

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以腸病毒 71 型小老鼠動物模式研究其治療及預防方法 (第  
三年)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC90-2314-B-002-463-

執行期間：90 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學醫學院小兒科

計畫主持人：張鑾英

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 2 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果

## 報告

計畫名稱：以腸病毒 71 型小老鼠動物模式研究其治療  
及預防方法 (第三年)

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-463

執行期間：90 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

計畫主持人：張 鑾 英

共同主持人：林奏延

計畫參與人員：施玲玲, 王惠芳, 翁佩玲

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告       完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開

查詢

執行單位：國立臺灣大學醫院小兒科

中 華 民 國 92 年 08 月 4 日

一、研究計畫中英文摘要：請就本計畫要點作一概述，並依本計畫性質自訂關鍵詞。

關鍵詞：腸病毒 71 型、基因型、抗原性、毒性、動物模式、致病機轉、預防、治療方法

1998 年台灣腸病毒大流行，約造成 78 位兒童死亡，及 400 多位重症病患。1981 年台北及 1986 年高雄也曾紀錄有腸病毒 71 型流行。本計畫之目的為得知 1). 不同年代、不同基因型的腸病毒 71 型，即抗原性是否不同 2). 擬建立一個動物模式，比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型是否毒性/致病性有所差別，及其致死之生理、病理、免疫等致病機轉。3). 並利用所建立的動物模式測試各種抗病毒藥物的效果，包含干擾素(interferon)、抗病毒藥物、抗血清，並測試口服小兒麻痺疫苗(oral polio vaccine)及滅毒或非活性的腸病毒 71 型疫苗的保護效果，進而選擇一毒性較小且抗原性較高之腸病毒 71 型作滅毒或非活性疫苗。

**第一年(88 年 8 月至 89 年 7 月):** 我們將比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型是否抗原性、毒性/致病性有所差別:

1. **比較不同型腸病毒 71 型對人體血清中和抗體效價:**利用六株不同年代、不同基因型的腸病毒 71 型中和病毒培養確定是腸病毒 71 型病患之血清，結果見第一年期中期成果摘要之附表，發現對於不同年代、不同基因型的腸病毒 71 型之中和抗體效價有明顯差別 (ANOVA,  $p < 0.001$ ), 表示抗原性有所差別。
2. **比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型之毒性/致病性:** 利用上述中和試驗得之抗原性差異最大之不同基因型及不同年代的腸病毒 71 型(TW/2272/98-genotype C, TW/1743/98-genotype B, TW/253/86-genotype I) 經培養後，以不同病毒量  $10^4$ - $10^8$  PFU ①經口②注入腦內③注入腹腔，觀察這些老鼠是否 ①死亡，進而測出百分之 50 致死劑量(LD50) ②是否肢體無力或有無中和抗體，進而測出百分之 50 致病劑量(ID50)，比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型是否毒性/致病性、抗原性有所差別。結果發現在 **Newborn mice** 注入不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型，其毒性/致病性並無明顯差距。

**第貳年(89 年 8 月至 90 年 7 月):** 腸病毒七十一型之致病機轉研究及體外試驗可能有效藥物之效果

1. **致病機轉研究:** 動物模式完成後，我們將作病理組織切片觀察，看各個器官病變及主要病變所在。從而瞭解致病機轉，是否與敗血症候群或中樞神經病變有關。並以 ELISA 定量病人及動物體內細胞激素中 interleukin-1、interlukin-6、tumor necrosis factor- $\alpha$  (IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ ) 及以 Nitric oxide analyzer NOA<sup>TM280</sup> 定量動物體內一氧化氮(NO)，測試死亡老鼠是否有敗血症候群引起這些細胞激素及 NO 的釋放。

我們

2. **體外試驗中藥及抗腸病毒藥物對腸病毒七十一型之效果:**利用病毒斑減低試驗(Plaque reduction assay)測試可能有效藥物的效果。結果顯示**有效複方中藥:涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯及普濟消毒飲**在 0.25-2.5mg/ml 的濃度下，可抑制 90%-99%腸病毒 71 型病毒斑之形成。**有效單方中藥:**2mg/ml 的濃度之牛蒡子、升麻、羌活、枇杷葉、茵陳蒿、大黃、石斛、陳皮可抑制腸病毒 71 型之病毒生長。尤其升麻、羌活、茵陳蒿、大黃效果較佳。

**第參年(90 年 8 月至 92 年 7 月):**

1. **動物試驗腸病毒七十一型疫苗之效果:** 由動物試驗得知致病性較小且中和抗體效體效價較高的病毒株，以福馬林 (Formalin) 將以病毒株非活性化，再以經腹腔或肌肉注射打入老鼠或

兔子，測其中和抗體效價，是否足夠高具有保護力。希經由比較而選出一最適當的病毒株來作疫苗。我們已不同之 genotypes (B or C) 或同時施打，其中和抗體皆可達到保護之效價(8 至 512) ，三組並無明顯差別。

Keywords: enterovirus 71, genotype, antigenicity, virulence, animal model, pathogenesis, prevention, treatment

There was an epidemic of enterovirus infection in Taiwan between April and Oct 1998, and the epidemic caused about 78-children death and 405 severe cases. The results of virus isolation revealed that enterovirus 71 (EV71) played the most important role on mortality and morbidity of the epidemic. To investigate the difference of antigenicity and virulence of different EV71 strains and the pathogenesis of enterovirus 71 infection, a mice animal model will be set-up. Through the model, the physiological, pathological and immunologic aspects will be investigated to elucidate the pathogenesis of enterovirus-71-related death. Furthermore, potential antiviral or anti-enteroviral therapy, such as interferon, capsid-binders, EV71 antiserum, and herb drugs will be tested as well as oral polio vaccine, attenuated and killed EV71 vaccine.

**In the first year, the antigenicity and virulence will be compared among different strains EV71** with different genotypes or isolated from different areas and isolated in different time. The EV71 neutralization antibody was tested with 6 different EV71 strains and we found that significant different titers were found between different genotypes ( $p < 0.001$ , with ANOVA). For the virulence study in animals, EV71 from an autopsied spinal cord (TW/2272/98-genotype II) and another EV71 (TW/1743/98-genotype I) isolated from a mild hand-foot-mouth case will be used. Different amounts of EV71 ( $10^4$ - $10^8$  plaque formation units) will be introduced into CD-1 newborn mice through the mouth cavity, the peritoneal cavity and the subarachnoid space. The mice were observed for at least 3 weeks to detect weakness or death. The  $LD_{50}$  (50% lethal dose) and  $ID_{50}$  (50% infected dose) of different virus strains and different routes could be detected.

**In the second year, the pathogenesis of EV71 infection or related death will be elucidate through the animal model.** We will use the most appropriate routes and EV71  $LD_{50}$ . As the immunologic aspect, serum cytokines related to systemic inflammatory response syndrome (SIRS), such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1, interleukin-6 will be tested by will be tested by ELISA methods. Nitrogen oxide will be measured by Nitric oxide analyzer NOA<sup>TM280</sup>. Cytokines and NO study will make clear whether death is related to SIRS. As physiologic aspect, the neurologic function (weakness) and the cardiovascular function will be carefully monitor to elucidate that the death is related to the neurologic problem or the cardiovascular problem. As pathological aspect, the internal organs including central nervous system, lung, heart, pancreas, liver, kidney, and so on, will be examined and virus loading will be also detected.

**In the third year, several potential antiviral drugs**, such as interferon, EV71 antiserum, capsid-binders or some herb drugs was tested. **Killed EV71 vaccine** was also used to test the protective effects. All the newborn vaccinated with EV71 had neutralizing antibody titer over or equal to 8. **The NT titers among newborn mice vaccinated with genotype c, newborn mice**

**vaccinated with genotype B and newborn mice vaccinated with both genotypes were not significantly different (p=0.73, Kruskal-Wallis test).**

The main compounds of 大黃 are sennoside A, sennoside B and emodin, and their effects on enterovirus 71 but the pure compounds did not have significant effects on EV71.

In conclusion, we found systemic proinflammatory cytokine response may be important for the development of cardiopulmonary failure in EV71 infection. There were some complex herb drugs, having anti-EV71 effect. The killed EV71 vaccine of different genotypes can trigger mice to induce adequate protective neutralizing antibody.

## 二、研究計劃內容

### 1. 前言

從 1998 年 4 月起，台灣爆發了手足口病/腸病毒的大流行(1, 2)，起先一般醫生與衛生機構都以為最常見引起手足口病之克沙奇 A16 有關，而克沙奇 A16 所引起的手足口病一般不會有嚴重併發症，僅少數可能合併無菌性腦膜炎，不會有死亡或後遺症(3-5)。然而，1998 年 5 月初，長庚兒童醫院及中部地區都陸續發現有孩童因手足口病併發肺水腫而猝死的病例，然而當時查遍文獻，世界上並沒有類似病例報告，只是 1997 年馬來西亞沙勞越島曾有約 30 位類似病例，雖事隔一年但是其致病因及致病機轉仍不清楚。

從 1998 年 4 月底本院陸續發現因手足口病併發肺水腫而快速死亡的案例，而且有為數不少腦炎及類似小兒麻痺症狀群的發生。經由本院病毒室由數位死亡個案作病毒分離及分型，才發現本次流行主要是由腸病毒 71 型所引起(1、4、5)。以下為本院針對 1998 年四月至八月份所有病毒培養出腸病毒之 415 個案之分析：

	<b>EV 71(174)</b>	<b>Non-71 EV(241)</b>
Uncomplicated cases	<b>119 ( 68 % )</b>	<b>187 ( 78 % )</b>
HFMD/Herpangina	108 (63%)	105 (43%)
Viral exanthema	2 (1.1%)	5 (2%)
Febrile illness	7 (4%)	18 (7.4%)
Others	2 (1.1%)	59 (24%)
Complicated cases	<b>55 ( 32 % )</b>	<b>54 ( 22 % )</b>
Meningitis	13 ( 7.5 % )	44 ( 18 % )
Encephalitis	18 ( 10 % ) #	4 ( 1.7 % )
Polio-like syndrome	4 ( 2.3 % )	3 ( 1.2 % )
Encephalomyelitis	6 ( 3.4 % ) #	0 ( 0 % )
Cerebellitis	2 ( 1.1 % )	1 ( 0.4 % )
Pulmonary edema	12 ( 6.9 % ) #	0 ( 0 % )
Fatal cases	<b>14 ( 8.0 % ) #</b>	<b>0 ( 0 % )</b>
Neurologic sequelae	<b>5 ( 2.8 % ) #</b>	<b>0 ( 0 % ) #</b>

# : $p < 0.001$ ; \*: one with central apnea, four with limb weakness

這些病例的臨床表現相當廣泛，約三成左右的患兒合併有中樞神經系統的併發症或肺水腫。71 型腸病毒合併之中樞神經病變較嚴重，而且所有發生肺水腫及死亡的病例都是由 71 型腸病毒所引起。

從 1998 年 4 月份迄 12 月底，有 78 位小孩因手足口病及併發症(大部分都有肺水腫或肺出血)而死亡，有超過 400 位病童因嚴重併發症而需住進加護病房；定點醫師通報有 12 萬個手足口病之病例(1)。因為大部份的家屬都拒絕病理解剖，所以其致病機轉仍不甚清楚；而缺乏有效治療方法及預防方法，疫情及嚴重病例一直到 8 月份才稍為緩和。然而 9 月份開始，南部又有一小部分流行。為了釐清腸病毒 71 型之致病機轉，及發展可能的治療及預防方法，建立

動物模式來研究上述課題是非常需要而迫切。

腸病毒 71 型自 1969 在美國加州被分離出來後 (6)，即在世界各州有或大或小的流行，其中死亡或後遺症數目較多的，包含：1975 年在保加利亞的流行，有 545 個無菌性腦膜炎，71 個類小兒麻痺症候群，68 個腦炎，共造成 44 位死亡，死亡病例經解剖，主要為腦幹發炎 (尤其 Reticular formation 與 4th ventricle 的底部)，但並未提及肺水腫或手足口病等情況(7)，與本次台灣及馬來西亞死亡個案幾乎都有手足口病及肺水腫情況不盡相同。在保加利亞流行時，他們原先認為是小兒麻痺流行，並再流行時施打小兒麻痺疫苗，後來才證實是腸病毒 71 型，並且曾準備了腸病毒 71 型疫苗，以備不時之需(7)。而 1978 年匈牙利的流行，造成上千位或數百位腦炎/腦膜炎，而有 47 位死亡(8)。而 1997 年在馬來西亞沙撈越的流行，死亡個案也合併手足口病及肺水腫，從 30 位死亡部分培養腸病毒 71 型，但大部分培養出腺病毒，他們認為是腺病毒引起心臟發炎所致(9)，而 1997 年馬來西亞本島有 4 位解剖病例，培養出腸病毒 71 型、病理為腦幹脊髓炎(10)。所在馬來西亞在臨床表現上與台灣流行雖然相似，在病因及致病機轉上還存在一些分歧。除了這幾次較多死亡病例的流行外，在世界其他地區，如美國、日本、澳洲、巴西、香港、大陸等都曾流行，引起腦炎，類似小兒麻痺症候群，所以腸病毒 71 型在小兒麻痺疫苗全面施打後，可能取代小兒麻痺病毒引起急性肢體無力症候群 (類似小兒麻痺症候群) 及急性肺水腫猝死的情況。所以腸病毒 71 型在未來的感染症中將愈來愈形重要 (11-16)。

究竟台灣在 1998 年流行以前有無腸病毒 71 型的蹤跡呢？據臺大醫院小兒科李慶雲教授的經驗，1980 年台北曾有約 20 位 3 至 4 歲小孩合併手足口病及類小兒麻痺症候群，並從其中五位小孩培養出腸病毒 71 型(1)。而 1986 年在高雄林貴香/黃高彬教授等從手足口病/咽峽炎病人培養出腸病毒 71 型，(其中包含 TW/253/86) (1)。而從我們所作 1997 年底 (流行前) 之血清流行病學研究也顯示事實上大於 6 歲的民眾在流行前一年半左右已有腸病毒 71 型抗體，所以腸病毒 71 型可能每隔 3 至 5 年就有一次或大或小的流行，但是為何沒有重大死亡或很多重症病例呢？其中可能的原因包含

- 1) 沒有持續監測腸病毒 71 型，所以不知是否有因此而死亡/或有併發症/後遺症之病例。
- 2) 沒有表現出手足口病/咽峽炎，所以不知是腸病毒感染。(像保加利亞的流行，並未描述病童有手足口病/咽峽炎之症狀)
- 3) 以前流行的腸病毒 71 型，可能不同基因形抗原性/毒性/致病性傳染性，與 1998 年流行的不同，所以沒有造成很大的流行或死亡/重症個案，而造成較輕微的手足口病/咽峽炎而已。

除了不同年代嚴重/死亡個案的不同外，在 1998 年流行時，各縣市的死亡率也不同，在中部、桃園地區死亡率特別高，而東部特別少(1)，是否腸病毒 71 型在不同地區也有不一樣的表現呢？

在 1998 年流行時林口長庚兒童醫院分離出的腸病毒 71 型，經 VP-1 及 5'UTR 基因序列分析發現有兩種基因型，95% 是同一種基因型 (genotype II)，只有 5% 是 genotype I，而 1986 年高雄醫學院分離之 TW/253/86 亦是 genotype I；而 8 株從死亡病例所分離出之腸病毒 71 型皆是 genotype II (17)。我們也曾比較 genotype I 與 genotype II 對同一組腸病毒 71 型兒童血清內中和抗體效價，結果發現同是 genotype II 病毒株之間效價無差別，然而 genotype I 與 genotype II 之間有 8-16 倍之差別。顯示台灣至少存在有兩種不同基因型之腸病毒 71 型，而且其抗原性



明顯有差異，至於其他生物特性，如毒性致病性、傳染性等是否有差別則值得我們進一步探討。

以小兒麻痺病毒為例，在 5'TUR 452 C→U point mutation 則其神經毒性有明顯的差別，至於腸病毒 71 型的毒性究竟與哪一種基因有關，目前尚不清楚。既然腸病毒 71 型流行時造成那那麼多孩童死亡及併發症，還有民眾恐慌，進一步研究不同年代，不同地區及不同基因型之腸病毒 71 型有其急迫性及重要性，再藉由這些研究，進一步選擇一高抗原性及低毒性之腸病毒 71 型病毒株以作為未來疫苗株之基礎。

雖然在世界各地都有流行，然而造成死亡的案例並不多，其中最引人注目的是保加利亞 1975 年的流行，曾經造成 44 人快速死亡，而且大都小於 2、3 歲之小孩，死亡病例解剖皆發現腦幹及脊髓嚴重發炎，並且從中樞神經可分離出腸病毒 71 型(8)。根據文獻的描述，死亡病人在發病 10 至 30 小時內快速死亡，然而他們並未提及肺水腫等表現(8)。去年馬來西亞也有懷疑腸病毒 71 型之流行，共有 47 位死亡，這些死亡病童有急性心肺衰竭、肺水腫的現象，這與台灣今年的流行死亡個案表現非常相似(9、10)。馬來西亞僅有 4 位作完整病理解剖，他們發現腦幹發炎最厲害，並且也從中樞神經培養出腸病毒 71 型(10)。

本院有一例解剖病例，也有相同的發現，我們也提出神經性肺水腫的理論(4)，然而其他死亡的病童大部分沒有作病理解剖，所以不清楚其致病機轉。致死機轉不明瞭對於嚴重病童的處理會有很大的影響，因為如果敗血症導致肺水腫與神經性肺水腫處理方式(水分的給予)是有很大的不同的。為了進一步明瞭其致病機轉及對神經毒性的關係，建立一動物模式以研究其致病機轉是很必需而急迫的。

已建立的腸病毒動物模式主要針對克沙毒 B 病毒及小兒麻痺病毒。例如利用小兒麻痺病毒接受器基因所發展出來的 transgenic mice，已可成功取代猴子，而形成一新的動物模式(17、18)。而克沙奇 B 型病毒經口或者注入老鼠腹膜腔，也可引起嚴重死亡、心肌炎、中樞神經、肝、胰等病變(19、20)。這些病變與在人身上的表現是類似的。

至於腸病毒 71 型的動物模式，在猴子已經建立了(21-23)。包含經口及打入脊髓腔的模式都可以造成猴子肢體麻痺(22、23)。然而猴子的動物模式昂貴而且作實驗較不易控制。至於老鼠的腸病毒 71 型動物模式，保加利亞在 1975 年已建立(8)，但這是經由打入腹腔或打入腦內等不自然感染的模式，這對於某些致病機轉(如敗血症、如病毒如何進入中樞神經)及測試治療方法及疫苗效果等都不是很好的動物模式。我們將由已經成立的老鼠動物模式及建立新的動物模式雙管齊下，包含經口、注入腹膜腔及打入腦內等途徑建立腸病毒 71 型的老鼠動物模式。經由不同途徑、不同劑量腸病毒 71 型，觀察老鼠是否死亡、是否肢體無力求出百分之 50 致死病毒量(LD<sub>50</sub>)及百分之 50 致病病毒量(ID<sub>50</sub>)；第二年再進行致病機轉的實驗。

此次流行之死亡致病機轉，敗血症與神經性肺水腫一直無法定奪。由於欠缺解剖案例，第二年我們將針對致病機轉作探討。根據第一年動物模式，得知哪種途徑、哪種劑量(LD<sub>50</sub>)可造成死亡，我們將在不同時間檢測血中病毒濃度及死亡前血液中與敗血症有關的細胞激素(tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1, interleukin-6 及 Nitric oxide 等),以瞭解死亡是否與敗血症(sepsis syndrome)或者全身性發炎反應症候群(systemic inflammatory response syndrome)有關。另外並作各種器官病理觀察及病毒培養,以釐清哪些器官受侵犯而導致死亡。

明瞭致病機轉對於腸病毒的防治仍然是不足的。要真正能夠降低發生率及死亡率，必須要有效的治療方法及預防方法。目前有效治療腸病毒的藥物仍未問世，但是有多種的藥物在測試當中，如下的表可見有五類藥物：

表 1 可能有效治腸病毒藥物

Target	Compound class
Cell susceptibility	Interferons
Viral attachment and binding to host cells	①Antibodies ex.Antiserum ②Capsid-binders
Viral uncoating	Capsid-binders
Viral replication	Enviroxime-like compounds
Viral protein synthesis	3C protease inhibitors

- 1).干擾素(Interferons)：已運用於 B 型及 C 型慢性肝炎，它可增加體內抗病毒免疫力，抑制病毒繁殖，降低感染腸病毒的機率(24、25)。
- 2).抗體：如免疫球蛋白，則可直接中和病毒(26)避免病毒接近人類細胞。
- 3).外膜結合物(Capsid-binder):這類藥品可附在病毒的外膜上，達到抑制病毒繁殖及感染人類細胞的能力(27-30)。
- 4).Enviroxime:則抑制病毒 RNA 合成(31)。
- 5).3C protease inhibitors:抑制病毒蛋白質的合成及修飾(32)。

就上述藥物而言，較有潛力的為干擾素、免疫球蛋白及外膜結合物。尤其某些外膜結合物在動物實驗及人體試驗已證實有效果(27,28)。例如 pleconaril 可縮短非 71 型腸病毒腦膜炎病程及頭痛程度(Mckinlay、unpublished data)。另外 SCH 可預防動物因非 71 型腸病毒導致的急性肢體無力(30)等。免疫球蛋白可降低免疫球蛋白缺乏的人腸病毒腦膜炎的機率(33)。

除了上述藥物外，我們也想嘗試中藥。根據林奏廷醫師的研究，中藥的雙黃蓮及銀翹可抑制 A 型流行性感冒病毒(unpublished data)，顯示中藥對某些 RNA 病毒具有治療的潛力。

第二年下半年及第三年，我們將利用已建立好的動物模式測試在不同時間給予不同劑量的

藥物，如下表：

表 2 將測試之藥物

藥物	時間
Interferon	①受感染時連續五天每天打一劑肌肉注射 ②感染後 2 天連續五天每天打一劑
Antiserum (EV71 Antibody from infected mice)	①感染前一天打一劑 200mg/kg 或 ②感染時打一劑 ③感染後 2 天打 1 劑 ④感染後 4 天打 1 劑
SCH 0 mg/kg 2 mg/kg 20 mg/kg 200 mg/kg	感染後 2 天每天吃 1 劑連吃 5 天
Pleconaril 0 mg/kg 2 mg/kg 20 mg/kg 200mg/kg	感染後 2 天每天吃 1 劑連吃 5 天

中藥含銀黃、魚腥草、雙黃連、連翹、黃芩、金銀花、板藍根、青黛、定喘湯、六味地黃丸、刺五加、絞股藍、葛根、導刺散、涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯、普濟消毒飲、黃連解毒湯、五苓散

第三年將利用動物模式所選出抗原性高且毒性小之 EV71，以 Formalin 把 EV71 先去除活性，或經數十代培養成減毒疫苗，再施打於老鼠，然後再用活的 EV71 感染之(以第一年所建立動物模式 LD<sub>50</sub>)。另外我們也將測試口服小兒麻痺疫苗對腸病毒 71 型是否具保護效果。因為在 1975 年保加利亞的流行中，他們曾經全國性施打 2 劑口服小兒麻痺疫苗(8)。他們認為有效果，既然口服小兒麻痺疫苗已施打數十年，也是一個現行可直接運用的預防方法。

上述治療方法觀察 20 天內老鼠死亡率及肢體無力的比率是否下降以判斷這些處理方式是否有效。希望本計劃的執行能對腸病毒 71 型的致病機轉能釐清，並進一步發展可行的抗病毒藥物及發展預防的方法(疫苗)。由於 1998 年腸病毒流行已造成至少 78 位兒童死亡，數百位重症病童，如果能發展有效的治療或預防法，將對未來台灣孩童的健康有很大的助益。另外腸

病毒 71 型也可能造成世界其他地區流行，本研究成果也可提供其他國家參考。

除了腸病毒 71 型，其它的腸病毒也可以造成嚴重的併發症及死亡，例如 1994 年台灣克沙奇 B1 病毒的流行也造成幾十位新生兒或小嬰兒的死亡，本計劃動物模式的建立也可利用在其它腸病毒上，作為未來腸病毒的動物研究模式。

### Reference:

1. Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Eng J Med* 1999;341:929-35.
2. Anonymous. Deaths among children during an outbreak of hand, foot and mouth disease—Taiwan, Republic of China, April-July 1998. *MMWR* 1998; 47: 629-32.
3. Chang LY, Lin TY, Huang YC. Fulminant neurogenic pulmonary oedema with hand, foot and mouth disease. *Lancet* 1998; 352: 367-68.
4. Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Clinical Illness During the Taiwan Enterovirus Epidemic, 1998. *Ped Infect Dis J* 1999; 18: 1092-6.
5. 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.
6. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974;129:304-09.
7. Shindarov LM, Chumakov MP, Voroshilova MK, et al. Epidemiological, clinical and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1979;23:284-95.
8. Nagy G, Takatsy S, Kukan E, Mihaly I and Domok I. Virological diagnosis of enterovirus 71 infections: Experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. *Arch Virol* 1982; 71: 217-27.
9. CardosanMJ, Krishnan S, Tio PH, et al. Isolation of subgroup B adenovirus during a fatal outbreak of enterovirus 71-associated hand, foot, and mouth disease in Sibul, Sarawak. *Lancet* 1999; 354:987-92.
10. Lum LCS, Wong KT, Lam SK, et al. Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Pediatr* 1998;133:795-8.
11. Blomberg J, Lycke E, Ahlfors K, Johnsson T, Wolontis S, von Zeipel G. New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and/or hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1974;2:112.
12. Ishimaru Y, Nakano S, Yamaoka K, Takami S. Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71: high incidence of complication disorders of central nervous system. *Arch Dis Child* 1980;55:583-88.
13. Samuda Y, Chang WK, Yeung CY, Tang PS. Monoplegia caused by enterovirus 71: an outbreak in Hong Kong. *Pediatr Infect Dis* 1987; 6: 206-08.
14. Alexander JP, Baden L, Pallansch MA, Anderson LJ. Enterovirus 71 infections and neurologic

- disease: United States, 1977-1991. *J Infect Dis* 1994;169:905-08.
15. Gilbert GL, Dickson KE, Waters MJ, Kennett ML, Land SA, Sneddon M. Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement *Pediatr Infect Dis J* 1988;7:484-88.
  16. Shih SR, Ho MS, Suen PC, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and nonfatal cases of hand, foot, and mouth disease during an epidemic in Taiwan (SUBMITTED).
  17. Ren R, Costantini F, Gorgacz E.J., Lee J.J., and Racaniello V.R. Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 1990; 63: 353-62.
  18. Koike S, Taya T, Kurata T, Abe S, Ise I, Yonekawa H, and Nomoto A. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1991; 88: 951-55.
  19. Loria RM, Kibrick S, and Broitman SA. Peroral infection with group B coxsackievirus in the newborn mouse: a model for human neonatal infection. *J Infect Dis* 1974; 130: 225-30.
  20. Hyypia T, Kallajoki M, Maaronen M, Stanway G, Kandolf R, Auvinen P, and Kalimo H. Pathogenetic differences between coxsackie A and B virus infections in newborn mice. *Virus Research* 1993; 27: 71-78.
  21. Hashimoto I, Hagiwara A, Kodama H. Neurovirulence in cynomolgus monkeys of enterovirus 71 isolated from a patients with hand, foot, and mouth disease. *Arch Virol* 1978; 56: 257-61.
  22. Hashimoto I, Hagiwara A. Pathogenesis of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathol Appl. Neurobiol* 1982; 8: 149-56.
  23. Hashimoto I, Hagiwara A, Uchino I. Ultrastructural changes of motoneurons in monkeys infected with enterovirus 71. *Arch Virol* 1985; 86: 137-42.
  24. Kandolf R, Canu A, and Hofschneider PH. Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17; 167-81.
  25. Langford MP, Kadi RM, Ganley JP, and YinMurphy M. Inhibition of epidemic isolates of coxsackie virus type A24 by recombinant and natural interferon alpha and interferon beta. *Intervirology* 1988; 29; 320vc -27.
  26. Vlaspolder F, Kraaijeveld CA, Van Buuren R, Harmsen M, Benaissa-Trouw BJ, and Snippe H. Prophylaxis and therapy of virulent encephalomyocarditis virus in mice by monoclonal antibodies. *Ach Virol* 1988; 98: 123-30.
  27. McKinlay MA, Frank JA, Benziger DP, and Steinberg BA. Use of WIN 51711 to prevent echovirus type 9-induced paralysis in suckling mice. *J Infect Dis* 1986; 154: 676-81.
  28. McKinlay MA, and Steinberg BA. Oral efficacy of WIN 51711 in mice infected with human poliovirus. *Antimicrob Agent Chemother* 1986; 29: 30-32.
  29. Woods MG, Diana GD, Rogge MC, Otto MJ, Dutko FJ, and McKinlay MA. In vitro and in vivo activities of WIN 54954, a new broad-spectrum antipicornavirus drug. *Antimicrob Agent Chemother* 1989; 33: 2069-74.
  30. Cox S, Buontempo PJ, Wright-Minogue J, DeMartino JL, and et al.. Antipicornavirus activity of SCH 47802 and analogs: in vitro and in vivo studies. *Antiviral Research* 1996; 32: 71-79.

31. Heinz, B.A., Vance, L.M. The antiviral compound enviroxime targets the 3A coding region of rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.* 1995; 69: 4189-4197.
32. Patick, A.K., Ford, C., Binford, S., et al. Evaluation of the antiviral activity and cytotoxicity of peptidic inhibitors of human rhinovirus 3C protease, a novel target for antiviral intervention. In: Abstracts of the 10<sup>th</sup> International Conference on Antiviral Research, Atlanta, GA, p. A75.
33. McKinney, R.E., Katz, S.L., C.M. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev. Infect. Dis.* 1987; 9: 334-356.

第一年上半年

一比較不同型腸病毒 71 型對人體血清中和抗體效價

1) **Detection of EV71 antibody by neutralization test (NT)**

**A. Prepare 100TCID<sub>50</sub>EV71 virus stock**

- a. Using different genotype EV71 isolated from the complicated and uncomplicated cases in both northern and southern Taiwan, including **EV71/TW/2272/98, EV71/TW/2086/98, EV71/TW/1011/98, EV71/TW/835/98, EV71/TW/1743/98, EV71/TW/253/86.**
- b. Culture the EV71 using Vero cell and RD cell in the culture flask. Adjust virus concentration to 100 TCID<sub>50</sub> and aliquot into several small tubes.
- c. Store the adjusted virus at 70°C until process NT.

**B. Serum from virus-culture-confirmed EV71 cases:**

取在 1998 年流行時經病毒培養證實為腸病毒 71 型病患之血清，  
另外有未曾感染之七八個月大嬰兒之血清當對照組。

**C. Neutralization test**

- a. Inactivate serum at 56°C for 30 min
- b. Make 2 fold serial dilution of serum from 1:2 to 1:1024 with PBS
- c. Add 50 ul of each diluted serum and 50ul of adjusted virus suspension (100TCID<sub>50</sub>EV71) onto the well 1 to well 8 of microtiterplate, shake reaction well for 1 min
- d. Prepare control wells including virus control, serum control and cell control.  
Virus control well : add virus and cell only, no serum; back titration from 100, 10, 1 to 1/10 100TCID<sub>50</sub>  
Serum control : add serum and cell only, no virus  
Cell control : add cell only, no serum and no virus
- a. Incubate above reaction wells at 35°C for 2 hours in 5% CO<sub>2</sub> incubator
- b. Prepare Vero cells suspension and adjust cell concentration to 3× 10<sup>5</sup>/ml
- c. Add 25ul of adjusted vero cell and 50ul of 10% MEM into each reaction well after 2 hours in step5
- d. Incubate wells at 35°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator for 48 hours until virus control well reach 100TCID<sub>50</sub>

**C. Interpretation of EV71 Ab titer**

- a. Observe CPE in each well under reverse microscope after 3 to 7 day incubation  
Check CPE in control wells including virus control well, serum control well and

cell control well : no CPE

Determine serum EV71 Ab titer by  $1TCID_{50}$  in each specimen well (well 1 to well 8)

第一年後半年及第二年前半年

二比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型之毒性/致病性

### 1. 老鼠

利用新生鼠(CD-1 newborn mice)出生一天內及成鼠分別作實驗。實驗組：每種感染途徑每個感染劑量使用 10 隻老鼠。對照組：5 隻老鼠

### 2. 病毒株

- (1) 由一位解剖病人腦幹所分離的腸病毒 71 型(EV71/TW/2272/98)經過 indirect immunofluorescence monoclonal antibody 鑑定及 DNA sequencing 確認，在 Vero cell 作培養，經過 3 至 4 次再培養後定量病毒約在  $10^8$  PFU/ml 濃度，然後保存在  $-70^{\circ}C$  下備用。感染劑量從  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$  PFU 等。
- (2) 一個病毒株則由輕微手足口病患者之水皰液所培養之腸病毒 71 型(EV71/TW/1743/98)作如上處理。
- (3) 一個病毒株則是 1986 年高雄醫學院由手足口病患者所培養之腸病毒 71 型(EV71/TW/253/86)

### 3. 培養液

用 minimal essential medium 加上 10%胎牛血清及 50 unit penicillin, 50 ug 的 streptomycin 及 amphotericin B.

### 4. 感染方式(Mode of infection)

#### 1) 打入腹膜腔(Parenteral:intraperitoneal route)

- a) 實驗組：打入含  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$  PFU EV71. 使用 30 號 1cc 針由老鼠大腿前中側皮下(經過消毒)進針再進入腹腔內。此法可避免病毒外漏於進針處。
- b) 對照組：打入腹膜腔等量的培養液。

#### 2) 經口傳染(peroral route)

- a) 實驗組：使用無菌 polyethylene tube 經口插入胃內再從管內打入  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$  PFU 的 EV71.
- b) 對照組：經口胃管打入等量培養液。

#### 3) 打入腦內 (Intracerebral route)

- a) 實驗組：剃光老鼠前額毛並無菌消毒，再用 30 號 1cc 針由前窗門打入  $10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8$  PFU 之 EV71.
- b) 對照組：打入等量的培養液。

### 5. 感染確認

每隻老鼠在實驗期間(20 天)每日觀察 2 次看是否死亡或者體肢無力。如果老鼠在 48 小時內死亡則認定是實驗外傷引起不列入統計。其它 48 小時至 20 天死亡的老鼠比率由 Spearman-Kärber estimation 來求出  $LD_{50}$  (50% lethal dose; 百分之 50 死亡劑量); 由肢體無力或死亡的比率來求出  $ID_{50}$  (50% infectious dose; 百分之 50 感染劑量)。

### 6. 採血

死亡老鼠、體肢無力老鼠及正常老鼠，在老鼠死亡時分別採血。儲存在-70°C 以便第二年作 cytokine、NO 等研究及作病毒培養及定量。

## 7. 器官採樣

死亡老鼠的內部臟器、腦及脊髓分別取樣，部分存在-70°C，部分放在 Formalin 固定，以便日後作病理觀察及各器官病毒培養及定量。

第二年後半年：

1. 利用第一年動物模式建立後，得知不同途徑(如經口途徑)的 LD<sub>50</sub>，以 LD<sub>50</sub> 給于老鼠感染，然後取出死亡、得病(肢體無力)及存活老鼠之血清、脊髓液及各內臟作以下試驗。

2. 血清及脊髓液細胞激素之測定

以 ELISA 測定中血清及脊髓液之 cytokines：老鼠的血清及脊髓液收集保存於-70°C 冷凍庫，到一定數量後，一起以 ELISA kit [ R & D ( Minneapolis, MN, USA ) ] 依廠商提供之步驟，說明，測定血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 TNF- $\alpha$  之量。其可測得之最小量為測為 IL-1 $\beta$ : 1.0 pg/ml, IL-6: 0.7mg/ml 及 TNF- $\alpha$ : 4.4mg/ml .

Interferon 則運用放射免疫方法(radioimmunoassay, RIA)測定(Centocor gamma interferon radioimmunoassay; Centocor Diagnostics, Malvern, PA, USA)

3. 各器官：作 H-E stain，看哪些器官有病變，重要病變所在可能需再作電子顯微鏡觀察。

4. In vitro test for antiviral activity:

將測每個所要測的藥物(Interferon- $\alpha$ 、SCH、Plenocaril、中藥等)的抗病毒濃度(50% Antiviral concentration, IC<sub>50</sub>)及毒性濃度(50% Cytotoxic concentration, LC<sub>50</sub>)，及推算治療指數 (therapeutic index=LC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>)。 抗病毒濃度(50% Antiviral concentration, IC<sub>50</sub>)及毒性濃度 (50% Cytotoxic concentration, LC<sub>50</sub>) 各用 Plaque reduction assay 及 Colometric MTT Assay 來測定。

### 1). Plaque reduction assay

RD cells 3.5X10<sup>5</sup> seeded at 6-well plates

Incubated for 1 day with 80% confluence

+50-100 PFU EV71 (TW/2272/98), incubated for 1hr

+Drugs at different time points and at different concentration

3% agar + 5X MEM

Incubated for 2-3 days

3.8% Formalin fixation, crystal violet staining

Count the PFU

### 2). Colometric MTT Assay for Cytotoxicity

↓ RD cells 8X10<sup>4</sup> /ml seeded at 96-well plates

↓ incubated 37°C 4hr in 5% CO<sub>2</sub> incubator



+ 2X serial diluted drug in quadruplicate  
 incubated 37°C for 3 days  
 removing overlay  
 + 100 ul of MTT (tetrazolium) at 1 mg/ml in PBS  
 incubated 37°C for 4h aspiration of unreacted MTT  
 +0.04 N HCL in isopropanol  
 measurement of OD<sub>570</sub> with ELISA reader  
 Selectivity Index = CC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>

### 想測之中藥

銀黃、魚腥草、雙黃連、連翹、黃芩、金銀花、板藍根、青黛、定喘湯、六味地黃丸、刺五加、絞股藍、葛根、導刺散、涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯、普濟消毒飲、黃連解毒湯、五苓散

可能有效複方中藥包括涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯及普濟消毒飲其單方組成如下，日後亦將測試其效果

**甘露飲** 【組成】茵陳蒿2.5 炙甘草2.5 枇杷葉2.5 石斛2.5 生地黃2.5 熟地黃2.5 天門冬2.5 黃芩2.5 麥門冬2.5 枳殼2.5

**涼膈散** 【組成】連翹8 黃芩2 大黃4 梔子2 竹葉2 芒硝4 甘草4 薄荷2

**普濟消毒飲** 【組成】黃芩5 黃連5 柴胡2 陳皮2 牛蒡子1 桔梗2 連翹1 薄荷1 玄參2 板藍根1 甘草2 馬勃1 升麻0.7 白殭蠶0.7

**柴葛解肌湯** 【組成】柴胡2.5 白芍2.5 葛根2.5 桔梗2.5 甘草1.5 白芷2.5 黃芩2.5 羌活2.5 石膏2.5 大棗2 生薑2

### 5. Killed EV71 Vaccine 的製備

EV-71 使用 1:4000 formalin 處理 72 小時(37°C 下震動搖晃)，然後以 alum 再吸收後，冰於 4°C 冰箱備用。另外再取經 Formalin 處理過後的 EV71 病毒，在 Veco cell 作培養，確定已無活性。

### 第三年：抗病毒藥物之效果

1. 先給于老鼠 LD-50 或 ID-50，隔 2 天後再給于不同劑量不同藥物或抗血清，對照組則不給予藥物然後觀察老鼠得病率及死亡率是否不同。

將測試之藥物:

### 將測試之藥物

藥物	時間
Interferon	①受感染時連續五天每天打一劑肌肉注射 ②感染後 2 天連續五天每天打一劑
Antiserum Antibody infected mice)	①感染前一天打一劑 200mg/kg 或 (EV71 ②感染時打一劑 from ③感染後 2 天打 1 劑

	200mg/kg	④感染後 4 天打 1 劑
SCH	0 mg/kg 2 mg/kg 20 mg/kg 200 mg/kg	感染後 2 天每天吃 1 劑連吃 5 天
Pleconaril	0 mg/kg 2 mg/kg mg/kg 200mg/kg	感染後 2 天每天吃 1 劑連吃 5 天

可能有效之中藥 感染後 2 天每天吃 1 劑連吃 5 天

可能有效之中藥依 plaque reduction assay 結果包括涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯及普濟消毒飲，可能有效之單方中藥依 plaque reduction assay 結果包括牛蒡子、升麻、羌活、枇杷葉、茵陳蒿、大黃、石斛、陳皮可抑制腸病毒 71 型之病毒生長。尤其升麻、羌活、茵陳蒿、大黃效果較佳。

2. 疫苗效果之評估

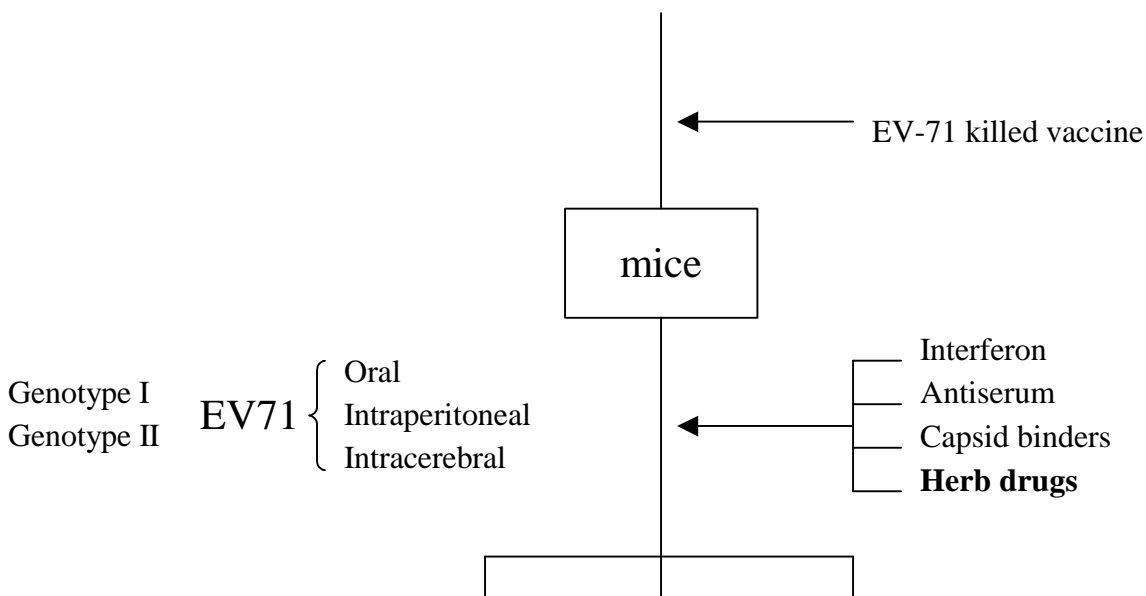
① Killed EV71 vaccine 組，則每 10 天打  $10^4$ 、 $10^5$  PFU Killed EV71 vaccine，打 3 次。

②對照組：則每 10 天打培養液，打 3 次

③之後再以活的 EV71 LD<sub>50</sub> 給予，觀察得病率及死亡率是否不同。

④中和抗體之測試: 打  $10^4$ 、 $10^5$  PFU Killed EV71 vaccine 之 mice 每 10 天抽血測試對腸病毒 71 型之中和抗體，步驟如第壹年一部份測試 EV71 NT Ab

總結本計劃之流程圖如下：



## RESULTS

1. **比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型之毒性/致病性:** 利用上述中和試驗得之抗原性差異最大之不同基因型及不同年代的腸病毒 71 型(TW/2272/98-genotype C, TW/1743/98-genotype B, TW/253/86-genotype B) 經培養後, 以不同病毒量  $10^4$ - $10^8$  PFU ① 經口②注入腦內③注入腹膜腔, 觀察這些老鼠是否 ①死亡, 進而測出百分之 50 致死劑量 (LD50) ②是否肢體無力或有無中和抗體, 進而測出百分之 50 致病劑量(ID50) 。 比較不同基因型/不同抗原性腸病毒 71 型是否毒性/致病性有所差別。

### 結果顯示:

注入腹膜腔百分之 50 致病劑量(ID50)

TW/2272/98-genotype II 約為  $5 \times 10^4$  PFU

而 TW/1743/98-genotype I 約為  $5 \times 10^7$  PFU

兩者有明顯差距

### 2. 病理發現

#### 1). Intraperitoneal route

Brain cortex: normal

Spiral cord: normal

Lung: congestion

Heart: normal

Liver: necrosis

Kidney: necrosis

Intestine: necrosis

#### 2). Oral route

Brain: normal

Spinal cord: Normal

Lung: with secretion & degeneration cell with possible aspiration and hyaline membrane formation

Spinal cord: neurononerosis

Liver: necrosis

Kidney: necrosis

#### 3). Intracerebral route

Brain: normal

Spinal cord: some neurononerosis

Lung: secretion, degeneration cell, R/O aspiration

Liver: necrosis

#### 4). All the Gram's stain was negative

5). Conclusion: EV71 can cause necrosis of abdominal organs and spinal cord in newborn mice.

### 3. Inflammatory Cytokine Study

Pulmonary oedema is the most striking manifestation of enterovirus 71 (EV71) infection. We did a cytokine study to delineate whether inflammatory mechanism is involved in EV71-related pulmonary oedema. EV71 patients with pulmonary oedema had significantly higher mean levels (48.4 pg/ml, 26.9 folds of the control,  $p=0.0043$ ) of IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ), IL-6 (interleukin-6, 947 pg/ml, 526 folds of the control,  $p=0.0001$ ) and TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , 22.4 pg/ml, 3.3 folds of the control,  $p=0.003$ ). EV71 patients with CNS involvement but without pulmonary oedema and uncomplicated EV71 patients did not have significantly elevated IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  (Table 1). It is imperative to determine whether alteration of these inflammatory mechanisms by immunomodulators can improve clinical outcome..

### 4. Proinflammatory Cytokine Reactions in Enterovirus 71 Central Nervous System Infections

Enterovirus 71 (EV71) infection can lead to devastating clinical outcomes. ~~However, aAn appreciationn understanding~~ of the ~~exactspecific~~ relationship between cytokine response and patient mortality may ~~help~~ limit the risks ~~posed by this deadly illness~~. This paper presents ~~study the~~ results ~~of a study which based on the comparison ofed the~~ cerebrospinal fluid (CSF), ~~and~~ serum interleukin-6 (IL-6), and intereukin-1 (IL-1)  $\beta$  of twenty-four EV71 patients. Cases ~~in this study~~ involved diverse manifestations and/or complications, including encephalitis, ~~a~~ poliomyelitis-like syndrome, meningitis, and pulmonary edema. ~~Hi; however,~~ ~~levels of~~ CSF IL-6 ~~levels were in study~~ patients were found to be consistently higher ~~on during~~ the ~~first initial 2two~~ days of ~~central nervous system (CNS)~~ involvement than ~~on the third day or laterafterward~~ (median 61, [range 15-4485] pg/ml vs. 25 [15-410] pg/ml  $p=0.04$ ) (Figure 1). ~~Compared to those without pulmonary edema,~~ EV71 patients suffering cardiopulmonary collapse demonstrated dramatic ~~variances around~~ median [range] blood level readings IL-6 (179 [11-1503] vs. 7.3 [1-19.1] pg/ml,  $p<0.001$ ), white blood cell counts (16.2 [10.8-24.2] vs. 11.2 [6.6-18.1]  $10^9/L$ ,  $p=0.004$ ) and glucose ~~levels~~ (324 [152-443] vs. 113 [65-190] mg/dL,  $p<0.001$ ) (Figure 2) ~~than those without pulmonary edema~~. ~~Our Ffindings~~ suggest that the combination of CNS and systemic inflammatory response may ~~lead trigger~~ EV71-related cardiopulmonary collapse.

### 5. AntiEV71 Effect by Plague Reduction Assay

1). 複方中藥: 利用不同濃度 ( $2.5 \times 10^{-7} \sim 25$  mg/ml) 煮過與未煮過的 20 種複方中藥包括銀黃、魚腥草、雙黃連、連翹、黃芩、金銀花、板藍根、青黛、定喘湯、六味地黃丸、刺五加、絞股藍、葛根、導刺散、涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯、普濟消毒飲、黃連解毒湯、五苓散，加入 50-100 pfu 腸病毒 71 型中，經過 3 天培養，觀察是否能降低病毒斑的形成 (plaque reduction assay)。結果顯示涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯及普濟消毒飲在 0.25-2.5mg/ml 的濃度下，可抑制 90%-99% 腸病毒 71 型病毒斑之形成。(Table 3)

2). 單方中藥: 可能有效複方中藥:涼膈散、甘露散、柴葛解肌湯及普濟消毒飲其單方組成如下，亦測試其效果

甘露飲 【組成】茵陳蒿 2.5 炙甘草 2.5 枇杷葉 2.5 石斛 2.5 生地黃 2.5 熟地黃 2.5 天門冬 2.5 黃芩 2.5 麥門冬 2.5 枳殼 2.5

涼膈散 【組成】連翹 8 黃芩 2 大黃 4 梔子 2 竹葉 2 芒硝 4 甘草 4 薄荷 2

**普濟消毒飲 組成】**黃芩 5 黃連 5 柴胡 2 陳皮 2 牛蒡子 1 桔梗 2 連翹 1 薄荷 1 玄參 2 板藍根 1 甘草 2 馬勃 1 升麻 0.7 白殭蠶 0.7  
**柴葛解肌湯 【組成】**柴胡 2.5 白芍 2.5 葛根 2.5 桔梗 2.5 甘草 1.5 白芷 2.5 黃芩 2.5 羌活 2.5 石膏 2.5 大棗 2 生薑 2  
 結果發現 2mg/ml 的濃度之牛蒡子、升麻、羌活、枇杷葉、茵陳蒿、大黃、石斛、陳皮可抑制腸病毒 71 型之病毒生長。尤其升麻、羌活、茵陳蒿、大黃效果較佳。(Table 4)

## 6. Effects of main compounds from herb drug on enterovirus 71

The main compounds of 大黃 are sennoside A, sennoside B and emodin, and their effects on enterovirus 71 are shown in the following Tables.

The pure compounds did not have significant effects on EV71.

Drug 溶於溶劑後再用 2%DMEM 溶至 2ml

溶劑：2%DMEM

Sennoside A 100  $\lambda$  : 1900  $\lambda$

Sennoside B 100  $\lambda$  : 1900  $\lambda$

Emodine 300  $\lambda$  : 1700  $\lambda$

### *Sennoside A*

Virus	濃度	10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	Virus control
2272	Plaque	Toxin 5	35	26	83	101
	Inhibition%	95	65%	74	18	
1743	Plaque	Toxin 1	12	24	37	68
	Inhibition%	99	82%	65	46	

用 5 mg/ml 作加藥時間：-30min 0min 30min 60min

Time	-30 min	0 min	30 min	60 min	Virus control
Plaque					
Inhibition%					

### *Sennoside B*

Virus	濃度	10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	Virus control
2272	Plaque	21	60	78	67	98
	Inhibition%	79%	39%	20	32	
1743	Plaque	0	23	40	52	82
	Inhibition%	100%	72%	51	37	

用 5 mg/ml 作加藥時間：-30min 0min 30min 60min

Time	-30 min	0 min	30 min	60 min	Virus control
Plaque	32/32	31/33	43/42	61/71	91/95
Inhibition%	65/66	66/65	53/56	33/25	

### *Emodin*

Virus	濃度	10 mg/ml	5 mg/ml	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	Virus control
2272	Plaque	Toxin 19	Toxin 42	147	123	125
	Inhibition%	85	66	0	2	
1743	Plaque	Toxin 6	Toxin 22	87	86	99
	Inhibition%	94	78	12	13	

用 5 mg/ml 作加藥時間：-30min 0min 30min 60min

Time	-30 min	0 min	30 min	60 min	Virus control
Plaque	12/13	11/7	6/11	11/7	111/92
Inhibition%	89/86	90/92	95/88	90/92	

## 7. Neutralizing antibody to EV71 with different genotypes of EV71

(1) Neutralizing antibody to EV71 after vaccination with genotype C TW-1998-2272 in newborn mice

The mean titer 85; median 32; range 8-512 (N=31).

(2) Neutralizing antibody to EV71 after vaccination with genotype B TW-1998-1743 in newborn mice

The mean titer 80; median 32; range 16-256 (N=7).

(3) Neutralizing antibody to EV71 after vaccination with both genotype C TW-1998-2272 and genotype B TW-1998-1743 in newborn mice

The mean titer 98; median 64; range 16-256 (N=8).

(4) Neutralizing antibody to EV71 after vaccination with genotype C TW-1998-2272 or genotype B TW-1998-1743 in adult mice

The mean titer 50; median 32; range 8-128 (N=15)

The NT titers among newborn mice vaccinated with genotype c, newborn mice vaccinated with genotype B and newborn mice vaccinated with both genotypes were not significantly different (p=0.73, Kruskal-Wallis test).

The mean NT titer of newborn mice was significantly higher than the titer of the adult mice (87±16 vs. 51±9, p=0.04, student's t test).

## **8. Neutralizing antibody to EV71 through different routes**

Publication related to this project

1. Lin TY, **Chang LY** (correspondence), Huang YC, et al. Different proinflammatory reactions in fatal and nonfatal enterovirus 71 infections: implications for early recognition and therapy. *Acta Paediatrica* 2002;91:632-5. (SCI 20/71, IF=1.315)
2. Lin TY, Hsia SH, Huang YC, Wu CT, **Chang LY** (correspondence). Proinflammatory cytokine reactions of cerebrospinal fluid in enterovirus 71 central nervous system infections. *Clin Infect Dis* 2003;36:269-74. (SCI 7/36, IF=3.545)
3. **Chang LY**, Tsao KC, Hsai SH, et al. Transmission and Clinical Features of EV71 Infections in Household Contacts (submitted)
4. Luan-Yin Chang, Shao-Hsuan Hsia, Chang-Teng Wu, et al. Outcome of EV71 Infection with or without Stage-based Management, 1998 – 2002c(submitted)
5. Luan-Yin Chang, et al. Effects of some herb drugs on enterovirus 71. (manuscript in preparation)



**Table 1. Demography, Inflammatory Parameters and Cytokine Levels**

<b>Group</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>p-value</b>
	<b>(N=8)</b>	<b>(N=9)</b>	<b>(N=17)</b>	<b>(N=21)</b>	
<b>Age (month)</b>	21 ±24 (7-79)	29 ±19 (7-65)	31 ±18 (9-72)	17±16 (4-78)	0.10
<b>Sex (M/F)</b>	4/4	4/5	11/6	9/12	0.57
<b>Peak Temperature</b>	39.8 ±0.4 (39.3-40.5)	39.0 ±0.9 (38-40.8)	39.2 ±0.7 (38-40.2)	--	0.13
<b>Duration of fever (day)</b>	2.7 ±0.8 (1-3)	5.8 ±3.2 (3-12)	3.8 ±1.6 (0-6)	--	0.016
<b>WBC</b>	28275 ±7643 (17900-40600)	14600 ±6846 (7700-25300)	12253 ±4691 (5100-22300)	--	0.0001
<b>C-RP</b>	18.5 ±16.3 (0-40)	27.8 ±34.9 (0-95)	15.9 ±29.1 (0-113)	--	0.61
<b>Glucose</b>	501 ±186 (254-760)	150 ±100 (77-298)	103 ±15 (82-131)	--	0.0001
<b>IL-1</b>	48.4 ±85.2 (5-255)	4.5 ±9.6 (0.9-30)	1.6 ±0.9 (0.9-4.5)	1.8 ±1.0 (1.0-5.1)	0.0043
<b>IL-6</b>	947 ±1239 (74-3880)	4.8 ±3.0 (2.1-11.7)	2.8 ±1.9 (1.4-8.6)	1.9 ±0.5 (1.2-3.0)	0.0001
<b>TNF-r1</b>	22.4 ±29.5 (9.4-82.5)	5.2 ±1.1 (3.9-6.6)	5.6 ±1.6 (3.1-9.0)	6.8 ±1.5 (3.1-9.3)	0.003

Data are shown as mean ±SD, and numbers in parenthesis are ranges.

**Table 2. 複方中藥對腸病毒 71 型之效果**

複方中藥	IC99	IC90	IC50
連翹	---	---	>2.5
黃芩	---	---	>0.25
金銀花	---	---	>0.25
板藍根	---	---	>2.5
青黛	---	---	>25
定喘湯	---	---	>2.5
六位地黃丸	---	---	>0.25
刺五加	---	---	>2.5
絞股藍	---	---	>25
葛根	---	---	>2
導赤散	---	---	8.3
<b>膈散</b>	<b>2.4</b>	<b>1.7</b>	<b>0.6</b>
<b>甘露散</b>	<b>4</b>	<b>2.8</b>	<b>0.8</b>
<b>柴葛解肌湯</b>	<b>&gt;4</b>	<b>4</b>	<b>1</b>
<b>普濟消毒飲</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>3</b>
黃連解毒湯	8.5	7.7	5

concentration mg/ml

**Table 3. 單方中藥對腸病毒 71 型之效果**

單方中藥	IC99	IC90	IC50
<b>甘露飲的單方</b>			
茵陳蒿	>4	4	1
枇杷葉	8	5	2.4
石斛	8	6.5	2.6
生地黃	---	---	>2
熟地黃	---	---	>2
天門冬	---	---	>2
黃芩	---	---	>0.25
麥門冬	---	---	>2
<b>涼膈散的單方</b>			
連翹	---	---	>2.5
黃芩	---	---	>0.25
大黃	2.2	1.8	0.8
梔子	---	---	>2
甘草	---	---	>2
<b>普濟消毒飲的單方</b>			
黃芩	---	---	>0.25
黃連	---	---	>0.02
柴胡	---	---	>2
陳皮	---	---	>4
牛蒡子	---	1.8	1.2
桔梗	---	---	>2
連翹	---	---	>2.5
玄參	---	---	>2
板藍根	---	---	>2.5
甘草	---	---	>2
升麻	8	7.7	1.3
白殭蠶	---	---	>2
<b>柴葛解肌湯的單方</b>			
柴胡	---	---	>2
白勺	---	---	>2
桔梗	---	---	>2
甘草	---	---	>2
白芷	---	---	>2
黃芩	---	---	>0.25
姜活	>4	>4	2.2
石膏	---	---	>2

concentration mg/ml

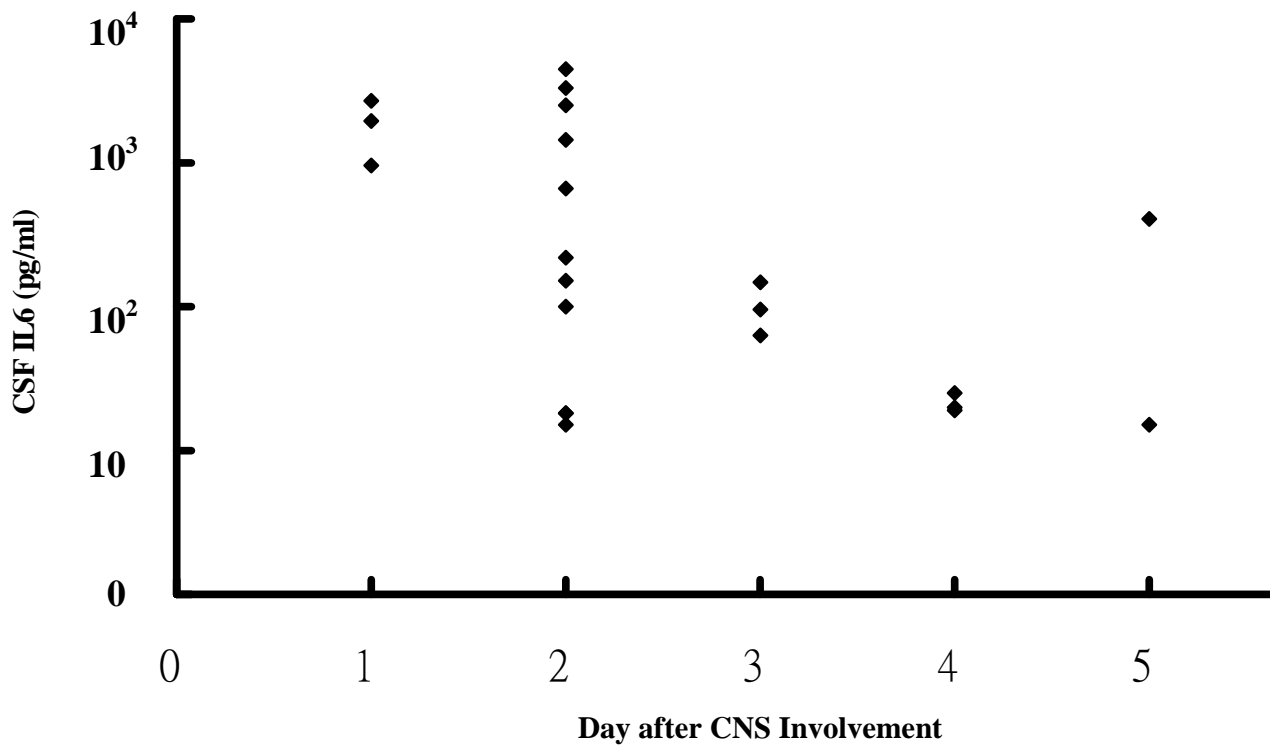
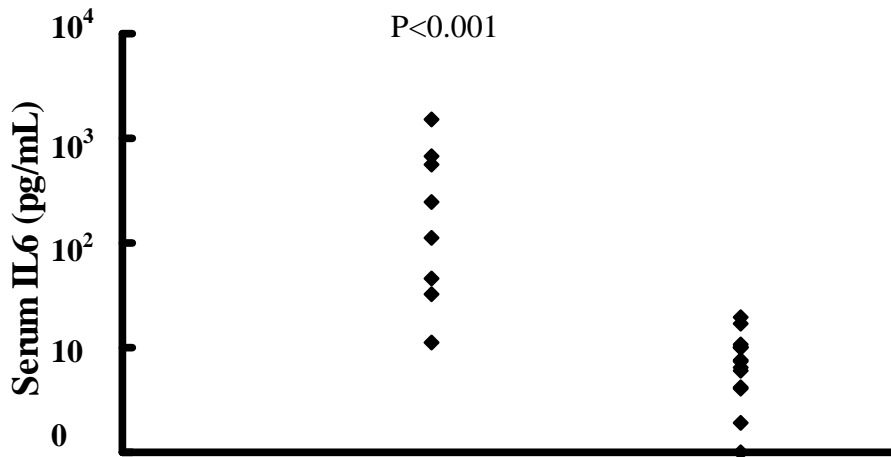
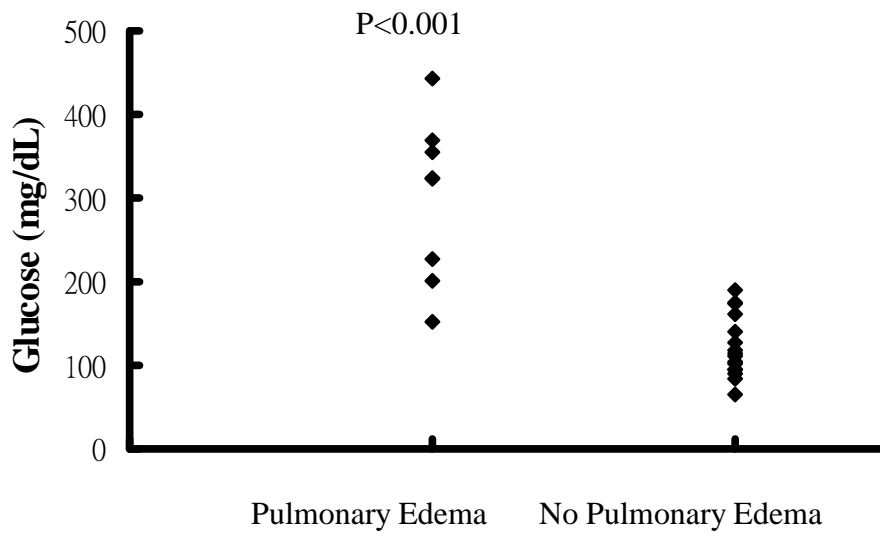
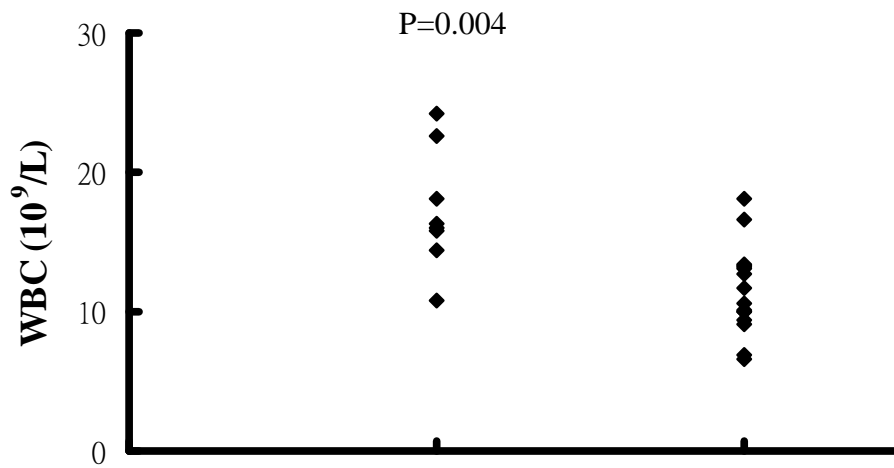


Figure 1





**Figure 2**