時間的抗體。黏膜疫苗的研發目前看起來是不必要的，因為現在研發出來的注射型疫苗已經相當有效。針對腸病毒 71 型與克沙奇病毒在疫情爆發時，細胞免疫在長期交叉保護力與病毒病理學的角色應該要有前瞻性研

究。而新疫苗的長期有效性監測也相當重要，因為不同基因型可能會有突變轉換，甚至有新的腸病毒出現，造成疫苗有效性下降。

除了全世界監視系統必需建立起來，另外動物研究模式也應該標準化，如此才能使疫苗有效性評估和腸病毒 EV71 型致病機轉的了解全球一致。

一個理想的 EV1 型病毒疫苗應該兼具不貴、安全、可以大量生產、容易提供且可以被家長接受的給予方式等多項優點。在疫苗販售價錢必須要考慮製程技術及硬體設備和廠商利潤，目前傾向一劑販售 25 美金的價錢，希望這樣的價錢可以吸引更多在疫苗製造相當有經驗的其他國家公司投入合作。

根據目前已做完的第三期人體試驗的三個中國研發疫苗來看，EV71 型疫苗應該列入中國的公費疫苗接種時程，如此才能有足夠強大的群體免疫。目前建議接種對象為 6~7 個月的嬰兒，接種辦法為先接種兩劑，然後在 18~24 個月時再接種第三劑。全球多國的疫苗有效評估研究應該緊接著進行，這樣才能了解疫苗的交互保護力程度。全球評估手足口症的監視系統應該完整建立起來，持續的監控才能了解流行病學及新興 EV71 變異型。在疫苗製造方面，針對疫苗株應該整合及標準化，動物研究模式統一以及選擇最有效與最便宜的製程方式，這些都相當重要。現階段的研究

還有將 Sanofi Pasteur 公司製造的五合一疫苗 (Pediaceel, 亦即白喉-百日咳-破傷風-小兒麻痺-b 型嗜血桿菌疫苗) 與 FI-EV71 疫苗共同注射到實驗老鼠上, 發現這兩種疫苗共同給予時並不會影響各自抗體的產生, 這代表了未來可以往結合疫苗的方向進行, 但臨床試驗應該還要再進行, 才能知道最終是否應該要製造這種五合一合併 EV71 疫苗。

【譯者評】台灣腸病毒感染導致重症死亡率約在 3.8~25.7% 之間, 歷年流行以 1998 年最嚴重, 當時的大流行造成 78 人死亡, 此後每年 (1999 年至 2014 年) 重症發生數約在 7~393 人之間, 尤其是年齡層在 0~3 歲之間為高危險群, 而引起腸病毒重症之型別以腸病毒 71 型為主, 其次是克沙奇病毒。目前臨床上還沒有有效治療方式, 只有嚴格的接觸隔離與良好的手部衛生才是重要的疫情阻絕方式, 未來如果 EV71 型疫苗可以上市, 對全世界兒童特別是亞洲兒童將是一大福祉! 然而要使手足口症病患數量下降, 讓民眾可以感受到注射疫苗後較不容易得到腸病毒感染, 則可以考慮研發 EV71/CVA16 合併的兩價疫苗, 因為 CVA16 也是重要手足口症的致病原, 如此疫苗政策會較容易推動。此回顧文章中也提到, 疫苗上市後嚴密的監測 A 型腸病毒的流行病學將會是重要的方向, 但各國目前仍尚無像流感這樣的監測機制, 未來這將會是

需要努力的重要議題。【中國醫藥大學兒童醫院 衛琇玫醫師/黃高彬醫師 摘評】

參考文獻

1. Chong P, Liu CC, Chow YH, et al: Review of Enterovirus 71 Vaccines. *Clin Infect Dis* 2015;60:797-803.
2. Kung YA, Hung CT, Liu YC, et al: Update on the development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14:1455-64.
3. Cheng A, Fung CP, Liu CC, et al: A phase 1, randomized, open-label study to evaluate the safety and immunogenicity of enterovirus 71 vaccine. *Vaccine* 2013;31:2471-6.
4. Chou AH, Liu CC, Chang JY, et al: Formalin-inactivated EV71 vaccine candidate induced cross-neutralizing antibody responses against subgenotypes B1, B4, B5 and C4A in adult volunteers. *PLoS One* 2013;8:e79783.
5. Li JX, Mao QY, Liang ZL, et al: Development of enterovirus 71 vaccines: from the lab bench to phase 3 clinical trials. *Expert Rev Vaccines* 2014;13:609-18.
6. Zhu FC, Meng FY, Li JX, et al: Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjunct enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;38:2024-32.
7. Zhu F, Xu W, Xia J, et al: Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N Engl J Med* 2014;370:818-28.
8. Li R, Liu L, Mo Z, et al: An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children. *N Engl J Med* 2014;370:829-37.
9. Mao Q, Cheng T, Zhu F, et al: The cross-neutralizing activity of enterovirus 71 subgenotype C4 vaccines in healthy Chinese infants and children. *PLoS One* 2013;8:e79599.
10. Chen CW, Lee YP, Wang YF, et al: Formaldehyde-inactivated human enterovirus 71 vaccine is compatible for co-immunization with a commercial pentavalent vaccine. *Vaccine* 2011;29:2772-6.