

手足口症疫苗的發展與挑戰

劉家齊

財團法人國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

前 言

引起幼童的手足口症 (Hand-Foot-Mouth Disease, HFMD) 主要是由腸病毒屬病毒如克沙奇病毒 A16 型 (Coxsackievirus A16, CV-A16) 和腸病毒 71 型 (Enterovirus A71, EV-A71) 所感染引起的傳染病，對於幼童能引起嚴重的症狀。主要常見症狀為發燒、泡疹性咽峽炎 (Herpangina)，並少數有可能會導致幼童發生嚴重神經性疾病如腦膜炎、腦炎肢體麻痺與神經性肺水腫等的重症，甚至造成死亡 [1]。除了腸病毒 71 型的流行外，各種克沙奇病毒亦會交替流行 [2-6]。從臺灣與其他亞洲各國如越南、新加坡、韓國、日本及中國大陸近 15 年來手足口症疫情流行的狀況，發現克沙奇病毒 A2、A4、A6、A10、A16 與 B3 型等都是常見的流行型別病毒 [2-6]。

目前有許多國家也調查並分析手足口症流行狀況，最近發現新型的克

沙奇 A6 病毒亦會造成成人手足口症 [7]，而美國亦報導新出現 EV-D68 與 EV-C105 的傳染疫情 [8-9]，如何預防手足口症儼然成為重要的公共健康議題。

腸病毒屬病毒特徵

腸病毒屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)，為一群病毒的總稱。在 1997 年以前，已知而被分類的腸病毒共有小兒麻痺病毒 (Poliovirus) 共 3 型 (1 至 3 型)、克沙奇病毒 (Coxsackievirus) 含 23 種 A 型 (A1 至 A22 型，A24 型) 及 6 種 B 型 (B1~B6 型)、伊科病毒 (Echovirus) 共 30 型 (1 至 33 型，但 8、10 及 28 型除外) 及腸病毒 (Enterovirus) (68 型~) 等 60 餘型 [10]。近年來又陸續發現多種型別，依據基因序列分析結果將之重新歸類，分為人類腸病毒 A、B、C、D (Human enterovirus A、B、C、D) 型，其中腸病毒 71 型與

克沙奇病毒 A16 型被歸類於人類腸病毒 A 型。現今腸病毒 71 型已被進一步區分為 A、B、C、D、E、F 六種基因型 (Genotype) [11]，目前 B 與 C 基因型為最主要的流行病毒型可再細分為 B1 至 B5 與 C1 至 C5 基因亞型 (Subgenotype)。

腸病毒屬病毒之遺傳物質為一條單鏈正股核糖核酸 (RNA)，大小約有 7,500 個鹼基對。由 VP1 至 VP4 四種病毒蛋白組成的外殼 (Capsid) 包覆遺傳物質，並以正二十面體的形式組成病毒顆粒[10]。當病毒顆粒接觸細胞表面特定的受器後，將會釋放包裹的遺傳物質進入細胞質中，開始進行病毒複製的過程。病毒的遺傳物質被轉譯出一條多蛋白分子，而核糖核酸之前後未被轉譯的區域稱為 5' 端與 3' 端非轉譯區(5'-UTR and 3'-UTR)。病毒多蛋白分子經特定病毒蛋白切割後，形成組成外殼的結構蛋白 VP0、VP1、VP3，以及非結構蛋白 2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D。非結構蛋白對病毒複製過程中，進行多蛋白分子切割與遺傳物質複製…等重要功能。結構蛋白 VP0、VP1、VP3 會以 VP1 為頂點形成 5 聚體 (pentamer)，再由 12 個 5 聚體形成正二十面體。當包裹新合成的病毒遺傳物質形成病毒顆粒後，結構蛋白 VP0 將進一步被切割成 VP2 與 VP4。細胞破裂後會釋放出成熟的病毒顆粒，再感染更多的細胞。因此發展疫苗的目標是促使人體的免疫系統能產生具中和能力

之抗體，以阻止病毒感染細胞進行複製繁殖，並被免疫系統所清除。

手足口症疫苗之研發

臺灣自從 1998 年的大流行發現腸病毒 71 型為主要造成許多幼童死亡的病因後，政府開始積極發展腸病毒 71 型疫苗。科學家們研發腸病毒 71 型疫苗是針對結構蛋白為主進行疫苗的研發，發展之方向有：減毒疫苗 (Live-attenuated virus)、死毒疫苗 (Inactivated whole-virion)、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) 與類病毒顆粒疫苗 (Virus-like particle) 等[10,12]。各種研發類型的疫苗各有其優點，均是表現全部或部分之結構蛋白促使免疫系統誘發出中和抗體。經過多年的發展，臺灣、中國大陸與新加坡已完成福馬林去活化腸病毒 71 型死毒疫苗的人體臨床試驗 (表一)。臨床試驗的資料顯示安全性良好，並引發顯著對抗腸病毒 71 型的中和能力[13]。然而，臨床試驗的結果也發現腸病毒 71 型疫苗是無法對抗克沙奇病毒 A16 型與其他腸病毒屬的病毒。

從結構蛋白序列上的研究發現腸病毒 71 型與克沙奇病毒 A16 型約有 20% 的差異，在已知的腸病毒 71 型抗原決定位 (epitope) 上二種則是極為

表一 去活化腸病毒71型疫苗臨床試驗

Organizations	Clinical Trials			
	Dosage of EV71 Antigen, μg	Population Target and Age (Sample Size)	Status Identifier	ClinicalTrials.gov
NHRI (Taiwan)	5 and 10	Adults 20~43 y (60)	Phase 1 completed	NCT01268787
Medigen Vaccinology Corp. (Taiwan)		2 months to <12 yrs (365)	Phase 2 recruiting	NCT02200237
Sinovac Biotech Co Ltd (China)	0.25, 0.5, and 1	Adults, children (> 5 y)	Phase 1 completed	NCT01273246
	1	Children (18~60 mo)	Phase 2 completed	NCT01273233
	1	Children (6~35 mo) (10,245)	Phase 3 completed	NCT01507857
Beijing Vigoo Biological Co Ltd (China)	0.4, 0.8, and 1.6	Adults, children (> 5 y)	Phase 1 completed	NCT01313715
	0.8	Children (18~60 mo)	Phase 2 completed	NCT01399853
	0.8	Children (6~35 mo) (10,077)	Phase 3 completed	NCT01508247
Chinese Academy of Medical Sciences (China)	0.4, 0.8, and 1.6	Adults, children (> 5 y)	Phase 1 completed	NCT01391494
	0.4, 0.8, and 1.6	Children (18~60 mo)	Phase 2 completed	NCT01512706
	0.25	Children (6~71 mo) (12,000)	Phase 3 completed	NCT01569581
Inviragen (Singapore)	0.6 and 3	Adults (36)	Phase 1 completed	NCT01376479

不同[13]，可以部分解釋為什麼腸病毒 71 型疫苗只能針對腸病毒 71 型病毒，卻沒有引起交叉中和抗克沙奇病毒 A16 型抗體，克沙奇病毒 A16 型可能成為手足口症的在未來的主要病因。此外，腸病毒屬病毒的交互流行提高了再次出現手足口症與病毒基因重組的風險。因此，結合腸病毒 71 型與克沙奇病毒 A16 型的雙價手足口症疫苗是非常需要的。

雙價手足口症疫苗的研究近來已正在進行，從克沙奇病毒 A16 型去活化疫苗與似病毒粒子疫苗的研究，對於病毒特性與病毒顆粒結構已有基本的了解。數個實驗室進行動物實驗已知道腸病毒 71 型與克沙奇病毒 A16 型所組合的雙價疫苗是可行的，兩

種抗原在實驗動物中能誘發中和抗體 [14-17]。因此，對於其他新興的腸病毒屬病毒的研究，將有助於多價手足口症疫苗的研發。

對開發疫苗另一個具有的重大進展是有效的動物模式，近十年來有許多種類的動物模式被發展出來驗證腸病毒 71 型疫苗的效果 [18]。從先期的乳鼠模式到近年來基因轉殖鼠模式，都有其使用的範圍 (表二)。自從 hSCARB2 與 PSGL-1 受體被確認是腸病毒 71 型病毒進入細胞的重要受體，hSCARB2 基因轉殖鼠模式的建立則更能驗證病毒毒力與疫苗效果 [19]。hSCARB2 基因轉殖鼠模式同樣也適用克沙奇病毒 A16 型，但對於其他型別則需進一步的研究。

表二 驗證腸病毒疫苗之動物模式

Model	ICR mice	NOD/SCID mice AG129 mice	Immuno-deficient	hPSGL-1 Tg mice	hSCARB2 Tg mice
Susceptible strain	Use mouse-adapted strain (MP4)	Use mouse-adapted strain (NOD/SCID)	Non-mouse-adapted strain (5865/SIN/00009)	Use mouse-adapted strain (MP10)	Clinical isolates
Origin receptor	Mouse	Mouse	Mouse	Human	Human
Symptom	Paralysis and death	Paralysis	Polio-like neuropathogenesis	Paralysis	HFMD, Paralysis and death

疫苗研發之挑戰

腸病毒 71 型疫苗的研發，逐步開拓了流行病學、病毒學、生化製程、免疫學、分析檢驗、動物模式、cGMP 製造生產與臨床試驗等相關研究。腸病毒 71 型與其他型別克沙奇病毒在結構蛋白上約有 20~35% 的差異，病毒特性因型別而有所不同且細胞受體亦不相同，因此在發展多價手足口症疫苗對抗不同型別腸病毒屬病毒的發展中，許多關鍵瓶頸亟待克服。(1) 疫苗株的選擇：各國都有當地交互流行的病毒株，篩選適當的病毒株才能具有廣泛的保護力，且能在繁複的製備過程中仍然保有免疫原性；(2) 抗原的選擇：各種研發類型的疫苗各有其優缺點，進行多價抗原不同比例混合時將會誘發不同程度的中和抗體；(3) 疫苗製程：各種類型的疫苗有各自最適化的生產條件；(4) 檢驗標準：多價抗原混合時需建立可分析的檢驗標準；(5) 交叉中和能力測定：在多種病毒建立有效的交

叉中和試驗；(6) 動物模式：需發展合適的動物模式驗證疫苗功效；(7) 臨床試驗：需要建立國際合作並尋求多價抗原組合後之有效劑量。

未來展望

為因應新興的腸病毒屬病毒所造成的手足口症，研發多價手足口症疫苗將有助於避免傳染病的流行，降低導致重症的機率與減輕因停班停課的社會成本。藉由腸病毒 71 型疫苗之研發，臺灣已具有 PIC/S cGMP 國際規範之生產能量，並有執行人體臨床試驗之經驗。藉由現有的經驗，研究不同型別腸病毒屬病毒之特性，進而研發適當的多價疫苗劑型，這將提升國內的學術研究能力，並能協助國內廠商投入疫苗產業之後續發展。

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

- Disease (HFMD). 2011.
- Taiwan CDC. Notifiable Infectious Diseases Statistics System. <http://nidss.cdc.gov.tw/singledisease.aspx?Pt=s&Dc=2&Dt=1&disease=0749>
 - Tseng, et al: Epidemiological survey of enterovirus infections occurring in Taiwan between 2000 and 2005: analysis of sentinel physician surveillance data. *J Med Virol.* 2007;79:1850-60.
 - Lo, et al: Clinical and epidemiologic features of Coxsackievirus A6 infection in children in northern Taiwan between 2004 and 2009. *J Microbiol Immunol Infect* 2011;44:252-7.
 - Ang, et al: Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001-2007. *Ann Acad Med Singapore* 2009;38:106-12.
 - Xing, et al: Hand, foot, and mouth disease in China, 2008-12: an epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2014;14:308-18.
 - Downing et al. Coxsackievirus A6 associated hand, foot and mouth disease in adults: clinical presentation and review of the literature. *J Clin Virol.* 2014;60:381-6.
 - US CDC. Non-Polio Enterovirus, D68. <http://www.cdc.gov/non-polio-enterovirus/about/ev-d68.html>
 - US CDC. Acute Flaccid Paralysis Associated with Novel Enterovirus C105. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0759_article
 - Solomon, et al: Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010;10:778-90.
 - 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.
 - Chong, et al: Production of EV71 vaccine candidates. *Hum Vaccines Immunother* 2012;8:1-9.
 - Liu, et al: Prospect and challenges for the development of multivalent vaccines against hand, foot and mouth diseases. *Vaccine* 2014;6:177-82.
 - Chong, et al: Immunological and biochemical characterization of coxsackie virus A16 viral particles. *PLoS One* 2012;7:e49973.
 - Cai, 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.
 - Ku, et al: A virus-like particle based bivalent vaccine confers dual protection against enterovirus 71 and coxsackievirus A16 infections in mice. *Vaccine* 2014;32:4296-303.
 - Lyu 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.
 - Wang & Yu. Animal models of enterovirus 71 infection: applications and limitations. *J Biomed Sci* 2014;21:31. Review.
 - Lin, et al: Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71. *PLoS One* 2013;8:e57591.