

動物模組對於腸病毒 71 型疫苗研發之重要性

周彥宏 游舒翎

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

前 言

近十七年來，腸病毒 71 型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。想針對腸病毒來研發相關預防及治療藥物產品，動物模組的建立非常重要，有合適的動物模組才方便我們了解腸病毒 71 型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，它在嚙齒動物身上沒有感染受器，簡單講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

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 (MP10)	小鼠馴化株	臨床分離株
接受體來源	小鼠	小鼠	小鼠	小鼠	人
症狀 和死亡	肢體麻痺	肢體麻痺 神經性症狀	天花相似性	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】

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、腦炎等，但輕微症狀一般不具致命危險。有一點類似呼吸道感染或出現皮膚症徵，例如手口足病及皰疹性咽頰炎。

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，正在已於臨床試驗一期成功、臨床試驗二、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。

腸病毒 71 型的動物模組發展史

動物模組最基本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

表二 不同病毒標的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			
	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	臨床試驗 註冊編號
國家衛生研究院 (台灣)	Vero 和 EV71 B4 GMP 檢測 顆粒色層分析	滾瓶培養, 無血清	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 顆粒色層分析	生物反應器培養, 無血清	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 顆粒色層分析	生物反應器培養, 無血清	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 顆粒色層分析	生物反應器培養, 無血清	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 顆粒色層分析	生物反應器培養, 無血清	0.6, 3	成人 (36)	臨床 I 期完成	NCT01376479

(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：

一、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。

二、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 EV71-26 M 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。

三、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]。

這樣的現象讓腸病毒 71 型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- α/β 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。

參考文獻

1. World Health Organization Western Pacific Region (2011). A guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth.
2. US CDC (2015, October). Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. Available 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, Nougairède 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 Vaccin Immunother* 2012;8:1775-83.
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;32:6177-82.
7. Chong P, Guo MS, Lin FH, 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;87:9064-76.
11. Lin YW, Yu SL, Shao HY, et al: Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71. *PLoS One* 2013;8:e57591.
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;9: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; 2005:757-78.
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;129:304-9.
15. Melnick JL: The discovery of the enteroviruses and the classification of poliovirus among them. *Biologicals* 1993;21:305-9.
16. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, et al: Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* 1979;60:329-40.
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;4:375-82.
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;56:257-61.
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;85:2981-9.
 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;354:1682-6.
 21. Ho M: Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks. *J Microbiol Immunol Infect* 2000;33:205-16.
 22. Arita M, Shimizu H, Nagata N, et al: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 2005;86:1391-401.
 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;81:9386-95.
 24. Zhang Y, Cui W, Liu L, et al: Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in rhesus monkeys. *Lab Invest* 2011;91:1337-50.
 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;432:417-26.
 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;8:149-56.
 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;7:523-8.
 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;86:2121-31.
 30. Arita M, Ami Y, Wakita T, et al: 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;82:1787-97.
 31. 劉家齊：手口足症疫苗的發展與挑戰。 *感控雜誌* 2015;25.