

## 新興人類冠狀病毒 NL63 簡介

---

曹國倩

長庚紀念醫院 林口總院

臨床病理科 長庚大學 醫學生物技術暨檢驗學系

人類冠狀病毒(human coronavirus; HCoV)共有五種，包括 1960 年代被鑑定出的 HCoV-OC43 及 HCoV-229E 兩隻病毒，以及在這幾年才陸續被鑑定發現的三隻病毒，包括 SARS-CoV、HCoV-NL63 及 HCoV-HKU1。

HCoV-NL63 是荷蘭的研究團隊在 2004 年所發現的新興人類冠狀病毒，隨後許多國家的研究均陸續在幼童的呼吸道中鑑定出此病毒，並證實它是人類呼吸道感染的另一個重要的新興致病原。

HCoV-NL63 基因具有 27,553 個核苷酸，和 HCoV-OC43 相似度較其他冠狀病毒為高，被歸屬於與 HCoV-OC43 較接近的第一類人類冠狀病毒(group1)。許多歐美國家的研究均顯示 HCoV-NL63 好發在冬季，主要的流行顛峰期是在一月至三月。HCoV-NL63 的感染陽性率約為 1.6-9.3%，主要感染對象為五歲以下的幼童。

HCoV-NL63 感染的臨床症狀主要為咳嗽、發燒、喉嚨痛，次要為鼻炎、呼吸窘迫及哮喘，臨床診斷主要為上呼吸道感染、氣管炎等，少數出現肺炎。由於 HCoV-NL63 在細胞培養中生長速度慢，而且細胞病變不易觀察，因此實驗室診斷最佳的方法是使用分子生物學技術，包括 RT-PCR 及 real-time RT-PCR。根據

HCoV-NL63 核苷酸序列之樹狀圖分析研究顯示，HCoV-NL63 可以分成 A 及 B 兩群，現在的研究顯示流行的型態主要以 A 群為主。HCoV-NL63 確實的臨床影響仍未十分明確，其對於大人及幼童的致病機轉仍有待進行更多的研究來了解及證明。

## 前 言

2003 年新興的冠狀病毒 SARS-CoV 在全球爆發大流行，其所引起的嚴重呼吸道症候群造成全球 774 人死亡，因此有關冠狀病毒在人類的感染變得愈發重要，重新燃起許多研究學者對於研究冠狀病毒的興趣。自從 2003 年以來，有四種新的人類冠狀病毒(human coronavirus; HCoV)陸續被鑑定出，包括 HCoV-NL63、HCoV-NL、HCoV-NH、HCoV-HKU1。其中 HCoV-HKU1 只有少數相關的研究，包括 2004 年香港的研究學者首先在一位 71 歲的肺炎患檢體中發現 HCoV-HKU1[1]，以及法國的研究證明這隻病毒與上呼吸道及腸胃疾病有關[2]，其重要性仍有待更多的研究來證實。而 HCoV-NL63 及 HCoV-NL 在 2004 年被發現後，許多國家的研究團隊均陸續在幼童的呼吸道中鑑定出此病毒，並證實它可能是人類呼吸道感染的另一個重要的新興致病原；而 HCoV-NH 被發現可能和 Kawasaki 疾病有關[3]，但卻有些研究認為完全無關係[4,5]。許多研究顯示 HCoV-NL63、HCoV-NL 及 HCoV-NH 這三隻冠狀病毒是十分相近的病毒，因此在本篇文章中將回顧在目前已經發表的文獻中，針對此 HCoV-NL63 已知的病毒特性、臨床症狀、流行病學及實驗室診斷方法做一整理與敘述。

## HCoV-NL63 病毒特性

人類冠狀病毒是屬於冠狀病毒科(Coronaviridae)，具有外鞘膜(envelope)且具有極性的正股單鏈 RNA 病毒，病毒基因大小約為 31 kb[6]，是目前已知的 RNA 病毒中最大的。由於外鞘膜向細胞表面突出，使得病毒顆粒

看起來類似冠狀，而被稱為「冠狀病毒」。在電子顯微鏡下觀察此病毒呈多切面型狀，其直徑在 60-220 奈米，長度約為 20 奈米。人類冠狀病毒主要侵襲呼吸系統中的支氣管、鼻腔以及肺泡的纖毛細胞。依照血清親和性學及基因序列，可將人類冠狀病毒分成三類，包括在 1960 年代被鑑定出的人類冠狀病毒 OC43 (HCoV-OC43, group 1) 及人類冠狀病毒 229E (HCoV-229E, group 2) [7-9]。這兩類的冠狀病毒主要好發在冬天及初春，它是引起人類上呼吸道感染的致病原，約有 10-30% 的普通感冒是由這兩類病毒所引起。第三類的人類冠狀病毒則是在 2003 年期間造成全球爆發嚴重呼吸道症候群的元兇：新興病毒 SARS-CoV。2004 年荷蘭的研究團隊在一個 7 個月大的幼童鼻腔抽取液中發現了與呼吸道疾病相關的新興人類冠狀病毒：HCoV-NL63 [10]，緊接著荷蘭的另一個研究團隊也在 1988 年由一個 8 個月大的幼童檢體中鑑定出 HCoV-NL 病毒 [11]，後來發現此兩病毒是十分相近的病毒。

在電子顯微鏡下觀察此 HCoV-NL63 病毒的平均大小為 140 奈米(範圍為 95-275 nm)，外鞘膜平均大小為 20 奈米(範圍為 12-24 nm)。HCoV-NL63 基因具有 27,553 個核苷酸及一個 A 多重複尾端(poly-A tail)，GC 含量為 34%，是所有已知的冠狀病毒中 GC 含量最低的。HCoV-NL63 基因結構如同一般的冠狀病毒，5'-3'端依序為 1a-1b-S-ORF3-E-M-N [12]，在 5'端約有三分之二基因是兩個大的 open reading frames (ORF) 所構成，為 ORF 1a 及 ORF 1b 基因；3'端的基因能製出四種結構性蛋白質(structural proteins)，分別為 spike (S)、envelope(E)、membrane (M) 及 nucleoprotein(N)；RNA 的表現濃度以 N 最高，佔 74.31%，其次為 M，佔 14.92%。比較 HCoV-NL63 與其他冠狀病毒的氨基酸序列，發現此病毒和 HCoV-OC43 相似度較其他冠狀病毒為高，約 43-67%，被歸屬於與 HCoV-OC43 較接近的第一類人類冠狀病毒(group 1)。

## 臨床表現及流行病學

荷蘭及許多歐美國家的研究均顯示 HCoV-NL63 好發在冬季，主要的流行顛峰是在一月至三月 [10,13,14]，然而在香港的研究卻顯示 HCoV-NL63 除了冬天外，在春天及夏天各有一波流行期 [15]，而且同時流行 HCoV-NL63 與 HCoV-OC43 兩種冠狀病毒，這表示在熱帶或亞熱帶地區，冠狀病毒的流行季節與歐美地區是稍有不同的。

依據各個國家的研究結果顯示，HCoV-NL63 的感染陽性率約為 1.6-9.3% (見表一)。HCoV-NL63 感染的臨床症狀主要為咳嗽、發燒、喉嚨痛，次要為鼻炎、呼吸窘迫及哮喘，臨床診斷主要為上呼吸道感染、氣管炎等，少數出現肺炎。最嚴重的案例報告，是一位加拿大的 92 歲高齡患者，於發病後 5 天死亡。法國在 2002 年 11 月至 2003 年 4 月期間的研究發現，300 名住院孩童呼吸道感染症狀者的檢體中，28 名被鑑定出有 HCoV-NL63 感染，感染率為 9.3%，兩歲以下孩童有 18 位，佔了 65% [14]。這項研究指出，感染 HCoV-NL63 的臨床症狀包括有 61% 發燒、39% 鼻炎(rhinitis)、39% 支氣管炎及肺炎(bronchiolitis & pneumonia)、33% 腸胃道問題(digestive problem)、28% 中耳炎(otitis)、22% 咽狹炎(pharyngitis) 及 17% 結膜炎(conjunctivitis)，也就是說有三分之一出現支氣管炎及肺炎之嚴重下呼吸道感染 [14]。在澳洲的一項回溯性研究中發現，840 隻鼻咽腔抽取液檢體中，有 16 隻被檢測出有 HCoV-NL63 [16]，包括 13 名男性及 3 名女性，其中有 63% 確定沒有其他的致病原，顯示 HCoV-NL63 是唯一的致病原。這些患者最常見的臨床診斷為上呼吸道疾病 81%，其中包括 38% 為支氣管炎，主要的臨床症狀包括咳嗽(81%)、發燒(69%)、呼吸窘迫(50%)、哮喘(44%)。加拿大在 2001 年的冬季期間收集 525 名急性呼吸道患者的檢體，鑑定出有 19 名感染 HCoV-NL63，感染率為 3.6% [17]。這些感染者的男女比例為 68% 及 32%，平均年齡為 37 歲，其中 5 歲以下陽性率為 7.2% (8/110)，5 歲以上陽性

率為 2.7% (11/402)，兩者之間有明顯的差異。另外，Bastien 等人也在 2003 年一年期間檢測 1,240 名急性呼吸道感染幼童，發現有 2.1% 感染 HCoV-NL63，86% 的門診患者有上呼吸道感染、58% 住院患者有支氣管炎[18]。

香港在 2001 年的一年期研究中發現，在 587 名住院孩童有發燒及急性呼吸道症狀者的檢體中鑑定出 26 名有 HCoV-NL63 感染，感染率為 4.4%[15]。這項研究顯示在 15 名感染 HCoV-NL63 的住院孩童中平均年齡為 2-3 歲(30.71±9.8 個月)，平均發燒溫度為 39.3°C±0.9°C，大多數的孩童都出現呼吸道症狀，沒有其他明顯的潛在疾病(underlying disorders)，73% 孩童只鑑定出 HCoV-NL63 一種致病原。孩童感染 HCoV-NL63 的平均發燒天數較 A 型流行性感冒病毒及呼吸道融合病毒為短，分別為 1.86±0.86 天、4.55±1.6 天及 3.46±2.5 天，住院天數在這三種病毒間沒有差異，而感染 HCoV-NL63 出現下呼吸道症狀的比例較呼吸道融合病毒感染為低。此外，香港的研究發現在鼻咽腔中的病毒含量(viral load)與發病的時間成反比，如果將病毒含量以 1,000 copies/reaction 為界線分成高低兩組，這兩組的平均發病後採檢時間分別 1±0.6 天及 2.25±0.96 天，有明顯的差異，但是發燒高峰期與發燒的天數在這兩組之間沒有差別，而且病毒含量與疾病的嚴重程度沒有相關性。Kaiser 等人發現在健康的新生兒體內也可以發現高達 7% 具有 HCoV-NL63 感染[19]，他們會出現下呼吸道症狀，而且病毒在體內可持續存在三週之久。

## 實驗室診斷

實驗室診斷 HCoV-NL63 最常用的檢體種類為鼻咽腔抽取液或抹片(nasopharyngeal aspirate or swab)，也可以使用痰液或支氣管沖洗液，鑑定方法包括細胞培養及分子生物學技術。HCoV-NL63 適合生長在 LLC-MK2 cells、tMK cells (tertiary Monkey kidney cells)或 Vero cells 中，而無法生長在 HeLa 或 HEP-2 cells，而且培養時必須經常補充 trypsin 才能生長較好[10,11]。HCoV-NL63 的生長速度慢，大約在細胞培養後約 6-8 天才會出現零星的細胞病變，直到約第 13 天才有 50% 的細胞產生病變，此病毒不會和雞或天竺鼠的紅血球產生凝集反應。

由於 HCoV-NL63 在細胞培養中生長速度慢，而且細胞病變不易觀察，因此除了首先發現 HCoV-NL63 的兩個團隊會使用細胞培養法外，其他國家的研究都是借重分子生物學技術來診斷 HCoV-NL63，包括 RT-PCR 及 real-time RT-PCR，或者再配合使用 nested RT-PCR 可提高偵測的敏感度[16]。在執行 PCR 時，最常使用引子序列的基因位置是變異性最小的 1b gene 及 N gene，有時會再加上 1a gene 進行確認或核苷酸序列分析(nucleotide sequence analysis)。

此外，Moes 等人設計出 degenerated primer，以 pancoronavirus RT-PCR 技術能夠進行包括四種人類冠狀病毒 SARS-CoV、HCoV-OC43、HCoV-229E 及 HCoV-NL63 等 14 種冠狀病毒的篩檢[20]，敏感度可達 50-5,000 RNA copies/ $\mu$ L。使用這樣技術的優點在於，篩檢時不需要使用多種的引子組合進行各種廣泛的冠狀病毒的鑑定，只須一次 RT-PCR 就能鑑定是否有冠狀病毒的確認感染，當結果為陽性時，再使用具專一性的引子進行 RT-PCR 試驗，以區分是哪一種冠狀病毒。

由於現在新興病毒感染人類的案例愈來愈多，需要類似符合經濟效益及有效率的技術來篩檢臨床檢體，能快速的鑑定出新興致病原，Sampath 等人運用這樣的概念，利用廣範圍的 PCR 反應(broad range PCR reaction)去增幅大群組(large groupings)的微生物核酸之標的物，發展出 electrospray ionization (ESI)

mass spectrometry 技術方式[21]，能準確的測量計算出 PCR 產物的質量(mass)，分析出核苷酸的組合(base composition)，進而能鑑定出是哪一種冠狀病毒。這樣的技術已經成功的運用在區分鑑別包括 SARS-CoV、HCoV-OC43 及 HCoV-229E 等 9 種不同的冠狀病毒，敏感度可以高達 1 PFU/mL，分析速度每天可以進行大於 900 次的 PCR 產物分析，未來也可以運用在 HCoV-NL63 等其他病毒、細菌、黴菌等致病原的分析鑑定。

## 共同感染

許多的宿主感染病毒時經常會出現同時感染其它微生物的現象，即所謂的共同感染(coinfections)。HCoV-NL63 的感染也不例外，約有 30%的機會出現與其他微生物共同感染。香港的研究中發現，在 15 例 HCoV-NL63 感染中有 5 例出現共同感染其它的微生物(33%)，包括 3 例 A 型流行性感冒病毒及 2 例細菌感染[15]。澳洲的 16 例 HCoV-NL63 感染中，有 5 例出現共同感染(31%)，包括 4 例其它病毒感染及 2 例細菌感染[16]。Kaiser 等人在新生兒的研究中發現，有一例同時感染 HCoV-NL63 及 HCoV-OC43 兩種冠狀病毒，並持續感染三週。是否這兩種病毒在長時間的共同感染時，有可能會有重新組合成新的病毒是值得注意。

## 核苷酸序列樹狀圖分析 Phylogenetic analysis

由於 1a gene 的變異性較大，因此一般最常使用此基因位置來進行 HCoV-NL63 核苷酸序列之樹狀圖分析。根據荷蘭、加拿大、澳洲、比利時及香港的研究均顯示，HCoV-NL63 可以分成兩群，包括 A 群及 B 群。最先發現 HCoV-NL63 的荷蘭株是屬於 A 群，其他國家的 HCoV-NL63 研究結果也發現以 A 群為主，約佔 1/3-3/4，B 群所佔之比例則均較低[15-17,20]。

## 結 語

從許多研究顯示，HCoV-NL63 的感染率約為 1.6-9.3%，感染率的差異與各研究間樣本採集的對象以及採集的季節有關係。但是無論如何，HCoV-NL63 已經被證明在全球是造成呼吸道疾病的一種新興重要致病原，不論是 HCoV-OC43、HCoV-229E 或 HCoV-NL63，這些冠狀病毒多半會造成上呼吸道的感染，少部分對於新生兒或幼童可能出現肺炎或支氣管炎，也有可能誘發氣喘或在免疫力較差的年長者造成嚴重的呼吸道疾病。HCoV-NL63 的感染似乎就如同呼吸道融合病毒或人類間質肺炎病毒的感染一樣，好發於五歲以下的幼童身上，而在流行期的時候，可以在各個不同的年齡群發現此病毒。然而，HCoV-NL63 確實的臨床影響仍未十分明確，其對於大人及幼童的致病機轉仍有待進行更多的研究來了解及證明。

表一 在不同國家有關 HCoV-NL63 感染之研究結果

研 究 家	研究時間	研究對象	HCoV-NL63 的感染陽性率	陽性病患的年齡	性別 (M/F)	流行尖峰時期	參考文獻
荷蘭	2002/12-2003/8	住院與門診病患	1.6% (8/493)	4個月-67歲	-	1-2月	[10]
荷蘭	2000/11-2002/1	呼吸道感染的住院病患	2.9% (4/139)	2個月-10歲	0/4	1月	[11]
澳洲	2001/11-2004/2	急性呼吸道感染的門診病患	2.1% (16/766)	1個月-62歲	13/3	3-8月	[16]
比利時	2003/1-2004/3	嚴重呼吸道感染的幼童	3.3% (7/211)	12個月-16歲	4/3	1-2月	[20]
加拿大	2001/1-2002/3	急性呼吸道感染的門診病患	3.6% (19/525)	1個月-100歲	13/6	1-3月	[18]
加拿大	2002/11-2003/12	急性呼吸道感染的幼童	2.1% (26/1,240)	2個月-9.5歲	17/9	2-4月	[17]
法國	2002/11-2003/4	急性呼吸道感染的住院幼童	9.3% (28/300)	-	-	1-3月	[14]
香港	2001/8-2002/8	急性呼吸道感染的住院幼童	2.6% (15/587)	6個月-6.6歲	9/6	2-5月, 7-8月	[15]
瑞士	-	發燒及下呼吸道感染之新生兒	7% (6/82)	1個月-11.1個月	-	-	[19]

### 參考文獻

- 1.Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al: Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. J Virol 2005;79:884-95.
- 2.Vabret A, Dina J, Gouarin S, et al: Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. Clin Infect Dis 2006;42:634-9.
- 3.Esper F, Shapiro ED, Weibel C, et al: Association

between a novel human coronavirus and  
Kawasaki disease. *J Infect Dis*  
2005;191:499-502.

4.Chang LY, Chiang BL, Kao CL, et al: Lack of  
association between  
infection with a novel  
human coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and  
Kawasaki disease in Taiwan. *J*  
*Infect Dis* 2006;193:283-6.

5.Shimizu C, Shike H, Baker SC, et al: Human  
coronavirus NL63 is  
not detected in  
the respiratory tracts of children with acute Kawasaki  
disease. *J Infect Dis* 2005;192:1767-71.

6.Cavanagh D, Mawditt K, Shaw K, et al: Towards  
the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. *Acta*  
*Vet Hung* 1997;45:281-98.

7.Hamre D, Procknow JJ: A new virus isolated  
from the human  
respiratory tract. *Proc Soc*  
*Exp Biol Med* 1966;121:190-3.

8.Tyrrell DA, Bynoe ML: Cultivation of viruses  
from a high  
proportion of patients with colds.  
*Lancet* 1966;1:76-7.

9.McIntosh K, Dees JH, Becker WB, et al:  
Recovery in  
tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc*  
*Natl Acad Sci U S A* 1967;57:933-40.

10.van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al:  
Identification of a  
new human coronavirus.  
*Nat Med* 2004;10:368-73.

11. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, et al: A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6212-6.
12. Pyrc K, Jebbink MF, Berkhout B, et al: Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. *Virology* 2004;1:7.
13. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-76.
14. Vabret A, Mourez T, Dina J, et al: Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1225-9.
15. Chiu SS, Chan KH, Chu KW, et al: Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clin Infect Dis* 2005;40:1721-9.
16. Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, et al: New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J Med Virol* 2005;75:455-62.
17. Bastien N, Robinson JL, Tse A, et al: coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2005;43:4567-73.
18. Bastien N, Anderson K, Hart L, et al: Human coronavirus NL63

infection in Canada. *J Infect Dis* 2005;191:503-6.

19.Kaiser L, Regamey N, Roiha H, et al: coronavirus NL63 associated with lower respiratory tract symptoms in early life. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:1015-7.

20.Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, et al: A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* 2005;5:6.

21.Samrath R, Hofstadler SA, Blyn LB, et al: Rapid identification of emerging pathogens: coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2005;11:373-9.