

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000119

衛生福利部疾病管制署 104 年度科技研究發展計畫

建立篩選具疫苗株與標準品潛力之腸病毒 71 型技術平台

研究報告

執行機構：衛生福利部疾病管制署血清疫苗研製中心

計畫主持人：江正榮

研究人員：張靜如、陳明哲、鍾瑋

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 年 12 月 31 日

目錄

目錄.....	2
中文摘要.....	3
英文摘要.....	5
前言.....	7
材料與方法.....	11
一、病毒的馴化增量與病毒庫製作.....	11
二、細胞和病毒的培養.....	11
三、病毒之檢驗.....	12
四、病毒株效價的測定.....	13
結果.....	15
一、腸病毒 71 型四種 subgenotypes 馴化與初步篩選.....	15
二、病毒原液之檢測與分析	15
三、測定有血清培養病毒株產生之抗體中和效價.....	17
四、C2 疫苗候選株(E12-20)無血清滾動培養瓶之試製並與 B4 和 C4 疫苗候選株互相比較	19
討論.....	22
圖表.....	25
參考文獻.....	40

中文摘要

腸病毒 71 型在台灣出現比例居高不下，自民國 87 年爆發後，腸病毒重症以三年為一循環，侵襲台灣抵抗力較弱之嬰幼兒族群，WHO 也將之列為遠東地區的重要新型傳染病。雖然一般成年人受到感染並不會出現症狀，但五歲以下的幼童卻容易併發腦幹腦炎、無菌性腦膜炎和神經性肺水腫等嚴重症狀。因此，為能有效控制疫情的發生，保障國人健康，持續針對腸病毒 71 型疫苗研究與開發，是一件刻不容緩的事。

本計畫延續 103 年計畫研發成果，繼續挑選台灣由 2005~2013 年來流行或是曾引發重症病例之腸病毒 71 型病毒株(不包含 B4、C4)，依照基因亞型不同分為 B5, C2 及 C5 等 3 種，最終建立 11 株病毒種庫。然後依據 1.TCID₅₀ 和 CPE 挑選容易培養與增殖的病毒；2.以 ELISA 與西方墨點法分析找出高抗原量的類型；3.小鼠試驗選出高免疫反應與中和效價寬廣的病毒；4.兔子試驗作為最後確認；等 4 個條件，挑選出 C2-E98-07 為疫苗候選株，綜合兩年成果，C2 亞基型病毒株將是未來開發新腸病毒 71 型疫苗的主要目標。

另外建立 103 年 C2-E12-20 疫苗候選株適量產之最適條件，並以相同培養條件比較本中心篩選出之 B4、C4、C2 三株疫苗候選株，以西方墨點法結果顯示 VP2 蛋白量含量 B4> C2> C4，另各個疫苗株之兔子抗血清針對 47 株病毒株(10 種亞基因型)之抗體交叉中和反應比例高低順序為 B4> C2> C4。

關鍵字：腸病毒 71 型、疫苗候選株、免疫抗原性、

抗體中和交叉試驗、動物試驗

英文摘要

Since the 1998 outbreak, enterovirus 71 (EV71) infections in Taiwan have occurred in 3 year cycles and show no sign of abatement, primarily targeting infants and children with compromised immune systems. As such, the WHO has identified it as an emerging infectious disease in the Far East. While most adults infected with EV71 are asymptomatic, children under 5 years of age are susceptible to complications such as brain stem encephalitis, aseptic meningitis, and neurogenic pulmonary edema. Therefore, in order to prevent future EV71 epidemics, the development of an inactivated EV71 vaccine is essential to safeguarding the well-being of all citizens in Taiwan.

Following the results of project performed by vaccine center at 2014, we continuously selected enterovirus 71 virus strains (not including B4, C4) which caused severe cases in Taiwan from 2005-2013 and set up a virus bank of total 11 viruses from B5, C2 and C5 subgenotypes. According to the following criteria 1. TCID₅₀ and CPE of virus; 2. The content and type of Antigen by ELISA and Western blotting; 3. Antibody response against 26 viruses in mice; 4. Antibody response against 47 viruses in rabbits, we selected C2-E98-07 as a vaccine candidate strain. Two years results concluded that C2 subgenotype virus will be the new target for development new 71 type vaccine in the future.

We also established the optimal condition of scale up model for C2-E12-20 vaccine candidate strain selected by vaccine center at 2014. In Comparison with immunogenicity and Vp2 antigen content of B4, and C4, and C2 three strains

vaccine candidate strains selected by vaccine center , the results show that the order of VP2 protein content measured by Western blotting is B4 > C2 > C4 . According to the results of cross neutralization titer over 40 against 47 EV virus strains (10 subgenotypes) of each prototype vaccine, the order is B4 > C2 > C4.

Keywords: EV 71 subgenotypes, Virus bank, Vaccine candidate,

Immunogenicity, Cross-neutralization test, Animal test

前言

美國疾病管制與預防中心指出 2012 年全球 5 大傳染病威脅之一便是腸病毒 71 型，文中認為此病毒將會持續在東南亞國家威脅數十萬幼童性命與健康【1】。依據傳染病統計暨監視年報台灣自民國八十八年開始監控腸病毒疫情至一百零一年底為止共有 1796 例重症病患，腸病毒 71 型佔了 1123 例(62.5%)。其中被感染者大都集中於身體抵抗力較弱之四歲以下嬰幼兒族群【2】。然而目前並無有效抑制腸病毒藥物上市，現行治療方式多給予支持性療法【3、4】。近幾年由於防疫機關對於腸病毒的重視，加上醫界多年宣導，使得幼童因腸病毒重症致死率下降，但在流行期對於家中有小孩的民眾，仍造成恐慌與壓力，影響社會安定。基於保障國人健康、生命及免除疾病威脅，為能有效控制疫情的發生，降低醫療成本與健保負擔，持續對於腸病毒 71 型疫苗之研究與發展是件刻不容緩的事，也是本署應負之職責。

腸病毒 71 型疫苗目前開發情形，以中國大陸位居領先的地位，本國與新加坡緊追在後【5】。由本署技轉國家衛生研究院新開發之 B4 genogroup 腸病毒 71 型疫苗已完成第一期臨床【6】，2014 年 2 月腸病毒 71 型疫苗第二期臨床試驗，正式通過 IRB 審查，在同年 6 月由國光生物科技公司與基亞疫苗科技股份有限公司啟動二期臨床試驗計畫，現都已完成受試者血清收集，正進行檢測與資料彙整中。另外清華大學、生物技術開發中心和台灣大學共同合作開發出 C2 genogroup 之腸病毒 71 型類病毒顆粒(VLP)疫苗，已可利用生物反應器量產至 20 L，其疫苗純度可達 92% 以上。並經獼

猴免疫實驗證明，獼猴可經由施打 EV71 類病毒顆粒產生高抗體效價及中和效價，能產生細胞免疫反應及免疫記憶反應，其誘發之抗血清對病毒的中和能力與去活化 EV71 病毒誘發的抗血清能力相當【7】。中國大陸則以 C4 genogroup 作為疫苗株來開發疫苗，並於 2013 年完成第三期臨床試驗，經評估 6 到 35 個月的孩童藉由 2-3 劑的疫苗注射後血清中平均中和效價可達 1:16 有效性為 20%【8】，目前則持續進行腸病毒 71 型與柯沙奇病毒 A16 的雙價疫苗開發，經動物實驗已知此兩病毒不會互相干擾免疫反應【9】。另外新加坡也積極開發以利用桿狀病毒為載體於昆蟲細胞內生產重組腸病毒 71 型類病毒顆粒(VLP)疫苗以及 B2 genogroup 腸病毒 71 型疫苗【10、11】。馬來西亞也開始針對重組腸病毒 71 型外鞘蛋白 VP1 作為免疫抗原可行性的相關試驗【12】。綜上，目前仍普遍認為以完整活病毒不活化後製成之不活化疫苗其免疫效價較受肯定【13、14】。

腸病毒 71 型根據其外鞘蛋白 VP1 核酸序列分為 A、B、C 三個基因型，基因型 B 和 C 可進一步各分出數個亞基因型(B0、B1、B2、B3、B4、B5、C1、C2、C3、C4、C5)，其中又可把 C4 (C4a、C4b)和 B5 (B5a、B5b 和 B5c)再做細分。基因型 B 主要分布於東南亞地區如馬來西亞與新加坡等，而基因型 C 則主要分布於中國、越南等地【15、16、17】。近期持續於印度發現基因型 D 和從非洲病人檢體分離出的基因型 E 與 F【18】。台灣與東南亞及中國因貿易來往和旅遊而頻繁的交流，造成人群移動迅速，容易在潛伏期時將它地病毒帶入。依據 1960 到 2011 年西太平洋各國腸病毒 71 型流行之亞型分析，台灣在 1998 年首次爆發嚴重流行的基因亞型為 C2、

1999~2003 年腸病毒 71 型主要流行的基因亞型為 B4 (與馬來西亞、新加坡相近)、2004~2005 年流行的基因亞型 C4 (源自中國大陸)，之後由 2007~2009 年流行的基因亞型又轉變為 B5 (與馬來西亞、新加坡相近)，2010 年流行的基因亞型為 C4，2011~2012 年流行的基因亞型又變回 B5，其中又出現可能源自越南的新基因型 C5 和 C2-like，由此可見台灣流行之病毒株會受到周邊各國影響而導致多次轉變，且每次基因型的轉變皆造成腸病毒的大流行【19、20】，若再加上潛在未被發現的野生型病毒株仍是一大隱憂。

綜合上述，如何選定疫苗候選株極為重要。國家衛生研究院 Huang Mei-Liang 博士等人以感染腸病毒 71 型病患的血清，和基因型 A、B1~B5 與 C1~C5 進行試驗，結果顯示，感染 B4 或 B5 病童之血清對 B genogroup 病毒的抗體效價較 C genogroup 或 A 病毒至少有高於四倍的差異【21】，成功大學王貞仁教授、日本 Mizuta 博士和中國 Zhang Huafei 等人的研究也與此結果相似【22、23】。而依據最新國衛院所發表腸病毒 71 型一期臨床試驗中疫苗受試者血清對不同 genogroup 之交叉中和試驗結果，免疫 2 劑 EV71 B4 疫苗後受試者血清中的中和抗體對於 C2 和 C4b genogroup 病毒中和效價小於 1：8【24】，也呼應本中心 103 年科技計畫發現小鼠其免疫血清在不同亞基因型病毒交叉反應之結果，亞基因型 B 的血清對於部分亞基因型 C 的病毒中和效果較差。依成功大學王貞仁教授對 B4、B5 和 C2 subgenotype 之 VP1 胺基酸序列分析，發現了可能影響不同基因亞型間抗原決定位差異的重要變異點。以上分析結果足以顯示當有新腸病毒 71 型流行

時，單一病毒株的中和抗體，可能無法完全交叉中和其他基因型病毒株。而且在 2012 年柬埔寨爆發腸病毒 71 型疫情時更首度發現有 7 歲及 61 歲的重症病患，無獨有偶台灣也於 2013 年出現首例 34 歲成人因腸病毒 71 型而導致之重症病患。中國也針對腸病毒 71 型和柯沙奇病毒 A16 嚴重發生的區域進行病毒基因分析，發現兩種病毒有部分基因發生重組互換【25】。上述發現是否顯示病毒致病性提高，或是病毒抗原性有重大改變，加上目前仍沒有明顯證據顯示那類基因亞型容易導致重症發生，若只仰賴單一型別疫苗株，可能會導致注射疫苗後仍再次受到病毒感染之情事發生，所幸每個亞型轉換造成爆發前都有腸病毒 71 型次要亞型的存在，因此持續監控腸病毒 71 型基因型變化，並建立完善之腸病毒疫苗株篩選平台，能在亞型轉換造成爆發前及時更換疫苗株，使疫苗保護效力達到最高。

本計畫主要目的將進一步建立更完備之腸病毒 71 型疫苗株篩選平台，並以本中心 103 年所篩選出之 B5、C2、C2-like 和 C5 做為基準，繼續挑選具有潛力之病毒株，評估未來可用來更換為疫苗株之候選株，並以動物模式建立出病毒株交叉中和保護效力之對照平台及進一步篩選出標準病毒株，作為未來疫苗株的比較篩選與疫苗產品效價檢驗的基準。另外由本中心所測試之市售腸病毒 71 型檢驗抗體之結果進一步優化現行疫苗檢驗方式，加速腸病毒 71 型疫苗審查上市。同時培訓本局血清疫苗研製中心人員的專業技能，支援疫苗工業之永續發展及提升國內疫苗產業專業能力，並作為國衛院所建立之疫苗緊急生產線的儲備人力。

材料與方法

一、病毒的馴化增量與病毒庫製作

1. 病毒的馴化增量

選取本局生物材料庫中腸病毒 71 型併發重症之分離株，2011 年 3 株、2012 年 3 株和 2013 年 2 株。每株病毒接種 1 ml 於 150 T-Flask 細胞培養瓶中的 Vero 細胞，於 37°C 含 5% CO₂ 條件培養，持續每天觀察細胞之 CPE (細胞病理現象)，當 CPE 達 80% 以上，即可以 4°C、4000 rpm 離心 30 分鐘去除細胞碎屑，收取病毒液，取 1 ml 進行 TCID₅₀ 定量、1 ml 重複馴化增量 2-3 次至 TCID₅₀ 達到穩定，其於保存於 -80 °C 冷凍庫。

2. 病毒庫製作

於每一代病毒增量馴化後，以 4°C、4000 rpm 離心 30 分鐘去除細胞碎屑，收取病毒液，分裝於冷凍小管，標示好日期、病毒名稱、編號置於冷凍 -80°C 三天，之後移至液態氮桶保存。

二、細胞和病毒的培養

1. 細胞株的培養

Vero 細胞培養在含 5% 胎牛血清之 M199 培養基，溫度 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中。

2. 病毒的培養

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感染 vero 細胞作病毒的繁殖，待細胞達到 CPE 80% 以上，過濾上清液後添加福馬林，置於 37°C 不活化病毒。

3. 黴漿菌的檢測以 Ez-PCR Mycoplasma Test Kit 進行檢測：取 1 ml 待

測樣品以 250 xg 離心去除細胞碎片，再以 5000-2000 xg 離心去除上清液，回溶於 50 μ l Buffer Solution 後以 95°C 加熱 3 分鐘，完成待測養品製備。以聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 將待測樣品放大，以 2% Agarose gel 分析待測樣品、Positive Control 以及 Negative Control，若有黴漿菌污染將會於 270 bp 位置觀察到。

三、病毒之檢驗

1. 病毒的定量-TCID₅₀

將病毒以序列稀釋的方法，接種於 96 well 細胞培養盤中的 vero 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE (細胞病理現象)，並經由結晶紫染色或免疫螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形，以其最高具 50% CPE 的稀釋濃度決定 TCID₅₀ 的效價。

2. 蛋白質濃度之測定

取樣品及 Bovine Serum Albumin 之標準液，至入 96 孔微量盤中，加入 Bicinchoninic acid working reagent 200 μ l，震盪 30 秒，放置於 37°C 作用 30 分鐘，於波長 562nm 測定其吸光值。

3. 蛋白質電泳

純化之樣品以 4—20% 梯度的正十二烷硫酸鈉—聚丙烯醯胺膠體，在電壓 150 伏特之下做電泳分離 90—120 分鐘，之後以銀染色方式分析蛋白質電泳的情況。

4. 西方點墨沾漬法

純化之樣品經過蛋白質電泳後，利用 Semi-phor 半乾式轉移槽，將蛋白質樣品由膠體轉移至硝酸纖維膜上，加入 5% 脫脂奶粉溶液於纖維膜上，震盪 30 分鐘後以 0.1% Tween80/PBS 清洗之後加入經過適當稀釋的腸病毒 71 型單株抗體於纖維膜上，在 37°C 保溫箱中作用 3

小時，以 0.1% Tween80/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。加入適當稀釋之 AP-conjugated goat anti-mouse IgG 抗體，在 37°C 保溫箱中作用 1 小時，以 0.1% Tween80/PBS 清洗三次來清除未結合之抗體。將 BCIP/NBT 溶於 10mL 水中後置於纖維膜上，震盪 5-10 分鐘，待其呈色後以去離子水洗淨纖維膜上，並觀察染色情形。

5. 抗原檢測—酵素連結免疫反應法

黏覆小鼠腸病毒 71 型病毒抗體於 96 孔微量滴定盤上，使用 ELISA 清洗儀，清除未黏覆之抗體，之後加入待測或對照組腸病毒 71 型病毒抗原樣品，放置於 37°C 保溫箱中一小時，再加入腸病毒 71 型單株抗體。最後加入 goat anti-mouse 馬山葵過氧化酵素複合體，放置於 37°C 保溫箱中作用二小時。清洗後，在每孔中加入 100 ml OPD (0-phenylenediamine dihydrochloride) 酵素受質體放置於室溫暗處，呈色反應 20 分鐘，以 ELISA 吸光儀 (Molecular Device, Emax) 讀取波長 450nm 及 650nm 吸收值之差值。

6. 病毒去活化

福馬林溶液以 1:4000 的比例加入純化之病毒液中，至於 37°C 下靜置，進行病毒去活化反應。反應期間，定期取樣檢測 50% Tissue Culture Infection Dose (TCID₅₀) 觀察病毒力價的變化，直至無病毒存活為止。經 3 天後，將去活化病毒混合鋁鹽佐劑，置備免疫用疫苗。

四、病毒株效價的測定

1. 動物免疫之操作

A. 小鼠實驗

取 12-15 克的 ICR 小鼠，於第 1 和 3 週以腹腔免疫老鼠共 2 次，第 4 週以乙醚麻醉致死進行心臟全採血，每次採血後將採收到的

血混合，以 4°C、3000rpm 離心 30 分鐘取上清液，再以 56°C 不活化血清 40 分鐘，保存於-20°C。

B. 兔子實驗

取 2.5 公斤的紐西蘭白兔，第一週先以耳動脈採血 5 ml，在抽血過後於第 1、3、5 和 7 週以肌肉注射免疫共 4 次，於第 1、3、5、7 和 9 週進行耳動脈採血 5-10 ml 直到實驗結束，每次採血後將採到的血混合，以 4°C、3000rpm 離心 30 分鐘取上清液，再以 56°C 不活化血清 30 分鐘，保存於-20°C。

2. 病毒抗體中和試驗

以棋盤交叉法作病毒中和試驗，比較各病毒免疫性的差異。將待測血清檢體系列稀釋，並依序與 100 個 TCID₅₀ 的各株病毒混合。在 37°C 作用 30 分鐘後，接種於 96 well 細胞培養盤中的 vero 細胞，經由 5-7 天的培養，觀察細胞之 CPE 現象，並經由結晶紫染色，或免螢光染色法，來證實細胞受病毒感染的情形。抗體之中和效價以血清在最高稀釋濃度下，仍可抑制病毒感染細胞的倍率來決定。

3. DNA 定序

定序免疫性最強和最弱病毒株的 VP1 蛋白基因，以 DNASTAR 軟體比較會影響中和免疫性表現的氨基酸序列。

結果

一、腸病毒 71 型三種 subgenotypes 馴化與初步篩選：

本計畫挑選台灣由 2005~2013 年來流行或是曾引發重症病例之病毒株(不包含 B4、C4)，依照基因亞型不同分為 B5, C2 及 C5 等 3 種共 14 株，作為新疫苗株篩選候選株之基因型別。各個病毒株經由 Vero 細胞繼代五次，馴化後建立病毒種庫，並觀察 CPE 天數以及 TCID₅₀，作為篩選候選疫苗株第一步。實驗初期使用 TCID₅₀ 作為初步篩選標準，根據表一此三種腸病毒亞型，分別為 B5：E10-358、E12-12、E11-41、E13-05、E10-R3；C2：E98-3H、E08-20、E98-07 及 C5：E06-37、E10-75、E10-66 總共 11 株，其中 C 型之 TCID₅₀ 較高，顯示病毒毒力佳且適應良好，尤其是 C2-E98-07 高達 8.44。

二、病毒原液之檢測與分析：

1. 抗原定量(bicinchoninic acid ,BCA assay 與 ELISA assay)

分別針對 11 株不同型 EV71 候選病毒以 175cm² T flask 小量製備，經離心處理與 0.2μm 濾膜過濾得到病毒液進行分析。其蛋白質定量與去年(103 年)類似，均為 1000 ug/ml 上下，推測主要是因為 2%FBS 有血清培養基的影響使總蛋白質量偏高，比照使用無血清培養基產程定量結果，初過濾病毒原液蛋白質濃度均低於 100 ug/ml，故蛋白質總量無法直接反應總抗原量，須藉由 ELISA 進一步專一性測定 EV71 抗原量。使用腸病毒 B4 免疫之兔子多株抗體固定候選株病毒顆粒，依據去年 MAB979、MAB5639 和 Ah-I4 等三株抗體結果，MAB979 單株抗體仍是辨認腸病毒 VP0 與 VP2 抗原位結果最好，而

11 株疫苗候選株之 ELISA 數值為 0.66 到 10.265 OD/ml (表二)，與 TCID₅₀ 數值沒有明顯相關性，推論 ELISA 與 TCID₅₀ 反映疫苗株不同面向之定量結果，並非 TCID₅₀ 高則 ELISA 也高。將 ELISA 病毒抗原量/蛋白質含量可獲得每 ml 病毒抗原量/蛋白質含量之比值，比值越高表示每單位蛋白質所含的相對抗原量越高(圖一)，作為 11 株病毒間抗原量比較之依據。11 株中，C2-E98-07 TCID₅₀ 高且單位抗原量也最高。

2. 抗原比例分析(Western. Blotting)

已知腸病毒顆粒是由外殼蛋白(capsid)包覆其單股 RNA，外殼蛋白由 VP1、VP2、VP3 與 VP4 四種蛋白質共同組成，VP4 與病毒 RNA 的穩定性有關，而 VP1、VP2 以及 VP3 則是與細胞接受器及抗體結合有關，其中 VP1 是發展疫苗與中和抗體主要作用區域；然而在培養病毒的過程中亦會大量出現 VP2 與 VP4 的前驅蛋白 VP0，VP0 亦會與 VP1、VP3 形成不含 RNA 的空心病毒顆粒。根據本中心與國家衛生研究院研究均顯示空心病毒顆粒的免疫力價低於完整病毒【10】。另依據本中心過去腸病毒 71 型 C4 原型疫苗的量產計畫所得結果與經驗，有病毒抗原生產量過低之情形，若剔除掉無血清生物反應器培養之因素外，也曾建議前期初步篩選病毒株時除考慮病毒毒力外，也應將病毒抗原產生量與抗原比例做為參考。因此有必要藉由西方墨點法進行抗原型式分析，比較各病毒株間是否對於空心病毒顆粒和完整病毒生成的比例間是否有所差異，避免進入試量產時完整病毒比例過低導致產量不佳。用 MAB979 對 VP0 和 VP2 進行

偵測，實驗結果顯示病毒本身所產生之抗原類型比例(中空病毒顆粒 VP0/完整病毒 VP2)均不盡相同，即使是同一基因型也不一致。在 B5 strains 以 E12-12 這株病毒的 VP0 產生比例高於 VP2，而 E14-41 VP2 產生比例則高於 VP0；四株 C5 strains 在 VP0 與 VP2 比例上皆相近，除 E10-75 的 VP0 產生比例略高；C2 strains 的三株 VP0 產生比例高於 VP2(圖二)。將上述資訊與病毒力價及交叉中和比對後，輔助選出適宜用於產程生產的疫苗候選株。

三、測定有血清培養病毒株產生之抗體中和效價

1. 小鼠

首先將 11 株病毒培養液經離心、過濾及去活化後,以原倍進行小鼠腹腔免疫注射，每劑 0.5 ml 注射兩劑，注射時間間隔 14 天。將小鼠安樂死後，進行心臟採血，分離得到抗血清將補體去活化後，凍存於-20°C 備用。以中和試驗檢測 11 株抗血清抗體效價(表三)，26 株病毒以 200 TCID₅₀ 力價進行細胞攻毒。結果顯示中和性抗體效價範圍可從最低的 7.07 到最高的 7000 以上。B5-E12-12 及 C2-E98-07 抗血清對於 B5 病毒株皆能產生高保護效價，也可中和不同基因型病毒株，而 B5(E13-05 及 E10-R3)、C2 (E98-3H、E08-20 及 E98-07)、C5 (E10-66)抗血清雖然無法對本身基因型來源之病毒株有好的中和效價，但對其他不同型病毒株有良好中和效價。這樣結果可能原因也許是檢測方式不同造成誤差、齧齒類小鼠與靈長類不同動物品種差異關係或是病毒之前處理以化學藥劑如福馬林進行去活化時，破壞了抗原使抗原性降低，使中和試驗不如預期。進一步探討 11 株病毒

抗血清(三種 subgenogroup)對 26 株病毒之抗體交叉中和百分比，其中 B5 subgenotype (E10-358、E12-12、E11-41、E13-05 及 E10-R3)交叉中和百分比均介於 46%~53.85%；C2 subgenotype (E98-3H、E08-20 及 E98-07)交叉中和百分比介於 46%~53.85%；C5 subgenotype (E06-37、E10-75 及 E10-66)交叉中和百分比介於 53%~57% (標準判定以中和效價達 40 以上)。綜合上述結果可初步得知三種 subgenotypes 病毒株皆有 46%以上之交叉中和涵蓋率，整體而言 11 株抗血清對於 B4、B5、C2、C4、C5 等病毒皆具備不錯之中和抗體效價，但對 A、B1 和 C2like 等病毒的中和效價則無或偏低，因此在後續動物試驗挑選準則是以交叉中和百分率涵蓋率達 5 成以上病毒株為主，故自三種基因亞型(B5、C2 及 C5)中各挑出一株病毒株 B5-E12-12、C2- E98-07 及 C5- E10-66 進行家兔試驗。

2. 兔子實驗

自小鼠試驗中挑選出三株較具潛力疫苗候選株 B5- E12-12、C2- E98-07 及 C5-E10-66 進行兔子試驗，首先將病毒培養液經離心、過濾及去活化後，以原倍進行肌肉免疫注射，每劑 1 ml 注射兩劑，注射時間間隔 14 天。從兔子耳動脈採血，分離得到抗血清將補體去活化後，凍存於-20 °C 備用。表四結果顯示針對本身病毒，B5-E12-122 所產生之抗體反應最佳，C5-E10-66 則最差。接著選取 3 株兔子第 6 和 7 週之抗血清，針對 47 株病毒株(10 種 subgenotypes)進行抗體交叉中和效價試驗，表五結果顯示三株病毒株 B5-E12-12、C2-E98-07 及 C5 E10-66 抗血清在 47 株之不同病毒株抗體交叉中和比例分別可達 36%、40%及 26%，其中 B5-E12-12-及 C5-E10-66 疫苗株產生之

抗體對於 B4、B5、C2、C4 及 C5 等亞型某些病毒皆能有效中和，但在對 CA16 病毒上卻只有 C2-E98-07 及 C5-E10-66 具有保護性。整體結果來看 C2-E98-07 之交叉免疫反應較寬廣，故較適合當作疫苗候選株亦可當作不同亞型免疫血清中和試驗之標準品。

四、C2 疫苗候選株(E12-20)無血清滾動培養瓶之試製並與 B4 和 C4 疫苗候選株互相比較

1. C2 疫苗候選株培養條件最適化

現行腸病毒疫苗製程為無血清培養基搭配滾動培養瓶系統進行大量生產，因此篩選出之疫苗候選株仍需進行試製，並進一步探討最佳化的生產培養基。由於先前已實驗證明以 VP-SFM 無血清培養基進行細胞培養效果較佳，因此細胞培養階段仍使用 VP-SFM。細胞依序馴化，當細胞覆蓋面積達 8 到 9 分滿時進行攻毒，攻毒時將細胞以 PBS 緩衝液清洗後加入含有 M.O.I (multiplicity of infection) 10^3 病毒量的培養基，並記錄觀察分析。綜合分析表六、圖三與圖四，含有 FBS 的 M199 培養基所增殖出的病毒在病毒力價($\log 10^{7.13}$)與 VP2 的比例上均為最高，抗原品質佳。VP-SFM、SFM4Mega 和 Plusvero 三種培養基在 VP2 的比例上相近，僅次於含 FBS 的 M199，但 SFM4Mega 有較高的病毒力價($\log 10^{7.0}$)和高 ELISA 讀值，然而收穫時間則長達 6 天。provero 培養基雖然可使收穫時間提前，但在 ELISA 讀值和病毒力價上明顯偏低($\log 10^{6.5}$)，以西方墨點法來看顯然 VP2 比例也較低，整體來說也較差。雖然目前 B4 疫苗的生產培養基是 VP-SFM，但是不同的疫苗株可能對培養基成分有不同需求，

進而產生不一樣的影響，所以本次以去年(103 年)篩選出之 C2 疫苗候選株(E12-20)來測試不同培養基對抗原生產的影響，發現 SFM4Mega 在病毒力價上略優於 VP-SFM，更適合抗原生產。

2. 無血清培養基(VP-SFM)搭配滾動培養瓶系統下 3 株疫苗候選株之比較

比較 C2 疫苗候選株(E12-20)在無血清培養基(VP-SFM)搭配滾動培養瓶系統進行培養時與 B4、C4 疫苗株的差異，並探討接種 M.O.I (multiplicity of infection) 10^{-3} 病毒量時，C2 疫苗候選株在培養過程中的變化。B4、C2 和 C4 三株從攻毒到收穫抗原量(ELISA，圖五)的變化與病毒產生(TCID₅₀，圖六)均表現一致性；抗原量的增加一直持續到第五天(收穫)，病毒產生以第四天達到最高峰，第五天呈現些微掉落。顯示隨著培養天數增加，病毒於第三天到第四天開始被大量釋放，直到第五天仍有少量的抗原被釋出，所以抗原量些微增加。但病毒被大量釋放後，細胞也大量死亡，病毒找不到新宿主無法繼續增殖，部分病毒可能因穩定性不佳而裂解，使得第五天病毒量減少 TCID₅₀ 也顯示下降。另將三株疫苗株經 0.22 μ m 濾膜過濾後以蛋白液相層析儀(FPLC)搭配 XK 16/100 管柱(充填 Superose 6 膠體)進行純化，純化後樣品以專一性抗體偵測 VP2 蛋白。由西方墨點法結果(圖七)顯示 VP2 蛋白量 B4 > C2 > C4，這結果與圖五 ELISA 所測量到三株疫苗株在第五天的抗原量之相對比例是一致的，顯示三株疫苗株中 B4 抗原產量最高，C4 最低。

3. 3 株疫苗候選株抗體中和效價之比較

三株疫苗株(B4-E59、C4-E36 及 C2-E12-20)利用無血清培養基及滾動培養瓶進行培養，經分子篩純化後獲得之抗原以福馬林去活化處理得到原型疫苗進行家兔免疫試驗，比較三株疫苗株之免疫原性。實驗以原液進行肌肉免疫注射(1 ml/dose,共免疫兩次，分別為第 0 週、第 3 週)，於第 0 週、3 週、4 週、5 週及 6 週各進行一次採血，血清處理後檢測抗體效價。由表七可知 3 株疫苗株第 1 次免疫之後即可產生抗體反應，B4 疫苗株特別好抗血清效價可達 1:2515，C2 次之(1:412)，而 C4 疫苗株抗血清免疫反應則較弱只有 1:20，但經過第二次免疫後 C4 中和效價即可達 100 以上，顯示 C4 疫苗株仍是不錯的免疫原。

接著將 3 株無血清腸病毒 71 型疫苗候選株兔子抗血清針對 47 株病毒株(10 種 subgenotypes)進行抗體交叉中和實驗，結果顯示(表八)各個疫苗株交叉中和比例 B4-E59 佔 40%、C4-E36 佔 34%及 C2-E12-20 則為 34%，所以 B4-E59 抗血清有較高交叉中和效價。

討論

本計畫主要是使本中心已建立之腸病毒 71 型疫苗相關種庫與疫苗株效價之開發與檢測平台更為完備，並持續針對現行已建立之腸病毒 71 型疫苗開發技術不足處，進行補強與改善，冀望能確立篩選系統，增加往後新疫苗株量產之成功性，從而降低時間與成本。

延續 103 年計畫結果，從 B5、C2、C2-like 和 C5 四型等共 15 株病毒中篩選 E12-20 (C2)作為疫苗候選株，本中心繼續建立 B5、C2 和 C5 三型之病毒株種庫，除了利用 TCID₅₀、ELISA 抗原含量測定和西方墨點法測定抗原型式等當做篩選條件外，這次利用更多的病毒株(小鼠實驗 26 株：兔子實驗 47 株)來進行中和效價之有效性與寬廣性比較，11 株病毒小鼠抗血清之交叉中和比例大約是 46-57%之間，可是對 A、B1 和 C2 like 等病毒的中和效價則無或偏低，和去年中心研發結果類似。

本署研檢中心透過實驗動物與感染者之血清和不同年代的不同基因型別的腸病毒七十一型病毒進行病毒血清中和試驗，得知免疫血清對不同基因型別腸病毒七十一型皆具有相同的保護力，因此腸病毒七十一型的基因型雖然有所不同，但只要免疫過後對不同的基因型仍具有保護作用【26】，所以我們考量動物種類產生之抗體特性也會不同，所以依據 1. TCID₅₀ 和 CPE 挑選容易培養與增殖的病毒；2. 以 ELISA 與西方墨點法分析找出高抗原量的類型；3. 小鼠試驗選出高免疫反應與中和效價寬廣的病毒等 3 個條件，每一種亞基因型選出一株(B5-E12-12、C5-E10-66、C2-E98-07)進行兔子試驗，B5-E12-12、C5-E10-66、C2-E98-07 其血清抗體交叉中和比例分別為

36%、26%、40%，如果扣除克沙奇和 A 亞型病毒，其比列分別為 40%、29%、43%，此結果亦顯示抗原含量愈高(表二所示)所產生之免疫抗體效果愈好也愈廣。雖然 B5-E12-12 和 C2-E98-07 兩株之抗體中和比例相近，但 C2-E98-07 亦能中和 1 株克沙其病毒且具高中和效價，所以根據 103 和 104 年的抗體交叉中和效價結果顯示 C2 將是篩選疫苗株的下一個重要目標。

另外根據本署病毒性感染症合約實驗室監測資料顯示，克沙奇 A6 型腸病毒曾經於 2009、2010 以及 2013 年於臺灣發生過大規模的流行，且於 2014 年年底出現一小波流行並延續至 2015 年【27】，2015 年第 29 - 30 週日本腸病毒疫情上升，已由西部擴散至東部，病毒型別以 CA16 為主，所以下次篩選疫苗株時將會將不同型別克沙奇病毒列入攻毒病毒之一，藉此評估疫苗候選株之優劣。

根據 B4 與 C4 疫苗量產實驗發現，病毒抗原生產量會隨著無血清培養系統及生物反應器的使用而下降，也可能容易使病毒產生較多低免疫原性的中空病毒顆粒，導致低產量低免疫原性，但是若能於疫苗株篩選初期多增加病毒生成量與抗原型式兩種考慮因素，更能使未來量產效率與成功率大幅提升。所以此次將 103 年本中心篩選出之疫苗株進行量產條件最適化，並評估量產可行性，最終以相同條件(VP-SFM 無血清培養基)試量產 B4、C4、C2 三株疫苗株，並比較其優劣。其結果證實 VP2 蛋白量(B4> C2> C4)，完整性病毒量愈高，其相對抗原產量也最高。至於抗體中和效價高與交叉中和寬廣性，雖然其優劣順序仍為 B4> C2> C4，但有時與施打時抗原含量多寡有關，由於三株疫苗株免疫前並未經定量調整抗原量到一致，因此 C4

疫苗株抗血清免疫反應較其他 2 株弱之原因，有部分為抗原量的不同所導致，另外 C2 並非在 FM4Mega 無血清培養基培養，所以有可能也是 VP2 和抗原含量比 B4 稍差之原因，後續有機會將改善相關問題，進行再評估。

本中心建立之腸病毒種庫，為了增加其附加價值，未來有機會可尋找與國內廠商合作，針對目前新研發腸病毒 71 型疫苗臨床試驗所得之血清樣本，進行血清抗體對抗不同基因型病毒之中和效價評估，做為本署未來採購腸病毒 71 型疫苗之參考依據。

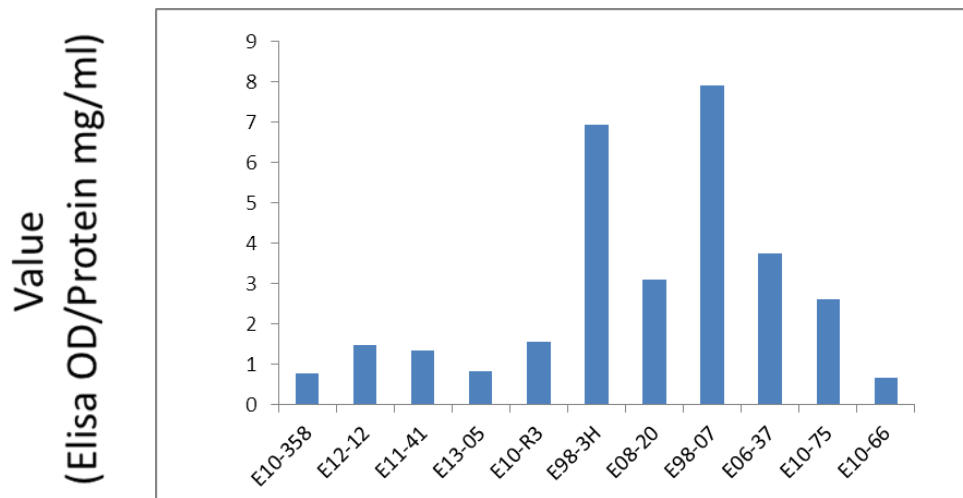
圖表

表一、腸病毒 71 型 3 種 subgenotype 11 株病毒經 2 到 5 代馴化後 CPE
與 TCID₅₀ 變化

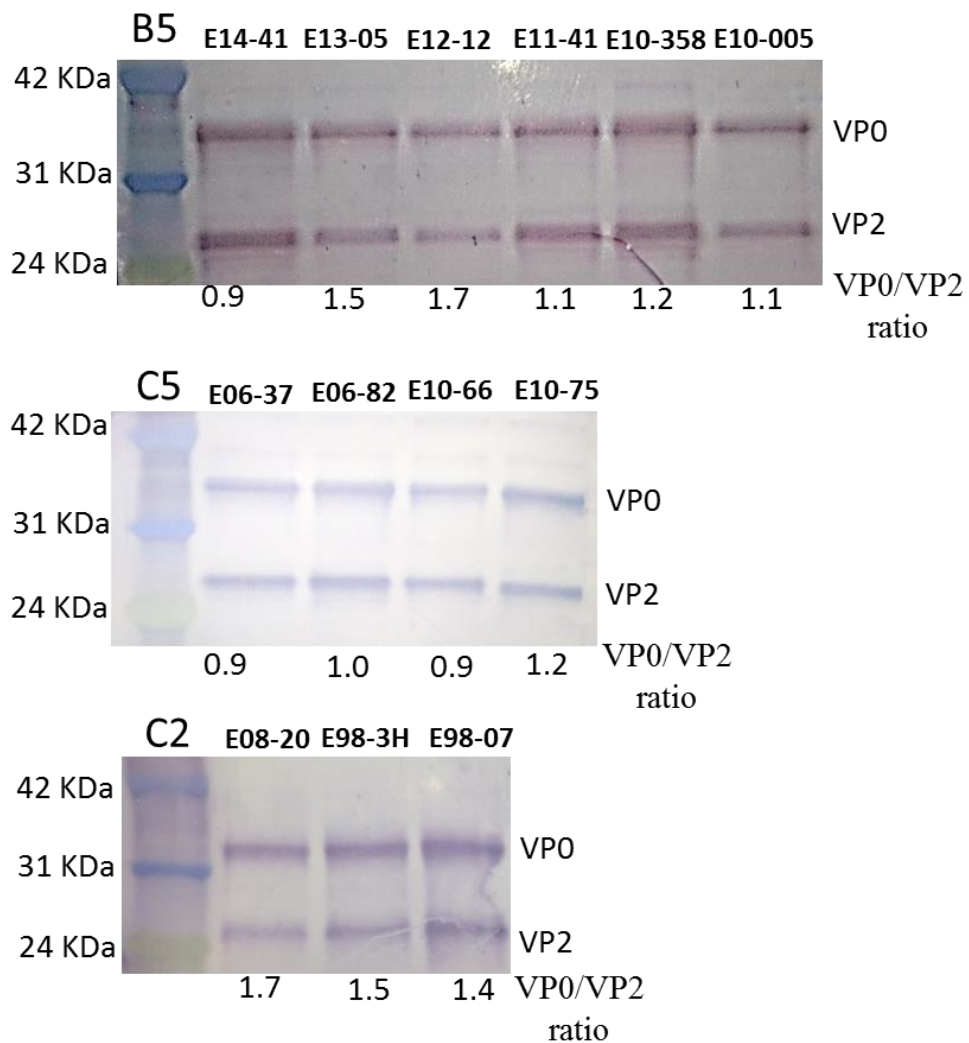
number of passages	V2		V3		V4		V5	
	CPE/ day	TCID₅₀	CPE/ day	TCID₅₀	CPE/ day	TCID₅₀	CPE/ day	TCID₅₀
B5								
E10-358	5	4.5	5	5.14	5	5.31	3	6.5
E12-12	5	3.66	5	3.84	5	5.3	4	6.13
E11-41	5	4.5	5	4.66	5	4.84	4	6.66
E13-05	6	3.5	6	3.66	6	5.13	5	5.19
E10-R3	6	4.3	6	5.3	5	5.36	5	5.4
C2								
E98-3H	5	7	5	7.13	5	7.3	5	7.5
E08-20	5	3.88	5	4.7	5	4.7	4	4.91
E98-07	5	5.14	5	5.84	5	7	5	8.44
C5								
E06-37	4	5.7	4	6	3	6.1	4	7.3
E10-75	5	5.5	3	5	4	6.5	3	7.3
E10-66	5	5.8	3	7.3	2	7.4	2	7.3

表二、11 株腸病毒 71 型疫苗候選株病毒原液蛋白質和抗原數值

Subgenotypes		Protein (ug/ml)	ELISA (OD/ml)
B5	E10-358	962	0.734
	E12-12	1236	1.807
	E11-41	904	1.196
	E13-05	1208	0.979
	E10-R3	1250	1.955
C2	E98-3H	1182	8.189
	E08-20	1375	4.247
	E98-07	1300	10.265
	E06-37	1055	3.96
C5	E10-75	1040	2.715
	E10-66	1018	0.667



圖一、11株腸病毒71型疫苗候選株病毒原液每單位蛋白質所含的相對抗原量



圖二、利用 Western blot 分析 13 株 EV71 病毒株培養原液 VP0 與 VP2 之比例

表三、11 株腸病毒 71 型病毒株之小鼠抗血清針對 26 株病毒株(10 種 subgenotypes)之抗體交叉中和反應

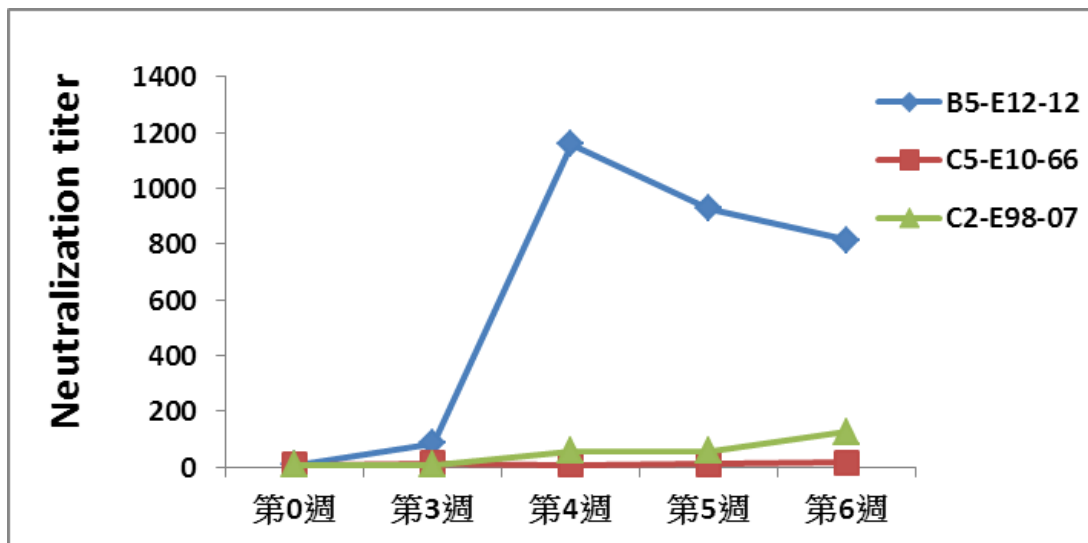
候選株抗血清/ 攻毒用病毒株	E10-358	E12-12	E11-41	E13-05	E10-R3	E98-3H	E08-20	E98-07	E06-37	E10-75	E10-66
1 A-BrCr	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
2 B1-E43	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
3 B4-E59	1259	750	546	492	1413	3508	754	224	7031	1331	501
4 B4-E43	531	173	122	224	492	457	247	266	372	407	262
5 B4-E63	224	79	206	203	776	246	492	98	157	145	407
6 B5-36	1178	700	822	1108	2512	881	546	381	794	80	257
7 B5-R3	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
8 B5-58	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
9 B5-E12	3219	1660	692	79433	39811	912	19953	7561	7413	262	273
10 B5-E41	7.07	832	646	2512	3831	447	1920	1366	931	126	122
11 C2-E20	141	224	136	222	316	525	346	242	931	288	330
12 C2-E59	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
13 C2-E15	40	52	7.07	56	224	141	72	158	73	63	72
14 C2-E41	1259	1380	6310	14360	1479	5220	10000	1479	3541	537	1259
15 C2-E3H	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
16 C2 like-01	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	708	3236
17 C2 like-49	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
18 C4-E36	7.07	50	7.07	25	53	162	22	35	49	58	71
19 C4-E49	56	43	43	56	101	323	40	20	195	94	72

20 C5-E37	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
21 C5-E75	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
22 C5-E66	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
23 C5-E92	4000	4500	5000	59	84	7244	79	73	4786	4358	4927
24 C5-E04	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07	7.07
25 C4-E00	46	33.5	46	13946	672	240	10000	6813	195	149	243
26 C2-E07	112.2	112.2	188.36	142.88	223.87	416.86	56.23	56.23	158	128.82	56

註:血清標準品 358/R2 中和效價為 46

表四、血清培養之 3 株腸病毒 71 型疫苗候選株於家兔免疫後抗體力價反應

週/ 候選病毒株	第 0 週	第 3 週	第 4 週	第 5 週	第 6 週
B5-E12-12	7.07	86.35	1158.95	926.5	815.5
C5-E10-66	7.07	12.655	7.855	11	17
C2-E98-07	7.07	7.07	57.595	57.35	126.5



表五、血清培養 3 株腸病毒 71 型疫苗候選株之兔子抗血清針對 47 株病毒株(10 種 subgenotypes)之抗體交叉中和反應

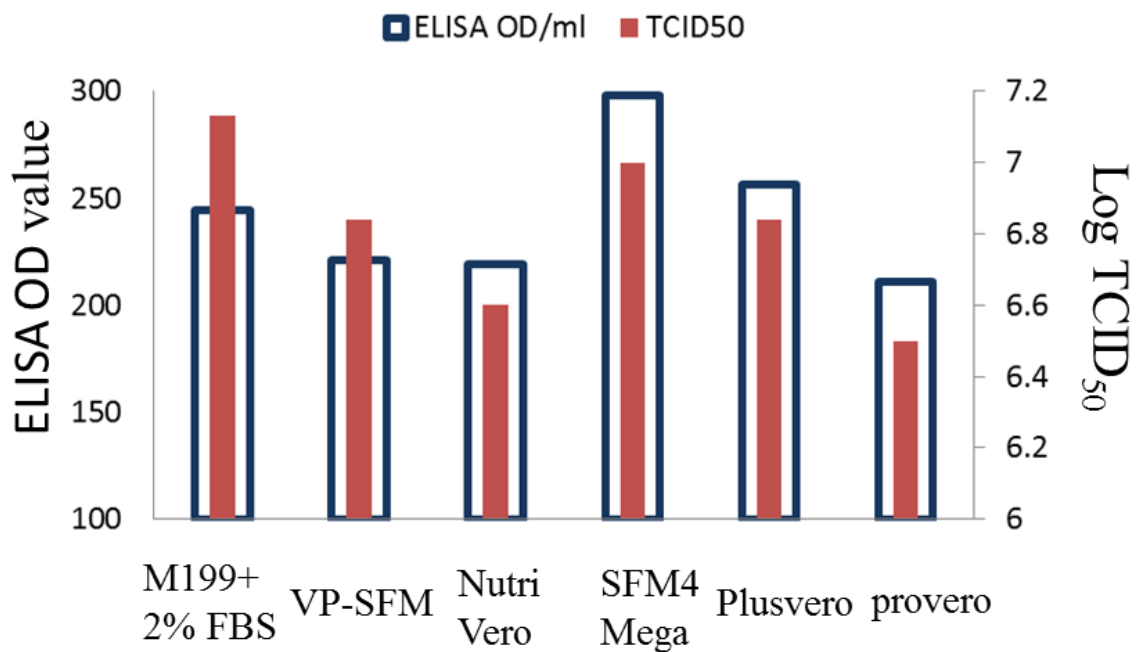
病毒株抗血清/ 攻毒用病毒株	E12-12	E10-66	E98-07
1 A-BrCr	7.07	7.07	7.07
2 B1-E43	7.07	7.07	7.07
3 B4-E59	3297	225	87
4 B4E43	40	21	109
5 B4-E63	47	48	25
6 B4-E17	10000	20000	3801
7 B4-E22	1328	31	1400
8 B5-58	7.07	7.07	7.07
9 B5-R2	7.07	7.07	7.07
10 B5-E12	20000	10000	15000
11 B5-E41	694	2944	7079
12 B5-E05	7.07	12	14
13 C2-E20	56.23	8	128
14 C2-E59	79	10	10
15 C2-E15	12	10	59
16 C2-E41	13183	1400	7174
17 C2-E3H	158	89	8
18 C2-E20	7.07	7.07	7.07
19 C2-E07	30	7.07	112
20 C2like-E01	35	8	8
21 C2like-E49	7.07	10	8
22 C4-E36	28	24	10
23 C4-E49	25	8	386
24 C4-E16	44	22	965
25 C4-E76	7.07	7.07	7.07
26 C4-E51	133	67	56
27 C4-E24	30	7.07	29
28 C4-E80	7.07	7.07	7.07
29 C4-E79	7.07	7.07	7.07
30 C4-E24	7.07	7.07	7.07
31 C5-E37	7.07	14.32	10

32	C5-E75	7.07	10	8.41
33	C5-E66	7.07	7.07	7.07
34	C5-E92	3981	2512	883
35	C5-E04	7.07	7.07	7.07
36	C5-E69	7.07	7.07	7.07
37	C5-E75	663	492	447
38	C5-E81	25	18	224
39	C5-E82	170	79	1000
40	CA16-25	7.07	7.07	7.07
41	CA16-69	7.07	7.07	7.07
42	CA16-97	11	112	138
43	CA16-21	7.07	7.07	7.07
44	C4a-2- 96	7.07	7.07	7.07
45	C4a-2- 67	7.07	7.07	7.07
46	C4a-2-17	7.07	7.07	7.07
47	C4-E00	1972	2512	12504

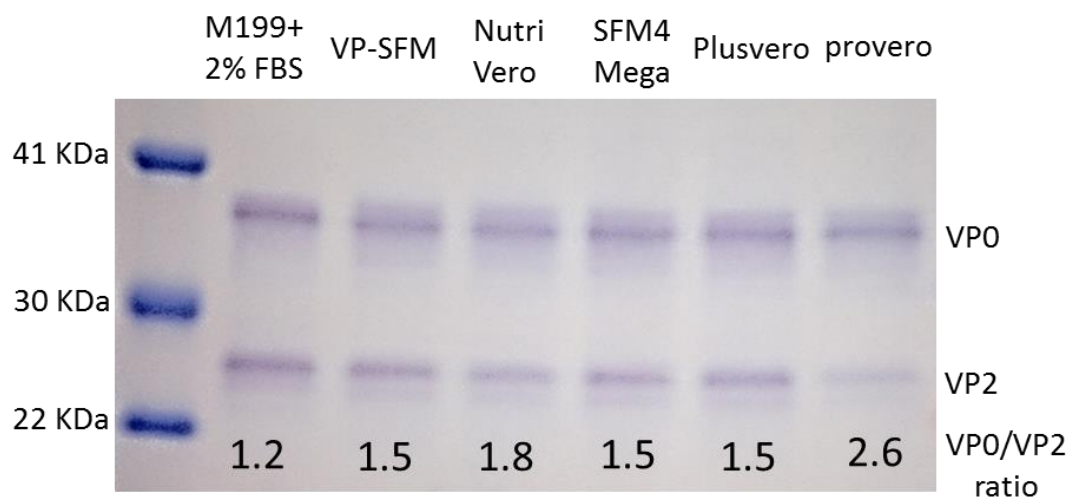
註:血清標準品 358/R2 中和效價為 46

表六、不同培養基搭配滾動培養瓶對 C2 疫苗候選株(E12-20)收穫天數的影響

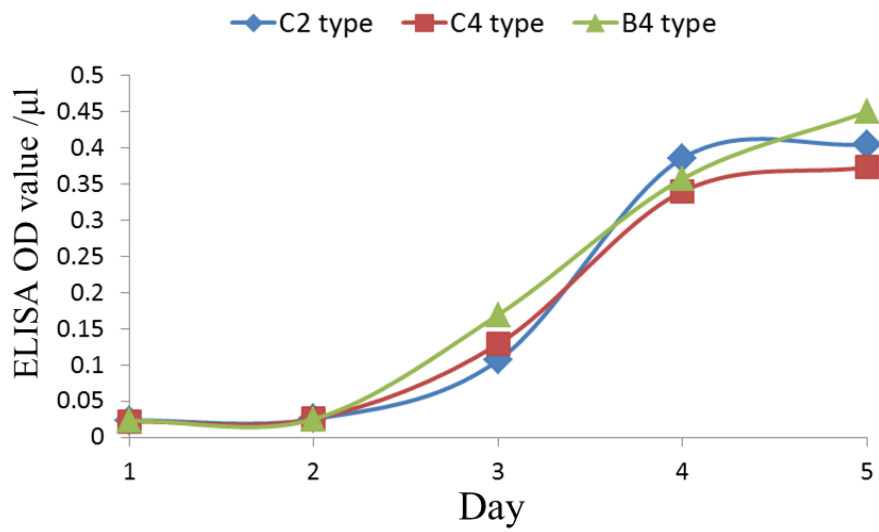
收穫天數	無血清培養基					
	M199+2 %FBS	vp-sfm	NutriVero	SFM4Mega	Plusvero	provero
	5	5	5	6	6	4



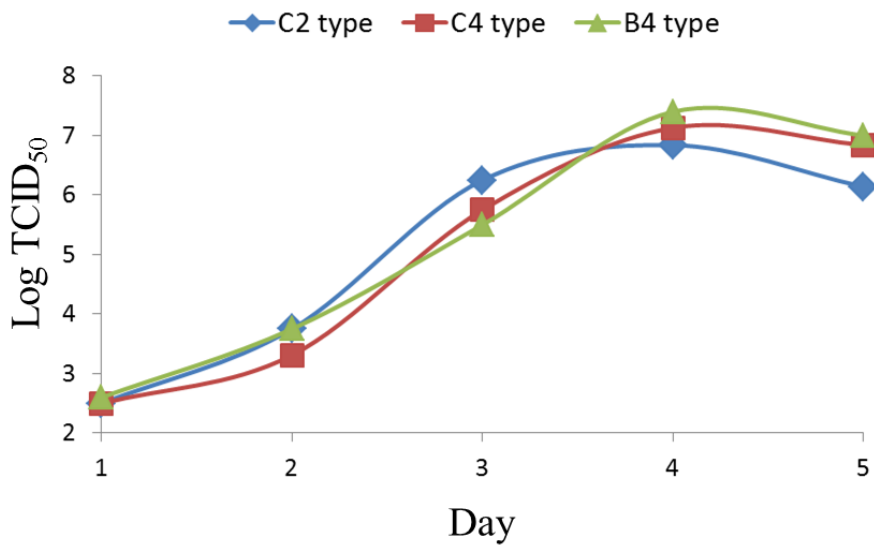
圖三、不同培養基搭配滾動培養瓶對 C2 疫苗候選株(E12-20)在病毒力價(TCID₅₀) 和抗原量(ELISA)的影響



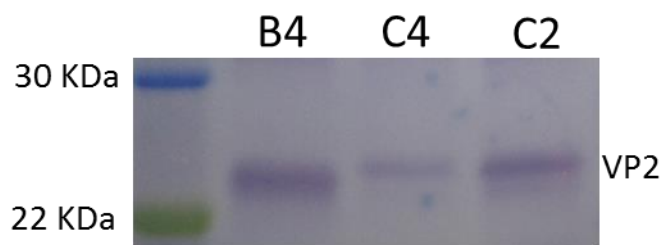
圖四、不同培養基搭配滾動培養瓶對 C2 疫苗候選株(E12-20) 產生之 VP0 與 VP2 比例上的差異。



圖五、從攻毒到收穫三株疫苗株的抗原量變化



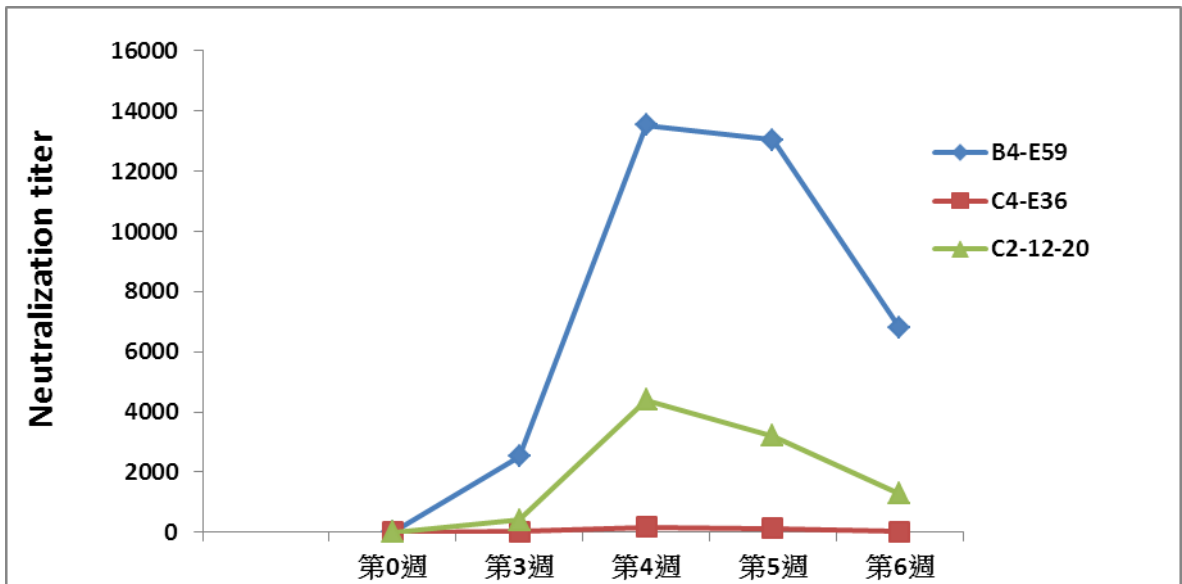
圖六、從攻毒到收穫三株疫苗株的 TCID₅₀ 變化



圖七、以西方墨點法偵測三株疫苗株經膠體純化後 VP2 蛋白含量

表七、3株無血清培養之腸病毒71型疫苗株於家兔免疫後
抗血清力價反應

週/ 候選病毒株	第0週	第3週	第4週	第5週	第6週
B4-E59	7.07	2515	13534	13037	6787.5
C4-E36	7.07	20	166	135.5	18.5
C2-E12-20	7.07	412	4406.5	3194	1273.5



表八、3株無血清腸病毒71型疫苗候選株之兔子抗血清針對47株病毒株

(10種 subgenotype)抗體交叉中和反應

病毒株抗血清/ 攻毒用病毒株	E59	E36	E12-20
1 A-BrCr	7.07	7.07	7.07
2 B1-E43	7.07	7.07	7.07
3 B4-E59	1760	7779	6310
4 B4-E43	240	62	12
5 B4-E63	224	40	8
6 B4-E17	10000	39811	79433
7 B4-E22	447	550	3548
8 B5-58	7.07	7.07	8
9 B5-R2	7.07	7.07	7.07
10 B5-E12	923	1023	4217
11 B5-E41	2010	2512	13276
12 B5-E05	7.07	7.07	7.07
13 C2-E20	146	43	2512
14 C2-E59	7.07	7.07	8
15 C2-E15	69	26	25
16 C2-E41	700	3739	10000
17 C2-E3H	8	7.07	7.07
18 C2-E20	7.07	7.07	7.07
19 C2-E07	7.07	7.07	49
20 C2like-01	7.07	7.07	7.07
21 C2like-49	7.07	7.07	7.07
22 C4-E36	268	35	20
23 C4-E49	52	15	240
24 C4-E16	86	40	1660
25 C4-E76	7.07	7.07	7.07
26 C4-E51	510	146	3347
27 C4-E24	74	40	87
28 C4-E80	7.07	7.07	7.07
29 C4-E79	7.07	7.07	7.07
30 C4-E24	7.07	7.07	7.07

31	C5-E37	7.07	7.07	7.07
32	C5-E75	7.07	7.07	7.07
33	C5-E66	7.07	7.07	7.07
34	C5-E92	5012	5888	501
35	C5-E04	7.07	7.07	7.07
36	C5-E69	7.07	7.07	7.07
37	C5-E75	1862	39811	8526
38	C5-E81	61	24	24
39	C5-E82	344	174	174
40	CA16-25	7.07	7.07	7.07
41	CA16-69	7.07	7.07	7.07
42	CA16-97	7.07	7.07	7.07
43	CA16-21	7.07	7.07	7.07
44	C4a-2- 96	7.07	7.07	7.07
45	C4a-2- 67	7.07	7.07	7.07
46	C4a-2-17	7.07	7.07	7.07
47	C4-E00	487	2723	39811

註:血清標準品 358/R2 中和效價為 46

參考文獻

1. Christian AK, Ijaz K, Dowell FS, Chow CC, Chitale AR, Bresee SJ, Mintz E, Pallansch AM, Wassilak S, McCray E and Arthur RR 2013 What we are watching*five top global infectious disease threats, 2012:a perspective from CDC's Global Disease Detection Operations Center. Citation: *Emerg Health Threats J*, 6: 20632.
2. Centers for Disease Control, Ministry of Health and Welfare, R.O.C.(Taiwan). 2013 November Statistics of Communicable Diseases and Surveillance Report 2012. (pp. 119-121). 2. Centers for Disease Control, Ministry of Health and Welfare, R.O.C.(Taiwan).
3. Wu, TN, Tsai, SF, Li, SF, Lee, TF, Huang, TM, Wang, ML, Hsu, KH, and Shen, CY. 1999 Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 5, 458-60.
4. Chang LY, King CC, Hsu KH, et al. Risk factors of enterovirus 71 infection and associated hand, foot, and mouth disease/herpangina in children during an epidemic in Taiwan. *Pediatrics* 2002;109:e88
5. Liang ZL, Mao QY, Wang YP, Zhu FC, Li JX, Yao X, Gao F, Wu X, Xu M and Wang JZ 2013 Progress on the research and development of inactivated EV71 whole-virus vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(8) 1–5.
6. Cheng A, Fung CP, Liu CC, Lin YT, Tsai HY, Chang SC, Chou AH, Chang JY, Jiang RH, Hsieh YC, Su IJ, Chong PC, Hsieh SM. 2013 A Phase I, randomized, open-label study to evaluate the safety and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine. *Vaccine*. 31(20):2471-6
7. Chung YC, Ho MS, Wu JC, Chen WJ, Huang JH, Chou ST, Hu YC. 2008. Immunization with virus-like particles of enterovirus 71 elicits potent immune responses and protects mice against lethal challenge. *Vaccine* 26:

1855-1862.

8. Zhu FC, Meng FY, Li JX, Li X., Mao QY, Tao H, Zhang YT, Yao X, Chu K, Chen QH, Hu YM, Wu X, Liu P, Zhu LY, Gao F, Jin H, Chen YJ, Dong YY, Liang YC, Shi NM, Ge HM, Liu L, Chen SG, Ai X, Zhang ZY, Ji YG, Luo FJ, Chen XQ, Zhang Y, Zhu LW, Liang ZL and Shen XL 2013 Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3. trial *The Lancet*, 381: 2024–32
9. Cai Y, Ku Z, Liu Q, Leng Q, Huang Z. 2014 A combination vaccine comprising of inactivated enterovirus 71 and coxsackievirus A16 elicits balanced protective immunity against both viruses. *Vaccine*. 32(21):2406-12.
10. Meng T, Kolpe AB, Kiener TK, Chow VTK and Kwang J, 2011 Display of VP1 on the Surface of Baculovirus and Its Immunogenicity against Heterologous Human Enterovirus 71 Strains in Mice. *PLoS ONE* . 6 (7) : e21757.
11. Chong P, Hsieh SY, Liu CC, Chou AH, Chang JY, Wu SC, Liu SJ 2012 Production of EV71 vaccine candidates. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 8:12, 1–9.
12. Tan CW, Chan YF, Sim KM, Tan EL, Poh CL 2012 Inhibition of Enterovirus 71 (EV-71) Infections by a Novel Antiviral Peptide Derived from EV-71 Capsid Protein VP1. *PLoS ONE*. 7(5) : e34589 .
13. Kung YA, Hung CT, Liu YC, Shih SR. 2014 Update on the development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Opin Biol Ther*. 3:1-10.
14. Lee MS, Tseng FC, Wang JR, Chi CY, Chon P, Su IJ 2012 Challenges to Licensure of Enterovirus 71 Vaccines. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 6(8): e1737.

15. Thoa le PK¹, Chiang PS, Khanh TH, Luo ST, Dan TN, Wang YF, Thuong TC, Chung WY, Hung NT, Wang JR, Nhan le NT, Thinh le Q, Su IJ, Dung TD, Lee MS. 2013 Genetic and antigenic characterization of enterovirus 71 in Ho Chi Minh City, Vietnam, 2011. *PLoS One*. 8(7):e69895. doi: 10.1371/journal.pone.0069895.
16. Huang YP, Lin TL, Lin TH, Wu HS. 2013. Antigenic and genetic diversity of human enterovirus 71 from 2009 to 2012, Taiwan. *PLoS One*. 8(11):e80942. doi: 10.1371/journal.pone.0080942. eCollection 2013.
17. Chan YF, Sam IC, Abubakar S. 2009 Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* DOI: 10.1016/j.meegid.2009.05.010
18. Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairède A, Joffret ML, Deshpande JM, Dubot-Pérès A, Héraud JM, de Lamballerie X, Delpeyroux F, Bailly JL. 2013 Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. *PLoS One*. 9(3):e90624. doi: 10.1371/journal.pone.0090624. eCollection 2014.
19. Lee MS and Chang LY 2010 Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. 9(2), 149–156.
20. McMinn PC 2012 Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Current Opinion in Virology*. 2:199–205.
21. Huang ML, Chiang PS, Chia MY, Luo ST, Chang LY, Lin TY, Ho MS, Lee MS 2013 Cross-reactive Neutralizing Antibody Responses to Enterovirus 71 Infections in Young Children: Implications for Vaccine Development. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7(2): e2067.
22. Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, et al. 2007 An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype A showed a

- broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol.* 81:9386-95.
23. Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T. 2009 Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine.* May 21;27(24):3153-8. Epub 2009 Apr 10.
24. Chou AH, Liu CC, Chang JY, Jiang R, Hsieh YC, Tsao A, Wu CL, Huang JL, Fung CP, Hsieh SM, Wang YF, Wang JR, Hu MH, Chiang JR, Su IJ, Chong PC. 2013 Formalin-inactivated EV71 vaccine candidate induced cross-neutralizing antibody against subgenotypes B1, B4, B5 and C4A in adult volunteers. *PLoS One.* 8(11):e79783. doi: 10.1371/journal.pone.0079783. eCollection 2013.
25. Liu W, Wu S, Xiong Y, Li T, Wen Z, Yan M, Qin K, Liu Y, Wu J. 2014 Co-circulation and genomic recombination of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 during a large outbreak of hand, foot, and mouth disease in Central China. *J Virol Methods.* 193(2):713-28.
26. 林翠莉, 王聖帆, 李麗俐, 郭盈君, 李祥吉, 狄家漂, 楊志元, 林鼎翔, 陳豪勇, 2004 腸病毒七十一型之不同基因型病毒及血清學之分析探討, 疫情報導, 第 20 卷第 11 期, 629-646.
27. 黃元品, 林翠莉, 吳和生, 2015 臺灣克沙奇 A6 型腸病毒之流行疫情分析, 疫情報導, 第 31 卷第 21 期, 527-531.