

計畫編號：DOH92-DC-2023

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

腸病毒 71 型 1998,2000,2002 分離株中和免疫特性之比較  
Comparison of immune characteristics of EV71 isolates in  
Taiwan during 1998,2000,2002

## 研究報告

執行機構：血清疫苗研製中心

計畫主持人：連偉成

研究人員：江正榮、蔡浩鵬、郭旭英、張瑞原、羅怡雯

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

# 目 錄

中文摘要	2
英文摘要	3
前言	4
材料與方法	6
一、細胞和病毒的培養	6
二、抗體中和效價的測定	8
結果與討論	10
參考文獻	12
圖表	
Fig1 : Effects of adjuvants after boosting at a interval of 14 days	14
Fig2 : Effects of adjuvants after boosting at a interval of 21 day	15
Fig3 : Antisera enhanced by AlPO <sub>4</sub> adjuvant	16
Fig4 : Virus strains as challenge viruses in neutralization test	17
Fig5 : Cross-neutralization among 2002 isolates antisera	18
Table I : Characteristics of EV71 strains	19
Table II : The cross neutralization test for isolates of 2002 and E259	20

## 中 文 摘 要

原型疫苗的製備方法中，不活化的全病毒顆粒已在動物試驗中產生保護效果，誘發中和抗體。為接續前項研究成果，本中心預備進入先導型疫苗量產，製備約 20-40 公升的病毒液。本研究計畫將尋求在這種量產操作下，不需濃縮程序即可誘發高中和抗體力價的病毒株；並以交互病毒中和試驗，比較各病毒株的保護範圍，尋求保護範圍較寬廣的病毒株。隨意選取本局生物材料庫中腸病毒 71 型分離株：1998 年 6 株 2000 年 3 株和 2002 年 6 株。病毒株經 3 次 Vero 細胞增殖，並以黴漿菌培養試驗確定陰性後，保存於 -80 冷凍庫，作為病毒工作種源庫。將每株病毒以 MOI = 0.1-0.01 的感染力價接種於細胞培養滾動瓶中的 Vero 細胞，待細胞 CPE 達 80%以上，過濾其上清液後添加福馬林，置於 4℃，不活化病毒。經 60 天後，將上清液混合鋁鹽佐劑，免疫小鼠兩次。心臟採血收集血清，以棋盤交叉法作病毒中和試驗，比較各病毒免疫性的差異。本研究計畫的實施，希望能得到適當的病毒疫苗株，除了可產生良好的免疫反應外，進入疫苗製程時，可穩定地呈現各項抗原特性，成為開發腸病毒 71 型疫苗的重要菌種。

## 英 文 摘 要

Inactivated viral particles of Enterovirus type 71 were prepared to generate neutralizing antibodies successfully in immunized mice. We produced this prototype vaccine from Vero cells, 20-40 liters virus culture fluid per batch, to develop pilot plant scale study. The neutralization test was performed to investigate a dominant virus strain that elicited high potency and wide range of neutralizing antibody to other EV71 stains. We compare with 6 stains of 1998, 3 stains of 2000 and 6 stains of 2002. These stains were subcultured in Vero cells for three times and identified as Mycoplasma-negative by a culture method. The virus stock was stored at -80 °C. The virus suspension was harvested from the roller bottle culture system after the cytopathic effect up to 80% at multiplicity of infection 0.1-0.01. After removing cell debris by centrifugation, virus fluids were inactivated by formalin 1/4000 at 4 °C for 60 days. The virus fluid adsorbed with AlPO<sub>4</sub> pH 7.5 as a adjuvant was immunized in mice twice at the period of two weeks. The immunized sera collected by heat puncture were pooled from 15 mice. The different antigenicities of EV71 strains were compared by the cross-neutralization test.

## 前 言

本研究計畫之目的在為研發不活化細胞培養腸病毒 71 型疫苗，尋找免疫性寬廣的疫苗病毒株，作為疫苗配方的一部份。

在台灣之腸病毒 71 型血清流行病學調查顯示，1995 至 1998 年間腸病毒 71 型的流行並不明顯，1999 年後腸病毒 71 型的中和抗體才普遍存在於 6 歲以下的兒童，因此腸病毒 71 型被推測會呈現每數年流行一次的特性 (Lu et al., 2002) 因為保護抗體力價不足，台灣 6-11 月齡的嬰幼兒是發病率和死亡率最高的危險群。這項發現與巴西的調查結果相似，85.2 % 的 0-3 歲發病巴西兒童沒有腸病毒 71 型中和抗體 (Gomes et al., 2002) 提昇 6 歲以下兒童的中和抗體，對抗腸病毒 71 型每數年就流行的趨勢，是必需且有效的方針。腸病毒科中，發展疫苗預防傳染病最為成功者屬小兒麻痺疫苗。台灣地區於 1991 年後就分離不到小兒麻痺野生株病毒，世界衛生組織更於 2000 年 10 月 29 日宣布台灣地區已根除小兒麻痺。這項顯著公共衛生的成就，完全仰賴口服活的減毒小兒麻痺病毒疫苗 (OPV) 或注射用不活化病毒疫苗 (IPV) 推廣使用和疫苗免疫效果良好所致。為接續這項成果，開發腸病毒 71 型疫苗將以注射用不活化病毒疫苗 (IPV) 為典範。71 型被分成三個基因型 (Brown et al., 1999)，但只有一

種血清型，這使得開發疫苗的複雜性降低。並非任一腸病毒 71 型分離株即是疫苗製造菌種，必需符合兩種特性：1. 可激發足夠的中和抗體力價，保護範圍寬廣 2. 經不活化和純化的過程，抗原保持完整沒有破壞。因此世界衛生組織（WHO）對各類的疫苗製造菌種，都會作評估和推薦。製造疫苗的菌種製備，是本研究計畫的重點。期望藉由有系統地比較 1998、2000 和 2002 年的本土分離株，挑選製造疫苗的合適菌種，並由免疫的特性分析各分離株抗原的差異

# 材 料 與 方 法

## 一、細胞和病毒的培養

### 1. 細胞株的培養

利用含有 5% 胎牛血清 ( Fetal Bovine Serum, FBS ) 的 M199 培養液培養非洲綠猴腎細胞 ( Vero Cell ), 培養箱設定 : 溫度 37 、 CO<sub>2</sub> 含量 5 % 。

### 2. 病毒的培養

以腸病毒 71 型 ( EV 71 ) 感染 Vero 細胞的方式繁殖病毒 ; 病毒培養基為含有 2 % 胎牛血清的 M199 培養液。

### 3. 病毒的收取

經由 5-7 天的培養 , 觀察細胞的細胞病理現象 ( Cytopathic Effect, CPE ) 。待細胞 CPE 達 80 % 以上 , 利用連續冷凍-解凍的方式釋出存在於細胞中的病毒。收集病毒培養液 , 以離心速度 3000rpm、離心時間 30 分鐘去除細胞碎屑 , 再以 0.22  $\mu$  m filter 過濾離心後的上清液。

### 4. 病毒不活化

先以 1 / 75 M PBS ( Phosphate Buffer Solution ) 將福馬林溶液 ( Formaldehyde Solution ) 稀釋為 1 / 20 倍並調整 pH 值至 7.4 , 再以 0.22  $\mu$  m filter 過濾之 , 存放於 4 冰箱。待進行病毒不活化時 ,

將福馬林溶液加入過濾後的病毒液中，使其福馬林溶液最後比例為 1 / 4000。將此病毒液靜置於 4 冷藏室 30 天，以進行病毒之不活化反應。

## 二、抗體中和效價的測定

### 1. 鋁鹽佐劑的製備—磷酸鋁溶液 ( Aluminum Phosphate, $\text{AlPO}_4$ ) :

#### ( 1 ) 配製 5 $\text{AlCl}_3$ / $\text{CH}_3\text{COONa}$ 溶液 :

( 即 0.164 aluminum chloride + 0.05 sodium acetate )

以製備一公升溶液為例 :

39.7 g  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  + 6.8 g  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  + 1L  $\text{H}_2\text{O}$  ,

其 pH 值約在 3 — 4 之間 ; 以 0.22  $\mu\text{m}$  filter 過濾 , 室溫存放。

#### ( 2 ) 配製 5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液 :

( 即 0.144 di-sodium hydrogen phosphate )

以製備一公升溶液為例 :

38.59 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 1L  $\text{H}_2\text{O}$  ,

其 pH 值約在 8.5 — 9.5 之間 ; 0.22  $\mu\text{m}$  filter 過濾 , 室溫存放。

#### ( 3 ) 先加入欲製備之鋁鹽溶液總體積 20 % 的 5 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液 ;

加  $\text{H}_2\text{O}$  到總體積的 50 — 55 % 。

#### ( 4 ) 再加入總體積 20 % 的 5 $\text{AlCl}_3$ / $\text{CH}_3\text{COONa}$ 溶液 ; 加 $\text{H}_2\text{O}$



調整最後體積至 100 % ；此為 1 的磷酸鋁溶液。

- (5) 調整溶液的 pH 值為 5.0 後，室溫下靜置 72 小時，使之分層。
- (6) 抽除上層的澄清液體，再加入同等體積的 0.9 % NaCl 溶液；混合均勻後，於室溫下靜置 72 小時。
- (7) 重複步驟 (6) 二次。清洗三次的目的在於去除多餘的 phosphate。
- (8) 經過高壓滅菌，鋁鹽佐劑的 pH 值會下降，因此需調整成適當 pH 值後再滅菌，以得到所需 pH 值的鋁鹽溶液。

## 2. 動物免疫之操作

- (1) 將所需 pH 值的鋁鹽溶液與不活化的病毒液以 1 : 9 的比例配製；先置於室溫下 1 小時，再置於 4 冷藏室 24 小時，使佐劑吸附腸病毒，作為免疫老鼠之用。
- (2) 取 12 — 15 公克的小白鼠，每週先以心臟抽血 10 隻 ICR 小鼠，再於抽血過後的第 1 週和第 4 週以腹腔注射免疫老鼠共 2 次；每星期繼續採血直到實驗結束。每次採血後將採到的血混合，離心取上清液，保存於 - 20 。做血清的中和試驗，測其抗體力價。

## 3. 中和抗體力價試驗

- (1) 先以 M199 + 2% FBS 的培養基將欲測試的老鼠血清做二倍數的系列稀釋，再以 1:1 的比例加入已利用相同培養基稀釋成 200 TCID<sub>50</sub> / 100 μL 的病毒，混合均勻；置於 4℃ 作用 18—24 小時。
- (2) 於 96 孔細胞培養盤中培養 Vero 細胞：每一 well 含有 100 μL 的細胞液，細胞數量約為 2×10<sup>5</sup> 個 / 1mL；置入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 24 小時。
- (3) 將血清與病毒混合的中和液接種至 96 孔細胞培養盤的 Vero 細胞，置於 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培養箱培養 5—7 天；觀察細胞的 CPE 現象，即細胞受病毒感染的情況。紀錄 CPE 結果並求得抗體的中和力價：將血清可抑制病毒感染細胞的最高稀釋倍率套入公式中計算而得之。

## 結 果 與 討 論

世界衛生組織 WHO 所允許用於人用疫苗的佐劑，只限於磷酸鋁、氫氧化鋁及磷酸鈣。本計劃以磷酸鋁 pH 7.0, pH 7.6、氫氧化鋁 pH 7.2 及磷酸鈣 pH 7.0 作為佐劑，比較兩次免疫間隔 14 天和 21 天之時程，分別於第二次補強免疫後 7、14、21 天收集血清。由 Fig. 2 得知，磷酸鋁 pH 7.6 免疫間隔 21 天、在第 7 天採血，可得 1 : 5762 之最高中和抗體力價。而且磷酸鋁 pH 7.0 和 pH 7.6 所免疫之抗體力價，比氫氧化鋁 pH 7.2 及磷酸鈣 pH 7.0 佐劑高。由於本次免疫時程，將作為未來比較 EV71 生產批次抗原性之優劣，因此選擇所費時間短而抗體力價有差異表現間隔 14 天之時程。在間隔 14 天時程的 Fig. 1 中，以磷酸鋁 pH 7.6 所呈現的抗體力價較平穩，另一佐劑磷酸鈣 pH 7.0 也有相似的曲線，表示佐劑的作用是緩慢釋出抗原，對免疫記憶性有增強效果，但佐劑磷酸鈣 pH 7.0 所激發的抗體力價皆比磷酸鋁 pH 7.6 少。因此往後之免疫時程以磷酸鋁 pH 7.6 當吸附佐劑，間隔 14 天後在第 7 天採血，作為實驗標準操作程序。

在 1998、2000 年分離株中 (Table I)，經由交叉中和抗體試驗 (Fig. 3, 4)，找出 E259 最適合作為疫苗候選株。E259 對不同病毒株所激發的抗體都可被中和，本身所產生的抗體也會中和其他病毒。而 E92 與 E43 自身的抗體卻無法中和自己，只中和別的疾病株，這種特性並不適合作為疫苗候選株。在 2002 年分離株中，作交叉中和抗體試驗 (Fig. 5)，其中以 E075

和 E117 所誘發的抗體可中和多數的病毒。再將 2002 年分離株與 E259 抗血清作交叉中和試驗 ( Table II ), E075、E117 和 E119 可被中和。

在磷酸鋁佐劑吸附的條件下，3 種年份所分離的病毒株，免疫性差異不大。磷酸鋁是以離子極性的方式吸附蛋白質，因此磷酸鋁的酸鹼值決定吸附的效率和蛋白質的種類。EV71 以酸鹼值大於 7.5 的磷酸鋁，可得到最佳的免疫效果；與破傷風和白喉類毒素偏好酸性的磷酸鋁正好相反。酸鹼值 7.5 的磷酸鋁是否會引起人體的不適，需在臨床試驗中得到驗證。

有些病毒產生之抗血清無法中和自家病毒的現象，是實驗誤差還是病毒特性所造成，本實驗室將持續進行了解。Kapsenberg ( 4 ) 曾發現腸病毒中和試驗時，需將攻擊病毒經 sodium deoxycholate 或 chloroform 處理才有中和力價。本實驗室將重複該項實驗，以求得一致和穩定的結果。

## 參 考 文 獻

1. Brown, BA, MS Oberste, JP Jr Alexander, ML Kennett, MA Pallansch. 1999. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 73:9969-9975.
2. Gomes Mde L, CM de Castro, MJ Oliveira, and EE da Silva. 2002. Neutralizing antibodies to enterovirus 71 in Belem, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1):47-49
3. Ho, M, ER Chen, KH Hsu, SJ Twu, K T Chen, S F Tsai, J R Wang, and S R Shih. 1999. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* 341:929-935.
4. Kapsenberg, JG, A Ras and J Korte. 1979. Improvement of Enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 12:329-334.
5. Lin, YC, CN Wu, SR Shih, and MS Ho. 2002. Characterization of a vero cell-adapted virulent strain of enterovirus 71 suitable for use as a vaccine candidate. *Vaccine* 20(19-2):2485-2493.
6. Lu, CY, CY Lee, CL Kao, WY Shao, PI Lee, SJ Twu, CC Yeh, SC Lin, WY Shih, SI Wu, and LM Huang. 2002. Incidence and case-fatality rates resulting from the 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan. *J Med Virol* 67(2):217-223.
7. Rueckert, RR. 1990. Picornaviruses and their replication. In: Fields, BN. Knipe, DM.(Eds), *Virology*. Lippincott-Raven, New York, p. 507.
8. Shih, S., M Ho, K Lin, S Wu, Y Chen, C Wu, T Lin, L Chang, K Tsao, H Ning, P Chang, S Jung, C Hsueh and KS Chang. 2000. Genetic analysis of

- enterovirus 71 isolated from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res.* 68(2):127-136.
9. Yan, JJ, JJ Su, PF Chen, CC Liu, CK Yu, JR Wang. 2001. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR. *J Med Virol* 65(2):331-339.
  10. Wang, SM., CC Liu, HW Tseng, JR Wang, CC Huang, YJ Chen, YJ Yang, SJ Lin, and TF Yeh. 1999. Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications. *Clin Infect Dis* 29:184-90.
  11. Wong, KT., KB Chua, and SK Lam, 1999. Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis [letter]. *Ann Neurol* 45:271-2.
  12. Wu, TN, SF Tsai, SF Li, TF Lee, TM Huang, ML Wang, KH. Hsu, and CY Shen 1999. Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 5: 458-60.
  13. Wu, CN, YC Lin, C Fann, NS Liao, SR Shih, and MS Ho. 2001. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine* 20(5-6):895-904.

# 圖 表

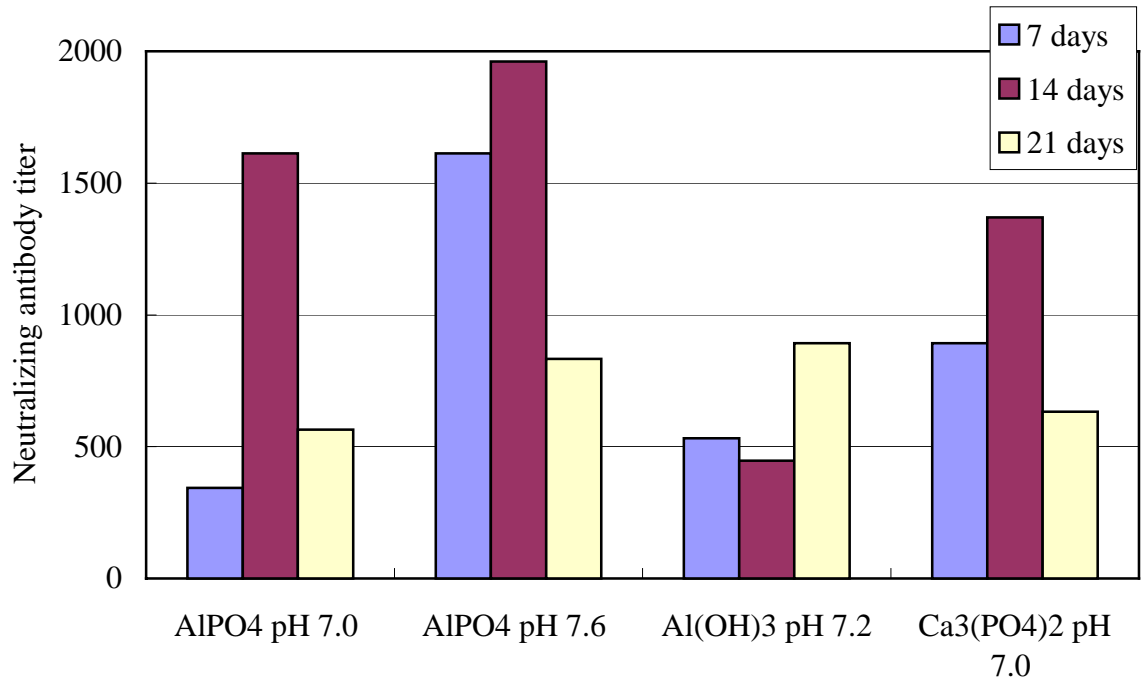


Fig.1 Effects of adjuvants after boosting at a interval of 14 days

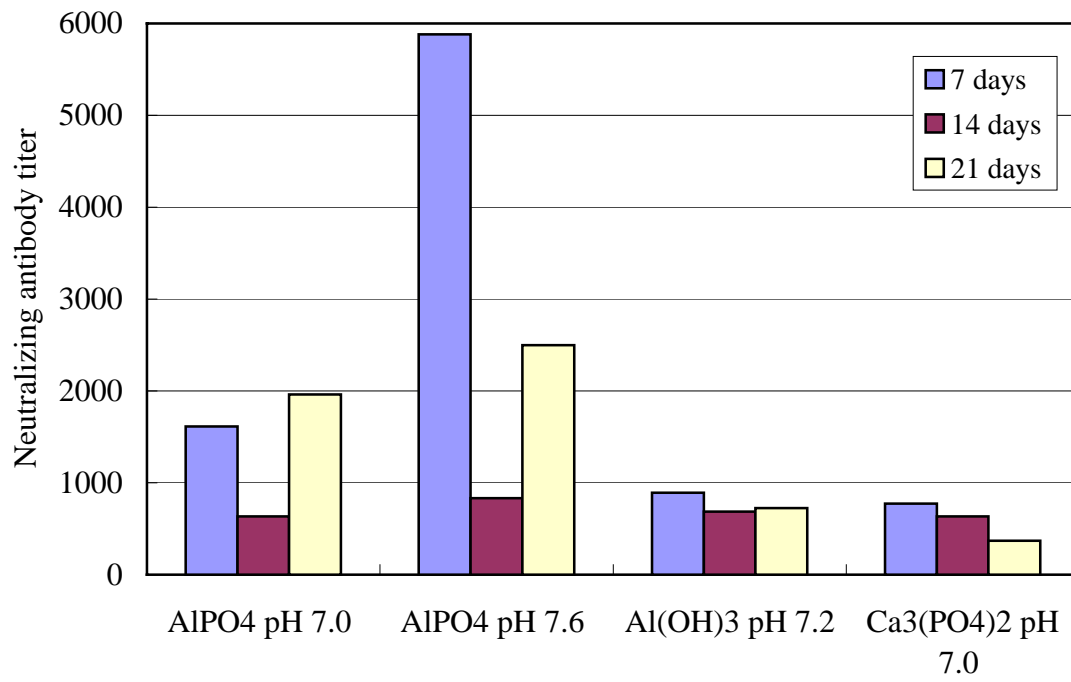


Fig. 2 Effects of adjuvants after boosting at a interval of 21 days



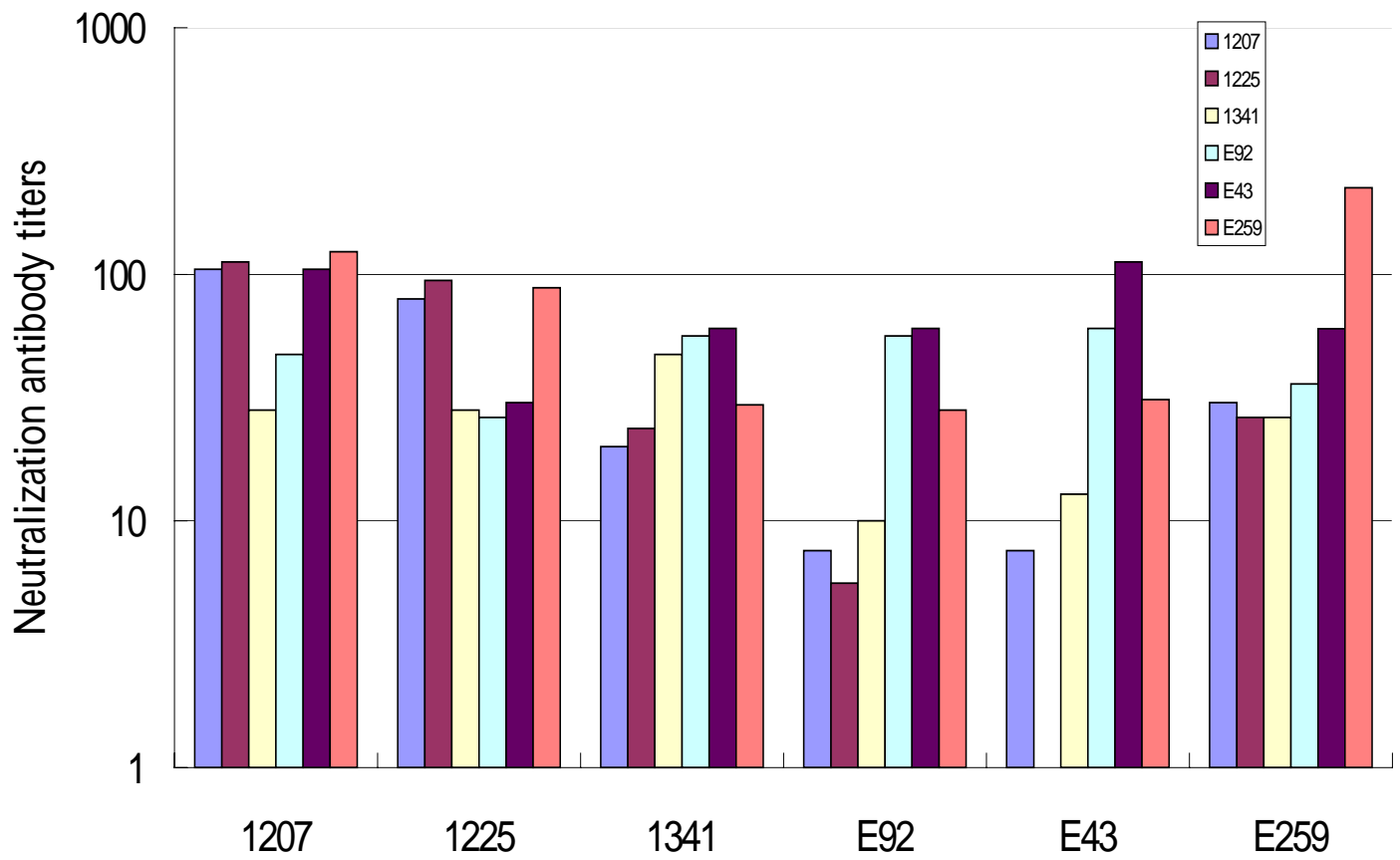


Fig. 3 Antisera enhanced by AIPO4 adjuvant

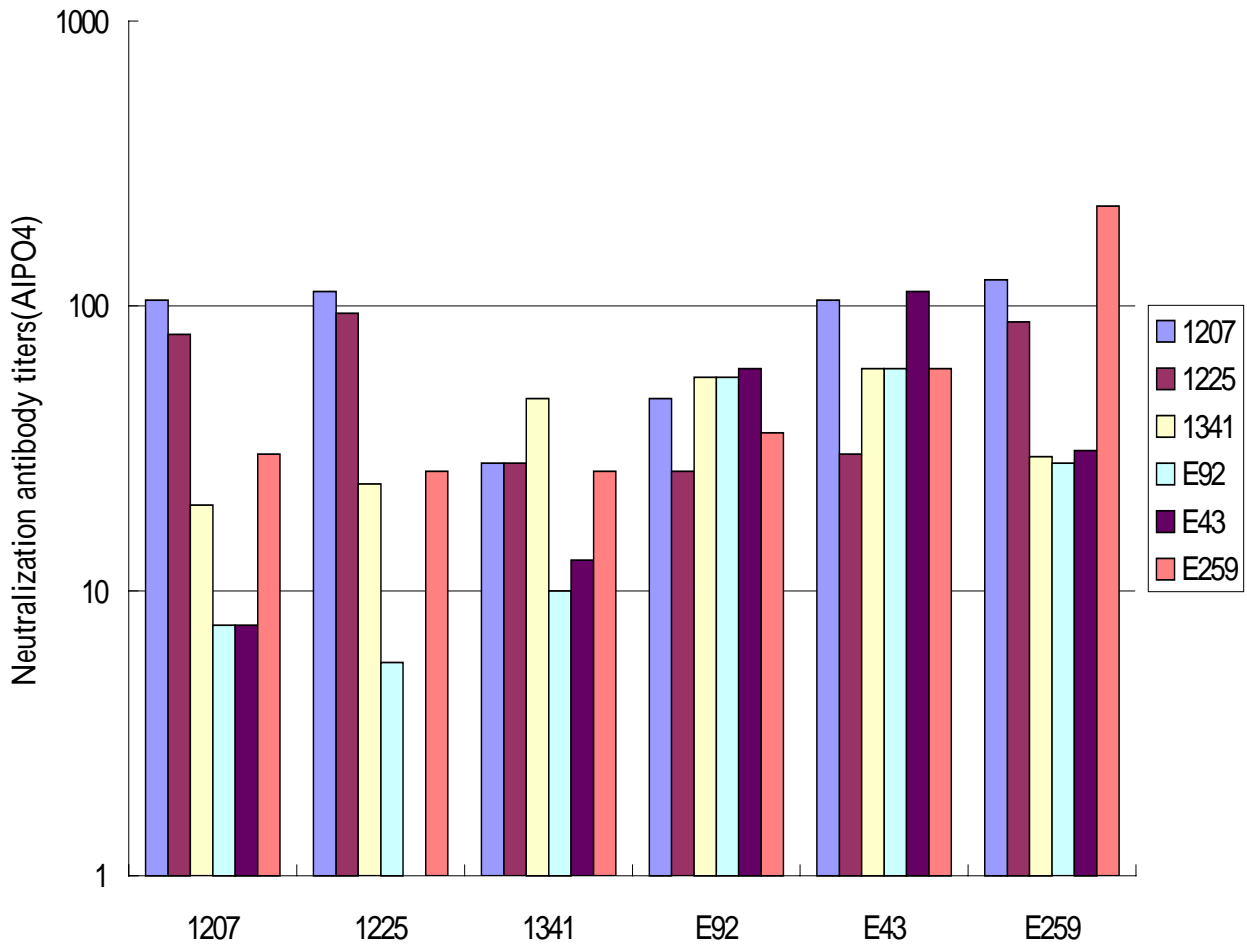


Fig. 4 Virus stains as challenge virus in neutralization test

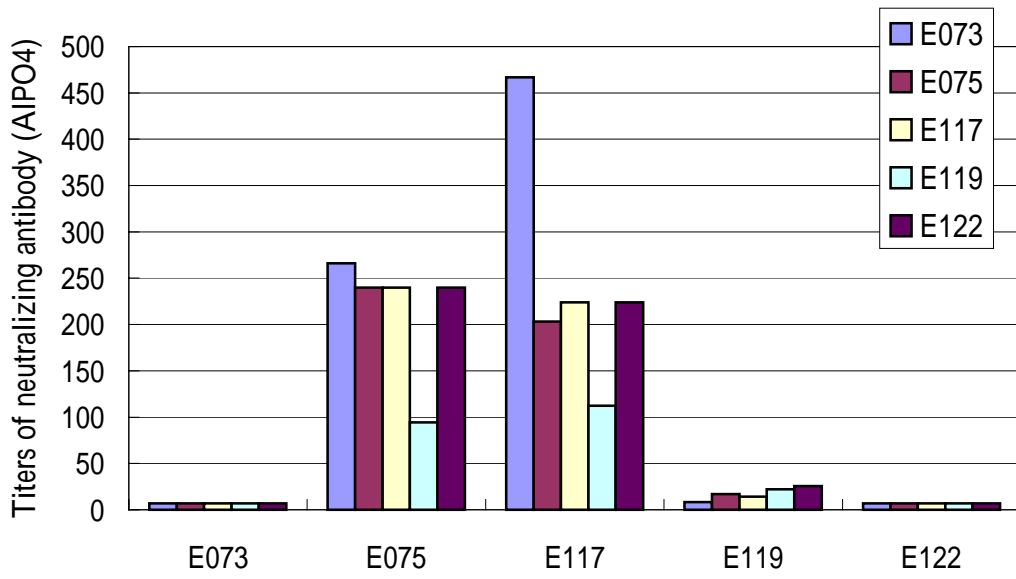


Fig. 5 Cross-neutralization among 2002 isolates antisera

Table I. Characteristics of EV71 strains

Virus strain	Year of Isolation	Location of Isolation	Virus titer in Vero cells
1207	1998	CH	7.0
1232	1998	TP	6.6
1225	1998	TC	6.67
1341	1998	IL	6.64
1263	1998	TP	7.25
E815	1998	CI	6.15
E92	2000	MC	6.25
E43	2000	TN	6.25
E259	2000	CH	7.0
YN3	1998	TP	6.75
E073	2002	-	6.63
E075	2002	-	7.0
E117	2002	-	7.18
E119	2002	-	7.25
E120	2002	-	5.5
E122	2002	-	6.4

Table II The cross neutralization test for isolates of 2002 and E259

	EV71 isolates of 2002					
	E073	E075	E117	E119	E120	E122
Neutralization titers to E259 antisera	-	748.89	891.25	188.36	-	-

-: NT titer is below 1:10