

# 登革熱(的) 台灣經驗

.....  
從流行病學及臨床到  
基礎科學的新視野  
.....

科技部台灣重要新興感染症  
研究計畫成果報告

---

# 序

我在 1970 年代開始我的病毒分子生物研究生涯，當時醫、學、研界充滿了自信與樂觀，深信傳染病已經是過去式，病毒或細菌引起的傳染病都可用疫苗或藥物來防治或控制，所以病毒學是沒有前途的。但不久，一連串的新興病毒給科學家當頭棒喝，愛滋病出現了。科學家預測兩年內可以製造疫苗，這個預測成為美國國家健康研究院 (NIH) 最難堪的失言。SARS 接踵而來，雖只是蜻蜓點水般的在不到一年內就消失不見，SARS 留下滿目瘡痍的社會。接著禽流感、新型流感、中東冠狀病毒、伊波拉病毒等等陸續出現，這些只是幾個對台灣比較有威脅性的新興傳染病毒的代表而已。此外，像西尼羅病毒，從熱帶地區擴張到北美；登革熱因氣候變遷，地球暖化而在很多地方，包括台灣，捲土重來；還有伊波拉跳出了非洲大陸，引起全世界大恐慌，這些只是眾多新興及再出現的傳染病的冰山一角，可見傳染病的威脅是無時不在的，而且與日增加。

台灣這幾年也深受傳染病的威脅，所幸從 SARS 所得到的經驗可以做亡羊補牢的工作，把失敗的經驗化為成功之經驗。緣於此，科技部 (舊國科會) 深感台灣必須強化傳染病的監視及研究來增加對傳染病的防堵及應付的能力，因此推動「台灣重要新興感染症研究計畫」以充實台灣在這方面的研發能量，並提高現在及未來防治感染病的能力，由本人及張上淳院長擔任正、副主持人。這個計畫涵蓋多種細菌及病毒，都是在台灣曾出現或可能出現的傳染症。當中，登革熱是近幾年來最威脅台灣的病毒，也同時是台灣最出色的研究領域之一。這本書邀請了台灣在這方面最傑出的學者，把上述計畫的研發成果整理出對登革熱的流行病學、診斷方法、疾病症狀及臨床處置方法的最新知識，目標是建立一套 SOP (Standard operating procedures)，來堵住病毒的入侵或散播。同時進行對病毒的基礎研究以改進對病毒的了解，且發展新的治療方法或研發疫苗。特別值得

一提的是目前所知的幾個登革熱的致病機制幾乎全是由台灣的研究團隊最先提出而加以闡述的。這些假說逐漸得到世界學者的肯定，這是台灣學者對科學的貢獻，是值得我們自豪的。

雖然這本書只討論登革熱，台灣在其他傳染病的研究，例如腸病毒也有很亮眼的成績，盼望以後也有類似本書的模式，可以讓這些傳染病的研究成果或臨床經驗更完整地呈現出來。本書的完成要特別感謝國立成功大學的林以行教授，由於她的效率，才能讓這本書順利完成。也感謝衛福部的支持，這本書代表政府對傳染病研發的重視，未來如再有其他傳染病出現，這些累積的經驗將會幫助我們面對這些傳染病。

「台灣重要新興感染症研究計畫」計畫主持人  
賴明詔

---

# 序

三月的南台灣豔陽高照，在人類歡喜迎接春天到來的同時，另一種生物也準備褪去冬衣，蛻變成為人人避之唯恐不及的黑色轟炸機 - 病媒蚊。過去兩年，位於台灣南部的高雄及台南，分別遭受大規模埃及斑蚊和白線斑蚊的襲擊，造成總計超過五萬八千人感染登革熱。今年由於暖冬的緣故，二月及三月的平均溫度，分別創下 137 年來當月氣溫的新高，登革熱的疫情，也隨之加溫，截至四月底為止，通報的案例已超過 460 件，為去年同期的 2.5 倍，可以預見的是，今年的疫情，恐將更加嚴峻。因此，如何未雨綢繆，做好防疫的工作，避免登革熱再度於國內爆發大流行，不僅是政府施政的首要之務，更是所有國人均需積極參與的全民運動。

科技部（前身為國科會）有感於登革熱傳染病對於國人健康及生命的威脅，自民國 99 年起，將登革熱研究議題納入「臺灣重要新興感染症研究計畫」及「前瞻疫苗技術開發研究計畫」中接續推動，補助國內學研界從事包括登革熱免疫機轉及疫苗研發、病毒與病媒之免疫關係、天然抗病毒藥物研發、新型檢測平台開發、病媒生態與防治及教育等多面向的研究計畫。希望透過學術界的研究能量，探討登革熱病毒、媒蚊、及宿主之間各種交互影響的因子，解開複雜的三角關係，並進一步找到可以用來防治甚或治療登革熱的良方妙藥。經過多年的努力，國內在登革熱致病機轉的研究、快篩試劑和治療性抗體的研發等方面都有具體進展，此外，在生態研究方面，也發現媒蚊已經隨著都市化的發展，找到新的滋生源，讓登革熱從原本以叢林鄉村為主的聚落型疾病，轉變成為都市型的大規模傳染病，這也是為什麼近年來登革熱在高雄、台南等都會區快速傳播的重要原因。

隨著全球暖化，氣候異常等天然條件的催化，加以交通便捷，人們往來密切的推波助瀾，全世界登革熱疫情的惡化情形，年甚一年。區域性甚至全球性的大流行，也不再是遙不可及的天方夜譚。所謂「知己知彼，百

戰不殆」，為了促進國民對登革熱的瞭解，國立成功大學「傳染性疾病及訊息研究中心」林以行教授，特別號召國內三十餘位學者，通力合作，編寫這本科普專書，從巨觀的流行病學角度切入，剖析國內及全球登革熱發生的趨勢及防疫的策略，接著介紹登革熱病毒的特性、傳染媒蚊的生態、及染病後之臨床癥狀及適切的處置方法。接著從微觀的分子層級介紹病毒感染後的致病機轉，治療藥物的研發策略以及抗登革疫苗發展的近況，書末更由楊倍昌教授從社會學的角度，暢談「科技知識的建立與溝通」，直接點出「溝通是科學研究走向社會的最後一哩路」，頗有畫龍點睛的功效。其實這也是科技部支持出版這本書的主要目的—透過適當的管道，傳播正確的科學知識。而且，這種知識的傳播，並非侷限于一時一刻，時做時不做，也非臨渴掘井，等情況緊急時再做。而是要有系統的將正確的、有益的科學新知，持續傳遞與一般民眾，使之藉由閱讀，日積月累的吸收，並融入其日常生活之中，那麼公民的科學素養，就自然而然地提升，即使面臨重大事故時，也能藉由其本身之科學常識，進行分析歸納，採取必要的因應作為，而不至於舉措失當，或無所適從。

本書的內容包羅萬象，編排上由簡入深，一氣呵成，遣詞用字也儘量通俗化，雖是介紹專業知識的書籍，讀起來卻沒有佶屈聱牙，不知所云的感覺。更重要的是，絕大部分的內容都是國內學者過去十幾年來的研究成果之結晶，不是移植國外的成果，也非一般街談巷議或網路流傳之偽科學所可比擬。本書的發行，相信對於增進國民對登革熱疾病及病媒蚊的瞭解，將有舉足輕重的影響。吾人如能詳讀本書，瞭解其精義，相信對於登革熱的防治，甚至本身健康的維護，都將獲益匪淺。

科技部生命科學研究發展司 司長

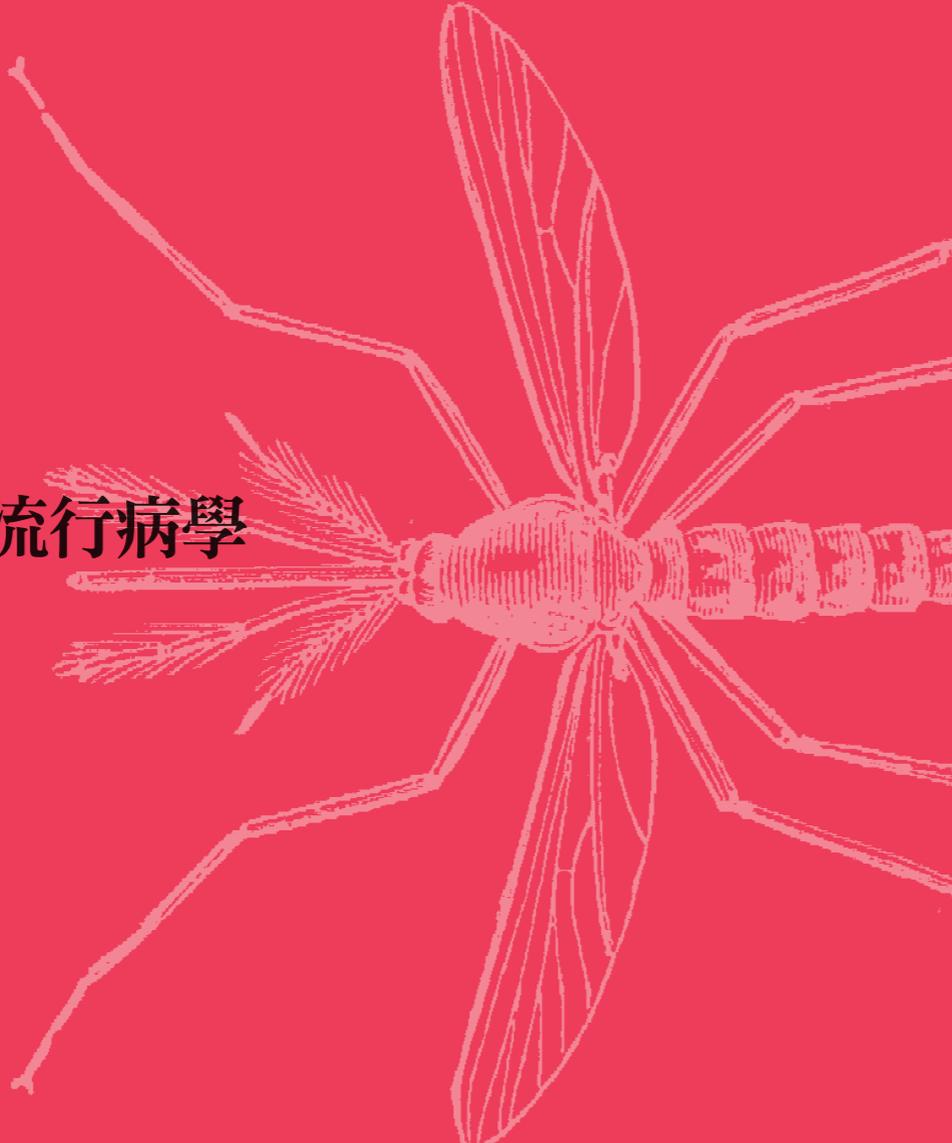
蔡少正

# 目錄

序文	002
作者名錄	007
第一章 登革熱流行病學	008
第一節 台灣登革熱分子流行病學	009
第二節 以全球觀點看登革熱病毒感染的偵測、流行病學與防疫策略	019
第二章 登革病毒	061
第三章 登革熱病媒蚊生態與防治	076
第四章 登革熱的臨床特徵與處置	089
第五章 登革致病機制	105
第一節 登革病毒與細胞自噬	106
第二節 分子模擬為基礎的登革自體免疫致病機制	114
第三節 登革病毒非結構性蛋白一之致病角色	125
第四節 巨噬細胞吞噬血小板在登革致病機轉中的角色	131
第五節 人類骨髓細胞與登革病毒的感染	136
第六節 C 型凝集素 CLEC5A 在登革致病機制的角色	148
第七節 登革研究動物模式	162
第六章 抗登革病毒治療與預防之研發策略	170
第一節 對抗登革病毒的策略與藥物發展	171
第二節 登革疫苗發展現況	183
第七章 實驗室之外，科技知識的建立與溝通 -- 登革熱不熱，有什麼關係？	193
結語	208

## 作者名錄

王淑鶯	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
伍安怡	國立台灣大學醫學院免疫學研究所
朱雅婷	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所
何宗憲	國立成功大學醫學系小兒學科 / 國立成功大學醫學院附設醫院小兒部 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心 / 國立成功大學醫學院臨床醫學研究所
何慈娟	國立成功大學醫學院基礎醫學研究所
余佳益	國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
李英瑞	戴德森醫療財團法人嘉義基督教醫院轉譯醫學研究中心
吳明芳	中央研究院基因體研究中心
林以行	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
林宜玲	中央研究院生物醫學科學研究所
林秋烽	台北醫學大學微生物及免疫學科 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
金傳春	國立台灣大學公共衛生學院流行病與預防醫學研究所
凌 斌	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
莊詠鈞	國立成功大學醫學檢驗生物技術學系
陳文裕	國立台灣大學醫學院免疫學研究所
陳泓如	國立成功大學醫學檢驗生物技術學系
陳斯婷	國立陽明大學臨床醫學研究所
陳嘉玲	台北醫學大學轉譯研究中心
陳錦生	長榮大學生物科技學系
張志鵬	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
舒佩芸	衛生福利部疾病管制署
黃明停	中央研究院基因體研究中心
黃雅蘭	中央研究院基因體研究中心
彭貴春	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
葉才明	國立成功大學醫學檢驗生物技術學系 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
萬書彤	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
楊倍昌	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 醫學、科技與社會研究中心
詹大千	中央研究院人文社會科學研究中心
廖經倫	國家衛生研究院感染症與疫苗研究所
劉校生	國立成功大學醫學院微生物及免疫學研究所 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心
劉清泉	國立成功大學醫學系小兒學科 / 國立成功大學醫學院附設醫院小兒部 / 國立成功大學傳染性疾病及訊息研究中心 / 國立成功大學醫學院附設醫院感染管制中心、門診部
謝世良	中央研究院基因體研究中心
羅玉枝	國立成功大學生物科技學院生物資訊與訊息傳遞研究所



## 第一章

# 登革熱流行病學

## 第一節

# 台灣登革熱分子流行病學

舒佩芸

登革熱雖然不是台灣本土性流行的傳染病，但每年皆有病例由境外引入，甚至導致登革熱疫情大爆發，疾病管制署對每年境外移入病毒及本土流行病毒建立基因序列資料庫，並分析境外及本土病毒間的演化及親緣性關係，以了解病毒的引進、本土流行病毒的來源、擴散及分佈情形。

登革熱是目前台灣最重要的蚊蟲媒介病毒傳染病。登革病毒為黃病毒科 (Flaviviridae)，黃病毒屬 (Flavivirus) 的 RNA 病毒，共有第一至第四型不同血清型別的登革病毒。全球每年約有三億九千萬人感染登革熱，五十萬人因登革熱重症住院，兩萬五千人因而死亡。登革熱主要流行於熱帶及亞熱帶地區，尤其是與台灣經貿、旅遊關係密切的東南亞國家，包括印尼、越南、泰國、菲律賓及馬來西亞等，都是登革熱盛行的國家。登革病毒主要由埃及斑蚊傳播，其次是白線斑蚊。埃及斑蚊分佈於台灣北迴歸線以南的各縣市，白線斑蚊則分佈於全台灣。目前登革熱雖然不是台灣本土流行的傳染病，但因每年有大量的境外病毒引入，又因台灣的生態環境非常適合病媒蚊的孳生，容易造成人-蚊-人之間的病毒傳播循環。近 30 年來，台灣幾乎每年都有因境外病毒移入進而造成本土性登革熱的流行，主要流行地區在埃及斑蚊分佈的台灣南部縣市，包括高雄市、台南市及屏東縣<sup>1-3</sup>。

為了追蹤台灣登革熱的病毒來源及傳播情形，疾病管制署對每年境外移入病毒及本土流行病毒建立基因序列資料庫，並分析境外及本土病毒間的演化及親緣性關係，以了解病毒的引進、本土流行病毒的來源、擴散及分佈情形。附表為 1981 年至 2015 年台灣登革熱流行的地區、本土流行病毒株的血清型別、基因型別、來源國家，以及本土及境外移入登革熱病例數。

台灣在日據時代 (1895-1945) 曾有多次登革熱流行的記錄，包括 1915-1916 年、1931 年及 1942-1943 年等有記載的大規模全島性的流

行。第二次世界大戰沉寂了約 40 年後，直到 1981 年在屏東縣琉球鄉爆發由第二型登革病毒造成的流行，估計全島約 80% 的居民受到感染。至 1987-1988 年在南台灣又爆發由第一型登革病毒造成的大流行。從此以後，台灣幾乎每年都有登革熱病例出現。1989 至 2000 年的登革熱流行幅度均不大，每年病例數在 0-329 例間，其中 1990 年及 1993 年為零本土病例。這段期間，流行病毒株以第一及第二型為主，少數為第三及第四型。自 2001 年以後，病例數有逐漸增加的趨勢，每年偵測到的流行病毒株不但數目增加，型別也增多。流行的病毒包括第一、第二及第三型，少數為第四型<sup>4-6</sup>。

台灣在 1987 至 2015 年間的大流行包括：(1) 1987 至 1988 年屏東及高雄地區爆發了以第一型登革病毒為主的流行，確定病例達 4,916 名，病毒來源為泰國；(2) 2001 至 2002 年在高雄市及屏東縣等南台灣地區爆發第二型登革病毒流行，共有 5,563 個登革熱確定病例，252 位重症出血性登革熱病例，其中有 21 人死亡，病毒來源為菲律賓；(3) 2014 年爆發了以第一型登革病毒為主的大流行，確定病例達 15,492 名，高雄市為主要的流行地區，病毒來源為印尼；(4) 2015 年台南市爆發了第二型登革病毒的大流行，高雄市則除了 2014 年跨冬流行的第一型登革病毒外，台南市流行的第二型登革病毒也擴散至高雄市及其他縣市，全國確定病例達 43,423 名，病毒的來源亦為印尼。這些大流行的特徵為病毒皆為越冬流行，冬季時雖然病媒蚊密度較低，登革熱病例數也較少，但登革病毒仍然在南台灣的社區中傳播。除了上述 4 個跨冬大流行外，也發生一些較小的跨冬流行，包括 2009 至 2010 年高雄市第

三型登革病毒的流行，約有 1,400 個病例；另一為 2011 至 2013 年在台南市及屏東縣的第一型登革病毒流行。很意外地，流行的病毒株來源為中南美洲，此病毒株不但在 2011-2012 年台南市越冬流行，2013 年又在屏東縣春日鄉造成一小波流行<sup>7,9</sup>。登革熱的流行主要發生在南台灣，但中部及北部也有少數流行發生，如 1995 年在新北市中和區有第一型登革病毒的流行，共有 179 例確定病例，這是自 1980 年代以來，台灣北部規模最大的流行。此外 1995 年台中市東海大學發現 8 例本土確定病例；1996 年台北市信義區也出現 10 例本土確定病例；2008 年台北市士林區有第一型登革病毒的流行，至少有 20 個確定病例；2010 年新北市五股區有第一型登革病毒的流行，至少有 12 個確定病例；2011 年台北市士林區及大安區與新北市泰山區有第一型登革病毒的流行，至少有 20 個確定病例。

由於國際間往來日益頻繁，藉由旅遊散播傳染病的情形也日漸增多。疾病管制署自 1989 年開始記載境外移入登革熱病例，1989 至 2003 年間，每年境外移入病例數在 10-110 例之間。自 2003 年 7 月，嚴重急性呼吸道症候群 (SARS) 發生的後期，台灣在機場建立發燒篩檢系統，利用紅外線體溫偵測儀篩檢與發燒有關的傳染病，包括登革熱等；由此篩檢措施，約可偵測 40-50% 的境外移入登革熱病例。自 2004 至 2015 年，每年境外移入病例數在 91-365 例間，有漸漸增加的趨勢。境外移入的來源國家以東南亞各國最多，此外也有來自南亞、中亞、太平洋島嶼、非洲及中南美洲等國家。由病毒基因序列比對及分析發現，台灣登革熱的流行主要是因為每年由境外引入登革病毒所引起，由國外來

的登革熱病人被本地蚊子叮咬後，在蚊子體內繁殖，再叮咬並傳播病毒給其他人，進而造成本土的流行。台灣登革熱流行季節約在 4 月至 12 月間病媒蚊密度高的時候。1-2 月因有寒流，若溫度降至 15°C 以下，病媒蚊密度變低，加以適當的病媒蚊防治方法，登革熱疫情通常可在冬季時結束。1981 至 2000 年間，造成本土流行的病毒來源以菲律賓、泰國及越南為主；2001-2015 年間除印尼、菲律賓、泰國及越南外，柬埔寨、緬甸及中南美洲病毒也相繼在台灣流行。分析 1989 至 2015 年間境外移入病毒株，發現東南亞流行以第一及第二型病毒為主，但近年來第三型病毒有增多的趨勢，與台灣流行的狀況相吻合。建立完整的病原體基因資料庫是一種重要的資產，除了對病毒的傳播及防疫有幫助外，對於疫苗、治療藥物開發、致病機轉的研究等都提供極有用的資訊。

2014 年共有 15,492 位本土確定病例，其中 97% 的病例出現在高雄市，為高雄市自二次大戰以來規模最大的流行<sup>10</sup>。這波流行由第一型登革病毒引起，病毒來源為印尼，相同病毒在 2015 年 1-6 月間仍持續於高雄市流行。2015 年共有 43,423 位本土確定病例，主要由第二型登革病毒造成大流行，其中台南市約有 23,000 位確定病例，為二次大戰以來台南市規模最大的流行。2015 年 7 月後，台南市流行的第二型病毒也傳播至高雄市，在 9 月後，也成為高雄市主要流行的病毒株。2014 及 2015 年的登革熱大流行是一警訊，突顯出現有防治措施之不足及未來登革熱在台灣可能成為地方性疾病。登革熱流行幅度的擴大，以及嚴重臨床病例的增加，已成為台灣公共衛生界的重要防疫問題。

台灣登革熱流行的特徵為：(1) 目前登革熱並非本土性傳染病，除少數病毒跨冬流行外，多數病毒是每年經由境外移入，進而造成本土流行，流行在春夏季開始，至冬季結束；(2) 流行主要發生在台灣南部埃及斑蚊與白線斑蚊共同存在的區域，中部及北部因為只有白線斑蚊存在，流行的規模較小；(3) 近年來流行發生的時間提前，每年 4-5 月已開始流行，10-11 月到達高峰，流行季節與病媒蚊的密度及雨季有關；(4) 近年來流行規模有變大的趨勢，與都市化、出國旅遊頻繁、病媒蚊產生抗藥性等因素有關；(5) 由於近年來南部地區大規模登革熱的流行，使二次以上感染之比例增加，未來登革熱重症的病例數也有可能增加，故對登革熱重症的臨床照護也愈重要。

開發登革熱疫苗是預防登革熱最有效的方法，但在理想的疫苗尚未問市之際，主動監測發現登革熱病例及清除蚊蟲孳生源，阻斷人-蚊-人間的病毒傳播循環，是登革熱最主要的防治方法。台灣登革熱流行的主要的原因是由於每年由鄰近東南亞國家引進大量的登革病毒，加以台灣的病媒蚊密度除了在冬季溫度降至 15°C 以下時較低之外，其他季節皆適合病媒蚊孳生，故病毒容易在人口聚集及病媒蚊密度高的地區造成流行。目前疾管署在機場所實施的發燒篩檢可檢驗出 40-50% 境外移入登革熱病例，為一種有效的偵測境外病毒的方法。但仍有許多境外移入登革熱病例，因處於潛伏期或非病毒血症期，以致未能在機場篩檢出。這些境外移入病例在國內發病後，如未發現並採取適當的隔離措施，極有可能被病媒蚊叮咬而造成流行。登革熱病人為病毒的增殖及擴散來源，病人的主動偵測及早期發現，以及醫師的早期診斷及

通報，對疫情的控制有很大的幫助。此外加強衛生宣導徹底清除積水容器及加強自我保護措施、醫師診斷疑似病例時能提高警覺並落實通報、室內外徹底清除病媒蚊孳生源、社區動員營造病媒蚊不易孳生的環境、適時實施化學及生物防治方法等，均有助於避免登革熱的流行。

表一、台灣 1981 至 2015 年登革熱主要流行的地區、流行病毒株的血清型別及基因型別、可能來源國家及歷年的本土病例數及境外移入病例數。

西元年	流行地區	流行病毒株的血清型別	流行病毒株的基因型別	流行病毒株的可能來源國家	本土病例數	境外移入病例數
1981	屏東縣 (琉球鄉)	第二型	Asian 2	菲律賓	> 8,000	-
1987	屏東縣、高雄市	第一型*	I	泰國	527	-
	高雄市	第二型	Asian 2	菲律賓		
1988	南台灣	第一型*	I	泰國	4,389	-
1989	-	-	-	-	16	19
1990	-	-	-	-	0	10
1991	高雄市	第一型	I	泰國	149	26
1992	-	-	-	-	4	19
1993	-	-	-	-	0	13
1994	高雄市	第三型	I	菲律賓	222	22
	台南市	第一型	I	越南		
1995	新北市	第一型	I	越南	329	40
	屏東縣	第一型	II	馬來西亞		
	高雄市	第三型	I	菲律賓		
1996	台北市	第一型	I	泰國	20	35
1997	台南市	第二型	Cosmopolitan	印尼	19	57

西元年	流行地區	流行病毒株的血清型別	流行病毒株的基因型別	流行病毒株的可能來源國家	本土病例數	境外移入病例數
1998	台南市	第三型	II	泰國	238	110
	高雄市	第二型	Asian 2	菲律賓		
	高雄市	第二型	Cosmopolitan	印尼		
1999	高雄市	第一型	I	越南	42	26
2000	台南市	第四型	II	泰國	113	26
2001	高雄市	第二型*	Cosmopolitan	菲律賓	227	54
2002	南台灣	第二型*	Cosmopolitan	菲律賓	5,336	52
	屏東縣、高雄市	第一型	II	印尼		
2003	屏東縣、高雄市	第二型	Cosmopolitan	菲律賓	86	59
2004	屏東縣、高雄市	第一型	II	菲律賓	336	91
	屏東縣	第四型	I	越南		
2005	高雄市	第三型	I	菲律賓	202	104
	台南市	第二型	Asian/American	越南		
	高雄市	第三型	II	越南		
2006	高雄市	第三型	II	柬埔寨	965	109
	高雄市	第三型	II	柬埔寨		
	高雄市	第二型	Asian 1	越南		
2007	台南市	第一型	I	泰國	2,000	179
	高雄市	第一型	I	越南		
	台南市	第二型	Asian 1	越南		
2008	高雄市	第一型	I	越南	448	226
	高雄市	第一型	I	泰國		
	高雄市	第二型	Asian 1	柬埔寨		
	台北市	第一型	I	越南		
2009	高雄市	第三型*	I	菲律賓	886	204
	屏東縣	第二型	Asian 1	越南		
	彰化縣	第一型	I	泰國		
2010	高雄市	第三型*	I	菲律賓	1,591	304
	台南市	第四型	II	印尼		
	高雄市	第二型	Cosmopolitan	菲律賓		
	台南市	第一型	I	越南		
	新北市	第一型	I	柬埔寨		

西元年	流行地區	流行病毒株的血清型別	流行病毒株的基因型別	流行病毒株的可能來源國家	本土病例數	境外移入病例數
2011	高雄市、屏東縣 澎湖縣	第二型	Asian 1	越南	1,545	157
	台南市、高雄市	第一型*	III	中南美洲		
	台北市、新北市	第一型	I	緬甸		
	屏東縣、高雄市	第三型	III	馬來西亞		
2012	台南市	第一型*	III	中南美洲	1,271	207
	高雄市	第二型	Cosmopolitan	印尼		
2013	屏東縣、高雄市	第二型	Cosmopolitan	印尼	596	264
	台南市					
	屏東縣 屏東縣	第一型* 第二型	III Cosmopolitan	中南美洲 印尼		
2014	高雄市、台南市	第一型*	I	印尼	15,492	240
	屏東縣					
	高雄市	第二型	Asian 1	緬甸		
2015	高雄市	第一型*	I	印尼	43,423	365
	台南市、高雄市	第二型	Cosmopolitan	印尼		

\* 跨冬流行之病毒株以粗體字及 (\*) 表示，病毒基因型之分類及命名是依據 A-Nuegoonpipat and others, Twiddy and others, Lanciotti and others, and Klunthong and others 分別對 DENV-1, DENV-2, DENV-3 及 DENV-4 四型登革病毒所發表的文獻。

## 參考文獻

1. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, Ho MS, Lin TH, Huang JH. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis.* 2005; **11**:460-2.
2. Shu PY, Yang CF, Kao JF, Su CL, Chang SF, Lin CC, Yang WC, Shih H, Yang SY, Wu PF, Wu HS, Huang JH. Application of the dengue virus NS1 antigen rapid test for on-site detection of imported dengue cases at airports. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; **16**:589-91.
3. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH. Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; **80**:1039-46.
4. Huang JH, Liao TL, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Kuo YC, Yang CF, Lin CC, Shu PY. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; **77**:903-9.
5. Chang SF, Huang JH, Chen LK, Su CL, Liao TL, Chien LJ, Lin TH, Su CJ, Shu PY. Retrospective serological study on sequential dengue virus serotypes 1 to 4 epidemics in Tainan City, Taiwan, 1994 to 2000. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; **41**:377-85.
6. Lin CC, Huang YH, Shu PY, Wu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Lei HY. Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002-2007. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; **82**:731-9.
7. Chang SF, Huang JH, Shu PY. Characteristics of dengue epidemics in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2012; **111**:297-9.
8. Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; **87**:349-58.
9. Yang CF, Su CL, Hsu TC *et al.* Surveillance and Molecular Characterization of Dengue Viruses in Taiwan, 2013. *Taiwan Epidemiology Bulletin.* 2014; **30**:157-70.
10. Chang SF, Yang CF, Hsu TC, Su CL, Lin CC, Shu PY. Laboratory-based surveillance and molecular characterization of dengue viruses in Taiwan, 2014. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;**94**:804-11.

## 第二節

# 以全球觀點看登革 病毒感染的偵測、 流行病學與防疫策 略

金傳春 詹大千

登革病毒在二次大戰擴張版圖，戰後造成東南亞多國的嚴重流行，南美於 1981 年古巴開始慘重流行，步入東南亞的後塵！如今登革熱已是全球最重要的病毒蟲媒傳染病，流行國數增、病例數升、流行嚴重度也愈演愈烈。為何如此？流行擴大往往起因於流行前的偵測失守，因此由偵測作法，續涵蓋流行的病媒、病毒、人宿主因素，全球與台灣的流行病學特徵與防疫策略之關係及流行預測。

## 壹、前言

登革病毒的感染可從沒病癥的不顯性症狀感染 (asymptomatic infection)、病毒症候群 (如兒童的類流感或成人的消化道病癥)、輕微的登革熱 (dengue fever) 至嚴重的登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever, DHF)、登革休克症候群 (dengue shock syndrome, DSS) 及死亡。世衛組織 2009 年以登革重症取代登革出血熱 / 休克症候群。由於學童感染登革病毒多為不顯性感染，但所帶的登革病毒仍可被病媒蚊叮咬傳播而引發後續感染<sup>1</sup>，造成防疫死角困難；換言之，登革熱的流行病學必須涵蓋登革病毒的感染，不能僅看病患的流行病學。

流行病學數據的正確性與偵測系統的良窳有關，由其分析結果再至高風險區而針對高危險群強化偵測，得更精準數據，供其後評估防疫策略及防疫單位改進之參考。因此本章簡述登革偵測、全球與台灣的登革病毒感染流行病學及其對防疫策略的啟示。

## 貳、登革偵測

### 一、台灣與全球的登革偵測問題

六種登革偵測各有優缺點，簡述如下：

1. 臨床偵測 (clinical surveillance)：最常被廣用，許多東南亞盛行國家僅通報登革出血熱與嚴重病例，台灣自 1987 年起不論是輕症的登革熱與重症的登革出血熱均要求醫師通報，但病人發病頭幾天去診所求醫的病癥多不典型，往往待病人至第二、

三家醫院才確診。這段逛醫院、診斷不確定時間，加上感染不發病者，恰提供病毒四處傳播良機，此為 2015 年五月台南跳蚤市場偵測的瓶頸。因此應教育流行區民眾盡早求醫、穿長袖衣褲與在家自主隔離、噴防蚊液等防蚊法；政府未來宜定期檢驗市售防蚊液的成效與訂定規範。2003 年嚴重呼吸道症候群 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 流行後，台大傳染流行病研究室、台大醫院急診科、國衛院、台北市衛生局及疾管局合作研發醫院急診症候群偵測系統 (Emergency Department Syndromic Surveillance System, ED-SSS)<sup>2</sup>，依此經驗，未來要研究兒童、成人、老人三年齡層網路版的登革症候群偵測系統，涵蓋門急診，以提早偵測，希望患者與其家屬及醫護人員務必記錄發病者不同發病日的各病癥，再配合採檢與實驗診斷，邁入人人防疫的新紀元，將有助於提早發現登革熱病例。

2. 病毒偵測 (virological surveillance)：了解哪一血清型登革病毒致禍，甚至基因型與病毒基因序列比對，此在疫情之初，能知登革病毒來自何處，極為重要，但須經病人同意才可採血，且發病過晚或出疹後採檢，病毒量低而難測得。過去困難是病毒偵測的敏感度低，如 1987-1988 年疫情病例多時，流行區的後期病例不進行病毒分離；病例數高時而不做分子檢測 (polymerase chain reaction, PCR)；2015 年大流行時，用 NS1 快篩及早診斷，而非分子檢測致當時的病例多不知其病毒型別；另 NS1 在登革病毒二次感染宜搭配登革抗體檢測，且 NS1 陰性，須用他法確認 (成大醫院王貞仁老師與國際結果顯示 NS1

與 IgM 合併快篩，準確率可達 80%-90%)。近年，分子檢測病毒量 (real-time PCR, qPCR) 不僅有助偵測，也有臨床早妥處置之效，因病毒量高與病例嚴重度相關<sup>3,4</sup>。另病媒蚊的登革病毒分離率低，也是瓶頸之一。病例多時，病毒偵測重點在：(1) 境外移入病例，(2) 疫地的首發與頭幾個病例，(3) 群聚病例，(4) 越冬病例；以確知 (1) 與 (2) 病毒型別、基因型及其來自何國或台灣何處；至於群聚病例多發生在埃及斑蚊分佈處，此蚊敏感度過高，稍一打擾即停吸血，但沒吃飽而易馬上再叮咬周遭的人，此多重吸血叮咬行為 (multiple biting behavior)，易擇選病毒複製力強而毒力高的登革病毒株<sup>5</sup>，所以有助於明瞭人致病與流行趨於嚴重之病毒機轉。越冬病例對次年的流行之初研判是續前面的流行或另有來源，至為重要。

- 血清偵測 (serological surveillance)：可探查誰已感染而不發病、不顯性感染率及病毒的活躍處，缺點是價昂，且若當地已四處延燒，患者被打擾數次而不願配合抽血；另 2009 年流行時，血清偵測一採為登革病毒 IgG 抗體陽性即判為 dengue (+)，此在常流行地區易「偽陽性」的患者居家也會被噴藥，造成地方官員與居民的苦惱，配合度更低。近年經費緊縮與人民意識高漲，所以單一病例周圍半徑 50 公尺與群聚病例四周半徑 100 公尺的擴大疫調血清偵測，難確實推動而效果受限。因此，血清偵測多用於：(1) 疫情發生時的前瞻追蹤感染者，即衛生單位的擴大疫調與半主動偵測 (semi-active surveillance)，以察覺登革病毒感染而不發病或輕微病癥者；及 (2) 在已流行疫區，回溯

明瞭登革病毒感染者的盛行率、發生率及危險、保護因子、評估防疫成效及探察是否已進入「地方性流行」，以預測「未來流行的潛力」<sup>6-10</sup>。

- 病媒偵測 (entomological surveillance)：常用容器指數、住宅指數、布氏指數與布氏密度等級；另有幼蚊指數、蛹指數及成蚊指數 ([http://ftp.klps.kh.edu.tw/topic/91\\_03/me.htm](http://ftp.klps.kh.edu.tw/topic/91_03/me.htm))。布氏指數預測人的疫情有限，容器與住戶指數也無法反映蚊密度，又未必每週所有高發區里均有數據，致其在流行病學應用有所侷限；蛹指數預測佳，但耗人力。最重要的成蚊指數難得到，且蚊有隱藏處，未來需更妥的蚊指數與抽樣作法。
- 環境偵測 (environmental surveillance)：新加坡是每年公布環境調查的重要戶內與戶外病媒孳生源，供民眾防疫。高雄市衛生局近年也如此努力。蚊孳生源的容器種類多而因地不同，無國際標準，未來若能加入環境偵測數據與氣候指數，對預測愈佳<sup>11,12</sup>。
- 社會偵測 (social surveillance)：了解疫區居民對登革病媒的了解與防治意願配合度，即公共衛生的知識、態度、行為，此在不同流行區與不同年層之疫訊管道來源有所差異，是防疫由民眾動手成敗的主要關鍵。2015 年台南高雄疫情大，官員清除孳生源，民眾卻袖手旁觀，所以從小教育做起，認識不同昆蟲及其習性，並鼓勵學童回家清除孳生源，影響家人齊力動手防治。

## 二、登革偵測的未來努力方向

一旦登革確定病例出現，馬上展開流行病學調查，察尋患者的住家、學校、工作地及曾過往處是否有其他類似病例，並採血驗證，以流行病學相關性追尋真正的「感染源」（蚊孳生處，如今年台南跳蚤市場的屋簷與貨櫃屋）而趕緊清除。此半主動偵測加上 2003 年新增的機場發燒偵測，顯示台灣的登革偵測是每環節佈網。未來若能將不同偵測系統整合，即哪個時間點、何情況下與哪種偵測系統整合，更能「提早」偵查登革病毒，最符合公共衛生的「預防效益」，即迅速推動衛生教育、風險溝通與清除病媒孳生源，將總病例數、嚴重與死亡病例降至最低。

台灣是全球第一篇發表以地理資訊系統推動登革偵測與流行病學探究<sup>13</sup>，也是全球首度發現登革出血熱的流行病學條件<sup>14</sup>。若在瓶頸處，以不同的登革偵測系統互補整合，加上台灣大多流行單一血清型登革病毒，在疫情尚未複雜化之前（即 2016 年為關鍵年），集才能之士，眾志成城，讓台灣的登革整合偵測供他國學習參考。

## 參、全球登革病毒感染的流行病學

由於交通便捷、都市人口成長快而難在水資源與垃圾、廢物處理妥當，加上病媒蚊的殺蟲劑抗藥性、全球暖化、極端氣候、動員疫區居民行為改變困難及成功防治不易，全球的登革熱病例數、登革熱重症病例數與死亡數均不斷增加，尤其近幾年因旅遊者帶病毒，造成跨國傳播已是防疫的最大困境，如 2014 年日本、2015 年美國夏威夷與

近幾年歐洲的登革熱流行均導因於輸入病例。即登革病毒感染的流行病學須以全球眼光明瞭來龍去脈，從而體認未來台灣在全球防疫可著力貢獻處。

### 一、全球流行病學

全球的登革流行病學可概分為五類：

- (1) 散發病例 (sporadic cases)：多自疫區輸入病例，但當地尚未有大量合宜的病媒蚊，如 2015 年的台北市登革病例全來自台南與高雄。
- (2) 爆發流行 (outbreak)：尚未有經常流行致群體免疫力 (herd immunity) 低，待登革病毒侵入，而當地又有較多斑蚊促爆發流行，如 2015 年台南的登革流行。
- (3) 每年季節性流行 (epidemic)：每年均有本土登革病例，且由某區擴散至另區，如高雄市近十年的每年登革流行。
- (4) 地方性流行 (endemic)：登革病毒已在當地終年流行，顯示兒童的登革出血熱與嚴重病例。
- (5) 高度地方性流行 (hyper-endemic)：比 (4) 的病例數更多，登革病毒在當地的流行已佔上風，且見兒童同時感染兩不同型別的登革病毒。

(4) 與 (5) 可見多種血清型的登革病毒在當地同時流行 (multiple serotype co-circulating)，致流行病學更為複雜。最重要的是 (4) 與 (5) 較易見嚴重的登革病例，且重症多為小於 15 歲，即 15 歲以下幼童處於兩極端，包括不顯感染與重症。台灣多數流行是某型為主，少此現象，所以昔美國學者認為多血清型登革病毒同時出現，是登革出血熱

的先決條件，此與台灣的流行病學觀察並不符合。南台灣現正處於 (2) 與 (3)，而北台灣較多 (1)，主因埃及斑蚊分布在嘉義布袋以南。台灣在 2015 年台南流行時，首遇近百名左右兒童病例，成大醫院初步分析得其中約 10% 為重症，顯示目前我國處於關鍵時刻，必須嚴密防杜登革熱邁入「地方性流行」。

## 二、影響登革病毒傳播的因素

由流行病學的鐵三角——病毒、宿主、環境來分析，可知登革熱是社區的環境衛生病。其中病媒與環境的關係最為樞紐。

### (一) 病媒

#### 1. 天氣因子與病媒蚊密度影響登革熱的發生率

##### (a) 溫度

溫度影響病媒蚊的分布、吸血活動、病毒在病媒蚊的複製多寡、體外潛伏期 (extrinsic incubation period, EIP) 長短及成蟲的壽命。埃及斑蚊在 16°C 以下不易傳播登革病毒，但在 20°C 以上可傳播，所以登革熱成為重要的夏季傳染病。防治佳時，登革病例在入冬前即甚低，如 2015 年 11 月台南的成功防控；相反地，若低溫仍見登革病例，顯示登革病毒在此處越冬，若次年乾燥，極可能發生高雄 2001~2002 年的跨年大流行。有趣的是熱帶菲律賓的太高溫會限制病媒蚊活動，與台灣的冬季低溫迥異。

另在低溫地，如哥倫比亞 2000 公尺高山、墨西哥

高處及位於喜馬拉雅山脈的尼泊爾均見登革病例，顯示埃及斑蚊在高處屋內可存活而引發流行。此外，全球化確實助長登革熱在溫帶的流行，即只要是斑蚊可到處所，人的病例仍可發生<sup>15</sup>。

### (b) 雨量

登革熱的季節性流行另一因素是與當地雨季有關，尤其是戶外生活的白線斑蚊，所以高溫多雨兩條件促使登革熱在東南亞國家常發生在梅雨季之後。新加坡 2000~2010 年當溫度自 25.5°C 升至 28.2°C，而累積雨量是 60 mm 增至 150 mm 的 3~4 個月後，可見登革病例數攀升達五個月<sup>16</sup>。

### 2. 流行地的環境條件

上述兩條件先由流行時間探其規律性，再看流行地的相同流行病學特徵，有助於尋覓重要的流行因素；如高雄登革熱常流行區是在三民、前鎮、鳳山區，而台南登革熱常流行區是在北區；換言之，哪些條件有助於斑蚊生生不息在這些地區致禍？又人口密度高與低兩不同地的流行條件是否有所差異？

至於是否病媒蚊密度達到某一閾值 (threshold) 指標，才會流行，目前知蚊子布氏指數 2 以下仍流行，新加坡 2005 年斑蚊密度已十分低 (總計 1.15%)，第一型登革病毒仍流行，發生率為每十萬人口有 322.6 位病例，致死率為 0.19%<sup>17</sup>，尤其在多人住的組合屋較公有或私有公寓為

高(斑蚊密度各為 2.28%、0.33% 與 0.8%)。

需多少雌成蚊密度會造成流行?泰國流行處一房間有 20 隻雌成蚊,而波多黎各 1991 年流行是一房子有 5~10 隻雌成蚊,尤其是平均每人有超過 1.5 隻雌埃及斑蚊是有顯著意義的危險因子;然居住處未必需許多隻雌蚊才造成流行,馬來西亞一旅社 20 人感染,只抓到 3 隻雌斑蚊,印度有 74 房舍的 43% 居民得登革熱,卻只抓到 3 隻雌蚊;此結果同哈佛大學斯匹爾曼教授(Dr. A. Spielman)認為蚊卵聚集的營養競爭等因素,會影響蚊體大小與其後流行。最近巴西的蚊實驗恰證實在較少蚊卵競爭孕育的雌蚊壽命長,也較易傳播登革病毒<sup>18</sup>。

### 3. 斑蚊習性

埃及斑蚊的飛躍距離在都會區受限而小於 25 米(此蚊多處,易見「群聚病例」),至開放環境可每日飛行 2.5 公里。台灣的半主動血清偵測是一位病例以半徑 50 公尺去找其他病例(群聚病例是半徑 100 公尺),即考慮斑蚊飛行範圍。

東非村落或泰國鄉下的雌埃及斑蚊吸血處多為鄰近區,前者是多數雌蚊只去 1~2 家吸血,僅 0.7% 雌蚊會光顧 5 家;後者顯示 10~13% 吸血蚊是吸入多於 1 個人的血,且吸年紀大人的血是多於小於 25 歲人的血,有些人被多次吸血!所以雖降低蚊群隻數,但只要有埃及斑蚊與帶病毒者,傳染鏈仍會持續而病例數易速升。

斑蚊可由不同交通工具散播病毒,如由汽車輸入邊界國,藉火車致泰國登革病例沿鐵道分布<sup>19</sup>;埃及斑蚊自非洲坐船入美洲、亞洲,斑蚊經船運而散佈祕魯亞馬遜地區與菲律賓<sup>20</sup>;1965 年經廢輪胎自美國入薩爾瓦多。1980 年代後,航空興起,斑蚊也搭飛機,在高空機艙中活存,加速廣布登革病毒。雖埃及斑蚊喜在近屋舍的容器,且多呈現住家的空間聚集與流行地的群聚病例,尤其是其 100 米附近兒童的感染危險性在頭幾天較高,但此焦點現象很快隨著蚊與人的移動及當地群體免疫力而改變,因此描繪登革流行的任何數理模式(mathematical model),必須奠基在徹底明瞭當地的流行病學<sup>21</sup>。

其他如斑蚊的壽命、活存率及吸血至產卵的生殖營養週期(gonotrophic cycle)均影響登革病毒的傳播;其壽命也與溫濕度及營養有關<sup>22</sup>。雌埃及斑蚊在東非自然界可活 9~42 天;吸血甚達 100 天(平均 55.6 天),在熱帶吸完人血可傳播登革病毒 75 天<sup>23</sup>。

白線斑蚊雖是戶外蚊,未必如埃及斑蚊要吸人血(表 1),但仍有傳播登革病毒能力,吸血後可飛至 3 公里處,傳播更廣遠,在熱帶郊區與非埃及斑蚊存在的歐洲溫帶,導致本土登革病例<sup>24</sup>。

表 1 比較登革熱主要兩病媒蚊 (埃及斑蚊與白線斑蚊)

生態習性	埃及斑蚊	白線斑蚊
台灣分布地區	嘉義布袋以南	全島均有
幼蟲孳生積水容器	人工積水容器如花瓶、水盤、廢輪胎、馬桶等	除人工容器外，亦出現於樹洞、竹筒等天然容器
生長環境	主要分布在城市	主要分布在市郊
成蚊食性	嗜吸人血	除人血外，動物血亦可
成蚊習性	主要住於室內暗處	主要居於室外
雌蚊吸血習性	較敏感，易因騷動中斷吸血	一次吸飽血
雌蚊吸血時間	上午10:00~12:00， 下午2:00~4:00	上午10:00~12:00， 下午2:00~4:00
飛行能力	飛行力不強	飛行力較強
成蚊壽命	30天	14天
適應溫度	較不耐寒	耐寒

## (二) 病毒

四型登革病毒中，第一型在全球與台灣最為廣布，流行頻率也最高，第四型最低，而第二型、第三型較易引發登革出血熱與重症病例，在台灣又以第二型造成的流行最為嚴重<sup>25</sup>。

愈來愈多的證據顯示登革病毒的二次感染未必導致登革出血熱。秘魯發現第一型登革病毒感染後經過第二型登革病

毒的二次感染，並沒有出現登革出血熱<sup>26</sup>。換言之，即使二次感染，也和此後面感染的病毒株有關；經分析發現東南亞基因型的第二型登革病毒在 E 蛋白第 390 個胺基酸 (E-390) 是 N，與美洲基因型在 E-390 位點的胺基酸是 D 不同<sup>27</sup>。然 1997-2000 年委內瑞拉流行的登革熱與登革出血熱，發現此兩種病人並沒有一致性的胺基酸變異，而亞洲的第二型登革病毒也有類似情形。既然無一致性的變異，那麼是否與源頭的病毒有關？

分子流行病學以演化樹分析，提供病毒起源處，有助於分辨病毒源於本地上一波流行，或是國外入侵，也能明瞭此病毒的演化方向、擇選壓力、病毒動態變異與其未來「流行潛力」(epidemic potential) 之關係<sup>13,28</sup>。在台灣、印尼、尼加拉瓜等國均發現同一血清型的登革病毒在不同時、地，有其不同的病毒變異株 (virus variants)；且有時某演化支系或基因型在某年不見了，卻由另一演化支系或基因型的登革病毒所取代<sup>29</sup>。新加坡是航運轉運站，在 2008 至 2010 年間有多次不同的登革病毒入侵，造成病毒多元化<sup>30</sup>，至於在此大都會人口密集，哪些病毒被淘汰，而又哪些被保留的擇選機制，至今仍不清楚。

為什麼同血清型的登革病毒某幾年在某地會大流行而另幾年在他地則否？即登革病毒「流行潛力」(epidemic potential) 的不同。如 1981 年古巴發生第二型登革病毒導致的 10,312 病例與 158 人死亡；1989 年後第二型與第三型始

在南美洲橫掃多國。1989年10月至1990年4月在委內瑞拉也發生第二型登革病毒的嚴重流行，造成6000登革出血熱病例與73人死亡。分析發現古巴與委內瑞拉的第二型登革病毒均源於東南亞<sup>3,31</sup>。即自1950年代流行於東南亞的第二型登革病毒基因型已較原南美自1980年代始流行的第二型登革病毒基因型更易引發嚴重的登革出血熱，是否因前者的複製量高而經多次流行篩選出優勝且毒力高的登革病毒及其篩選的機制，至今仍是謎。

對於是何種宿主或環境或兩條件下促登革病毒分子的變異而影響臨床與流行的嚴重度，至今仍不清楚。然委內瑞拉在1993-1997年由第二型登革病毒株Ven2引發的流行，僅出現登革熱，但後來即被取代而有愈多的登革出血熱，是否意謂着無論是境外入侵或本土的不同第二型登革病毒株群聚一堂，足以從中選擇毒力更高的病毒株而引發其後更嚴重的流行？

泰國<sup>32</sup>與台灣<sup>33</sup>的分子流行病學研究，均發現同第二型的不同登革病毒株在同流行期會競爭，若其源於共同祖先病毒，更易加速演化而成為毒力較高的病毒株致引發較嚴重的流行，當病毒變異度愈大時，愈易篩選毒力高的病毒<sup>34</sup>，此顯示導致嚴重登革出血熱的病毒株是否已歷經多年與多地流行的演化而成戰勝者？此與1970年代太平洋島、印尼等地的早期研究結果相一致<sup>35</sup>，即源於東南亞的第二型登革病毒入牙買加後造成古巴1981年的嚴重流行<sup>3,31</sup>；另亞洲斯里

蘭卡的第三型登革病毒1944年入尼加拉瓜後，也造成美洲的嚴重流行<sup>35</sup>。

近年以全病毒基因序列及次世代定序(next-generation sequencing)檢視登革病毒在人與蚊不同宿主傳播的動態變化<sup>36</sup>，發現>90%的單一核苷酸變異病毒株(single nucleotide variants, SNVs)自人傳至蚊時已不見了，自蚊中腸至唾腺也消失，即歷經多波流行而仍存留的新登革病毒變異株，是在持續傳染鏈存活的常勝軍。

古巴研究2001-2002年的第三型登革病毒流行，發現嚴重徵狀的病人大多是二、三次感染；而登革病毒的變異量隨着流行拉長而增<sup>37</sup>；在流行中後期可見少許(>1% minor population)登革病毒E與PrM基因出現有意義的變異(non-synonymous mutation)，導致胺基酸改變；在同一位二次感染的病人雖只隔兩天，發現其體內有>1%的病毒在E與PrM蛋白和非結構性蛋白NS5卻出現很大且有意義的改變。

綜言之，登革病毒的變異與擇選必須結合流行病學與病毒群體來剖析其隨着流行演變之動態變化。

### (三) 人宿主

#### 1. 家戶傳播

埃及斑蚊的多食行為與飛行短距，在其分布區常見「家庭群聚病例」。研究指出波多黎各單人的9家戶全無登革病例；但在有2~4家人的57家戶中，至少有1位

登革病例 (共 61 病例); 5~9 人家人數的 69 戶中, 高達 76.8% 至少有 1 位登革病例, 說明登革熱同麻疹, 有隨著家內人數而增病例之趨勢。另 5 位宏都拉斯家人感染中, 4 位在 4 日內發病。越南一島上浮動村的 111 家戶研究, 發現在半徑 20 米的 4 天內感染危險最高<sup>38</sup>。台灣及泰國研究顯示登革出血熱的家庭群聚更高<sup>4</sup>。此說明社區動員在防治登革熱之重要性。

## 2. 人移動傳播

近距離的人移動, 包括就學處、工作地 (如高雄與台南市鄰近區常相互傳播)、人群往來處 (如車站、市場、公園)、大型蚊媒孳生處及外勞 / 外配群居處的社區傳播; 尤其人群聚集處比居住處對後續的廣泛散播更重要<sup>39</sup>。因此, 感染者將登革病毒傳播至未感染蚊或帶登革病毒的蚊感染人, 在人群聚集與病媒密度高處兩者均可造成綿延不斷的傳遞鏈。

在泰國、馬來西亞疫情失控時, 城市往鄉村 (易感受族群多處) 散播, 且兒童發病而未保護者及自疫區回來軍團旅客, 扮演傳播要角。

## 3. 其他重要傳播

疫區的輸血傳播, 警示不必要的輸血可減少此類傳播。另登革病毒懷孕期子宮內的傳播 (in utero transmission) 遠小於茲卡病毒。

綜言之, 只要有沒抗體的易感族群存在, 一旦登革病

毒入侵, 即會引發流行。至於多少人數可維持連續不斷的傳播, 尚有待研究。

## 三、登革熱的全球流行病學特徵

### (一) 流行時間

1950 年代, 東南亞諸國首先接連爆發登革熱流行而迄今從未中斷<sup>40</sup>; 因旅遊貿易漸興盛, 於 1990 年代在原未有登革熱或已控制區的委內瑞拉、哥倫比亞、古巴、巴西、夏威夷等地爆發流行。當登革熱在東南亞流行 63 年而在南美流行 35 年之後, 許多地區已是「地方流行」, 所以登革出血熱等嚴重病人數增。

登革熱在東南亞的流行多與季風的雨季有關, 在菲律賓等熱帶國, 高溫是病媒蚊的限制因素, 但在台灣卻是連續冷風低溫在 18°C 以下, 限制了 1998 年第三型登革病毒在台南的跨年流行<sup>13</sup>。

### (二) 流行地區

在南北緯 30 度適斑蚊區是主流行地, 以東南亞和南美洲的流行較為嚴重, 且自 1970 年代至今四十多年有流行愈趨嚴重的趨勢。然隨著全球暖化與旅遊, 登革熱在日本、夏威夷、歐洲等溫帶流行, 且自都市往鄉村散佈。

### (三) 流行嚴重度

為何登革出血熱等嚴重病例僅在某幾年流行? 是眾所關注的科學議題。二次世界大戰與戰後的日本兵與聯軍行

軍，帶著登革病毒擴張流行區；戰後貧瘠都會區的供水與廢物處理未建置，讓埃及斑蚊擴其版圖，大量湧入人口，恰成為登革病毒的易感宿主，在此連續不斷傳染鏈之下，終於 1953~54 年於菲律賓馬尼拉爆發亞洲首度的登革出血熱流行，兩年後的馬尼拉又發生第二波的流行，至 1958 年泰國曼谷爆發第三次的登革出血熱流行，而回溯探究發現當地在 1950 年代已流行了一陣子而未被發覺。此後，每隔 3~5 年可見東南亞有登革熱流行，且至 1980 年代病例數愈來愈多，流行幅度變大，流行版圖也增廣，印度、斯里蘭卡、中國均受波及，模範生的新加坡也不例外。

二次大戰埃及斑蚊擴大地盤，太平洋諸島在 1942~45 年均均有第一型登革病毒流行。因海島隔絕，其後病例數少，直至 1964 年大溪地發生第三型登革病毒導致的登革熱流行；有趣的是此型登革病毒在 1969 年又出現流行，顯示登革病毒可在此島存活 5 年。1971 年尾在斐濟與大溪地幾乎同時發生第二型登革病毒的登革熱流行，次年元月又波及新喀里多尼亞 (New Caledonia)；三月流行至紐埃島 (Niue)，六月已延燒至美屬薩摩亞 (Samoa)，1974 年四月東加王國及太平洋中、南、西區諸島流行。1975 年，第一型登革病毒再度駕臨，同第二型快速席捲太平洋不同島嶼。1979 年有第四型與 1980 年有第三型入侵。這些島嶼的不同流行嚴重度開啟了病毒研究。例如：為何 1972 年第二型登革病毒在紐埃島的 4600 人口中，卻造成 90% 的感染與 12 人死亡，且有

些病例是第一次感染，隨著流行拉長，病例愈趨嚴重，且病毒分離率高<sup>41</sup>；然 1974 年第二型登革病毒在東加王國卻是靜寂傳播，病例少而輕微，病毒分離率也低。

2001~2008 年第一型登革病毒再度橫掃太平洋島，2012 年來自東南亞此型的第 I 基因型與原太平洋島的第 IV 基因型病毒同時在新喀里多尼亞流行，即同血清型登革病毒以不同基因型而延長流行時間。2008 年第四型首度出現登革病毒，2009 年第一、四型登革病毒同時流行，2010 年第一型登革病毒仍作怪，但第四型已消失，2011 年沒登革病例卻出現屈公病例。2012~13 年發生嚴重的大流行，可見第一型在此島流行多年尚未引發夠高的群體免疫力，或因易感族群增，致同血清型登革病毒流行較久。換言之，島嶼的流行病學與病毒的演化分析，可知不同血清型別與基因型別的登革病毒在同地的動態變化。

流行愈嚴重區：(1) 重症病例以兒童為主，(2) 四型登革病毒活躍，(3) 多為埃及斑蚊分布區而甚難成功滅絕。全球流行病學發現若某地原為白線斑蚊而被埃及斑蚊取代，重症病例數會增。

#### (四) 其他重要流行病學特徵：

##### 1. 年齡

蟲媒傳染病初流行時，發病者在各年層；然流行在地化時，新感染者與發病者多為幼童；所以東南亞等地方性流行國家學童感染登革病毒呈現登革出血熱或不顯性感染

兩極端，若幼童登革出血熱病例增時，代表登革病毒在當地流行有趨於在地化的前兆；而台灣現今登革熱輕症與重症均仍以成人為主，顯示尚未進入地方性流行<sup>13</sup>。

### 2. 輸入病例

菲、泰、越、寮、印尼自二次大戰至今飽受登革威脅，且愈演愈烈。台灣的登革流行多始於旅客自東南亞疫情國帶病毒而輸入。

### 3. 其他感染

登革病毒可同時伴隨其他感染，甚而引發惡化的免疫病理<sup>42</sup>。近幾年，美洲及太平洋島常見登革病毒與茲卡及屈公病毒同時流行。

綜言之，近年全球暖化與氣候變遷，適病媒蚊生長，登革熱爆發的風險逐增；聖嬰現象發生年(1998、2001~2002、2006)的東南亞登革疫情常居高，影響台灣該年登革病例數也較高。此外，台灣解嚴後，國際貿易與跨國旅遊增，升高自東南亞登革的「地方性」或「高度地方性」流行區境外移入病例點燃台灣本土疫情的機會。據世衛組織，在2000~2008年間東南亞共有1,020,333登革出血熱確定病例，柬埔寨、越南、馬來西亞和菲律賓為主流行國，而在東南亞爆發流行年也常見台灣主要流行病毒株與東南亞類似。在台灣所屬的西太平洋區近幾年登革威脅仍持續上升(2012年356,838病例較2011年的244,855病例為高)，其中以高棉、菲律賓、寮國較嚴重，而太平洋島嶼中，紐埃島和與台灣有邦交的馬紹爾島的流行較高。

## 四、登革出血熱流行病學研究的學術爭議

登革熱的流行病學研究是多年探察登革熱、登革出血熱和登革休克症候群此三類或僅登革熱與登革出血熱二類病例有何不同，然此與流行時的人蚊人傳播之自然規律迥異；加上學界兩派各執己見而停滯不前。

一派是夏威夷大學的里昂·羅森(Leon Rosen)教授在太平洋島的登革熱流行觀察，發現同一血清型的登革病毒在不同年代的不同太平洋島，卻有輕、重度不同的流行，因此提出因「病毒毒力(viral virulence)差異」的「一次感染(primary infection)假說<sup>43</sup>，即不同登革病毒株的毒力差異，造成某年在某島的登革出血熱病例數多，而另些年在他島卻非如此，不需經二次感染。雖然他已發現自登革出血熱重症病例分離的登革病毒株較登革熱輕症病例分離的登革病毒株在蚊內複製量高(higher level of viral yield)，但仍難在人體清楚定義「病毒毒力」。

同校的史考特·郝斯德(Scott Halstead)教授在泰國的登革熱流行觀察，發現先感染第一型而後感染第二型登革病毒，易造成登革出血熱；但自第一次至第二次感染有間隔時間，致第一次感染的抗體量降至無法中和之後，再感染「異血清型」(heterologous serotype)的登革病毒，卻因前次感染產生的抗體攜帶此異型的登革病毒入人血大量繁殖而增病毒量，此為「二次感染」(secondary infection)的假說<sup>44</sup>。雖然他由體外細胞實驗證實加入稀釋倍數高而無法中和的首次感染登革病毒抗體會增其後異型登革病毒的病毒量，但此仍為體外實驗而說服力低。

1977年古巴發生第一型登革病毒僅導致輕度的登革熱流行，至

1981 年第二型登革病毒卻引發嚴重的登革出血熱流行，郝斯德教授因此認為間隔四年是必要，此時「二次感染」假說佔上風。有趣的是古巴在 1997 年又發生第二型登革病毒的嚴重流行，所以間隔四年未必是導致登革出血熱流行的充分必要條件！然四型登革病毒兩次不同感染 12 種組合中，如何解釋僅第一型先而第二型在後的嚴重病例數較多？又如何說明有些人得兩次不同血清型別登革病毒的感染卻無嚴重病癥？

近年病毒與免疫學者明瞭哪些登革病毒的抗原決定基 (epitope) 有保護作用，而另些卻更易拉入後感染的異型登革病毒，快速提升病毒量而致禍，但至今尚無定論。事實上，徹底探察每次流行的自然規律，才符合科學精神。

## 肆、台灣登革病毒感染的重要流行病學特徵

### 一、台灣登革流行史與流行相關因素

東晉曾有此疾。在 1900-1943 年日治期，台灣由 1903 年的少數病例，至 1915、1931 與 1942-43 年三次的全島大流行。

1965 年瘧疾撲滅後，登革熱因解嚴而於 1990 年代後竄起，成為台灣最重要的蟲媒傳染病，而台灣登革防治依重大政策與當時的防疫組織，概分四期 (表 2)<sup>45</sup>。

#### (一) 自然發生期 (1943~1949 年)

台灣的登革出血熱嚴重疫情最早溯至 1922 年澎湖縣，而本島是 1931 年爆發流行，1943~1945 年南洋戰爭造成登革病毒的跨國流行，感染人數激增，台灣為了戰爭炸彈燒民房的快速滅火而家家戶戶儲水，滋長了斑蚊，終致該年爆發

全島登革出血熱流行<sup>40</sup>。

#### (二) 戒嚴期 (1949~1987 年)

民國 38 年台灣戒嚴而在東南亞登革疫情深重時未被波及，1950 年代始瘧疾撲滅計畫，以 DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) 殺蟲劑室內殘效噴灑，恰壓制埃及斑蚊，全島為登革清淨區近 38 年<sup>46</sup>。

1981 年屏東小琉球首度突然爆發二次戰後的不明原因熱，患者出現後眼窩痛、紅疹、骨痛等症狀，當地醫師不知何病，而一名病患至台北馬偕醫院就醫時，醫師懷疑為俗稱「天狗熱」的登革熱。流行病學調查發現當地 71 位漁民曾赴有四年第二型登革病毒疫情的菲律賓而帶回病毒，加上當地缺自來水系統，民眾儲水滋長病媒蚊造成全島 80% 民眾感染，至少 12,500 病例，但未詳載嚴重病例<sup>47</sup>。

#### (三) 解嚴後的環境整治期 (1987~1998 年)

1987 年 7 月台灣解嚴後，9 月東南亞的第一型登革病毒悄登屏東東港，次年蔓延至大高雄及台南；首度引發台灣本島此三地的大流行<sup>46,48</sup>，醫院人滿為患，醫界始明瞭妥善處置登革病人之重要，因流行區的後通報病例不檢測，總病例數至少六千以上，然僅兩位登革出血熱病例。自此衛生署預防醫學研究所與環保署擬定防治登革熱，以環境整治為主要策略，包括社區動員、孳生源檢查與緊急噴藥、生物防治及半主動偵測，台灣登革疫情獲得控制。

1994 年高雄出現首位兒童登革出血熱病例 (由第二型登

革病毒引發)，為避免其後兒童受波及，政府積極防治。

1995 年，台北縣（現新北市）中和市發生第一型登革病毒流行，179 位病例，證實白線斑蚊也能致生疫情。

在 1990、1992、1996、1997 年共四年出現本土病例低於境外移入病例，1990 年更出現本土零病例<sup>48</sup>；顯示每年四月前積極防治，可預防其後大流行。

#### （四）衛生防疫期（1998 年～）

1998 年泰國與印尼流行第三型登革病毒，台灣政府鼓勵南進，果然台南發生此型導致的流行，恰與泰國的第 II 基因型有關，幸快控制，共 142 病例，家戶調查得 23 位登革出血熱病例與 1 人死亡。該年因第 71 型腸病毒流行，疾管局成立，登革熱自此轉為快速噴藥為主要防治措施，較忽視環境整治。

2001-2003 年高雄縣市與屏東縣爆發近 60 年來最大規模的登革大流行，源於菲律賓的第二型登革病毒都會基因型 (cosmopolitan genotype) 侵入，共計 5,649 總病例，家戶調查共 253 位登革出血熱與 21 人死亡，是解嚴後首次最嚴重的登革出血熱流行。主肇因於 2001 年尾高雄前鎮區與鳳山市交界處登革病例群聚流行久，暖冬致斑蚊未被完全壓制，續擴散，次年暑流行加劇，衛生單位噴藥多次致埃及斑蚊有抗藥性，疫情失守。此時台大首用地理資訊系統呈現病例散播的空間變化<sup>49</sup>。值得思考的是，為何如此多不同第二型登革病毒入侵中，卻是都會基因型佔優勢而成為後來主要的流行病毒株？

2003 年嚴重呼吸症候群 (SARS) 流行，登革熱病例最少 (86 位)。

2004 年起，前一年啟用的發燒篩檢正式納入機場檢疫，期望在機場即發現大部分的登革病患；另 SARS 後強化民眾傳染病認知，加上疾管局聘傳染病專業人才為顧問，2004~2005 年的登革熱病例數為歷年新低。2004 年屏東出現第一型與第四型登革病毒，均是小規模流行，足見專業防疫之成功。

2006 年高雄縣市邊界發生第三型登革病毒境外移入病例點火後，速蔓延至前鎮、苓雅等區，因老舊社區，地下室雨後積水，病媒蚊孳生，衛生單位加強噴藥次數，又因一採 dengue-IgG(+) 即判，民眾不滿配合度低，共 965 病例 (19 位登革出血熱及 4 人死亡)。

2007 年台南市久未有登革熱流行，空屋地下室積水、空地髒亂未清，六月第一位登革確定病例後，擴大採檢發現當地已流行，七月第一型登革病毒蔓延至北區、東區，八月延燒至東區的榮民之家，因榮民年長而發燒不明顯，加上聖帕颱風來襲連日下雨積水，爆發群聚感染。十月下旬台南市舉辦全國運動會，衛生單位加強會場週邊監測，活動期間無選手感染。其後因秋颱柯羅莎造成大量積水容器，漏水空屋多，清查市區空屋、空地管理，疫情才獲控制<sup>10</sup>，共 1,475 確定病例 (僅 11 位登革出血熱及無人死亡)。

2009 年七月 16 至 26 日高雄市舉辦世界運動會，政府投資強化病媒偵測與孳生源清除，流行季前對常流行的三民、前鎮與鳳山三區擴大孳生源調查，並以誘蚊產卵器進行病媒蚊主動監測，幸雨季晚，境外移入病例 3 例而本土病例在世運盛會是零，初期防治尚成功。然八月 8 至 9 日巧遇莫拉克風災，造成大量環境孳生源，人力資源不足，登革熱自小港爆發後，往前鎮、苓雅等區延燒，直到鼓山區，至次年

二月共 848 總病例數 (11 位登革出血熱與 4 人死亡)。

2010 年高雄市與台南縣市有登革出血熱病例，兩地有不少區域為兩型以上登革病毒同時流行，其中台南縣市主要型別為第一型 (台南縣) 與第四型 (台南市)，高雄市三民區是第二與第三型，且出現 3 例 15 歲以下的幼童登革出血熱確定病例。

2013 年屏東發生第一型登革病毒的小流行 (475 登革熱病例)。

2014 年高雄也發生第一型登革病毒的流行，氣爆後見病例數升，14,999 登革病例；2015 年十月後又出現第二型登革病毒，共 19,785 登革病例 (99 人死亡)，造成較原第一型更多重症與死亡，延燒至 2016 年春，是第一型與第二型登革病毒均跨年流行。

2015 年台南二月病媒蚊指數爬升，五月擴大疫調發現跳蚤市場有第二型登革病毒群聚病例，高溫多雨後病例躍升，此病毒的傳播力強，蔓延至高雄及他縣市，是台灣自 1943 年後至今最嚴重的流行 (共 22,761 登革病例，112 人死亡)，顯示任一地的開始流行之成功防控至為重要。

綜言之，2004 與 2005 年的成功登革防疫，啟示首重預防。近年將是台灣未來是否邁入地方性流行的關鍵時期。

表 2 台灣的登革流行史、大環境 / 社經之變遷與特殊事件

年代	流行類型 (血清型)	登革總病例數 (登革出血熱人數)	大環境/社經狀況與流行特殊事件	流行區	流行區的人口	流行區發生率	主要病媒蚊 (斑蚊)
1930~40	登革熱/登革出血熱	約500萬	南洋戰爭	全島	約587萬	約83.3%	埃及/白線
1981	登革熱 (第二型)	約10,000	自菲律賓輸入與小琉球當地有儲水習慣	小琉球	約12,000	約80%	埃及
1987~88	登革熱 (第一型)	4,389 <sup>a</sup>	解嚴 環保署成立	屏東縣·高雄縣市 台南縣市	約508萬	0.08%	埃及
1994	登革熱/登革出血熱	244 (11) 1死	首位登革出血熱死亡病例	高雄市	約147萬	0.017%	埃及
1995	登革熱 (第一型)	179	證實白線斑蚊在台也可發生疫情	台北縣 中和市	382,00	0.048%	白線
1998	登革熱/登革出血熱 (第三型)	179 (14) 1死	7月1日疾管局成立	台南市	72萬	0.025%	埃及
2001~02	登革熱/登革出血熱 (第二型)	5,563 (237) 21死	北高市長選舉	高雄縣市 屏東縣	3,651,164	0.152%	埃及
2006	登革熱/登革出血熱 (第三型)	952 (19) 4死	北高市長選舉	高雄縣市	2,759,191	0.035%	埃及
2007	登革熱/登革出血熱 (第一型)	1,459 (10)	台南已多年未有登革大流行 全國運動會	台南市	764,658	0.19%	埃及
2009	登革熱/登革出血熱 (第三型)	623 (9) 3死	莫拉克風災	高雄市	1,525,996	0.04%	埃及
2010	登革熱/登革出血熱 (第三型)	1,566 <sup>b</sup> (18) 2死	五都選舉 凡那比風災	台南縣市 高雄市	3,398,148	0.046%	埃及
2012	登革熱/登革出血熱 (第一、二型)	1,478 (35) 7死	總統選舉	台南市 高雄市	4,660,304	0.032%	埃及
2014	登革熱/登革出血熱 (第一型)	15,058 21死	七合一選舉 高雄氣爆	高雄市	2,778,992	0.539%	埃及
2015	登革熱/登革重症 (第二型) <sup>c</sup>	22,754 <sup>d</sup> 19,659 <sup>d</sup> 228死	準備總統、立委選舉 蘇迪勒颱風	台南市 高雄市	1,885,541 2,778,918	1.207% 0.707%	埃及

<sup>a</sup> 該年總共通報 10,423 例病例，且當時並未完全以實驗室診斷，因此會低估。

<sup>b</sup> 因 2010 年自 12 月起高雄縣市合併，但高雄縣該年疫情並不嚴重，因此未列入。

<sup>c</sup> 高雄市 9 月前第一型登革病毒居多。

<sup>d</sup> 台灣疾管署數據更新至 April 16, 2016。

## 二、登革病毒感染的血清流行病學

血清流行病學研究可知同一縣市登革病例的高發區與低發區之登革病毒感染的盛行率 (dengue-IgG)、發生率 (dengue-IgM)、不顯性感染比例及感染的危險與保護因子；早期用血球凝集抑制抗體篩檢，再測四型登革病毒的中和抗體，近幾年全改為酵素免疫法較便捷。

台灣為非登革熱地方流行區，因此防控是否成功，可以就學率達 99.9% 的學童世代 (代表那年齡層的社區感染實況) 進行前瞻追蹤研究，以明瞭登革病毒發生率，一次與二次感染情形<sup>6-10,50</sup>。結果發現：(一) 高雄、屏東東港及台南在流行後，均可見登革病毒的靜寂傳播 (silent transmission)；(二) 同校而不同居住里別的登革病毒感染發生率不同，顯示居住地的傳播與社區防治十分重要；(三) 登革病毒 IgG 抗體盛行率隨著年齡上升而增，且與 1931、1942~43 及 1987~88 年大流行的歷史相吻合；(四) 除年齡、居住地之外，其他危險因子包括家中有登革病患、學校有蚊媒孳生處、家中有積水容器、沒用或錯用防蚊措施 (如點蚊香等)；及 (五) 家中裝紗門與紗窗為保護因子。所幸，台灣學童的登革病毒感染仍遠較東南亞國家為低，即尚未進入「地方性流行」。

## 三、台灣登革熱的流行病學特徵

### (一) 流行時間

台灣登革熱的流行規模較東南亞小，但近幾年也與全球流行愈演愈烈。在 1998 年之前，幾乎是每 3~4 年會有小流行，而每十年一次大流行，如 1987~88、1991、1994~95、1998 年，尤其是選舉年人群聚集造勢與病媒孳生場所多，

即許多環境、社會與政治因素促進登革病毒的傳播<sup>45</sup>。近幾年的流行趨勢是病例數快速上升，流行規模大、範圍廣，且登革出血熱等嚴重病例數增。在暖冬與防控失守有四次越冬流行 [1987~88 年 (第一型)、2001~2002 年 (第二型)、2009~2010 年 (第三型)、2014~2015 年 (第一、二型)]。

台灣與東南亞同是高溫多雨後流行幅度上升，但台灣暑假旅遊至東南亞者眾，所以高峰經常在九、十月或颱風 2~4 週後，而東南亞是在梅雨季的五月。此外，連續冷風在 18°C 以下，限制了 1998 年台南的第三型登革病毒跨年流行。最重要的是台灣的登革流行需境外移入病例與適合的高溫、低濕度之兩條件同時存在，引發本土的流行<sup>11</sup>。

綜言之，台灣登革流行也與高溫、降雨有關，暖冬易跨年流行，且颱風一個月後，也見病例數爬升。然天氣因素對喜屋內的埃及斑蚊，並非造成登革流行的唯一充分必要條件，仍有其他因素左右。

### (二) 流行地區

主要流行地區在埃及斑蚊分布的台灣南部縣市，包括高雄市、台南市及屏東縣。

除了 2013 與 2015 年之外，高雄幾乎每年有全台最多的登革病例。常集中在人口密度高而老舊屋多，與市場/攤販林立的三民、前鎮、鳳山區，小港區近港口有外勞，也曾流行多次，旗津區舊漁船擱置成為養蚊溫床，左營區眷村屋易讓蚊躲藏，苓雅區鄰近三民區也常流行。當然，不同年代

也波及他區(如鼓山區、新興區等)流行。

台南是在 1987~88 年(第一型)、1998 年(第三型)、2007 年(第一型)及 2015 年(第二型),共四波重要流行,流行地各為台南北區、中西區、北/東區及各區。2015 年是由舊房舍多的北區起蔓延至中西區、南區及東區。

屏東自小琉球裝海底水管與斑蚊控制後已較少流行,高雄疫情會延燒至屏東,多在屏東市區斑蚊密度高處流行。

其他地區也曾有小流行,如 1995 年在新北市中和區有第一型登革病毒的流行(179 例確定病例);該年台中市東海大學發現第二型登革病毒的 8 位本土確定病例,1996 年台北市信義區出現 10 位本土確定病例,2011 年 10 月台北陽明山近區也有第一型登革病毒流行,共 24 位本土確定病例。因此,僅有白線斑蚊處的流行規模與嚴重度均遠小於埃及斑蚊分布區,仍易控制。

### (三) 病毒型別

台灣南部僅某幾年有大幅度的流行,其中第一型登革病毒的引發流行頻率最高,尤其是僅白線斑蚊的台北市與新北市,第四型最少,且在 1998 年之後,出現第三型增多,而 2002 年之後出現第二型較多,第一型中,以基因型 I 居多,第二型以都會基因型較多,此與早期小琉球流行的亞洲 2 (Asian 2) 基因型不同,第三型近年是 I、II 基因型均有,第四型的 II 基因型也在台南 2000 年與 2010 年造成病例。然未必每次大流行均造成嚴重的流行,而流行的嚴重度多與

第二型與第三型登革病毒有關。簡言之,高雄、台南、屏東已是不同型別登革病毒常出沒地,顯示隨著全球暖化、極端氣候與社會環境變遷,登革嚴重流行在高雄、台南已勢不可免,且次年之流行更嚴重。

本土病例中,1987~1997 年間仍以第一型的登革為主軸,第二型雖曾在 1981、1995、1998 年流行,但至 2001~2003 年首度造成大幅度且嚴重的流行,至 2015 年台南的第二型登革病毒源於印尼都會基因型,其流行幅度與嚴重度均超過 2001~2003 年,且又波及高雄及其他縣市,即高雄在 2015 年開始雖續原 2014 年的第一型,至 10 月後已轉為第二型登革病毒為大宗,是台灣少見的同一年、同一地有兩種不同血清型別同時大流行,至 2016 年初高雄流行未斷,顯示其後防疫要上緊發條。

### (四) 登革病例的其他危險因子

台灣的登革流行多始於東南亞旅客帶病毒輸入,1989 年開放外勞及與年俱增的東南亞外籍配偶,尤其印尼外勞趨增,在 2014 年第一型登革病毒於高雄大流行與 2015 年第二型登革病毒致台南史上最大波流行,均扮演重要的輸入角色。偶有中南美洲帶病毒輸入,流行幅度小而不嚴重。

南部流行區的空屋、空地、廢輪胎、住家附近有廟宇、積水容器及大量人口移動是登革本土病例的重要危險因子;紗門紗窗有保護作用。

全球氣候變遷下,台灣溫度愈高,登革熱發生的風險

增<sup>11</sup>，而溼度與登革呈負相關，全球暖化也促登革病毒更適應於白線斑蚊及其行為改變，可能未來有助於登革疫情的北移。

其他嚴重病例的危險因子有 60 歲以上長者、罹患糖尿病者、腎病、高血壓、急性呼吸衰竭、其他共同感染及尿血症，易病情惡化死亡，且嚴重腹痛病人，應避免不必要的侵入性手術，可減少較多的住院天數<sup>51</sup>。

#### (五) 台灣登革熱流行病學的發現以提升防疫成效

1998 年台南的流行，台大研究群發現登革出血熱的流行病學特徵：(1) 單一血清型的登革病毒可在南台灣發生嚴重流行，多為成人病例；(2) 登革出血熱出現在登革熱之「後」，是家庭群聚的後發病例；(3) 台南中西區流行長，其登革出血熱對登革熱病例數的比值在流行「後期」最高，「中期」又高於「前期」；(4) 出生在 1943 年後的 12 位登革出血熱病人中，有 11 位是一次感染，證實並非二次感染較易得登革出血熱；(5) 不論一次或二次感染的登革出血熱病人血中病毒量均比登革熱病人高，且家中「後」發病例較「前」發病例的病毒量高而更易感染他人；(6) 一旦登革出血熱出現，入冬總病例驟降，仍見後續有此重症；(7) 「感染源」多在中西區，即病例分布需以「感染源」(非居住地)分析，確切找出蚊孳生處，盡速滅蚊；(8) 與美國蟲媒病毒張光正老師合作，發現家戶中後感染者的登革病毒基因序列差異較同戶先感染者為大，且病毒量高，此符合 1970 年代里昂·羅森教

授提出埃及斑蚊多食行為而有「擇選毒力高的登革病毒」角色<sup>43</sup>，易造成家庭群聚病例的後發病例較嚴重。明示未來遇病毒量高的登革出血熱等重症出現處，須更及時徹底滅蚊；打斷疫區傳染鏈與降低群聚病例，將減少其後的重症。

高雄 2001~2002 年第二型登革病毒及 2006 年第三型登革病毒兩流行，均發現流行拉長而愈趨嚴重，顯示病毒與宿主交互演化、擇選而致流行地的後期病例愈趨嚴重。此外，2001~2003 年高屏區的流行，暑期人口大流動，病例有兩擴散模式，始在高雄與鳳山兩市交界處，呈半徑 1 公里的同心圓擴散，續由南向北呈跳躍式的多點散布，擴大疫情。若僅有病媒蚊而無感染者，無續發病例，兩者同存才引發不斷的疫情；警示衛生教育在流行季節前先清除斑蚊孳生源(孳清)及流行時防蚊之重要，尤其發燒前幾日的病毒量高，但台南、高雄患者仍常穿短袖衣褲，致病毒傳播速率快於防疫成效。另發現登革出血熱病例的流行條件：在人口密度高處，若每波流行久或病例傳播度高，引發登革出血熱百分比高；但在人口密度低處，需此兩條件並存，易有較高的登革出血熱。即需防堵病毒在人群擴散幅度和速度，以縮短流行期。更重要的是噴殺蟲劑僅有短效，2~3 周後仍會病例竄升；但全面同時孳清，費時一個半月後，病例驟降，不再上升。換言之，病例數升高反映孳清未徹底或有隱性孳生源。

綜言之，台灣與登革「地方性流行」的東南亞諸國有不同的流行病學特徵：(1) 多為成人而非兒童病例；(2) 除了 2015 年高雄是第一型在先而第二型在後之外，其他年的流行均是單一主型流行，並未如東南亞有多種血清型登革病毒同時流行；(3) 流行季晚而短；(4) 因嘉義布

袋以南多為埃及斑蚊而白線斑蚊是全島分布，所以流行嚴重區仍依次為高雄、台南與屏東，和泰國等東南亞國家是都會區為埃及斑蚊而郊區為白線斑蚊的分布稍有所不同，尤其近年高雄與台南都會區下水道淨化處理後，在凹凸不平的陰溝淨水處，也可發現斑蚊，是防疫困難處。

## 伍、防疫策略

### 一、登革流行病學與公共衛生政策

較佳的防疫政策是依據強化偵測系統所得精準數據，規劃未來。此在世衛組織近年發現全球登革疫情嚴重時，先估算不同國家在登革熱的健康影響 (disease burden)<sup>52</sup>，再採用整合蟲媒傳染病的防治，尤其人才培育上，將不同的蚊媒傳染病一起規劃。

流行季「前」應備妥人員培訓、孳生源減量工作，流行季之「初」，一定要把握「早期」發覺病例與隨後馬上防治。流行「高峰」，需馬上檢討哪些防控做法未到位，並以小單位（如里）的病例空間分布，進行評量比較不同防治策略<sup>53</sup>。流行尾時，可分析數據，進行檢討，甚而加入天氣因子，供未來預測。

### 二、世衛組織規劃

在登革疫苗未上市前，世衛組織曾對全球 70% 登革病例的東南亞及西太平洋兩區域，訂定 2008~2015 年的防疫策略。首先呼籲各國勿自掃門前雪，必須以地域性的視野跨國合作。幾項重要原則是：(1) 登

革整合偵測必須與防治作為和健康照顧相得益彰；(2) 以網絡進行跨部會合作，確定人物力資源到位；(3) 以科學數據評量任一防治作為的有效性，速求改進；(4) 經由系統性的架構，包括全國性、跨國區域性與全球性的合作夥伴推動防治作業；最大問題是流行幅度大時，要有處理突然湧現量能 (surging capacity)。做法上，是偵測各指標數據攀升時，即馬上推動有效的防治作為。

### 三、新加坡的防疫策略

分四大項：(1) 預防性偵測與控制：以地理資訊系統與手機每日掌握病媒孳生處，立即打斷傳染鏈，尤見群聚病例時；(2) 大眾教育與社區參與：標示各社區病媒蚊安危狀況，讓訪友前可上網查看，以大眾傳播媒體告知何處流行，及其周遭也該採防治行動；(3) 以法條追蹤管理；(4) 環保單位及國家級研究室，推展病媒研究。

### 四、台灣登革防治的成敗經驗

台灣登革防治的成敗經驗包括：(1) 四月是關鍵，若四月前成功控制，後顧之憂少；(2) 若前一年失守而餘波延燒至次年，流行的幅度攀升快；(3) 若該地有斑蚊，連續雨天後，尤其是無沖刷力的雨（非颱風雨），病例數會快速竄升<sup>54</sup>；(4) 生態防治法有其環境條件及需民眾配合處，如小琉球放魚在大桶中卻被曬死或學童玩死，高雄民眾不願每天餵魚；(5) 社區守望相助，鄰里長動員最為有效；(6) 大型孳生源空屋、空地及回收垃圾要列冊追蹤；(7) 建築工地、市場、公園、地下室積水、屋簷溝常是病媒蚊躲藏孳生處；(8) 2015 年台南大數據分析，以「里」為每

日評估單位，比較不同防疫作法，一旦掌握成功之鑰，有鼓舞士氣作用。

我國環保署曾訂定病媒防治策略，小琉球登革防治成功後，人員新陳代謝，加上屋外蚊由環保單位管，屋內蚊由衛生單位負責，所以指揮體系不明確，又不重視衛生教育與病媒研究致近兩年斑蚊反撲，流行愈趨嚴重。

### 陸、未來展望

我國曾成功防治登革熱。惜病例數少後，易受忽視，防治所需的衛生教育、蚊子達人、偵測系統增益效能、流行病學探究與政策評估均有改進空間。事實上，台灣資訊強，有實驗人才，健保體系涵蓋廣，未來須以防疫數據即時分析、回饋改進，配合納入每日天氣的時空預測流行統計模式，化流行教訓為回饋全球衛生的群智力量。欣聞行政院 2016 年四月將成立「蚊媒傳染病防治研究中心」，協助地方政府提升防疫效能。

### 致謝

感謝美國疾管與預防中心的古柏樂 (Dr. D. Gubler)、張光正老師 (Dr. Jeff G.J. Chang) 與台灣預研所流行病學組前吳盈昌組長多年傳授寶貴經驗，也特別謝謝流行區的所有公衛人員 (高雄衛生局韓明榮前局長、何啟功前局長、蔡武雄前處長、陳朝東前技正、何惠彬股長、倪嘉鴻技士，台南衛生局胡淑貞前局長、林聖哲局長、蔡玲珊科長) 及鄧

華真、張念台、吳懷惠、陳維鈞、蔡坤憲、徐爾烈六位老師在蚊子偵測的賜教，劉建衛、劉清泉、何宗憲三醫師的臨床指導，更要由衷感謝國科會 / 科技部、國衛院、疾管局的研究計畫經費支持及所有參與登革研究的老師、學生、助理等年輕夥伴的努力。最後，特別謝謝董宗華多年的行政協助、趙黛瑜、舒佩芸、何啟功、蔡坤憲四位老師的撥冗審稿及李亭儀的打字。

## 參考文獻

- Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, Huy R, Tarantola A, Scott TW, Sakuntabhai A, Buchy P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:14688-93.
- Wu TS, Shih FY, Yen MY, Wu JS, Lu SW, Chang KC, Hsiung C, Chou JH, Chu YT, Chang H, Chiu CH, Tsui FC, Wagner MM, Su IJ, King CC. Establishing a nationwide emergency department-based syndromic surveillance system for better public health responses in Taiwan. *BMC Public Health*. 2008;8:18.
- 趙黛瑜 1998-99 年台南第三型登革病毒導致登革出血熱爆發流行之流行病學探究暨病毒分子變異群與疾病嚴重程度之相關性。台灣大學公共衛生學院流行病所 2003 年博士論文。
- Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, Li CM, Lin SC, Ho ST, Huang JH, King CC. 2003 High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with denguehemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*. 2003;305:330-8.
- Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:315-41.
- 簡麗蓉 小琉球地區學童登革病毒血清流行病學暨比較第一、第二型登革病毒在不同細胞的生長與其在單核細胞的免疫增強作用。陽明大學公共衛生研究所 1990 年碩士論文。
- 林孟平 東港地區登革病毒血清流行病學研究暨登革病毒快速偵測法之建立。台灣大學公共衛生學研究所 1993 年碩士論文。
- 謝佑祥 台大新生第二代 B 型肝炎疫苗評估暨 1991 年小琉球 B 型肝炎病毒、C 型肝炎病毒和登革病毒血清流行病學研究。台灣大學公共衛生學研究所 1993 年碩士論文。
- 林秀蔚 高雄地區登革病毒血清流行病學研究暨登革病毒在人類單核細胞的免疫增強作用。台灣大學公共衛生學研究所 1995 年碩士論文。
- 李崢嶸 台南市和高雄市登革大流行後的環境、病媒蚊密度與防治策略等因子對病毒感染率及病例發生率之影響，2008-2011。台灣大學公共衛生學研究所 2012 年碩士論文。
- Shang CS, Fang CT, Liu CM, Wen TH, Tsai KH, King CC. The role of imported cases and favorable meteorological conditions in the onset of dengue epidemics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e775.
- Chan TC, Hu TH, Hwang JS. Daily forecast of dengue fever incidents for urban villages in a city. *Int J Health Geogr*. 2015;14:9.
- King CC, Chao DY, Wen TH, Kao CL, Wu JTS, Huang YJS, Tipayamongkholgul M, Shang CS. Epidemiologic characteristics of dengue in Taiwan and implications for global control, *Book on —Dengue Disease, 2008, Research Signpost, Kerala, India.*
- Chao DY, Lin TH, Hwang KP, Huang JH, Liu CC, King CC. 1998 dengue hemorrhagic fever epidemic in Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:552-4.
- Bouzig M, Colon-Gonzalez FJ, Lung T, Lake IR, Hunter PR. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. *BMC Public Health* 2014;14:781.
- Hii YL, Rocklöv J, Wall S, Ng LC, Tang CS, Ng N. Optimal lead time for dengue forecast. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1848.
- Koh BK, Ng LC, Kita Y, Tang CS, Ang LW, Wong KY, James L, Goh KT. The 2005 dengue epidemic in Singapore: epidemiology, prevention and control. *Ann Acad Med Singapore*. 2008;37:538-45.
- Juliano SA, Ribeiro GS, Maciel-de-Freitas R, Castro MG, Codeço C, Lourenço-de-Oliveira R, Lounibos LP. She's a femme fatale: low-density larval development produces good disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:1070-7.
- Harrington LC, Fleisher A, Ruiz-Moreno D, Vermeylen F, Wa CV, Poulson RL, Edman JD, Clark JM, Jones JW, Kitthawee S, Scott TW. Heterogeneous feeding patterns of the dengue vector, *Aedes aegypti*, on individual human hosts in rural Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e3048.
- Fonzi E, Higa Y, Bertuso AG, Futami K, Minakawa N. Human-mediated marine dispersal influences the population structure of *Aedes aegypti* in the Philippine archipelago. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003829.
- Chao DL, Longini IM Jr, Halloran ME. The effects of vector movement and distribution in a mathematical model of dengue transmission. *PLoS One*. 2013;8:e76044.
- Goindin D, Delannay C, Ramdini C, Gustave J, Fouque F. Parity and longevity of *Aedes aegypti* according to temperatures in controlled conditions and consequences on dengue transmission risks. *PLoS One*. 2015;10:e0135489.
- Trpis M. *Aedes (Gymnometopa) mediovitatus* (Diptera: Culicidae) as an experimental vector of *Brugia pahangi* and *B. malayi* (Spirurida: Filariidae). *J Med Entomol*. 1994;31:442-4.

24. Kaufmann C, Collins LF, Brown MR. Influence of age and nutritional status on flight performance of the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Insects*. 2013;**4**: 404-12.
25. 劉英姿、方啟泰、顏哲傑。2003 至 2013 年台灣地區登革熱併發登革出血熱危險因子分析。《台灣公共衛生雜誌》34 卷第 4 期 437-446 頁，2015 年。
26. Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1999;**354**:1431.
27. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, de Chacon IV, Ramos C, Rico-Hesse R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.*, 1999;**73**: 4738-47.
28. Lourenço J, Recker M. The 2012 Madeira dengue outbreak: epidemiological determinants and future epidemic potential. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;**8**:e3083.
29. Quiner CA, Parameswaran P, Ciota AT, Ehrbar DJ, Dodson BL, Schlesinger S, Kramer LD, Harris E. Increased replicative fitness of a dengue virus 2 clade in native mosquitoes: potential contribution to a clade replacement event in Nicaragua. *J Virol*. 2014;**88**:13125-34.
30. Lee KS, Lo S, Tan SS, Chua R, Tan LK, Xu H, Ng LC. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infect Genet Evol*. 2012;**12**:77-85.
31. Rico-Hesse R. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010;**338**:45-55.
32. Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;**58**:96-101.
33. 吳民惠 2001~2003 年台灣南部地區登革熱 / 登革出血熱的流行病學探討。國立台灣大學流行病學研究所 2003 碩士論文。
34. Mir D, Romero H, Fagundes de Carvalho LM, Bello G. Spatiotemporal dynamics of DENV-2 Asian-American genotype lineages in the Americas. *PLoS One*. 2014;**9**:e98519.
35. Gubler DJ, Suharyono W, Lubis I, Eram S, Gunarso S. Epidemic dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;**30**:1094-9.
36. Sim S, Aw PP, Wilm A, Teoh G, Hue KD, Nguyen NM, Nagarajan N, Simmons CP, Hibberd ML. Tracking dengue virus intra-host genetic diversity during human-to-mosquito transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;**9**:e0004052.
37. Rodriguez-Roche R, Blanc H, Bordería AV, Díaz G, Henningsson R, Gonzalez D, Santana E, Alvarez M, Castro O, Fontes M, Vignuzzi M2, Guzman MG. Increasing clinical severity during a dengue virus type 3 Cuban epidemic: deep sequencing of evolving viral populations. *J Virol*. 2016 Feb 17. pii: JVI.02647-15.
38. Le Viet T, Choisy M, Bryant JE, Vu Trong D, Pham Quang T, Horby P, Nguyen Tran H, Tran Thi Kieu H, Nguyen Vu T, Nguyen Van K, Le Quynh M, Wertheim HF. A dengue outbreak on a floating village at Cat Ba Island in Vietnam. *BMC Public Health*. 2015;**15**:940.
39. Stoddard ST, Morrison AC, Vazquez-Prokopec GM, Paz Soldan V, Kochel TJ, Kitron U, et al. The role of human movement in the transmission of vector-borne pathogens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;**3**:e481.
40. Kuno, G. Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the First Half of the 20th century. *Rev Med Virol*, 2007;**17**:327-41.
41. Gubler DJ, Reed D, Rosen L, Hitchcock JR Jr. Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *Am J Trop Med Hyg*. 1978;**27**:581-9.
42. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 1999;**73**:2650-7.
43. Rosen L Disease exacerbation caused by sequential dengue infections: myth or reality? *Rev Infect Dis*. 1989;**11** Suppl 4:S840-2.
44. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol Spectr*. 2014;**2**:AID-0022-2014.
45. 董宗華、蔡坤憲、金傳蓬、金傳春。台灣登革熱與登革出血熱的流行史、社會政治大環境變遷及未來防治展望。《台灣衛誌》2011;**30**:517-532.
46. 葛應欽。登革熱流行病學 - 登革熱在台灣熱的流行。《高雄醫誌》1989;**5**:1-11.
47. Hsieh WC, Chen MF, Lin KT, Hsu ST, Ma CI, Wu SS. Outbreak of dengue fever in 1981 in Liouchyong Shiang, Pingtung County. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi*, 1982;**81**:1388-95.
48. King CC, Wu YC, Chao DY, Lin TH, Chow L, Wang HT, et al. Major epidemics of dengue in Taiwan in 1981-2000: Related to intensive virus activities in Asia. In C. Prasittisuk (Ed.), *Dengue Bulletin*. 2000;**24**:1-10: World Health Organization.

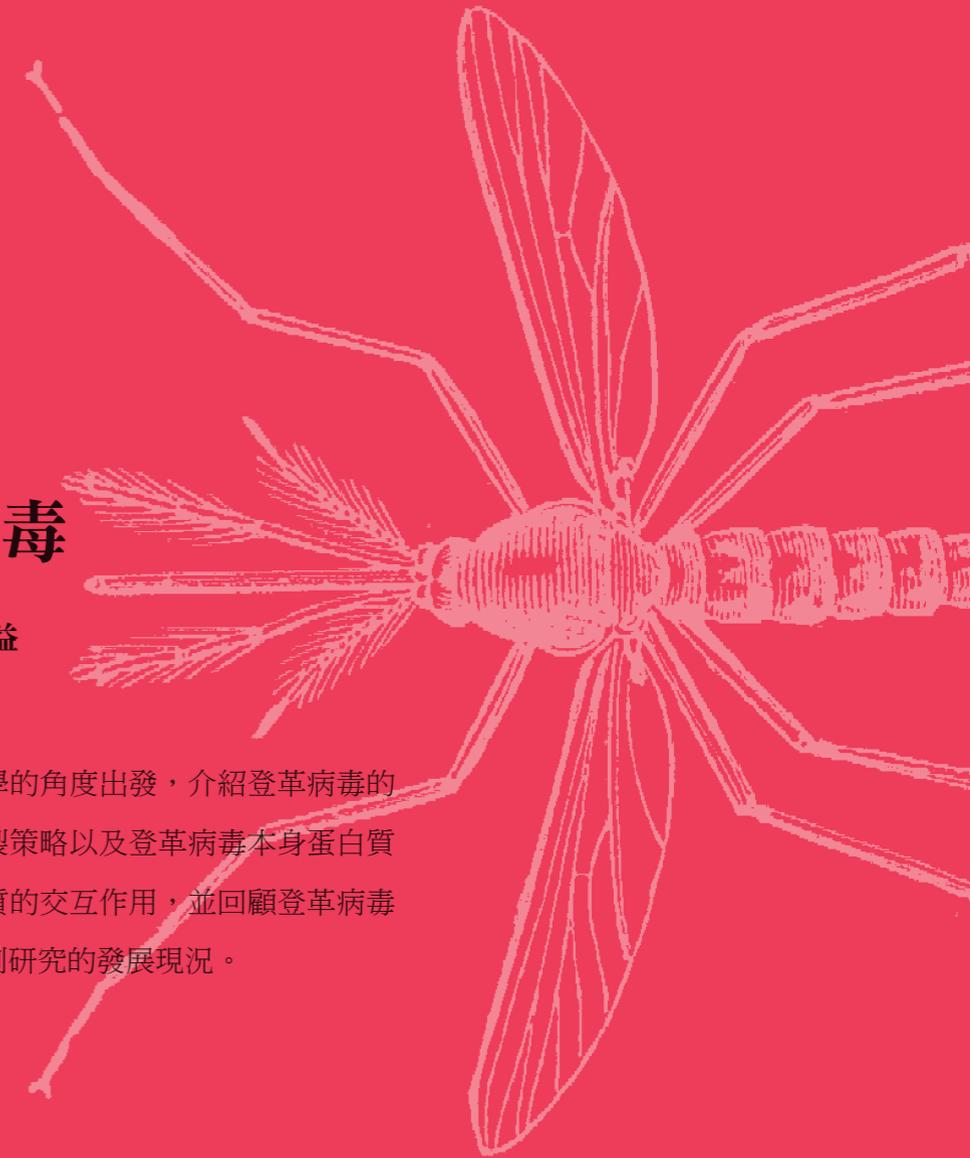
49. Kan CC, Lee PF, Wen TH, Shang CS, Lin NN, Wu MH, Chao DY, Huang SYJ, Fan IC, Shu PY, Huang JH, King CC, Pai L. Two clustering diffusion patterns identified from the 2001-2003 dengue epidemic, Kaohsiung, Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; **79**:344-52.
50. Chen WJ, Chen SL, Chien LJ, Chen CC, King CC, Harn MR, Hwang KP, Fang JH. Silent transmission of the dengue virus in southern Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; **55**:12-6.
51. Lee IK, Liu JW, Yang KD. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults: emphasizing the evolutionary pre-fatal clinical and laboratory manifestations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; **6**:e1532.
52. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, Hay SI, Bedi N, Bensenor IM, Castañeda-Orjuela CA, Chuang TW, Gibney KB, Memish ZA, Rafay A, Ukwaja KN, Yonemoto N, Murray CJ. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis.* 2016 Feb 10. pii: S1473-3099(16)00026-8.
53. Wu HH, Wang CY, Teng HJ, Lin C, Lu LC, Jian SW, Chang NT, Wen TH, Wu JW, Liu DP, Lin LJ, Norris DE, Wu HS. A dengue vector surveillance by human population-stratified ovitrap survey for *Aedes* (Diptera: Culicidae) adult and egg collections in high dengue-risk areas of Taiwan. *J Med Entomol.* 2013; **50**:261-9.
54. Yang CF, Hou JN, Chen TH, Chen WJ. Discriminable roles of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in establishment of dengue outbreaks in Taiwan. *Acta Trop.* 2014; **130**:17-23.

## 第二章

# 登革病毒

廖經倫 余佳益

以分子病毒學的角度出發，介紹登革病毒的生活史、複製策略以及登革病毒本身蛋白質與宿主蛋白質的交互作用，並回顧登革病毒相關分子機制研究的發展現況。



台灣身處於熱帶 / 亞熱帶地區，潮溼炎熱的海島氣候，使得蚊蟲易於滋長，有利於蚊媒病毒 (mosquito-borne viruses) 的傳播。隨著環境的變遷，台灣各個城市漸漸步入現代化，消失的農村田野與快速增高的人口密度，也悄悄地改變了台灣蚊媒病毒的流行樣貌。長期以來，登革病毒與日本腦炎病毒都是威脅台灣人民健康、影響社會甚鉅的蚊媒病毒；隨著養豬環境的改善與日本腦炎疫苗的使用，以豬隻為主要增幅宿主 (amplification host) 的日本腦炎病毒，其威脅性已大幅獲得控制；反觀登革病毒，由於能夠以人類作為增幅宿主、又無理想的疫苗與治療藥物，因此，在台灣隨著全球暖化所造成的氣溫升高與暴雨影響後，登革熱疫情反而更日益肆虐。在本章中，我們將從分子病毒學的角度出發，介紹登革病毒的複製策略，並回顧登革相關研究的發展現況。

### 登革病毒的發現

登革熱 (dengue fever) 在台灣俗稱「天狗熱」，是日據時代以「dengue」的日式發音演變而來；而「斷骨熱」(break-bone fever) 一詞則是源自於美國醫師 Dr. Benjamin Rush 在 1780 年代對這個疾病的症狀描述<sup>1</sup>。然而，就現有文獻記載，這個疾病 (或是症狀類似登革熱的疾病) 最早可能出現在西元 992 年中國的東晉時期<sup>2</sup>。這個古老的疾病是由大眾所熟知的「登革病毒」(dengue virus) 所造成；雖然目前學界對登革病毒是源自非洲或東南亞尚未有一致的看法，但一般相信登革病毒可能源自於田野森林，一開始在野外以「非人類宿主 - 蚊蟲」的模式進行傳播，也就是所謂的「叢林循環」(sylvatic cycle)。而人類在進

入叢林狩獵開發的過程中意外受到感染，再加上病毒本身也可能產生了異變，使得登革病毒能在人類宿主中產生足量的病毒血症 (viremia)，進而使叮咬受感染人類的蚊蟲也能被感染；這種「人類宿主 - 蚊蟲」之間的傳播模式一旦形成，登革病毒即可脫離野外宿主，利用這樣的「城市循環」(urban cycle) 模式在人類社會中不斷肆虐。

雖然登革病毒的起源仍有待進一步地考究，科學家在 1940 年代成功分離出登革病毒，則是二次世界大戰期間一段值得一提的歷史。由於登革病毒能在人類與蚊蟲宿主之間不斷循環感染，對於需要野外作戰與群體生活的軍隊而言，無疑是最適合傳播登革病毒的環境，也成為削弱部隊戰力最致命的原因之一。在當時，無論是西方聯軍或是日本軍隊，只要是派駐在亞洲或是環太平洋的部隊，都窮於應付這個以蚊蟲為媒介的熱帶疾病；也因此，兩個陣營的官方單位都成立相關的研究委員會，致力於解決前線士兵飽受登革熱之苦的問題。在 1943 年，日本學者 Kimura 和 Hotta 將登革熱急性期病患的血清，以顱內注射的方式送進未離乳小鼠 (suckling mice) 中，而成功分離出登革病毒<sup>3</sup>。可惜的是，這個發現當時發表在較不知名的日文期刊，以致於被忽略了數年之久；在 1944 年，屬於另一陣營的美國學者 Sabin 則在印度、夏威夷、新幾內亞等美國駐軍的士兵身上也分離出相似的幾株病毒，Sabin 陣營同時也利用血清凝集素抑制法 (hemagglutination-inhibition test) 將這些抗原相似、卻又有所不同的病毒加以分類，而當時來自夏威夷的病毒株 (Hawaii strain) 即被認為是第一型登革病毒 (DENV-1) 的原型 (prototype)；來自新幾內亞的病毒株 (New Genia "C", NGC strain) 則被認為是第二型登革病毒 (DENV-2) 的原型<sup>4</sup>；不久後，第三、四型

也陸續在世界各地被分離鑑定出來。而在過去半個世紀以來，科學家所發現的登革病毒都侷限在這四種血清型中；直到 2013 年 Nikolaos Vasilakis 在個人通訊中，發表了在馬來西亞可能出現了新的第五型登革病毒 (DENV-5)。然而，目前對 DENV-5 的了解與研究，仍有待其他登革研究團隊的支持；因此，現階段學界對登革病毒的血清分型，仍廣泛以四型 (DENV-1~4) 為主。

在台灣，首次出現登革熱的病例是在 1870 年，而後在 1915 到 1942 年間陸續出現數次全島性的大流行<sup>5</sup>。而根據衛生福利部疾病管制署的統計資料，自 1998 至 2015 年，台灣登革熱累計確診病例早已超過七萬人次；2014~2015 年間，南台灣出現了近年來最嚴峻的登革熱疫情，除了登革熱患者自身生命健康受到直接的影響，大量登革病患造成醫療資源的排擠、民眾對登革病毒心理上的恐懼等因素，對台灣社會、經濟層面也造成了巨大的影響。因此，登革病毒在台灣絕對是一個不容輕忽的公共衛生議題。

### 登革病毒的生活史與分子病毒學

在分類上，登革病毒屬於黃病毒科 (Family Flaviviridae)、黃病毒屬 (Genus Flavivirus) 的成員，和著名的黃熱病毒 (Yellow fever virus)、西尼羅病毒 (West Nile virus)、日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus)、與最近流行於中南美洲的茲卡病毒 (Zika virus) 等有著相似的基因與蛋白序列，也都是藉由蚊媒所傳播。登革病毒以一條 5' 端加帽 (5'-capped)、長約 11 kb 的正向 RNA (positive-sense RNA) 作為遺傳物

質，包覆在直徑約 40~60 nm 的病毒顆粒中。由於病毒顆粒具有外套膜，對外在環境的物理化學變化相對較無抗性，若無適當的宿主存在，登革病毒在體外很快就會失去感染力。

事實上，並非所有細胞都能被登革病毒所感染；登革病毒會利用許可性宿主 (permissive host) 細胞膜上黏滯性較高的含醣類分子 (如 heparan sulfate、DC-SIGN 等) 作為其接受器 (receptor)<sup>6</sup>，再藉由網格蛋白媒介胞吞作用 (clathrin-mediated endocytosis) 進入細胞中<sup>7,8</sup>；此外，若非初次感染登革病毒，先前感染登革病毒後所產生的非中和性抗體，就有機會與後來的不同型的登革病毒結合形成複合體，再藉由抗體恆定區接受器 (Fc receptor) 進入細胞，這也就是由 Halstead 所提出的「抗體依賴性增強作用」(antibody-dependent enhancement, ADE) 假說。被胞吞後的登革病毒，會存在於細胞的胞內囊泡 (endosomal vesicle) 中，再藉由胞內囊泡的酸化，使得病毒結構產生變化、病毒的外套膜與胞內囊泡的膜融合；這樣的病毒脫殼 (uncoating) 過程，目的是使登革病毒的正向基因體 RNA 能夠被釋放到細胞質中<sup>9</sup>。曝露於細胞質中的加帽病毒 RNA，就像一般細胞的加帽 mRNA 在內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 中進行轉譯；由於登革病毒的基因體 RNA 在 3' 端並不具有多聚腺苷酸尾巴 (poly A tail)，因此，登革病毒便將 5' 端和 3' 端未轉譯區 (untranslated region, UTR) 演化成可以互補的結構，使病毒的正向基因體 RNA 得以利用 RNA 環化的方式轉譯出大量的病毒蛋白。

由於人類細胞內的基因表現必須符合 monocistronic 的規則，但登革病毒必須使用僅有的單一正向基因體 RNA 生產出所有的病毒蛋白才

能進行複製；因此，登革病毒所採取的策略是先產出一條多蛋白前驅物 (polyprotein precursor)，並在轉譯的過程中，利用宿主的訊息酵素 (signalase) 與病毒自身的絲胺酸蛋白酶 (viral serine protease) 將之剪切成十種病毒蛋白；其中，核 (core) 蛋白、前驅膜 (prM) 蛋白以及外套膜 (envelope) 蛋白為包裹病毒顆粒所需的結構性蛋白 (structural protein)；而另外七種不存在於病毒顆粒的非結構性蛋白 (nonstructural protein：NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 與 NS5)，則是用來協助病毒產出負向基因體 RNA 模板，再以 RNA 複製 RNA 的模式 (RNA-dependent RNA polymerization) 生合成出更多的正向基因體 RNA。複製完成後的正向病毒基因體 RNA 和結構性蛋白會先在內質網中組成一個未成熟病毒顆粒<sup>10,11</sup>；而這些新生成的未成熟病毒顆粒在外泌經過高基氏體時，必須藉由宿主的弗林蛋白酶 (furin protease) 將 prM 蛋白切斷成 pr 和 M，使得最終釋出的登革病毒顆粒是成熟且具有感染力的。而從感染到釋出新病毒顆粒所需的時間，雖然會因細胞的種類而有所差異，但一般而言，登革病毒大約僅需 12~15 小時便能完成一次生活史<sup>12</sup>。

### 登革病毒蛋白簡介

**核 (core) 蛋白** 登革病毒轉譯出多蛋白前驅物、再經由病毒蛋白酶 (NS2B3) 切割後，第一個製造出來的就是分子量大約 12 kDa 的核蛋白。就病毒轉譯需求而言，核蛋白的 5' 端 RNA 序列不僅編譯 (encode) 核蛋白 N 端的胺基酸組成，其 RNA 結構也是登革病毒 RNA 轉譯時

所必須的。核蛋白的 C 端帶有前驅膜 (prM) 蛋白的訊息胜肽 (signal peptide)，用來協助轉移前驅膜蛋白至內質網的腔室。被登革病毒感染後，無論是在細胞核或細胞質，均可發現有核蛋白的分布<sup>13</sup>。細胞質中的核蛋白，主要功能是提供內質網膜與病毒基因體 RNA 的互動，以利登革病毒的組裝；而位在細胞核中的核蛋白，除了已知能和核內的一些宿主蛋白互動 (如 histone、nucleolar RNA helicase、importin- $\alpha/\beta$  等) 外，其功能與角色仍待釐清。

**前驅膜 (precursor membrane；prM) 蛋白** 前驅膜蛋白 prM 由二段蛋白：pr 以及 M 蛋白所組成。登革病毒顆粒在內質網組裝的過程中，prM 可協助外套膜蛋白正確的摺疊，並保護未成熟的病毒顆粒，避免過早與宿主細胞中的脂膜結構融合，而導致無法釋出<sup>14</sup>。然而，若最終釋出的病毒顆粒帶有 prM 蛋白 (未成熟登革病毒)，這些病毒顆粒也不易感染下一個細胞；因此，未成熟的登革病毒顆粒必須在外泌過程中，藉由宿主的弗林 (furin) 蛋白酶將 prM 蛋白切斷成 pr 和 M<sup>15</sup>。而 pr 蛋白在被切割完後，在外泌的酸性小泡中仍能覆蓋在登革病毒顆粒表面上，避免與宿主的脂膜融合；而 pr 蛋白在細胞外、偏中性的環境下，則會離開病毒顆粒表面，使得釋出的病毒顆粒，成為成熟、具感染力的登革病毒<sup>16</sup>；而這樣的成熟過程也確保登革病毒在釋出的過程中能維持正確的方向性。

**外套膜 (envelope；E) 蛋白** 外套膜蛋白是以反平行二聚體 (anti-parallel dimer) 的方式覆蓋在登革病毒顆粒表面上，主要負責與宿主細胞結合、進入細胞、調節病毒膜與細胞膜的融合。在結構上，外套膜蛋白主要可以分成三個區域 (domain)：ED-I、ED-II 以及 ED-III<sup>17</sup>。

ED-I 位於外套膜蛋白的中央，負責與另一個外套膜蛋白形成同型二聚體 (homodimer)；ED-II 中含有融合胜肽 (fusion peptide)，負責病毒膜與細胞膜的融合；ED-III 則是參與在宿主細胞受器的辨識與結合<sup>18</sup>。由於宿主的免疫系統可針對外套膜蛋白產生中和性抗體 (neutralizing antibody) 來干擾病毒的感染<sup>19</sup>，因此也常成為登革病毒疫苗研究的標的之一<sup>20,21</sup>。

**非結構蛋白 1 (nonstructural protein 1 ; NS1)** NS1 被轉譯製造出來後會被醣化，可能滯留在細胞內質網膜上，或是外泌至細胞外。由於 NS1 與病毒 RNA 複製時所產生的雙股 RNA (double-stranded RNA ; dsRNA) 在細胞內有共位 (colocalization) 現象，因此被猜測 NS1 在細胞內的功能也可能與登革病毒的 RNA 複製有關<sup>22</sup>。至於外泌至細胞外的 NS1，在受感染的病人血清中能夠與補體系統交互作用，使得登革病毒免於補體依賴中和反應<sup>23</sup>，而逃脫宿主的免疫攻擊。一般認為，血清中的 NS1 濃度與登革患者的疾病嚴重程度具有正相關<sup>24</sup>，而可能的原因是：(1) 較高的 NS1 濃度，代表可能有較高量的登革病毒在進行複製；(2) 高量的 NS1 較有機會誘發自體抗體 (autoantibody) 去破壞患者自身的血小板與內皮細胞，使得患者出血 (hemorrhage) 或血漿外滲 (plasma leakage) 的可能性大幅增高，也就是所謂的「molecular mimicry」假說；(3) 較多的胞外 NS1 可以直接活化更多的類鐸受體 (Toll-like receptor)，造成較強的發炎反應。另外，由於 NS1 具有良好的抗原性 (antigenicity)，也有許多的研究是以 NS1 做為標的，進行疫苗或診斷試劑的開發。

**非結構蛋白 2 (nonstructural protein 2 ; NS2)** NS2 被轉譯出來後會被病毒蛋白酶 NS2B3 再進一步切割成 NS2A 及 NS2B。位在 N 端的 NS2A 是一個厭水性強的蛋白，可能藉由與細胞內膜狀結構的交互作用，參與病毒的 RNA 複製、組裝；也可藉由抑制宿主細胞的干擾素訊息傳遞 (interferon signaling)，對抗宿主細胞的先天免疫系統。而位在 C 端的 NS2B，則是下一個非結構蛋白 NS3 的輔助因子 (cofactor)；NS3 必須藉由與 NS2B 的交互作用，形成 NS2B3 複合體，才具有蛋白酶的切割活性 (protease activity)。

**非結構蛋白 3 (nonstructural protein 3 ; NS3)** NS3 是黃病毒中保守性高、第二大的病毒蛋白。其 N 端三分之一的部份是一個絲胺酸蛋白酶 (serine protease)，至少要有 NS2B 最末端 40 個胺基酸的參與，這個絲胺酸蛋白酶才會具有活性；而剩餘的 C 端部份則具有 RNA 解旋酶 (RNA helicase)、核苷三磷酸酶 (nucleoside 5'-triphosphatase, NTPase) 的活性。登革病毒在製造複製所需的病毒蛋白時，必須仰賴這個絲胺酸蛋白酶正確的切割處理；病毒 RNA 複製的過程中，所形成的 dsRNA 結構，則有賴 RNA 解旋酶的活性將其旋開 (unwinding)，而解旋過程所需的能量則由核苷三磷酸酶提供<sup>25</sup>。由於 NS3 絲胺酸蛋白酶的酵素活性是登革病毒複製所必須的，再加上 NS3 的高度保守性，也使得 NS3 是許多抗登革藥物研發時的常見標的之一。

**非結構蛋白 4 (nonstructural protein 4 ; NS4)** NS4 與 NS2 類似，都是屬於厭水性的分子，而且都可再被切割成二部分：NS4A 與 NS4B。NS4A 最末端有一段稱為 2k 的片段，可以帶領 NS4B 進到內質網腔室中。而 NS4A 和 NS4B 除了參與病毒複製外，NS4B 也具有部份

阻斷干擾素訊息傳遞的功能。

**非結構蛋白 5 (nonstructural protein 5 ; NS5)** NS5 是所有登革病毒蛋白中最大、保守度最高的蛋白<sup>26</sup>。NS5 的 N 端具有甲基轉移酶 (methyltransferase)、鳥苷酸轉移酶 (guanylyltransferase) 活性；藉由這二個酵素，新生成的登革病毒 RNA 才得以進行加帽甲基化 (cap methylation)。至於登革病毒基因體 RNA 的複製，則必須全然仰賴 C 端的 RNA 依賴型 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)。NS5 除了與病毒 RNA 複製有關之外，NS5 也被發現能夠與轉錄因子 STAT2 結合，再召集細胞內的 UBR4 使 STAT2 泛素化 (ubiquitination)，最後使 STAT2 被蛋白酶體 (proteasome) 水解，進而阻斷干擾素的訊息傳遞<sup>27</sup>。

### 登革病毒蛋白與宿主蛋白於細胞內的修飾

蛋白質的轉譯後修飾 (post-translational modification) 可以進一步影響與控制蛋白質的活性、位置、更新 (turnover) 以及與其他蛋白質之間的交互作用<sup>28</sup>。轉譯後修飾可以藉由添加修飾基團到胺基酸上而達成，常見方式有：磷酸化 (phosphorylation)、甲基化 (methylation)、乙酰化 (acetylation)、醣化 (glycosylation)、泛素化 (ubiquitination)、小泛素化 (sumoylation) 等。目前已知轉譯後修飾也參與在登革病毒的感染過程中，藉由修飾病毒蛋白來調控登革病毒的複製，也可藉由修飾宿主蛋白來塑造有利於病毒複製的環境。

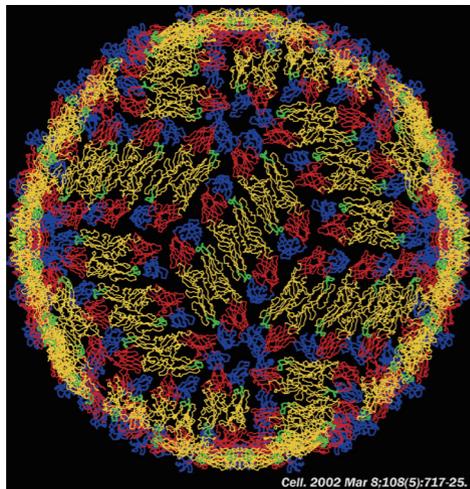
登革病毒的前驅膜蛋白、外套膜蛋白、NS1 蛋白都可被醣化。外

套膜蛋白序列上第 67 與第 153 個天門冬醯胺 (Asparagine ; Asn-67 與 Asn-153) 二個位置上的醣化與否，會影響病毒的組裝、釋出、以及感染力。而 NS1 蛋白的醣化則發生在 Asn-130、Asn-207 以及 12 個高保守性的半胱胺酸 (Cys) 上；Asn-207 醣化可幫助 NS1 分泌至細胞外，而 Asn-130 醣化則可穩定細胞外的 NS1 形成六聚體 (hexamer) 結構。不論是 Asn 或 Cys，NS1 上的醣化若受到抑制，都可導致登革病毒的複製受到延遲或阻滯<sup>29</sup>。NS5 可藉由不同程度的磷酸化調整其在細胞核與細胞質分布的比例；NS5 亦可藉由小泛素化調控自身的半衰期，進而影響 NS5 複製病毒基因體 RNA、與對抗干擾素的能力<sup>30</sup>。有趣的是，轉譯後修飾也可作為宿主細胞對抗病毒的先天免疫手段，例如：宿主細胞可共價鍵結一種名為 ISG15 的小蛋白分子至 NS3 與 NS5 上，使得登革病毒的複製受到抑制<sup>31</sup>。

另一方面，前述登革病毒蛋白表現策略中提及，登革病毒所產出的多蛋白前驅物必須藉由訊息酵素與登革病毒蛋白酶 NS2B3 複合物的剪切，才能被後修飾成十種病毒蛋白。目前已知病毒蛋白酶 NS2B3 至少負責其中六個位點的切割：NS2A-NS2B、NS2B-NS3、NS3-NS4A、NS4B-NS5 之間、以及核蛋白、NS4A 蛋白 C 端的切割。然而，相較於登革病毒蛋白酶的「病毒蛋白受質」已被廣泛且深入地探討，「宿主蛋白受質」的相關研究則因成本與技術的門檻，而較少被提及。最近已有三個宿主蛋白被發現能被登革病毒蛋白酶所切割，分別是 MITA (Mediator of IRF3 activation, 又名為 STING 或 TMEM173)、MFN1 (mitofusin-1, 粒線體融合素 1)、以及 MFN2。登革病毒可藉由切割 MITA 阻斷細胞干擾素的產生<sup>32</sup>；藉由切割 MFN1 與 MFN2 調控

宿主細胞粒線體的形態與動態平衡 (mitochondrial dynamics)，並進而影響受感染細胞干擾素的產量、以及病毒誘發細胞病變 (virus-induced cytopathic effects) 的嚴重程度<sup>33</sup>。由此可知，這些病毒與宿主細胞之間的互動，對於後續的感染結果有著重要的影響；而這些研究成果仍有待基礎與臨床研究學者的結合，賦予其更高的應用價值。

當細胞被登革病毒感染後，宿主細胞或病毒的蛋白會藉由轉譯後修飾來使細胞內的環境更有利於登革病毒的複製。登革病毒如何調控細胞因子？宿主細胞如何修飾病毒蛋白來符合病毒複製所需？這些相關的分子機制研究仍有待進一步的釐清。全世界約有 40% 的人口遭受登革病毒感染的威脅，使得登革疾病逐漸成為全球性的公共衛生問題，而身處熱帶 / 亞熱帶的台灣更是首當其衝。在未來，我們期望相關的基礎研究結果，可以提供更多線索給不同領域的登革研究團隊，藉由應用到預防、治療、預後等各個層面，共同來發展對抗登革病毒的策略。



登革病毒

## 參考文獻

1. Rigau-Pérez JG. The early use of break-bone fever (Quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; **59**:272-4.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 1998; **11**:480-96.
3. Kimura R, Hotta S. Experimental inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku.* 1943; **3344**:1378-9.
4. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science.* 1945; **101**:640-2.
5. Ko YC. Epidemiology of dengue fever in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci.* 1989; **5**:1-11.
6. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997; **3**:866-71.
7. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 2008; **4**:e1000244.
8. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol.* 2008; **89**:474-84.
9. Zaitseva E, Yang ST, Melikov K, Pourmal S, Chernomordik LV. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* 2010; **6**:e1001131.
10. Westaway EG. Flavivirus replication strategy. *Adv Virus Res.* 1987; **33**:45-90.
11. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe.* 2009; **5**:365-75.
12. Cleaves GR, Ryan TE, Schlesinger RW. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology.* 1981; **111**:73-83.
13. Bulich R, Aaskov JG. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *J Gen Virol.* 1992; **73**:2999-3003.
14. Yu IM, Holdaway HA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. *J Virol.* 2009; **83**:12101-7.

15. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol.* 1997; **71**:8475-81.
16. Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008; **319**:1834-7.
17. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; **100**:6986-91.
18. Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MA, Da Poian AT. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 2015; **39**:155-70.
19. Chiu MW, Yang YL. Blocking the dengue virus 2 infections on BHK-21 cells with purified recombinant dengue virus 2 E protein expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; **309**:672-8.
20. Messer WB, de Alwis R, Yount BL, Royal SR, Huynh JP, Smith SA, Crowe JE Jr, Doranz BJ, Kahle KM, Pfaff JM, White LJ, Sariol CA, de Silva AM, Baric RS. Dengue virus envelope protein domain I/II hinge determines long-lived serotype-specific dengue immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; **111**:1939-44.
21. Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe.* 2008; **4**:229-38.
22. Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology.* 1996; **220**:232-40.
23. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Atkinson JP. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* 2010; **207**:793-806.
24. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002; **186**:1165-8.
25. Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol.* 1999; **73**:3108-16.
26. Davidson AD. Chapter 2. New insights into flavivirus nonstructural protein 5. *Adv Virus Res.* 2009; **74**:41-101.
27. Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, Rajsbaum R, Pisanelli G, Simon V, Mulder LC, Fernandez-Sesma A, García-Sastre A. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog.* 2013; **9**:e1003265.
28. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003; **21**:255-61.
29. Fan J, Liu Y, Yuan Z. Critical role of dengue virus NS1 protein in viral replication. *Virol Sin.* 2014; **29**:162-9.
30. Su CI, Tseng CH, Yu CY, Lai MM. SUMO modification stabilizes dengue virus nonstructural protein 5. *J Virol.* 2016; **90**:4308-19.
31. Hishiki T, Han Q, Arimoto K, Shimotohno K, Igarashi T, Vasudevan SG, Suzuki Y, Yamamoto N. Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; **448**:95-100.
32. Yu CY, Chang TH, Liang JJ, Chiang RL, Lee YL, Liao CL, Lin YL. Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *PLoS Pathog.* 2012; **8**:e1002780.
33. Yu CY, Liang JJ, Li JK, Lee YL, Chang BL, Su CI, Huang WJ, Lai MM, Lin YL. Dengue virus impairs mitochondrial fusion by cleaving mitofusins. *PLoS Pathog.* 2015; **11**:e1005350.

### 第三章

## 登革熱病媒蚊生態與防治

陳錦生

過去常用的病媒指數主要是用在黃熱病防治使用，且制定的環境條件也和目前的環境不同。因此，有必要再制定適合本地環境特色的病媒指數，例如使用誘卵器調查的產卵陽性率 (ovitrap positive index, OPI)、卵密度指數 (egg density index, EDI) 等方法亦可考慮。二種病媒蚊已漸漸適應地下的 (subterranean) 孳生源和其他過去較常忽略的所謂「隱性孳生源」，這是未來防治應該注意的新孳生源。台灣防治登革熱病媒蚊成效不彰的原因有很多，其中，昆蟲學的研究和昆蟲人才長期被忽略，基層技術人員的訓練不足及監測與評估技術未能落實尤為嚴重。

由於登革熱是蚊蟲媒介的傳染病，目前並無有效的治療方法，亦無理想有效的疫苗可以使用，唯一可行的方法是阻斷其傳染的途徑，避免病媒蚊的傳播。因此，防治病媒蚊，減少蚊蟲與人接觸的機會，便成了登革熱防治最重要的手段。

### 登革熱病媒 (Vector)

在早期就有許多學者推測登革熱是經由蚊蟲傳播，但一直到 1903 年才由 Graham 首次證實其相關性；1906 年 Bancroft 則進一步證實登革熱主要是由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 傳播<sup>1</sup>。但 1916 年台灣和 1926 年菲律賓、印度等地的登革熱流行，則和白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 有關，而 1931 年從野外白線斑蚊分離出登革病毒，更證實了白線斑蚊為僅次於埃及斑蚊的次要病媒<sup>2</sup>。1942 年，台灣全島大流行，及 1995 年以後台灣北部和中部的流行；2014 廣州和日本的登革熱亦為白線斑蚊所傳播。另外，在南太平洋一些島嶼的登革熱流行，也發現此二種病媒蚊以外的四種斑蚊 (*Aedes* spp.) 和登革熱有關，如：*Ae. hebrideus*，*Ae. polynensis*，*Ae. scutellaris*，*Ae. mediovittatus* 等。但這些蚊蟲主要分布於南太平洋，對登革熱的媒介作用有其侷限性<sup>1</sup>。除了斑蚊之外，其他常見的蚊蟲，如居家常見的熱帶家蚊 (*Culex quinquefasciatus*)，雖曾被高度懷疑與登革熱有關，但在實驗室經接種登革病毒實驗失敗後，排除其為病媒的可能性<sup>3</sup>。WHO 目前仍將埃及斑蚊視為登革熱的主要病媒，白線斑蚊則為次要病媒。一般認為埃及斑蚊是城市型登革熱的主要病媒，白線斑蚊則是叢林型和農村地區的主要病媒。在台灣，埃

及斑蚊僅分布於嘉義以南，白線斑蚊則全島均有分布<sup>4</sup>。

### 病媒蚊與病毒

人和靈長類動物是登革病毒的自然宿主，在馬來西亞和西非的叢林中捕獲的蚊蟲中可分離到病毒，證明病毒有森林型自然循環。在城市型疫原地內隱性感染者和病人是主要的感染源和宿主。病人發病前一天和發病後五天為病毒血症 (viremia) 期，傳染性最強。病毒血症有時可持續到 12 天，病毒滴度 (viral titers) 可達到  $10^8$  50% 的蚊蟲感染劑量 (MID50)。當雌蚊叮咬病毒血症病人後，病毒在蚊蟲唾液腺內增殖，經 8-10 天的潛伏期，病毒可分布到蚊體全身；當蚊蟲再次吸血時，便藉著唾液腺將病毒傳播給健康人，有時一隻雌蚊可以把病毒傳給好幾個人。斑蚊在感染病毒後無任何症狀，且可終生帶毒和傳播病毒。在感染病毒的雌蚊卵巢中也可檢測到病毒，並有報導有經卵傳播 (transovarial transmission) 現象。Rosen 等人<sup>5</sup>用台灣的白線斑蚊在實驗室內進行感染試驗，發現四型登革病毒均有經卵傳播的能力，而埃及斑蚊則只能傳播第一型病毒，且陽性率很低。但在馬來西亞利用誘卵器的調查野外蚊蟲的結果則發現在 7 隻白線斑蚊幼蟲和 3 隻埃及斑蚊幼蟲可檢測到病毒，證明某些情況下，經卵傳播也有其保持病毒自然循環的作用<sup>6</sup>。

### 流行因素

登革病毒、宿主和斑蚊是登革熱流行的三個因素，三者之間的關

係主要有幾個影響因子：

- (1) 宿主因素：登革病毒對人的致病性、感染後的發病、產生出血和休克的免疫機制、不同人群和不同型別與株別的病毒都有關係。病人末梢血液病毒的滴度和二種斑蚊的感染閾值 (infective threshold) 尚不清楚，這也是病媒蚊傳播效能 (vector competence) 的條件之一。此外，人群的生活條件和習慣，如：人口聚集密度和供水條件也是重要因素。
- (2) 媒介因素：病媒蚊的族群動態，生活習性及其環境條件；病媒蚊感染病毒後在體內增殖病毒的能力，特別是中腸屏障 (midgut barrier)，如消化酶、圍食膜 (peritrophic membrane)、上皮細胞受體等因素，亦因病媒蚊種類，不同病毒株別，吸入病毒滴度和環境的溫度均有關係。有些病毒經胸部接種，避開中腸屏障可以感染，但經口則無法感染，這方面尚需更深入的研究<sup>7</sup>。
- (3) 蚊蟲密度因素：某一地區的蚊蟲密度閾值 (vector density threshold) 多大亦是流行病學所關心的問題。過去在都市型黃熱病的研究，埃及斑蚊的密度閾值為房屋指數 (House index, HI) 1% 或布氏指數 (Breauteau index, BI) 小於 5。但以此標準用於登革熱未必可行。事實上，現在常用的指數 (布氏指數 BI、房屋指數 HI、容器指數 CI 等) 常因調查者的偏差，有時所對應的密度等級常出現不一致的現象，造成防治決策的困擾。新加坡曾將密度閾值降到 HI 為 1，但仍有病例發生，後來再降到每戶 0.2 隻雌蚊作為臨界密度。原因可能是當時針對黃熱病所訂的各種指數，並不符合現在登革熱流行的各種環境。因此，有必要再制定適合本地環境特色的指數，例如使用誘卵

器調查的產卵陽性率 (ovitrap positive index, OPI)、卵密度指數 (egg density index, EDI) 等方法亦可考慮。事實上，蚊蟲密度雖有影響，更直接的是受感染蚊蟲的密度。另外，亦有報導當人群的免疫率超過 80% 以上時，即使蚊蟲的密度很高也不會有傳播發生。

### 病媒蚊生態習性

埃及斑蚊主要分布於熱帶地區，一般喜棲於室內，其吸血習性較偏嗜吸人血 (anthropophilic)，且多在白天吸血，並選擇陰暗潮濕之處棲息，故多分布於都市區；白線斑蚊則主要分布於熱帶及溫帶地區，一般喜棲於室外，吸血習性除人類外，並可吸食其他哺乳動物、鳥類、爬蟲類等血液，多在清晨及傍晚吸血，有時亦可在夜間吸血，吸血行為及吸血後棲息多在戶外。此二種病媒蚊均孳生於人工容器，如：水缸、花瓶、廢輪胎、水盤等乾淨的水體，而白線斑蚊除了人工容器外，尚可孳生於樹洞、竹筒等天然容器內。故就孳生源之種類及範圍而言，白線斑蚊較埃及斑蚊為廣。然而，最近的研究發現：埃及斑蚊似可適應環境的改變而改變其孳生源，例如在波多黎各，埃及斑蚊可在化糞池大量孳生<sup>8</sup>；在澳洲，水井、人孔亦成為埃及斑蚊孳生源<sup>9</sup>。台灣南部最近的調查也發現，過去未曾注意的水溝也成了登革熱重要的孳生源。主要原因可能是高雄、台南完成衛生下水道工程後，雨水、汗水分流，一般家庭汗水並未排入水溝，因此水溝內積水多為較乾淨的雨水，形成另類的人工容器，加上因登革熱防治，大力清除孳生容器的結果，蚊蟲只好被迫選擇水溝產卵，變成幼蟲調查中的隱性孳生源。

另外在 2015 年台南的登革熱流行時，亦發現貨櫃屋屋頂的積水及一般房屋屋簷排水的「天溝」也成了埃及斑蚊的孳生源<sup>10</sup>。而在日本的調查也發現，在公園許多貯水池或下水道入口 (catch basins) 亦可發現白線斑蚊孳生，並成為重要的孳生源<sup>11</sup>。也就是說，此二種蚊蟲已漸漸適應地下的 (subterranean) 孳生源和其他過去較常忽略的所謂隱性孳生源，這是未來防治應該注意的新孳生源。

在各種生態特性之比較方面，生命表的研究顯示：白線斑蚊之平均壽命為 26.67 天，較埃及斑蚊之 21.57 天為高，但埃及斑蚊之淨生殖率則較白線斑蚊為高；其餘各因子差異並不顯著<sup>12</sup>。而發育零點 (development threshold) 方面，埃及斑蚊為 13.42°C，白線斑蚊則為 11.4°C，亦顯示白線斑蚊應較埃及斑蚊更耐低溫。白線斑蚊在低溫時，有滯育 (diapauses) 的現象，在乾燥時，卵也可耐乾燥幾個月仍可孵化。

在兩種蚊蟲的地理分佈方面，埃及斑蚊分布於熱帶地區，白線斑蚊原只限於亞洲的熱帶及溫帶地區。但近年來，由於亞洲廢輪胎的外銷及交通運輸的頻繁，白線斑蚊已漸漸擴張其版圖。美國德州在 1986 年開始記錄白線斑蚊的入侵，至少已有 26 個州發現白線斑蚊<sup>7</sup>。這些白線斑蚊主要來自亞洲的廢輪胎，尤以日本為最多<sup>13</sup>。此外，歐洲許多國家也陸續發現白線斑蚊的入侵。由此觀之，全球貿易、交通工具的頻繁流動等全球化的結果，對病媒蚊的分佈較氣候影響更為重要。

一般而言，埃及斑蚊分布於熱帶，白線斑蚊分布較趨熱帶、亞熱帶及溫帶，二者形成反向的梯度分布。北部白線斑蚊居多，南部埃及斑蚊居多，中間會有共存區域。Higa<sup>14</sup>認為斑蚊的分佈受溫度、濕度、雨量的影響。在越南，白線斑蚊分布在北部，埃及斑蚊分布在南部，

中間地帶二者共存。在日本，埃及斑蚊只分布在琉球。他認為埃及斑蚊的卵和成蟲較耐乾燥，在南部乾熱區較白線斑蚊更易存活。而在中間地區，亦受溫度變化的影響而有不同。此外，埃及斑蚊的都市型和白線斑蚊的鄉村型分布，亦會影響其分布地區。在台灣，埃及斑蚊僅分布於嘉義布袋以南，而白線斑蚊則全島均有分布。南部地區，二種斑蚊均有分布，但因地理環境而有不同，鄉村地區及郊外主要以白線斑蚊為主，都市區則以埃及斑蚊為主。但近年來，都會區的公園綠地增加，亦可發現白線斑蚊孳生。至於為何埃及斑蚊只分布於嘉義布袋以南，除了氣候因素以外，有研究指出二種蚊蟲的競爭，亦受到各自幼蟲體內共生簇蟲影響的假說<sup>15</sup>。在埃及斑蚊及白線斑蚊體內各有其共生的原生動物，前者為嗜蚊簇蟲 (*Ascogregarina culicis*)，後者為台灣簇蟲 (*Ascogregarina taiwanensis*)。此二種寄生蟲對各自的宿主均無明顯的為害。有些研究指出，簇蟲對其天然宿主無明顯之影響，但對非天然宿主而言，則其死亡率甚高<sup>16</sup>。實驗室之結果顯示：埃及斑蚊若餵食白線斑蚊體內所產下的台灣簇蟲之孢子囊，則死亡率約達 70%；反之，白線斑蚊若餵食埃及斑蚊體內所產下的嗜蚊簇蟲之孢子囊，則死亡率不明顯。在台灣野外調查的結果亦發現：白線斑蚊之台灣簇蟲感染率在中部地區為 79.8%，而在南部地區則為 22%。而南部地區埃及斑蚊感染嗜蚊簇蟲之比率則甚低<sup>15</sup>。由此可推論，台灣簇蟲在中部地區甚為普遍，故一旦埃及斑蚊入侵中部，很容易因感染台灣簇蟲致死，此一假說值得再進一步研究。

### 病媒蚊防治

登革熱病媒蚊防治，主要在避免人與病媒蚊的接觸。在平時以孳生源清除為主，並進行病媒蚊的分布調查及密度監測。監測的方法除了疾病管制署目前所用的各種指數外，也可使用誘卵器 (ovitrap)，較為客觀。孳生源不易清除之處，可使用其他防治方法，如：食蚊魚、蘇力菌、劍水蚤等生物防治法。孳生源清除除了環保單位負責之外，運用社區的力量介入，由鄰里或社區組織自行定期調查，預防蚊蟲孳生，並透過衛生教育手段，加強民眾的危機意識，防患未然。登革熱的流行與人的活動行為有密切的關係。因此除了以衛教宣導改變人的行為外，利用法規防治，訂定病媒防治法規及罰則，對不願配合之民眾或單位科以罰款，亦可收效，在新加坡施行的成效可為借鏡。

在新科技研發方面，利用一種叫做沃巴赫氏立克次體 (*Wolbachia pipientis*)，可經卵傳播的革蘭氏陽性菌，將其殖入病媒蚊中，可產生對登革病毒的抗性，並降低病媒蚊的壽命。若將其大量繁殖，釋放至自然界，將可遏阻登革熱的流行<sup>17</sup>。此一構想在澳洲、巴西、馬來西亞、廣州等地均已進行田間試驗，但效果如何，是否有其他的副作用 (如：產生孤雌生殖的蚊蟲，可能增強其他病毒的感染力等問題)，尚待評估，目前 WHO 尚未推薦使用。另外，以基因改造方式產生的「基改蚊蟲」(GM mosquito)，使其專產不吸血的雄蚊，或改變其吸血習性，達到防治的目的。這些目前仍在研發階段，但已帶來許多疑慮。如英國 Oxitec 生技公司計畫在美國佛羅里達進行田間試驗，便引來居民的強烈質疑<sup>18</sup>。

在疾病發生後，由於病媒蚊一旦帶毒，終生帶毒，因此必須要迅

速消滅帶毒蚊蟲。此時的緊急防治就必須考慮使用化學防治。由於近年來，登革熱防治多使用合成除蟲菊，病媒蚊對許多常用的合成除蟲菊多已產生抗藥性，因此對這些化學殺蟲劑的藥效試驗和抗藥性監測在平時就要進行檢測<sup>19</sup>。南部地區，由於二種病媒蚊習性不同，因此噴藥的方式亦不相同。一般而言，室內埃及斑蚊防治以空間噴霧為主，WHO 推薦使用冷式噴灑，戶外白線斑蚊防治則可用熱霧式空間噴灑或綠籬法做殘效噴灑。

在物理防治方面，過去使用很多的是加裝紗窗紗門、蚊帳或浸藥蚊帳等方式來防治蚊蟲，但由於生活習慣不易改變，效果也不好。利用紫外光（波長 370 nm）捕蟲燈防治蚊蟲，對夜行性的家蚊可能有效。但對白天活動的埃及斑蚊（反應波長約 500 nm）就無法達到防治效果<sup>20</sup>。最近美國一家 LED 公司與比爾蓋茲基金會合作，開發出利用雷射殺蚊的方法，利用光子網（photonic fence）偵測雌蚊之頻率，可以有效殺死 25-100 公尺範圍內之蚊蟲。目前尚未量產，是否有實用價值，尚待觀察。

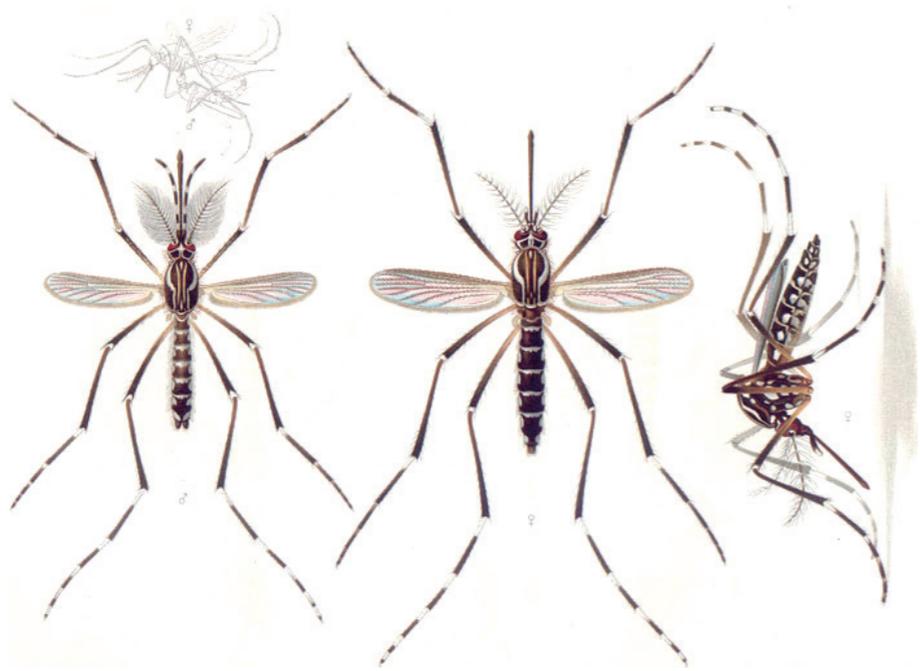
使用綜合病媒管理（Insect Vector Management, IVM）的觀念，運用各種資訊與方法，在適當的時機使用適合的防治方法，以預防及減少登革熱的發生。最近台南市登革熱防治，利用公開開放的資訊平台及地理資訊系統（GIS）結合各種氣候及幼蟲密度指數的資料進行大數據分析，協助防治策略的釐定便是 IVM 的一種例子。

## 結論

過去登革熱病媒防治成效不彰的原因，經由巴西、瓜地馬拉、菲律賓、越南等四國的個案研究分析指出：(1) 人力不足（昆蟲學家、社會學家、病媒防治人員）；(2) 基層技術專家不足；(3) 預算不足；(4) 不適當的地理覆蓋度；(5) 過度依賴殺蟲劑；(6) 社區工作困難；(7) 小容量建築多；(8) 幾乎未做監測與評估等因素為主要原因<sup>21</sup>。而在新加坡的經驗，更顯示：雖然在 1970 年代成功防治登革熱後，十五年間未曾大規模發生，卻在 1990 年代再度復發，而病媒蚊指數並未明顯升高，主要原因可能是：(1) 居民群體免疫力降低；(2) 病毒在戶外傳播的機會增加；(3) 成人感染明顯增加（以往為常在家的小孩和老人較多）；(4) 監測重點改為早期發現病例和判斷是否為群聚感染為主，忽略了病媒監測工作。因此新加坡政府重新重視流行病學及昆蟲學的研究，回歸病媒防治的計畫做為重點而非只是及早發現病例而已<sup>22</sup>。這些原因其實也是台灣防治登革熱病媒蚊成效不彰的原因。其中，昆蟲學的研究和昆蟲人才長期被忽略，基層技術人員的訓練不足，及監測與評估技術未能落實尤為嚴重。

## 參考文獻

- Gubler DJ, Ooi EE, Vasudenvan S, et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever (2nd ed.). CAB International, UK. 2014.
- Huang YM. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia. XIV. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Asia I – The scutellaris group of species. Contributions of the American Entomological Institute 1972; **9**:1-110.
- Huang G, Vergne E, Gubler DJ. Failure of dengue viruses to replicate in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1992; **29**:911-4.
- 黃正中、陳錦生。埃及斑蚊與白線斑蚊在台灣分佈現況之探討。東海生物 **13**:22-42。1986。
- Rosen L, Shroyer DA, Tesh RB, Freier JE, Lien JC. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 1983; **32**:1108-19.
- Lee H L, Rohani A. Transovarial transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in relation to dengue outbreak in an urban area in Malaysia. Dengue Bulletin 2005; **29**:106.
- 楊珮英、秦鄂得(編)。登革熱和登革出血熱—基礎理論與實驗技術。人民軍醫出版社。1999。
- CDC. Information of *Aedes albopictus*. <[http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/albopic\\_new.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/albopic_new.htm)>. Accessed 2010 Sep 29, 2010.
- Russell BM, McBride WJ, Mullner H, Kay BH. Epidemiological significance of subterranean *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) breeding sites to dengue virus infection in Charters Towers, 1993. J Med Entomol. 2002; **39**:143-5.
- 陳錦生。2015 台南市登革熱—病媒蚊防治經驗與建議。科技報導 **408**:6-8。2015。
- Kawada H, Maekawa Y, Abe M, Ohashi K, Ohba S-Y, Takagi M. Spatial distribution and pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from catch basins in parks in Nagasaki City, Nagasaki, Japan. Jpn J Infect Dis. 2010; **63**:19-24.
- 陳錦生、黃正中。登革熱病媒蚊之生態研究—發育零點與生命表之比較。玉山生物學報 **5**:1-15。1988。
- Reiter P. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988–1995: The shape of things to come? J Am Mosq Control Assoc. 1998; **14**:83-94.
- Higa Y. Dengue vectors and their spatial distribution. Trop Med Health. 2011; **39**:17-27.
- 黃旌集、陳錦生。簇蟲對登革熱病媒蚊分佈之影響。第九屆病媒防治技術研討會論文集，行政院環保署 pp.33-44。1997。
- 葉美玲、陳錦生、劉國鈞。蚊寄生性簇蟲之實驗感染研究。東海學報 **35**:87-106。1994。
- Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, McGraw EA, O'Neill SL. Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. PLoS Negl Trop Dis. 2014; **8**:e2688.
- Palmer L. Genetically modified mosquito sparks a controversy in Florida. Yale Environment 360. 04 Jun 2015.
- 張念台。登革熱及瘧疾病媒計畫編號：DOH100-DC-1026，昆蟲防治策略研究。行政院衛生署疾病管制局 100 年度科技研究發展計畫。2011。
- Muir LE, Thorne MJ, Kay BH. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: spectral sensitivity and other perceptual parameters of the female eye. J Med Entomol. 1992; **29**:278-81.
- Horstick O, Runge-Ranzinger S, Nathan MB, Kroeger A. Dengue vector-control services: how do they work? A systematic literature review and country case studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010; **104**:379-86.
- Ooi EE, Goh KT, Gubler DJ. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. Emerg Infect Dis. 2006; **12**:887-93.



埃及斑蚊雄蟲 (左)、雌蟲 (中) 及側面觀 (右) (取自 Wikimedia Commons, the free media repository)



白線斑紋雌蟲 (陳錦生油畫)

## 第四章

# 登革熱的臨床特徵與處置

何宗憲 劉清泉

登革的臨床症狀與很多常見疾病不易區分，因此需要抽血做一般常規實驗室檢查，再佐以登革快速診斷試劑。世界衛生組織將登革疾病分類導入警示症狀與嚴重度分級的概念，將登革疾病分為無警示症狀的登革、有警示徵象的登革、與嚴重登革三類。臨床初級照護的重點為從發燒就診之病人中，找出登革熱疑似病患，診斷後 24 小時內通報，以早期進行防疫措施。同時評估疾病期及嚴重度，找出有警示徵象患者，轉診或住院以進行靜脈輸液治療。

### 登革熱臨床診斷困難之處

登革熱是全球最盛行的一種蚊媒傳染病，最新的研究估計每年全球約有近 4 億人受到感染，但其中僅約 9 千萬人有臨床症狀<sup>1</sup>；也就是說，無症狀的感染者佔 7 成以上，如此也造成早期診斷的挑戰與防治的困難。全球登革擴散的主要原因為易感人口增加、都市化與全球化、氣候變遷與缺乏有效的病媒蚊控制<sup>2</sup>。

台灣登革熱流行的特色為每年入夏後由境外移入，在本土散播，冬天疫情退燒。先前的流行病學資料分析已知大部分病人為成年人，好發年齡層為 50-54 歲，出血熱的好發年齡層為 60-64 歲。有糖尿病、高血壓、腎臟病等慢性病患感染登革熱之死亡率較高<sup>3,4</sup>。最近的一項本土病例對照研究亦發現，登革感染者發生登革出血熱的獨立危險因子是 60 歲以上長者與第二型登革病毒感染。登革出血熱死亡的獨立預測因子則是 60 歲以上長者及糖尿病患者<sup>5</sup>。

被登革病毒感染後，往往有突發性高燒（體溫驟升至 39~40°C，持續 5~6 天）伴隨著畏寒、頭痛、四肢酸痛、骨關節酸痛、肌肉痛、背痛、後眼窩痛、畏光、虛弱及全身倦怠；有些則有臉部潮紅、結膜充血、噁心、嘔吐、腹瀉、食慾不振；發燒後期可能會出現斑疹，尤其是下肢。可惜的是，用症狀來診斷登革熱通常專一性不高，登革的臨床症狀與很多常見疾病（如流行性感冒、腸胃炎）不易區分（如表 1）<sup>6</sup>。

表 1 不同臨床症狀診斷實驗室確診之登革熱感染之準確性

症狀	敏感性 (%)	專一性 (%)
發燒	67.3	12.3
出疹	59.2	75.4
肌肉痠痛	46.8	53.5
噁心嘔吐	33.5	66.7
出血點	37	25.4

出處：Journal of Biomedical Science 2013, 20:75

台灣兒童感染登革熱之平均年齡為 14 歲，這些青少年常見的症狀與成人相似，如：肌肉痠痛、出血點、頭痛、噁心、嘔吐等，但皮膚癢的比率較成人患者多 4 倍。

典型的登革熱皮疹表現，即所謂的『紅海中的白島』("white island in the sea of red"，圖 1)，往往在快退燒時才會出現。對臨床醫療人員而言，診斷的最大挑戰在於學齡前兒童，他們往往不容易清楚描述身體的不舒服；而發燒合併噁心、嘔吐又與急性腸胃炎等常見疾病難以區分，況且登革熱也較少被列為台灣兒童不明熱鑑別診斷項目；因此，這些小小孩通常都是在疫區內發生不明熱，或是家中成員確診登革熱時才被診斷出來。既然臨床症狀專一性不高，當懷疑感染登革熱，必須考慮抽血檢查。



圖 1 典型的登革熱皮疹 - 『紅海中的白島』

以一般常用實驗室檢查項目來看，若白血球及血小板下降、肝功能 AST 或 ALT 上升 (AST/ALT>1.5 倍)、凝血時間 aPTT 延長，則登革熱的可能性很高。依傳染病防治法規定，只要懷疑是登革熱個案，皆需於診斷後 24 小時內向衛生單位通報

典型登革熱通常約一週退燒，依其臨床變化可分為第 1-3 天的發燒期，第 4-6 天的危險期，以及恢復期等三期。(圖 2 登革熱臨床分期)<sup>7,8</sup>

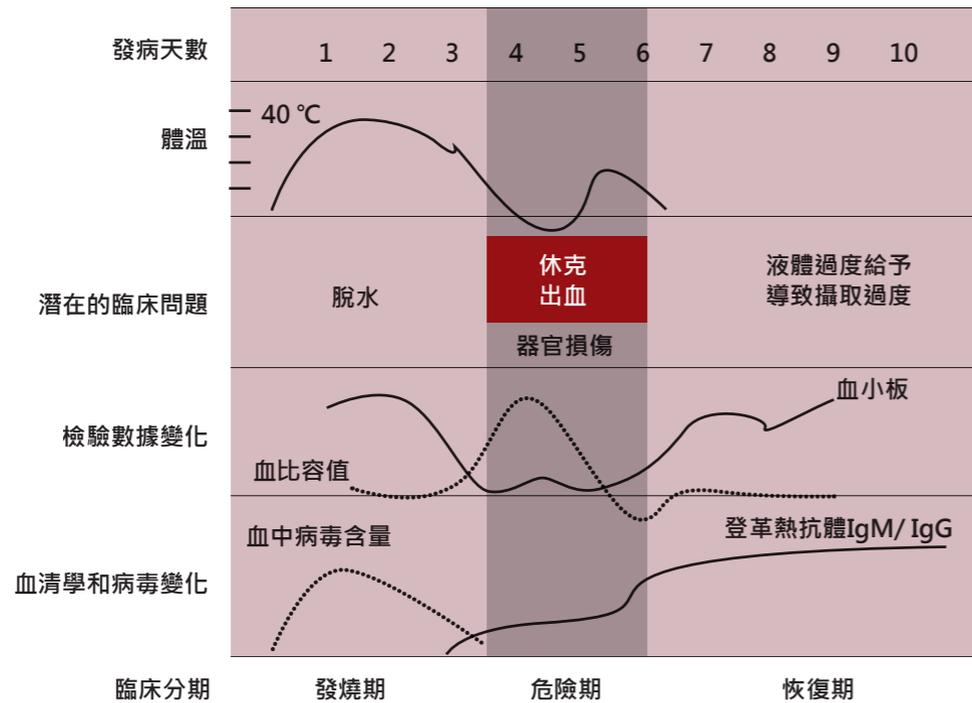


圖 2 登革熱臨床分期 (摘自 WHO Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2009 ed. p.25)

病人在發病前 1 天及發病後約 5 天內，血液裡就會有病毒，稱為「可傳染期」。登革熱患者在「可傳染期」內捐血，登革病毒似有轉移到受血者體內的可能。目前並沒有任何國家將登革病毒列為常規篩檢項目，但可以藉由加強捐血者健康狀況把關。受血者輸入帶有登革病毒血液的機率，相較於民眾未配合清除環境孳生源，遭受病媒蚊叮咬而感染登革熱的機會，可以說微乎其微。

### 登革病人之分級分流

舊版 (1975/1997) 登革感染臨床分類為登革熱 (dengue fever)、登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever)，並將登革出血熱分為四級 (grade)，再將第三與第四級登革出血熱稱為登革休克症候群。

最新版 (第三版, 2009) 的登革臨床指引，導入警示症狀 (warning signs) 與嚴重度分級 (severity-based) 的概念。將登革感染分為無警示症狀的登革、有警示症狀的登革、與嚴重登革三類。所謂的「警示徵象」包括腹部疼痛/壓痛，持續性嘔吐，體液蓄積 (胸水、腹水)，黏膜出血，嗜睡，躁動不安，肝脾腫大，或抽血檢查有血比容增加合併血小板急速下降等。

世界衛生組織新版治療指引更為了適當分流病人，以病人潛在疾病、身體檢查與基本血球檢查結果，將登革熱病人分三群 (Group A、B、C)，而不再區分登革熱與登革出血熱。

圖 3 世界衛生組織 2009 年版登革熱病例分類

<b>GroupA</b>	病人無「警示徵象」或潛在疾病因素及特定社經狀況 (如糖尿病、腎衰竭、慢性溶血疾病、肥胖、懷孕婦女、 嬰兒、老人、獨居或偏遠地區居民)→門診追蹤
<b>GroupB</b>	病人有「警示徵象」與潛在疾病因素及特定社經狀況 →住院
<b>GroupC</b>	病人有嚴重血漿滲漏導致休克、嚴重血漿滲漏導致體 液蓄積及呼吸窘迫、嚴重出血、嚴重器官損傷 →醫學中心

其中 Group A 病人無「警示徵象」或特定潛在疾病因素與社經狀況，如糖尿病、腎衰竭、慢性溶血疾病、肥胖、懷孕、嬰兒（小於一歲）、老人（大於 65 歲）、獨居或偏遠地區居民，建議門診追蹤治療。

Group B 病人有「警示徵象」或特定潛在疾病因素與社經狀況，建議住院。

至於 Group C 病人有嚴重血漿滲漏導致休克或體液蓄積、嚴重出血、嚴重器官損傷，則需至醫學中心加護病房治療。

新版的分類方式可視為一種簡易的登革熱臨床處置決策工具，意即先抓出可能臨床嚴重度較高的病人，減少死亡率。但在登革熱尚未本土化且醫療資源相對豐沛的我國，如何減少死亡個案，避免社會恐慌更是防疫重點。此一簡單易懂的分類可加強第一線醫療機構的通報意願，搭配即時迅速的疾管局實驗室確診，應可達到減少死亡與嚴重個案的成效。在尼加拉瓜的一項以 544 位實驗室確診登革熱病患比較新舊版分類標準的研究，也呼應此一看法，肯定新版分類標準比舊版更能發現

需要密切照顧的嚴重病患<sup>9</sup>。

對新版標準的疑慮則是只要有警示症狀都建議住院密切治療，在流行地區可能會發生高估疫情情形或是增加醫療資源的消耗，造成醫療體系負擔加重。此外，未明確規範實驗室診斷定義，符合個案臨床定義的不一定是登革熱。而不強調病態生理學之嚴重度分級，更造成日後流行病學研究與多年累積之數據無法銜接之問題<sup>10</sup>。而嚴重登革熱的診斷標準，休克與登革熱疾病本身的關聯性，以及肝功能變化可能與藥物或病人其他疾病相關，也都造成臨床人員之困惑。

如何減少登革熱流行期住院病人數目且兼顧病人安全，一直是全球醫護人員的重要課題。以新加坡為例，他們根據當地的病人特性（主要為年輕成人），使用有別於世界衛生組織 2009 年版的住院標準，結果降低了三成以上的住院人數（住院率從 2006 年 91.9% 降到 2008 年的 53.9%），且重症的人數並未因此增加；而單一的警示徵象並無法預測重症的發生，往往需要結合檢驗數值，身體檢查結果與相關病史，才能找出可能發生重症的病人予以適當處置<sup>11-13</sup>。這些研究結果也顯示登革熱流行病學之地域特殊性，必須根據本土資料量身訂製，才能建立更實用的臨床處置分流標準。

### 登革熱病人之臨床處置

臨床初級照護的重點為從發燒就診之病人中，找出登革熱疑似病患。發現登革熱疑似病患，診斷後 24 小時內通報，以早期進行防疫措施。病史詢問需包括相關症狀，過去病史及家族史等。身體檢查則包

括完整的身體、神智評估與血流動力學臨床評估。同時評估疾病期及嚴重度：找出有上述「警示徵象」患者，轉診或住院以進行靜脈輸液治療。

發燒初期，很難預期是否會進展為登革熱重症，多樣的登革熱重症表現常在臨床進展到危險階段才會出現。因此，應安排病人回診，並須量測血壓、脈搏及體溫、液體補充及流失量、尿量及頻次、檢驗血比容值、白血球及血小板，檢查臨床症狀，是否有「警示徵象」、血漿滲漏及出血徵象，以評估病程進展。若血比容值正常或只有微升，則可暫時診斷為典型登革熱，建議安排隔日或 2~3 日後門診追蹤。若血小板  $<100,000/\mu\text{l}$ ，則應安排每日回診。「警示徵象」可做為疾病進展之高風險指標，若有「警示徵象」，或已有血漿滲漏、血液濃縮的現象，則可能會發展成登革熱重症，需安排病人立即住院治療。

登革感染之血小板低下，一部分的致病機轉類似血小板低下性紫斑症 (idiopathic/immune thrombocytopenic purpura, ITP)，都是自體免疫系統活化造成；也因此不論血小板數值多低，只要沒有持續或大量出血，並不需輸血小板。至於預防性血小板輸注更不需要，輸進去的血小板往往如『泥牛入海』，半衰期極短，提升數值效果有限，因此當前所有的臨床指引均不建議此一作法<sup>14</sup>。但與 ITP 不同的是，免疫球蛋白與類固醇之使用均無法改善登革熱造成之血小板低下；顯示登革感染時對凝血系統的影響更為複雜，除了血小板功能與數量下降，骨髓中血小板前驅細胞減少，相關的凝血機制亦有變化，因此登革重症病人的出血並無法單純以血小板低下解釋，更遑論單以提高血小板數值來治療。此外，登革感染的凝血異常是暫時性的，只要撐過關鍵的

幾天危險期，往往會自然改善。

採居家追蹤方式的病患必須給予衛教。口渴和脫水起因於高燒、厭食及嘔吐，故應口服補充足量液體，即使退燒後仍應補充液體，足量口服液體的補充可以減少住院需要。電解質補充液、清湯、椰子汁或果汁等要比純開水來的好，也可使用治療腹瀉疾病的口服補充溶液 (ORS)。但應避免攝取深咖啡色的飲料，如可樂，以利觀察是否有消化道出血情形。需特別注意含糖液體可能會導致糖尿病患者或登革熱病患高血糖。此外，需注意排尿情形，每 6 小時至少需解尿一次。若患者於高燒時有不舒服或曾發生熱性痙攣，可以給予乙醯胺酚 (acetaminophen)，每劑間需間隔 4~6 小時以上；服藥後若仍有高燒，可使用溫水擦浴。不可給予阿斯匹靈，ibuprofen 或其他非類固醇消炎劑 (NSAIDs)，此類藥物可能會引起胃炎或胃出血。採居家追蹤方式的病患，如有以下任何徵兆，需立刻至醫院就醫：臨床症狀未改善、退燒時症狀惡化、嚴重腹痛、持續嘔吐、四肢冰冷濕黏、嗜睡或煩躁及躁動、出血（如解黑便或咖啡狀嘔吐物）、超過 4~6 小時未排尿等。

治療藥物方面，除了適當退燒與止吐藥物外，皮膚癢的病人可給予抗組織胺與肥大細胞穩定劑；另外，針對有消化性潰瘍或上消化道出血病史或上腹痛之病童，可給予自費質子幫浦阻斷劑（抗胃酸藥）(proton pump inhibitors, PPI) 等藥物。

登革熱是斑蚊傳播的感染性疾病，並不會像流感或腸病毒經由飛沫或接觸傳染。因此病童不用戴口罩，亦不需隔離，應於發病後 5 日內預防被病媒蚊叮咬，並加裝紗窗、紗門，病人可睡在蚊帳內。同時要配合衛生單位噴藥，加強住家內外病媒蚊撲滅和孳生源（如積水容

器、廢棄物)之清理。出入疫區時應著長袖、長褲，並使用衛福部核可之防蚊液於裸露皮膚部分，避免被病媒蚊叮咬；但注意兩個月以下的嬰兒不建議使用任何成分的防蚊液<sup>15</sup>。

### 登革快速診斷試劑的角色

登革感染的臨床表徵可以從無症狀至嚴重如出血性登革熱、甚至休克。早期診斷及治療相對重要，但因臨床症狀經常為非特異性，傳統性血清抗體檢測缺乏特異性，目前市售的登革快速診斷試劑雖多，但多未經嚴謹的臨床驗證，且價格不斐，故尋求便宜且具特異性診斷工具是臨床處置與防疫之重點<sup>16</sup>。

在最近的登革流行中，登革快速診斷試劑-『登革快篩』也再次成為焦點話題，不少發燒的病人，一進診間就要求做『快篩』。與流感快篩不同的是，登革快篩是 "no pains, no gains"- 要抽血！那登革快篩到底是甚麼呢？

遭到登革病毒感染的最初幾天，病人血中可檢測出登革病毒的非結構性蛋白 1 (NS1) 抗原。相較於偵測登革病毒抗體至少要等到發病後 4~5 天，要迅速許多。因此 NS1 抗原常作為急性登革感染之快速診斷標的 (Rapid Diagnostic Test, RDT)，即俗稱的『登革快篩』，目前 NS1 快篩主要是自費項目，約需 300 元。以 2015 年為例，公費快篩支出對象需年滿 60 歲以上具健保身分者，且符合登革熱病例定義、臨床狀況為中度 (B 級) 或嚴重 (C 級) 條件、發病 7 天內，居住在台南市、高雄市與屏東縣民眾，或居住於該三縣市以外，但有該三縣市及國外登革

熱流行地區旅遊活動史的病患，才符合資格。2016 年 3 月底起，疾病管制署更放寬 NS1 快速診斷試劑適用對象條件至具有健保身分且符合登革熱病例定義，發病 7 日內，居住於台南市、高雄市與屏東縣，或有登革熱流行地區旅遊活動史的個案，經醫師判定需進一步檢驗者。

不過在初次感染的前兩天，此類快篩的敏感度較低<sup>17</sup>。為提高檢驗正確性並避免不必要之抽血疼痛，建議快篩應使用於有『警示徵象』之疑似登革感染病人，或是有疫區相關旅遊史，不明熱連續三天以上，且排除呼吸道、泌尿道等常見感染原因。

不論做不做登革快篩，要讓憂心的病人與家屬能安心，關鍵還是在於清楚易懂的衛教。在流行期間，急、門診平均每位病患，至少需五到十分鐘的時間說明登革熱注意事項，相對造成看診時間之延長。因此製作統一的衛教單張或是在候診區進行團體衛教，都可以有效減輕家屬與病人的焦慮，並讓診療進行更流暢。

至於無症狀病人的處置 (就是隱性感染者或帶原者)，不論是病人自己、家屬、醫師、或公衛人員都無法分辨或得知，所以實務上也無從處置，只能加強平日多元化衛教宣導。但若對於確診病人的密切共同生活者有所懷疑時，則可擴大採血，進行登革快篩檢驗。同時亦應尋求價格較為合理之快篩檢驗試劑，以使相關防疫經費得以達到最大效益。

在我們過去的研究發現，在急性登革感染的病人血清中，登革病毒的非結構性蛋白 1 (NS1) 與人類凝血酶 (thrombin) 此二蛋白質會形成複合物，而且可用酵素免疫呈色分析法 (Enzyme-linked immunosorbant assay, ELISA) 偵測。利用抗 NS1 之單株抗體，經由檢驗病人血清中

NS1 與凝血酶複合物來進行登革感染的快速診斷，其敏感度比僅僅檢驗 NS1 的市售登革檢驗試劑套組要高<sup>18</sup>。

結合體外檢測試劑 (In vitro diagnostics, IVD) 之重點照護檢驗 (Point-of-care testing, POCT) 的應用將可輔助臨床醫師與防疫人員之決策分析，也是未來發展新預防與醫療照護模式之重要基礎<sup>19</sup>。目前我們正前瞻性地以 2015 年登革熱流行期成大醫院確診的登革病人檢體對此檢驗套組進行臨床驗證，並了解在登革不同病程中試驗敏感度之改變程度 (第 1-3 天為發熱期，第 4-6 天為危險期，第 7 天後為恢復期)。這些資料對於後續建立快速診斷輔助登革臨床決策新模式，將提供重要的參考依據。

### 老年重症病人的醫療處置

在我們過去的研究中，已發現出血熱 (嚴重登革熱，即 B 或 C 級) 的好發年齡層為 60-64 歲的年長者<sup>3</sup>。登革熱死亡相關的危險因子，為「登革熱警示徵象」和有糖尿病、高血壓、腎臟病等慢性疾病<sup>4</sup>。2015 年台灣死亡案例的常見表現，為高齡、具慢性病史、CRP 或白血球上升等。根據疾管署 2015 年 12 月底之統計，全台累計 212 名死亡個案中，男性 111 人、女性 101 人，年齡中位數 75 歲，平均每人約罹患 3 種慢性病，以高血壓、糖尿病、冠狀動脈疾病及慢性腎臟病居多，發病至死亡平均天數 6.2 天<sup>20</sup>。而新加坡的研究也發現，60 歲以上的登革患者症狀較不典型，住院時間較長，且容易合併肺炎與泌尿道感染<sup>21</sup>。

對於已病重、無法表達意願的老人，家屬代為簽署不施予心肺復甦術同意書 (Do-Not-Resuscitate, DNR) 的情況亦時有所見。是否因此造成死亡率之估算提高，必須進一步分析。至於如何將此一問題納入登革醫療處置之標準作業程序中，並將 2015 年底通過之「病人自主權利法」可能造成之影響一併考慮。除了加強相關醫病溝通之外，亦必須同時加強醫護人員之認知與相關法律教育。

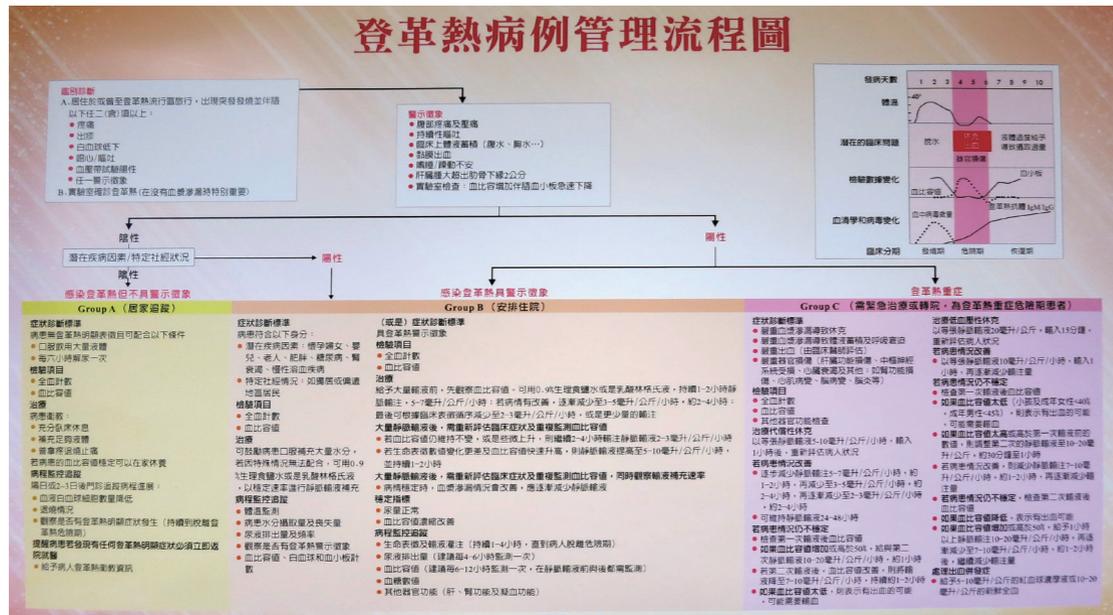
登革熱對我們的傷害，除了身體生理的層面外，包括生活品質與心理狀態等方面，也都有明顯的影響<sup>22</sup>。此外，在 2015 年的登革流行期，許多臨床人員亦發現部分 65 歲以上病患在登革熱恢復後，會有疑似認知功能減退之情形。將心智狀態和認知功能的評量納入老年登革病患臨床實務和長期照護，更是醫界應及早投入研究並研擬對策之重點。

### 結論

登革熱是一個難纏的環境相關感染症，在全球暖化趨勢與國際旅行便利性快速增加的今日，未來全體國人將都無法自外於此一疾病。也希望藉成大的照護經驗拋磚引玉，有更多同道投入登革之診療與防治，讓台灣人民不再聞「登」色變，即使不幸罹患登革熱，都能化險為夷，平安痊癒。



成大醫院急診登革病患留觀區



登革熱病例管理流程图

### 參考文獻

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; **496**:504-7.
- WHO Regional Office for South-East Asia. Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever—Revised and expanded edition. World Health Organization, 2011. ISBN: 978-92-9022-387-0.
- Lin CC, Huang YH, Shu PY, Wu HS, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, Liu CC, Lei HY. Characteristic of dengue disease in Taiwan: 2002–2007. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; **82**:731-9.
- Liu CC, Huang KJ, Huang MC, Lin JJ, Wang SM, Liu JJ, Tsai JJ, Huang JH, Lin YS, Liu HS, Yeh TM, Lei HY. High case-fatality rate of adults with dengue hemorrhagic fever during an outbreak in non-endemic Taiwan: risk factors for dengue-infected elders. *Am J Infect Dis*. 2008; **4**:10-7.
- 劉英姿、方啟泰、顏哲傑。2003 至 2013 年台灣地區登革熱併發登革出血熱危險因子分析。台灣公共衛生雜誌，34:437-446。2015。
- Ho TS, Wang SM, Lin YS, Liu CC. Clinical and laboratory predictive markers for acute dengue infection. *J Biomed Sci*. 2013; **20**:75.
- 衛生福利部疾病管制署。登革熱臨床症狀、診斷與治療。防疫學苑系列 015, 2015 年 5 月。
- World Health Organization. Dengue guidelines, for diagnosis, treatment, prevention and control—new edition. World Health Organization, 2009. ISBN: 978-92-4-1547871.
- Narvaez F, Gutierrez G, Pérez MA, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E. Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; **5**:e1397.
- Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, Nimmannitya S, Kalayanaroj S. Dengue—how best to classify it. *Clin Infect Dis*. 2011; **53**:563-7.
- Lee LK, Earnest A, Carrasco LR, Thein TL, Gan VC, Lee VJ, Lye DC, Leo YS. Safety and cost savings of reducing adult dengue hospitalization in a tertiary care hospital in Singapore. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013; **107**:37-42.
- Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hao Y, Ng LC, et al. Utility of warning signs in guiding

- admission and predicting severe disease in adult dengue. BMC Infect Dis. 2013;13:498.
13. Wong JGX, Thein TL, Leo Y-S, Pang J, Lye DC. Identifying adult dengue patients at low risk for clinically significant bleeding. PLoS One. 2016;11:e0148579.
  14. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. J Med Virol. 2001; 63:143-9.
  15. American Academy of Pediatrics. A parent's guide to insect repellents. 2009, Updated 6/2012.
  16. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vázquez S, Yoksan S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. Nat Rev Microbiol. 2010; 8:S30-8.
  17. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, Vazquez S, Cartozian E, Pelegrino JL, Artsob H, Guzman MG, Olliaro P, Zwang J, Guillem M, Kliks S, Halstead S, Peeling RW, Margolis HS. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8:e3171.
  18. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. J Infect. 2012; 64:325-34.
  19. Carter MJ, Emary KR, Moore CE, Parry CM, Sona S, Putschat H, Reaksmey S, Chanpheaktra N, Stoesser N, Dobson AD, Day NP, Kumar V, Blacksell SD. Rapid diagnostic tests for dengue virus infection in febrile Cambodian children: Diagnostic accuracy and incorporation into diagnostic algorithms. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9:e0003424.
  20. 衛福部疾病管制署新聞稿：高雄市登革熱疫情連 5 週趨緩，持續擘清降低感染風險 (2015-12-29) <http://www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treedid=cf7f90dcbcd5718d&nowtreeid=F94E6AF8DAA9FC01&tid=020E586077C8EE2C>
  21. Rowe EK, Leo Y-S, Wong JGX, Thein T-L, Gan VC, Lee LK, et al. Challenges in dengue fever in the elderly: Atypical presentation and risk of severe dengue and hospital-acquired infection. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8: e2777.
  22. Lum LC, Suaya JA, Tan LH, Sah BK, Shepard DS. Quality of life of dengue patients. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78:862-7.

## 第五章

# 登革致病機制

### 前言

登革疾病的病理機制相當複雜，對於登革病毒的致病機制至今仍未完全盤了解。除了來自病毒的直接參與外，宿主因子包括免疫細胞和補體的活化、以及細胞激素造成的異常發炎現象，均參與在出血性登革熱的病程發展。台灣學者多年來針對登革的研究成果，在國際上已受高度注意和肯定。本章節列舉台灣在科技部經費補助下的登革致病機制研究的一些重要領先成果，包括細胞自噬與登革病毒在細胞內複製的關聯性；以分子模擬為基礎的登革自體免疫致病機制；登革病毒非結構性蛋白一 (NS1) 的致病角色，與造成出血及血管滲漏的相關性；血球吞噬症候群在登革致病機制的角色；登革病毒對人類骨髓細胞的感染；C 型凝集素 CLEC5A 在登革致病機制的角色，造成嚴重發炎反應及大量細胞激素釋放 (也稱細胞激素風暴)；以及動物模式的建立，有助於更進一步了解登革致病機轉，甚或應用於疫苗及抗病毒藥物之研發測試。

## 第一節

# 登革病毒與細胞自噬

李英瑞 劉校生

登革病毒可以透過感染細胞，藉由引起細胞內質網壓力，進而引起細胞自噬現象的發生，而這樣的機制便被登革病毒利用來增加自身的繁殖與複製，增加成熟病毒顆粒的產生；或將未成熟的病毒體包裹在自噬體中，再藉由細胞外的自噬體與新的細胞融合的過程來增加未成熟病毒顆粒的感染率。

細胞自噬 (autophagy) 是一種用來維持細胞內生理現象平衡的機制，廣泛地存在於真核細胞內，從最低等的酵母菌至高等的哺乳類動物細胞中皆可發現<sup>1</sup>。細胞自噬主要透過形成雙層膜構造的自噬體 (autophagosome)，將細胞內累積的蛋白質 (包含摺疊錯誤的蛋白質)、核酸<sup>2</sup> 以及受損的細胞胞器包含於自噬體內，進一步使得這樣的自噬體與細胞內的溶小體 (lysosome) 結合，形成所謂的自噬溶小體 (autolysosome)，透過溶小體內的分解酵素將這些蛋白質分解成為原料並釋出能量，一方面可以提供細胞繼續生長所需；另一方面還可以減少細胞內之錯誤蛋白質堆積太多所引發的細胞病變甚至死亡的現象<sup>1,3</sup>。因此，細胞自噬機制的調控受損已被證實與糖尿病、帕金森氏症、心臟病、神經病變以及腫瘤等疾病的發生有關<sup>1,3</sup>。

此外，當細胞受到病毒或細菌的攻擊時，細胞也可以透過自噬反應將這些入侵物質吞噬分解，某種程度地扮演了先天免疫的角色，以抑制致病菌的攻擊；另外還可以透過這樣的機制將這些致病菌的抗原，經由抗原呈獻作用表現於受感染細胞之表面，進一步增加後天性免疫反應的活化，以加強清除細胞內的致病菌<sup>4-6</sup>。

然而，病毒等致病菌經過長期的演化，部分病毒及細菌也已經演化出一套可以躲避細胞自噬之活化而被清除的機制，包含：第一型單純疱疹病毒 (HSV-1)、卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒、以及小鼠的疱疹病毒 (murine  $\gamma$ -herpesvirus 68) 等。這些病毒可以透過自身表現的特定蛋白質來抑制細胞產生細胞自噬的現象，以逃避被清除的命運<sup>5</sup>。

另外，有一群病毒，包含：登革病毒、腸病毒 71 型、小兒麻痺病毒、鼻病毒、冠狀病毒、EB 病毒、柯沙奇病毒、愛滋病毒、C 型肝炎病毒 (HCV) 等皆已經被證實其感染可以增加被感染細胞產生細胞自噬的現象<sup>6-10</sup>；有趣的是，雖然細胞自噬的發生看似可以清除致病菌的感染，但是在這些病毒的感染下所引發的細胞自噬現象反而會增加病毒自身的複製，此時，細胞自噬現象的發生反而轉變為幫助這些病毒的複製及擴散<sup>6-10</sup>。此現象與以下幾個病毒感染所引發之現象有關：

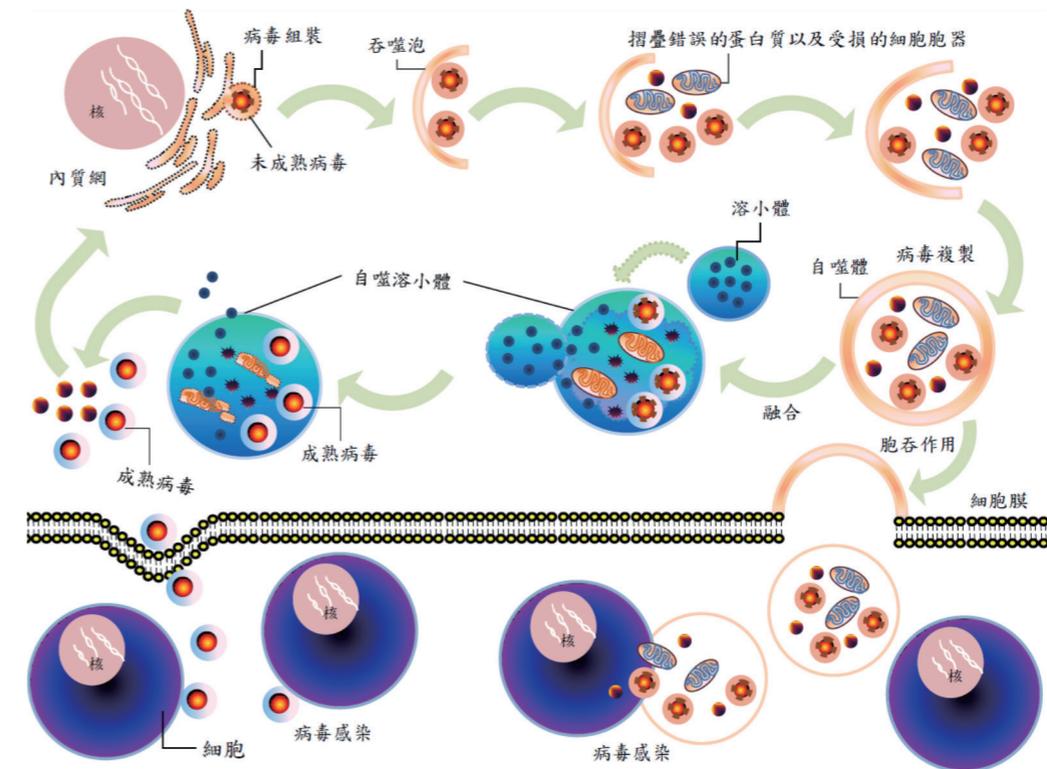
- (1) 當病毒感染細胞時，由於大量病毒蛋白質的製造，以及細胞內的新陳代謝機制受損，造成細胞產生內質網壓力 (ER stress)，進而啟動胞內的細胞自噬機制，細胞透過啟動細胞自噬機制來清除多餘及有害的物質，包括蛋白質以及致病原，最終促使細胞正常化<sup>11</sup>。細胞自噬反應的過程，其中一個步驟會形成一雙層膜的胞器稱為“細胞自噬體 (autophagosome)”。細胞自噬體的雙層膜結構形成來源之一為胞內的內質網膜<sup>12</sup>。細胞的內質網膜已知是病毒複製的重要場所，因此，細胞一方面藉由透過製造出更多的細胞自噬體促進細胞自噬反應來清除入侵的病毒，但病毒反而利用形成的細胞自噬體，提供其更多複製的平台。總言之，受病毒感染之細胞會引發強烈的自噬反應，反而幫助病毒的複製及釋放<sup>11,12</sup>。
- (2) 細胞自噬反應的發生，原是用來解除細胞內壓力，並藉此產生能量及細胞生長所需原料，以維持細胞繼續生長<sup>1,3</sup>。然而，當細胞遭受到病毒感染之壓力時，一方面引發細胞自噬反應，另一方面也引起細胞凋亡現象<sup>11,13</sup>。在病毒感染引發細胞自噬反應尚未揭曉前；病毒學家認為，當細胞遭受到病毒感染後，為避免病毒擴大感染，被

病毒感染的細胞會啟動自我防禦的機制—細胞凋亡，使被感染之細胞死亡，病毒的繁殖及擴張隨之而停止，達到限制病毒感染範圍及程度的目的<sup>13,14</sup>。目前的新發現是當病毒感染細胞後，可同時誘發細胞自噬及細胞凋亡現象<sup>11,13</sup>。有證據顯示，當活化細胞自噬機制時會抑制細胞凋亡現象的發生<sup>15</sup>，此現象顯示當病毒感染細胞後，一方面引發細胞自噬反應來清除病毒，另一方面也引發細胞凋亡來造成細胞的死亡，然而細胞自噬反應卻延緩了細胞凋亡的發生時程，造成細胞死亡的時間延後，此現象可以幫助病毒增加其複製繁衍的機會<sup>15</sup>。因此一旦抑制細胞自噬反應，反而減少病毒的複製，同時也增加被感染細胞的死亡<sup>7-10,15</sup>。

- (3) 最近的研究發現，細胞自噬反應所形成的自噬體，除了可以跟細胞內的溶小體融合以形成自噬溶小體來清除內容物外，另一方面，自噬體也被證實可以自細胞內透過與細胞膜融合的方式，經由胞吐作用將包裹物釋放到細胞外<sup>16</sup>，顯示被包裹的病毒可能會利用此機制被釋放到細胞外，並進一步與細胞周遭的新細胞融合，進而感染新的細胞。這個機制的揭露，對病毒感染的途徑又提供一個新的觀念<sup>16</sup>。因此病毒感染細胞引發細胞自噬現象的產生，恐怕就不只是增加病毒繁殖這麼簡單的思維了。
- (4) 登革病毒在成熟的過程中，當核蛋白與膜蛋白及外套膜蛋白組成完整病毒顆粒後，這樣的病毒顆粒仍屬未成熟，需要在較酸的環境中，將膜蛋白與套膜蛋白加以修飾後，才能成為一個完整成熟具有感染力的病毒<sup>17,18</sup>。然而細胞自噬體的產生，一方面可以提供登革病毒繁殖複製的地方，另一方面當複製組裝完成的未成熟病毒體，也可

以藉由自噬體與溶小體結合後，提供一個酸性環境來促進未成熟登革病毒之成熟，並增加病毒子代的感染能力<sup>7,9,17-19</sup>。

我們的實驗室率先發現登革病毒可以透過感染細胞，引起細胞內的內質網壓力，進而誘發細胞自噬反應，促進登革病毒的複製，這樣的現象同時在被感染的細胞及小鼠中觀察到<sup>7,9</sup>。我們也以小鼠實驗證實以藥物抑制登革以及腸病毒誘發之自噬反應的確可以降低受病毒感染小鼠的病情，減低小鼠之死亡率以及登革病毒之繁殖<sup>7,8</sup>。綜述之，登革病毒可以透過感染細胞，藉由引起細胞內的內質網壓力，進而引起細胞自噬現象的發生，而這樣的機制便被登革病毒利用來增加自身的繁殖與複製，並增加成熟病毒顆粒的產生；對於未成熟病毒顆粒而言，也可以透過細胞自噬體的胞吐作用，將未成熟的病毒體包裹在自噬體中，進一步藉由細胞外的自噬體與新的細胞融合的過程來增加未成熟病毒顆粒的感染機率（圖一）。因此，透過更多的研究探討，我們便可以了解並利用調控細胞自噬的方法，例如使用藥物或微小 RNA 等方式，來對細胞自噬現象加以調控，進一步達到控制登革病毒感染及複製的目的，最終希望能控制臨床患者的病情，減少登革重症病患的發生甚至死亡的情形。



圖一 登革病毒感染細胞誘發胞內及胞外自噬體之產生以協助病毒的複製與釋放。

## 參考文獻

- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007; **9**:1102-9.
- Lan SH, Wu SY, Zuchini R, Lin XZ, Su IJ, Tsai TF, Lin YJ, Wu CT, Liu HS. Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of miR-224. *Hepatology.* 2014; **59**: 505-17.
- Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007; **21**:2861-73.
- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Münz C. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 2005; **307**:593-6.
- Puleston DJ, Simon AK. Autophagy in the immune system. *Immunology.* 2014; **141**:1-8.
- Rey-Jurado E, Riedel CA, Gonzalez PA, Bueno SM, Kalergis AM. Contribution of autophagy to antiviral immunity. *FEBS Lett.* 2015; **589**:3461-70.
- Lee YR, Hu HY, Kuo SH, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Liu HS. 2013. Dengue virus infection induces autophagy: an in vivo study. *J Biomed Sci.* 2013; **20**:65.
- Lee YR, Wang PS, Wang JR, Liu HS. Enterovirus 71-induced autophagy increases viral replication and pathogenesis in a suckling mouse model. *J Biomed Sci.* 2014; **21**:80.
- Lee YR, Lei HY, Liu MT, Wang JR, Chen SH, Jiang-Shieh YF, Lin YS, Yeh TM, Liu CC, Liu HS. Autophagic machinery activated by dengue virus enhances virus replication. *Virology.* 2008; **374**:240-8.
- Huang SC, Chang CL, Wang PS, Tsai Y, Liu HS. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J Med Virol.* 2009; **81**:1241-52.
- Fung TS, Torres J, Liu DX. The emerging roles of viroporins in ER stress response and autophagy induction during virus infection. *Viruses.* 2015; **7**:2834-57.
- Blanchard E, Roingeard P. Virus-induced double-membrane vesicles. *Cell Microbiol.* 2015; **17**:45-50.
- Gougeon ML, Piacentini M. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis.* 2009; **14**:501-8.
- Hasnain SE, Begum R, Ramaiah KV, Sahdev S, Shajil EM, Taneja TK, Mohan M, Athar M, Sah NK, Krishnaveni M. Host-pathogen interactions during apoptosis. *J Biosci.* 2003; **28**:349-58.
- Joubert PE, Werneke SW, de la Calle C, Guivel-Benhassine F, Giodini A, Peduto L, Levine B, Schwartz O, Lenschow DJ, Albert ML. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med.* 2012; **209**:1029-47.
- Shrivastava S, Devhare P, Sujjantarat N, Steele R, Kwon YC, Ray R, Ray RB. Knockdown of autophagy inhibits infectious hepatitis C virus release by the exosomal pathway. *J Virol.* 2015; **90**:1387-96.
- Choy MM, Zhang SL, Costa VV, Tan HC, Horrevorts S, Ooi EE. Proteasome inhibition suppresses dengue virus egress in antibody dependent infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; **9**:e0004058.
- Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe.* 2010; **8**:422-32.
- Richards AL, Jackson WT. How positive-strand RNA viruses benefit from autophagosome maturation. *J Virol.* 2013; **87**:9966-72.

## 第二節

# 分子模擬為基礎的登革自體免疫致病機制

林秋烽 陳嘉玲 萬書彤 林以行

登革感染誘發自體免疫反應，由於病毒與宿主間分子模擬，因此因感染而產生的抗非結構性蛋白 1 之抗體會如同自體抗體，結合到宿主細胞如內皮細胞或血小板，並且導致細胞死亡、發炎或失去功能，進而導致登革疾病。

## 前言

藉由埃及斑蚊及白線斑蚊叮咬之傳播途徑，感染登革病毒 (dengue virus; DENV) 可造成對於人類健康有嚴重威脅性的急重症傳染病。臨床病症除了輕微的登革熱 (dengue fever; DF)，嚴重致命性的病症還包括登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever; DHF)、登革休克症候群 (dengue shock syndrome; DSS) 以及多重器官損傷的參與。臨床及實驗病理學發現嚴重性血小板減少症、血管內皮系統病變及凝血因子異常是導致 DHF/DSS 的主要病因。過往科學家提出許多分子及細胞致病機制的證據嘗試釐清登革諸多病理的發生，然而一般認為 DHF/DSS 是多因複雜的病理總和結果。登革相關病症除了是來自病毒的直接參與外，宿主因子包括免疫細胞、補體的活化以及細胞激素的異常發炎現象均參與 DHF/DSS 的病程發展。本章節我們回溯文獻歸納對於起因於病毒與宿主間分子模擬 (molecular mimicry) 之自體免疫 (autoimmunity) 參與登革病症發生的相關研究。

## 登革自體免疫

自體免疫泛指免疫細胞或分子對自體抗原的辨識及活化反應。一般生理情況下，在宿主免疫反應成熟的過程中，抑制自體免疫的發生可透過株落剔除或免疫低反應等讓宿主產生免疫耐受性，因此不對自身抗原發生細胞性及體液性抗體反應。然而在生理異常或病理情況發生時，起因於宿主免疫耐受性喪失的內在路徑啟動抑或是病原體感染後之外在因素均可能造成自體免疫的發生。自體免疫一般認為是慢性

發炎反應後的免疫致病結果，常見於遺傳、性別以及環境因子的相互參與。其中感染症發生自體免疫的現象主要在病毒感染症及細菌感染症中而被發現，常因於持續的感染進而誘導自體免疫的發生，主要歸咎感染後的慢性發炎造成免疫耐受性的喪失。當然，某些急性感染症亦經由異常的發炎反應導致自體免疫。宿主對抗病原體可誘導專一特異性及記憶性的抗體反應，病原體表現的抗原決定位便是宿主細胞性及體液性抗體反應的標的。因此，為了躲避免疫防禦，病原體常藉由分子模擬 (molecular mimicry) 的特性亦即表現與宿主蛋白質相同的胺基酸序列或分子結構，致使免疫耐受性發生進而脫逃宿主免疫分子及細胞的辨識及活化作用<sup>1,2</sup>。然而在感染導致的異常發炎作用下，科學家發現宿主免疫系統亦可能對這些具有分子模擬特性的病原體誘導自體反應細胞 (autoreactive cells) 及自體抗體 (autoantibody)；在此情形下，宿主對分子模擬的病原體失去免疫耐受性進而誘發自體免疫。

### 登革自體免疫相關研究

以下內容摘錄過往研究登革感染誘發自體免疫的相關研究，特別著重於分子模擬相似性導致登革自體免疫的研究：

1977年<sup>3</sup>在 DHF 病患血小板表面發現免疫複合體的存在，包括抗體及補體的表現。

1983年<sup>4</sup>在 DHF 病患血小板表面發現血小板自體抗體的表現。

1997年<sup>5</sup>英國學者發現製備登革病毒非結構性蛋白 1 (NS1) 單株抗體的融合瘤小鼠產生對凝血因子及內皮細胞結合作用的抗體反應。

2001年<sup>6</sup>成功大學研究團隊利用 1998-1999 年台南市爆發登革熱疫情所蒐集的血清檢體，首度證實存在於登革病患血清中與血小板有結合作用的自體抗體，在 DHF/DSS 病患血清中自體抗體的含量比典型 DF 的病患較高，而其表現量與疾病程度及發病時期有相關。

2002年<sup>7</sup>為了證明抗登革病毒 NS1 抗體會產生自體免疫反應如 1997 年英國學者在單株抗體製備之小鼠模式的發現，成功大學研究團隊利用 NS1 重組蛋白致敏小鼠得以產生抗登革病毒 NS1 抗體，並且證明抗體可以與內皮細胞發生結合作用。此外，抗體亦會導致內皮細胞以一氧化氮媒介的凋亡作用，推測可能在登革病毒感染所引起的出血致病機制上扮演了重要的角色。抗登革病毒 NS1 抗體對內皮細胞的結合作用可能以分子模擬的基礎導致自體免疫。

2002年<sup>8</sup>慈濟大學研究團隊亦發現登革病毒 NS1 與 arginine-glycine-aspartic acid (RGD) 的結構具有相似性的特性，這可能是抗登革病毒 NS1 抗體交叉結合至血小板的原因之一。

2003年<sup>9</sup>成功大學研究團隊證明登革病患血清中抗內皮細胞自體抗體與內皮細胞的結合作用會經 NS1 蛋白的競爭結合處理所抑制，進而顯示了抗登革病毒 NS1 抗體可以結合內皮細胞。並且，抗體結合後會誘發以補體活化的細胞溶裂作用導致細胞死亡。此結果呼應了 2001 年登革血清自體抗體與血小板結合作用後誘導補體活化一致。

2003年<sup>10</sup>日本研究團隊針對登革病患在發病急性期出現血小板減

少症的病理研究證實 53 位病患血小板表面有結合之 platelet-associated IgG (PAIgG) 的表現，而在健康受試者的血小板則無。

2004 年<sup>11</sup> 隔年，日本研究團隊在另外 78 位登革病患的研究發表血液中存在有血小板相結合抗體之免疫複合體表現，進一步證實在發病急性期同時有 PAIgG 以及 PAIgM 的表現且在 DHF 病患中表現為高。這些結果推測 PAIgG 及 PAIgM 與血小板減少症的發生有關。

2005 年<sup>12</sup> 除了誘導內皮細胞凋亡作用，成功大學研究團隊亦證明抗登革病毒 NS1 抗體結合至內皮細胞後，會先誘發細胞活化產生炎症反應，包括細胞激素與趨化激素的釋放以及細胞黏著性增加。細胞活化的分子路徑與轉錄因子 NF- $\kappa$ B 活化有關。

2007 年<sup>13</sup> 慈濟大學研究團隊繼而在小鼠模式證實被動給予抗登革病毒 NS1 抗體可交叉結合至血小板，與小鼠的致死率、纖維蛋白的沉積與降低表現的抗凝血蛋白有正相關性。

2008 年<sup>14</sup> 成功大學研究團隊建立小鼠自體免疫疾病動物模式，由主動致敏小鼠登革病毒 NS1 致使生成抗登革病毒 NS1 抗體，抑或是被動給予小鼠抗登革病毒 NS1 抗體，均證實抗體會結合至小鼠肝臟內皮細胞並誘導細胞凋亡，進而致使小鼠肝臟機能損傷有類似急性肝炎的症狀。以上結果推測與臨床上登革病患出現肝臟功能異常有關係。

2009 年<sup>15</sup> 成功大學研究團隊利用蛋白質體學方法鑑定出數種內皮細胞表面蛋白質與抗登革病毒 NS1 抗體有結合作用，進一步序列比對分析證實登革病毒 NS1 胺基酸序列片段 P311-330 與鑑定出的自體抗原有相似性極高的胺基酸序列。

2009 年<sup>16</sup> 為了釐清位於蛋白質 C 端的胺基酸序列可能是產生自體抗體的抗原決定位，成功大學研究團隊重組一修飾後的登革病毒 NS1 稱為  $\Delta$ C DENV NS1 (亦即去除 DENV NS1 C 端胺基酸序列 271-352 之片段) 並致敏小鼠生成抗  $\Delta$ C DENV NS1 抗體。實驗結果發現該抗體失去與血小板結合並導致血小板凝集抑制的能力，而小鼠血液凝集測試亦證實抗  $\Delta$ C DENV NS1 抗體無法造成血液凝集延遲的作用。登革病毒 NS1 C 端的抗原決定位可能就是造成抗登革病毒 NS1 抗體自體免疫發生的重要片段。

2009 年<sup>17</sup> 成功大學研究團隊根據蛋白質體學的結果證實數種自體抗原的存在，其中內皮細胞膜表面蛋白質 protein disulfide isomerase (PDI) 的胺基酸序列與登革病毒 NS1 C 端有極高的相似性。抗登革病毒 NS1 抗體可抑制 PDI 的蛋白質活性，利用合成的 C 端片段胜肽 P311-330 可以抑制抗登革病毒 NS1 抗體或登革病患血清與血小板的結合作用，並降低抗體對血小板凝集的抑制作用。

2013 年<sup>18</sup> 進一步的分子機制研究證實抗登革病毒 NS1 抗體結合內皮細胞誘導細胞凋亡的發生，可能是藉由活化細胞中生物活性脂質神經醯胺進而促成 NF- $\kappa$ B 活化及一氧化氮生成有關。

2013 年<sup>19</sup> 印尼研究團隊觀察臨床登革病患血小板凝集的抑制作用與發病時間有關聯性，進一步量測抗登革病毒 NS1 抗體與抗 PDI 抗體的表現量在發病急性期有上升的情況，可能參與血小板凝集抑制發生。

2015 年<sup>20</sup> 慈濟大學研究團隊證實在二次感染登革病毒的小鼠模式下，病毒及抗血小板自體抗體的雙重作用會誘發出血及死亡病變。

動物實驗結果支持自體抗體有可能是造成出血性登革熱的主因之一。同年<sup>21</sup> 該團隊亦證實抗登革病毒 NS1 抗體與 TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (death receptor [DR]4) 有結合性並可能刺激內皮細胞進而造成抗凝血性抑制作用、血管內皮損傷及血漿滲漏。

2015 年<sup>22</sup> 成功大學研究團隊發表登革病患血清中抗內皮細胞自體抗體與抗登革病毒 NS1 抗體的表現量有顯著的關聯性。進一步發現非結構性蛋白 1 胺基酸序列 P311-330 相較於內皮細胞膜表面蛋白質 protein disulfide isomerase (PDI) 的胺基酸序列有極高的相似性，此結果意味著 PDI 可能是宿主細胞的自體抗原。

2015 年<sup>23</sup> 抗登革病毒 NS1 抗體除了誘導補體活化致使血小板溶裂而與血小板減少症有關，成功大學研究團隊亦證實抗登革病毒 NS1 抗體會促使血小板與抗體的複合體透過抗體與巨噬細胞的結合作用，進而誘發巨噬細胞吞噬血小板的最終結果。此發現闡明臨床上血小板減少症可能發生的病理機制之一。

## 結論

免疫致病機制被認為參與 DHF/DSS 的病理現象發生，而關於登革自體免疫至今已許多評論亦認同參與登革免疫致病假說<sup>24-30</sup>。根據研究的發表得知台灣的研究對探討登革自體免疫的發生是最早也是最完整的。考量於諸多研究的臨床意義，未來的研究應擴大臨床的觀察樣本數，以及可回溯或追溯感染登革病毒後病患發生自體免疫相關疾病的可能性。自體抗原的鑑定仍是釐清以分子模擬為基礎的登革自體免

疫發生機制的重要課題，抗原決定位的發現才能驗證此一病理假說。近年來登革疫苗的開發以登革病毒 NS1 作為疫苗候選亦為廣泛的研究，為避免抗登革病毒 NS1 抗體衍生的自體免疫副作用，分子模擬相似性的相關研究應可作為修飾登革病毒 NS1 成為安全的疫苗候選抗原蛋白的重要考量。

## 參考文獻

1. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2001; **8**:377-88.
2. Oldstone MB. Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005; **296**:1-17.
3. Phanichyakarn P, Israngkura PB, Krisarin C, Pongpanich B, Dhanamitta S, Valyasevi A. Studies on dengue hemorrhagic fever. IV. Fluorescence staining of the immune complexes on platelets. *J Med Assoc Thai.* 1977; **60**:307-11.
4. Basanta Otero P, González Villalonga C, Orbeal Aldama L. Platelet autoantibodies in dengue hemorrhagic fever. *Acta Haematol.* 1983; **70**:141-2.
5. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol.* 1997; **142**: 897-916.
6. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol.* 2001; **63**:143-9.
7. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, Lin YS. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* 2002; **169**:657-64.
8. Chang HH, Shyu HF, Wang YM, Sun DS, Shyu RH, Tang SS, Huang YS. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. *J Infect Dis.* 2002; **186**: 743-51.
9. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Lin YS. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol.* 2003; **69**:82-90.
10. Oishi K, Inoue S, Cinco MT, Dimaano EM, Alera MT, Alfon JA, Abanes F, Cruz DJ, Matias RR, Matsuura H, Hasebe F, Tanimura S, Kumatori A, Morita K, Natividad FF, Nagatake T. Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol.* 2003; **71**:259-64.
11. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, Buerano CC, Matias RR, Morita K, Natividad FF, Nagatake T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol.* 2004; **138**:299-303.
12. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Lin YS. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol.* 2005; **174**:395-403.
13. Sun DS, King CC, Huang HS, Shih YL, Lee CC, Tsai WJ, Yu CC, Chang HH. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. *J Thromb Haemost.* 2007; **5**:2291-9.
14. Lin CF, Wan SW, Chen MC, Lin SC, Cheng CC, Chiu SC, Hsiao YL, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest.* 2008; **88**:1079-89.
15. Cheng HJ, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Luo YH, Lin YS. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009; **234**:63-73.
16. Chen MC, Lin CF, Lei HY, Lin SC, Liu HS, Yeh TM, Anderson R, Lin YS. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol.* 2009; **183**:1797-1803.
17. Cheng HJ, Lei HY, Lin CF, Luo YH, Wan SW, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol Immunol.* 2009; **47**:398-406.
18. Chen CL, Lin CF, Wan SW, Wei LS, Chen MC, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies cause NO-mediated endothelial cell apoptosis via ceramide-regulated glycogen synthase kinase-3beta and NF-kappaB activation. *J Immunol.* 2013; **191**:1744-52.
19. Rachman A, Harahap AR, Widhyasih RM. The role of anti-dengue virus NS-1 and anti-protein disulfide isomerase antibodies on platelet aggregation in secondary dengue infection. *Acta Med Indones.* 2013; **45**:44-8.
20. Lien TS, Sun DS, Chang CM, Wu CY, Dai MS, Chan H, Wu WS, Su SH, Lin YY, Chang HH. Dengue virus and antiplatelet autoantibodies synergistically induce haemorrhage through Nlrp3-inflammasome and FcgammaRIII. *Thromb Haemost.* 2015; **113**:1060-70.
21. Sun DS, Chang YC, Lien TS, King CC, Shih YL, Huang HS, Wang TY, Li CR, Lee CC, Hsu PN, Chang HH. Endothelial cell sensitization by death receptor fractions

- of an anti-dengue nonstructural protein 1 antibody induced plasma leakage, coagulopathy, and mortality in mice. *J Immunol.* 2015; **195**:2743-53.
22. Cheng HJ, Luo YH, Wan SW, Lin CF, Wang ST, Hung NT, Liu CC, Ho TS, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Correlation between serum levels of anti-endothelial cell autoantigen and anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; **92**: 989-95.
  23. Wan SW, Yang YW, Chu YT, Lin CF, Chang CP, Yeh TM, Anderson R, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies contribute to platelet phagocytosis by macrophages. *Thromb Haemost.* 2015; **115**:646-56.
  24. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; **19**:429-36.
  25. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol.* 2006; **19**:127-32.
  26. Lin YS, Yeh TM, Lin CF, Wan SW, Chuang YC, Hsu TK, Liu HS, Liu CC, Anderson R, Lei HY. Molecular mimicry between virus and host and its implications for dengue disease pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011; **236**: 515-23.
  27. Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, Yeh TM. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2013; **20**:42.
  28. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, Lin YS. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *J Formos Med Assoc.* 2013; **112**:3-11.
  29. Palacios-Cuervo F, Calderón-Rivera A, Espinal-Reyes F, Canelo-Aybar C. Autoimmunity in dengue: Literature review. *Reumatol Clin.* 2015; pii: S1699-258X(15)00111-4.
  30. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015;**385**:453-65.

### 第三節

## 登革病毒非結構性蛋白一的致病角色

莊詠鈞 陳泓如 葉才明

登革病毒 NS1 蛋白是登革病毒的一個重要致病因子，在登革病毒感染時造成的出血及血管滲漏都扮演重要角色，未來如果能針對登革病毒 NS1 蛋白發展抗體藥物和疫苗，將可有效保護國家經濟及人民健康免於登革病毒感染所造成的傷害。

登革病毒感染是台灣最常見的蚊子傳播的病毒疾病，被病媒蚊叮咬後會導致登革熱或可能致死的登革出血熱及登革休克症候群。每年南台灣都會有登革熱病例發生，但 2015 年爆發登革熱大流行為近年來最嚴重，確診病例達四萬人，死亡病例高達 200 餘人。目前對登革病毒感染的致病機轉並未完全瞭解以至沒有藥物可抑制登革出血熱之發生，目前研發的登革疫苗亦未盡理想。

登革病毒非結構性蛋白一 (nonstructural protein 1, NS1) 是一個大小約 48 kDa 之糖蛋白，和其他非結構性蛋白最大的不同是它可以被宿主細胞表現在細胞膜也可以被分泌出來在血液中。在細胞膜 NS1 蛋白以二聚體結構黏附在膜上如內質網 (ER)，高基氏體或細胞膜。三個二聚體結構可再進一步形成六聚體，六聚體結構是被分泌至胞外最主要的形式，其構形為中空環狀，具疏水性之中央空腔攜帶約 70 個脂質分子，其組成類似於高密度脂蛋白。登革病毒 NS1 蛋白可在病人血液循環中累積最高可達 50  $\mu\text{g/ml}$ 。然而過去只知道偵測 NS1 蛋白的存在可以作為登革病毒感染的早期診斷指標，但對其致病角色除了知道分泌的 NS1 蛋白能與補體結合，並促其降解來影響免疫功能之外，我們所知有限。由於登革病人主要的病理變化是異常出血及血管通透增加，因此在過去幾年我們對於登革病毒是如何造成這些病理變化加以研究，希望透過了解登革病毒感染的致病機轉，能幫助藥物或疫苗的開發。

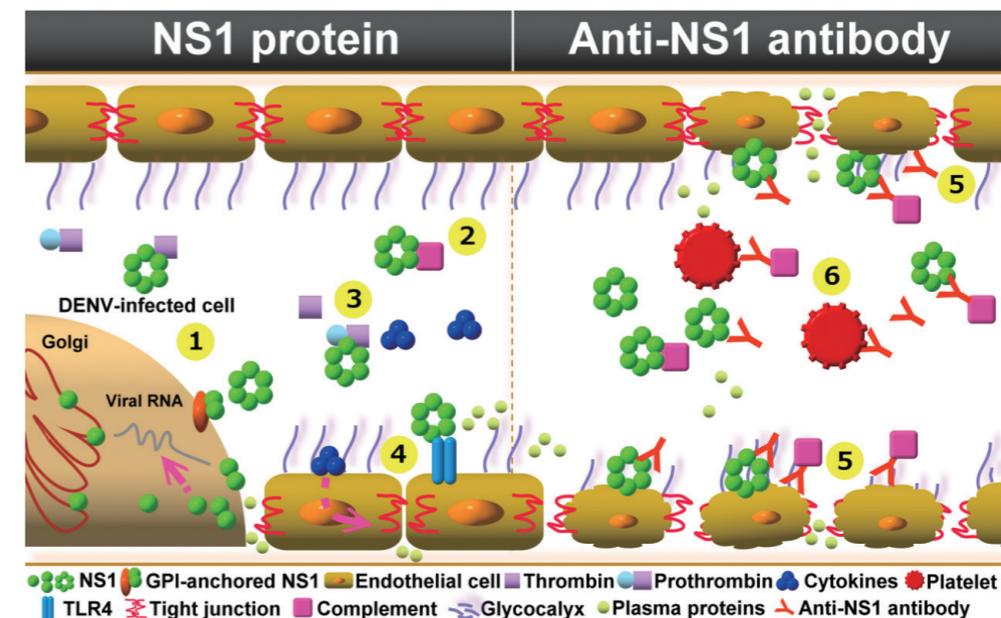
我們身體的凝血機制是由一連串複雜的反應所調控，包含了由血小板所誘導的初級凝血反應以及凝血因子所主導的次級凝血反應。在

過去成功大學林以行教授的研究中已證實登革病毒 NS1 蛋白會經由分子模擬誘導出自體抗體結合至血小板，並促進血小板的活化及清除，使初級止血反應異常<sup>1</sup>；此外登革病毒 NS1 蛋白也會引起抗體和內皮細胞作用造成血管病變<sup>2</sup>。然而對於登革病毒感染是否會影響以及如何影響次級凝血反應所知並不多。次級凝血反應可分為內在及外在兩道途徑，當凝血作用被誘發時，兩道途徑都會活化第十凝血因子，並與第五凝血因子形成複合體來活化凝血酶原 (prothrombin)；當凝血酶原轉化為具活性的凝血酶 (thrombin) 時，會進而促進纖維蛋白 (fibrin) 生成並組成網狀結構來阻止出血。當止血作用告一段落後，纖溶作用則會被啟動來清除纖維蛋白的結構。組織纖溶酶原活化物 (tissue plasminogen activator) 或尿激酶 (urokinase) 可以將纖溶酶原 (plasminogen) 轉為活化態的血纖維蛋白溶解酶 (plasmin)，進而溶解纖維結構產生 D-dimer 等降解產物，使凝血部位恢復正常狀態。過去登革感染的臨床研究報告顯示臨床登革病患會有延長的活化部分凝血活酶時間 (activated partial thromboplastin time)，而纖溶作用相關指標如 D-dimer 會有上升的現象，意味著整體走向抗凝血並促進纖溶現象的結果。因此我們過去針對登革病毒感染是如何影響凝血因子所主導的次級凝血反應加以探討。首先我們發現在登革病人血清中的 NS1 蛋白可以和凝血酶原結合並抑制其活化<sup>3</sup>，此外我們也發現登革病人血清中含有辨識到凝血酶以及纖溶酶原的自體抗體，這些抗體能夠抑止凝血酶活性卻可以促進纖溶酶原活化，使纖維蛋白或纖維蛋白原 (fibrinogen) 被降解，干擾血液凝固的產生，造成不完全凝固或加速纖溶作用<sup>4</sup>。在後續的研究中則進一步證實以登革病毒 NS1 蛋白免疫動物可以誘導出類似上述性質的自體抗

體<sup>5</sup>，因此登革病毒 NS1 蛋白可能在登革感染造成出血上扮演重要角色。

血管滲漏是另一個登革熱感染的重要病徵，液體滲入組織中，將造成水腫、腹腔積液、低血壓等症狀，再加上凝血功能障礙、血小板低下導致的出血症狀，若未及時接受輸液治療，將造成循環系統失去功能、多重器官衰竭，最後造成病人的死亡。雖然 NS1 蛋白引發的自體抗體可能導致內皮細胞凋亡造成血管損傷進而引起血管滲漏，但藉由登革病人的臨床病程研究發現，血管滲漏通常發生在感染後 4-7 日，但抗體的產生所需的時間通常為感染後 7-12 日。由於登革病毒 NS1 蛋白在感染初期即可被宿主細胞分泌至血液循環中，且根據過去的研究指出，NS1 在血液中的濃度和病情嚴重程度呈現正相關，近期的研究亦指出 NS1 蛋白有可能和周邊血液細胞及血管內皮細胞上的 Toll-like receptor 4 (TLR4) 結合造成血管滲漏<sup>6,7</sup>。然而 NS1 蛋白是如何透過 TLR4 影響血管內皮細胞之通透性其分子機制仍未完全明瞭。由於臨床上觀察登革病人血管滲漏的情形，若接受妥善的輸液治療，在 4-7 日關鍵期過後，很快便能得到改善，並且觀察不到明顯的血管損傷，目前多認為血管滲漏的現象是經由細胞激素導致。我們的研究發現巨噬細胞移動抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 在重症登革熱導致死亡的病人血液中的濃度高於在存活的病人血液中的濃度<sup>8</sup>。細胞實驗也證實登革病毒感染之血管內皮細胞會藉由 MIF 增加其通透性<sup>9</sup>，顯示 MIF 在登革病毒所引起的血管通透性增加扮演重要的角色。另外 MIF 也可因 TLR4 之活化而被分泌，因此登革病毒感染當病人血液

中的 NS1 蛋白累積到達一定濃度時，可能會藉由 NS1 蛋白活化 TLR4 引起 MIF 的分泌進而造成血管滲漏。綜合上述，登革病毒 NS1 蛋白是登革病毒的一個重要致病因子，在登革病毒感染時造成的出血及血管滲漏都扮演重要角色 (圖一)<sup>10</sup>，未來如果能針對登革病毒 NS1 蛋白發展抗體藥物和疫苗，將可有效保護國家經濟及人民健康免於登革病毒感染所造成的傷害。



圖一 登革病毒非結構蛋白一及其抗體可能的致病機轉。

1. 當登革病毒感染時，會誘導細胞產生出不同型態的 NS1 蛋白並且分泌至細胞外。2. NS1 蛋白被證實能與補體結合，並促進其降解來影響免疫功能。3. NS1 蛋白能與血液中的凝血酶原結合來抑制凝血功能。4. NS1 蛋白透過 TLR4 使內皮細胞分泌細胞激素促進血管通透性增加。5. NS1 抗體能交叉辨識到內皮細胞，並誘導內皮細胞受損。或藉由結合至感染的細胞表面之 NS1 蛋白，來促進清除感染的細胞。6. NS1 抗體可交叉辨識血小板並使其被清除，造成血小板低下現象。

## 參考文獻

1. Cheng HJ, Lei HY, Lin CF, Luo YH, Wan SW, Liu HS, Yeh TM, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies recognize protein disulfide isomerase on platelets and inhibit platelet aggregation. *Mol Immunol.* 2009; **47**:398-406.
2. Chen CL, Lin CF, Wan SW, Wei LS, Chen MC, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies cause NO-mediated endothelial cell apoptosis via ceramide-regulated glycogen synthase kinase-3beta and NF-kappaB activation. *J Immunol.* 2013; **191**:1744-52.
3. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *J Infect.* 2012; **64**:325-34.
4. Chuang YC, Lin YS, Liu HS, Wang JR, Yeh TM. Antibodies against thrombin in dengue patients contain both anti-thrombotic and pro-fibrinolytic activities. *Thromb Haemost.* 2013; **110**:358-65.
5. Chuang YC, Lin J, Lin YS, Wang S, Yeh TM. Dengue virus nonstructural protein 1-induced antibodies cross-react with human plasminogen and enhance its activation. *J Immunol.* 2016; **196**:1218-26.
6. Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K, Harris E. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med.* 2015; **7**:304ra141.
7. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, Hume DA, Stacey KJ, Young PR. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. *Sci Transl Med.* 2015; **7**:304ra142.
8. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, Lin YS, Wang ST, Shyu HW, Yeh TM. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; **74**:142-7.
9. Chuang YC, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Fu TF, Yeh TM. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine.* 2011; **54**:222-31.
10. Chuang YC, Wang SY, Lin YS, Chen HR, Yeh TM. Re-evaluation of the pathogenic roles of nonstructural protein 1 and its antibodies during dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2013; **20**:42.

## 第四節

# 巨噬細胞吞噬血小板在登革致病機轉中的角色

萬書彤 林以行

血小板低下及血漿滲漏會造成登革疾病嚴重情況增加。除了血小板相關聯的抗體可增加血小板破壞，活化的內皮細胞則可促進血小板的黏附或被清除。近來亦發現透過抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體為媒介，可促使血小板在活化的內皮細胞上被巨噬細胞所吞噬的量增加，為登革致病機轉可能的機制之一。

登革病毒 (dengue virus, DENV) 藉由病媒蚊傳播，導致全球人口約有三分之一處於被感染的危險中。所引發的疾病程度從較為輕微的登革熱，到較為嚴重甚至可能會致死的登革出血熱或登革休克症狀。登革出血熱的臨床表徵，初期的發燒大約持續 2-7 天，接著體溫會回到正常。但在這之後的 24-48 小時卻會是更危險的時期，可能會出現嚴重的血小板低下 (thrombocytopenia,  $<100,000$  platelets/mm<sup>3</sup>) 及血漿滲漏 (plasma leakage)。渡過危險期後，最後會到達恢復期，甚至不會有後遺症留下。血小板低下開始於發燒期，在危險期會到達最低點。造成血小板低下的主因分成血小板的來源減少或使用及破壞增加，目前有幾種可能的機制：(1) 登革感染造成骨髓細胞的功能受到抑制，所以血小板的製造受到影響；(2) 骨髓中的巨核細胞 (megakaryocyte) 大幅增加，並且伴隨著血小板的存活時間縮短，可能導致血小板的破壞大增；(3) 起因於血管的損傷，導致血小板黏附到內皮細胞，所以血小板使用量隨之增加；(4) 血小板上發現帶有登革病毒抗原的免疫複合物，此免疫複合物可幫助血小板被吞噬細胞清除及破壞<sup>1</sup>。

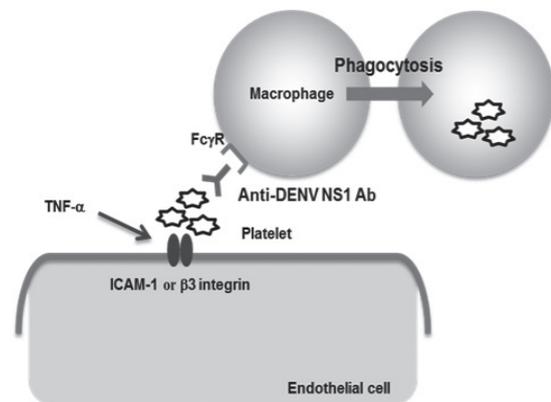
目前有許多文獻或病歷報告皆指出血球吞噬症候群 (hemophagocytic syndrome) 與登革疾病的關聯性，特別在一些登革重症病人中可發現血球吞噬症候群，而這些病例的相同點則是很明顯的細胞激素增量以及血小板低下。血球吞噬現象 (hemophagocytosis) 是指巨噬細胞吞噬其他血液成分，如紅血球、白血球及血小板等，容易在骨髓、脾臟或淋巴結中被觀察到這個現象。此現象也參與在其他病毒感染的致病機制中，如 EB 病毒 (Epstein-Barr virus)、腺病毒 (adenovirus)、

及 C 型肝炎病毒 (hepatitis C virus) 等。血球吞噬症候群主要是由於干擾素 - $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) 及腫瘤壞死因子 - $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等細胞激素的過度產生，導致巨噬細胞過度而不正常地活化，再進一步吞噬了其他血液成分。因此在登革病人中，過度活化的巨噬細胞吞噬了血小板，所引起暫時性的血小板低下為可能的致病機制之一<sup>2</sup>。此外，利用非人類哺乳類的恆河猴動物模式中，在登革病毒感染後的恆河猴血液中發現有血小板及單核細胞的共同聚集增加，並且可以觀察到血小板被單核球 / 巨噬細胞所吞噬<sup>3</sup>。

登革病毒感染會造成強烈而又異常的免疫反應活化，如細胞激素的過度生成或針對血小板或內皮細胞的自體抗體的出現。與血小板有關連的抗體被認為與血小板低下及登革疾病的嚴重程度具有正相關性<sup>4</sup>。我們發現不管是來自病人血清或是免疫後小鼠血清中的抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體都會交叉反應到血小板，並且可能造成補體媒介的血小板裂解，而這個現象會導致血小板減少症的發生<sup>5,6</sup>。被登革病毒感染的內皮細胞與血小板間的交互作用，亦是血小板減少的機制之一<sup>7</sup>。此外，被感染的單核細胞所分泌的細胞激素，如腫瘤壞死因子 - $\alpha$  也能誘使內皮細胞表現許多黏著分子，這些黏著分子不但增加內皮細胞與血小板間的交互作用<sup>8</sup>，也由於內皮細胞上所黏附的血小板吸引吞噬細胞過來，增進這三者細胞間的交互作用<sup>9,10</sup>。

由於先前的研究指出在抗體的調理 (opsonization) 下可以幫助血小板被巨噬細胞所吞噬<sup>1</sup>。我們的研究更進一步證明，內皮細胞在腫瘤

壞死因子  $\alpha$  活化後，使得黏著分子表現增加，幫助血小板及巨噬細胞結合到內皮細胞，再透過抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體為媒介而導致血小板被吞噬。抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體結合到血小板上並不會影響血小板黏著到內皮細胞；反而透過黏附在血小板上之抗體的 Fc 區域與巨噬細胞的  $Fc\gamma R$  結合。表現在內皮細胞上的黏著分子細胞間黏附因子 (Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 與  $\beta 3$  整合素 (integrin) 以及表現在巨噬細胞上的  $Fc\gamma R$ ，在抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體為媒介而導致血小板在內皮細胞上被巨噬細胞吞噬中扮演著重要角色 (圖一)。此外，我們也在小鼠動物模式中發現，在登革病毒感染狀況下，抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體可以特別顯著地增加了血小板被巨噬細胞吞噬。綜合而論，我們的實驗結果提供了證據，說明抗



登革病毒非結構性蛋白 1 抗體在增加血小板被巨噬細胞吞噬的現象中所扮演的角色。而這個角色與登革疾病中血小板低下的症狀有關，以上的發現將可以做為往後研究登革病毒疫苗以及治療上的參考<sup>11</sup>。

圖一、透過抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體 (anti-DENV NS1 Ab) 為媒介，幫助血小板 (platelet) 在腫瘤壞死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 所活化的內皮細胞 (endothelial cell) 上被巨噬細胞 (macrophage) 吞噬。表現在內皮細胞上的黏著分子細胞間黏附因子 (ICAM-1) 與  $\beta 3$  整合素 (integrin) 以及表現在巨噬細胞上的 Fc 接受器 ( $Fc\gamma R$ )，在抗登革病毒非結構性蛋白 1 抗體為媒介而導致血小板在內皮細胞上被巨噬細胞吞噬中扮演著重要角色<sup>11</sup>。

## 參考文獻

1. Chuansumrit A, Chaiyaratana W. Hemostatic derangement in dengue hemorrhagic fever. *Thromb Res.* 2014; **133**:10-6.
2. Lei HY. Transient hemophagocytic activity in dengue immunopathogenesis. *J Formos Med Assoc.* 2009; **108**:595-8.
3. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villingier F, Ansari AA, Perng GC. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood.* 2010; **115**:1823-34.
4. Saito M, Oishi K, Inoue S, Dimaano EM, Alera MT, Robles AM, Estrella BD Jr, Kumatori A, Moji K, Alonzo MT, Buerano CC, Matias RR, Morita K, Natividad FF, Nagatake T. Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections. *Clin Exp Immunol.* 2004; **138**:299-303.
5. Lin CF, Lei HY, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, Wang ST, Yang TI, Sheu FC, Kuo CF, Lin YS. Generation of IgM anti-platelet autoantibody in dengue patients. *J Med Virol.* 2001; **63**:143-9.
6. Lin CF, Lei HY, Lin YS, Liu CC, Anderson R. Patient and mouse antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 cross-react with platelets and cause their dysfunction or depletion. *Am J Infect Dis.* 2008; **4**:69-75.
7. Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; **66**:435-41.
8. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2009; **85**:195-204.
9. Kirton CM, Nash GB. Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. *J Lab Clin Med.* 2000; **136**:303-13.
10. Kuijper PH, Gallardo Torres HI, Houben LA, Lammers JW, Zwaginga JJ, Koenderman L. P-selectin and MAC-1 mediate monocyte rolling and adhesion to ECM-bound platelets under flow conditions. *J Leukoc Biol.* 1998; **64**:467-73.
11. Wan SW, Yang YW, Chu YT, Lin CF, Chang CP, Yeh TM, Anderson R, Lin YS. Anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies contribute to platelet phagocytosis by macrophages. *Thromb Haemost.* 2016; **115**:646-56.

## 第五節

# 人類骨髓細胞與登革病毒的感染

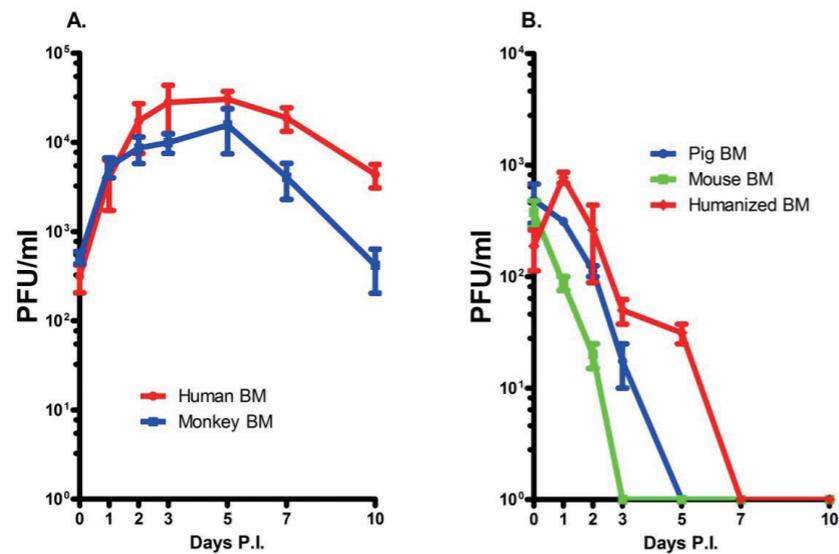
羅玉枝 何慈娟 彭貴春

猴子實體研究和體外人類骨髓細胞所進行的實驗結果顯示，骨髓的造血幹細胞負責登革病毒感染和複製。存在於骨髓或臍帶血中的巨核前驅幹細胞是主要被登革病毒感染的細胞群，而登革熱低血小板症來自於病毒會直接感染巨核前驅幹細胞。

登革熱是受病媒蚊傳染的重要人類疾病，近年來有一些相關的報導指出，此疾病除了主要由被帶有登革病毒的蚊子叮咬所造成外，亦會經由輸血、骨髓移植和不經意受到污染的針頭刺傷等途徑感染<sup>1</sup>。被登革病毒感染的臨床症狀很多時候是不明顯的，或是感染者根本沒有症狀，但少部分則會有發燒並發展成出血性的重症登革熱。登革熱早期主要分布於熱帶及亞熱帶地區，然而交通的發達使人類頻繁的移動、過度的城市開發和氣候暖化的現象，使得此疾病有往高緯度地區擴散的趨勢。根據世界衛生組織的統計，目前已有 130 個國家受到登革病毒感染的威脅，估計每年約有四億人口暴露於登革病毒感染的風險中，並造成約九千六百萬登革病例包括重症出血登革熱<sup>2</sup>。因此登革熱是危害人類健康及造成國家社會成本支出的重要傳染病。

埃及斑蚊和白線斑蚊是傳染登革病毒的主要媒介，藉由蚊子吸血的動作將登革病毒傳入人體內，一旦進入體內，病毒必須進行繁殖和複製，進而引起人類登革熱病癥。但是病毒如何在人體內繁殖和散播目前並沒有很完整的報導，雖然文獻指出登革病毒會感染人體內的免疫細胞如：單核細胞、巨噬細胞和樹突細胞<sup>3,4</sup>，但這些細胞是否會產生傳染性的登革病毒，目前並無明確的證據。早期在人體的登革熱檢體研究發現，在發燒初期人類的骨髓細胞量會大量減少，尤其是造血幹細胞，如巨核前驅幹細胞<sup>5</sup>。在發燒的中、後期這些幹細胞會在骨髓大量的增生<sup>6</sup>，但由於大部分的登革病患在發燒四天後才尋求醫療的救助<sup>7</sup>，且骨髓細胞的取得非常不易，又因為沒有良好登革熱研究的動物模式<sup>8,9</sup>，所以很可惜先前的發現並無法有效的追蹤與研究。

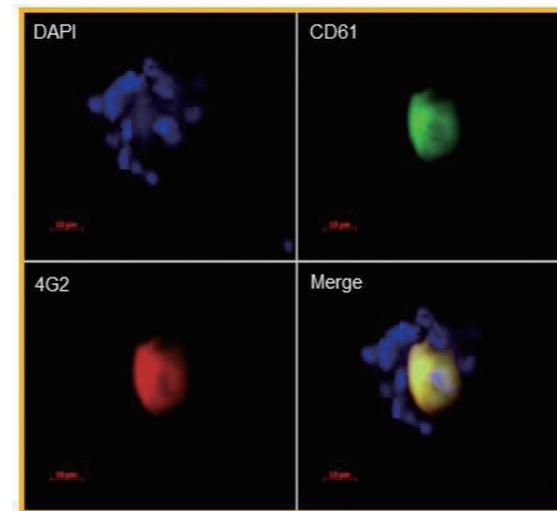
雖然過去許多動物曾經被用來嘗試進行登革病毒的感染試驗，然而僅有猴子和靈長類動物會受到登革病毒的感染，因此認為猴子是登革病毒的宿主之一。雖然被感染的猴子不像人類一樣會有登革熱的臨床症狀，但是卻可以用來驗證人類被登革病毒感染後骨髓細胞量的變化。猴子感染登革病毒的實驗顯示，感染初期會有低血小板症及骨髓細胞量的減少，尤其是巨核前驅幹細胞會被登革病毒感染，但在感染後期，骨髓細胞會大量的增生<sup>10</sup>。由更進一步的研究和分析發現，人類和猴子骨髓細胞很容易被登革病毒所感染<sup>11,12</sup>，但是非靈長類的動物，例如小鼠和豬的骨髓就不容易被登革病毒感染（圖一），這也是為什麼要建立



圖一 人類和猴子動物骨髓細胞容易被登革病毒感染。以定量的登革病毒感染新鮮取得的骨髓細胞，在感染後的不同天收集上層液，利用病毒斑實驗偵測具有感染力的病毒量。人類 (Human) 和猴子 (Monkey) 的骨髓細胞明顯受到登革病毒感染。豬 (Pig) 和老鼠 (Mouse) 骨髓細胞則不容易被登革病毒感染。在移植人類骨髓細胞的擬人鼠 (Humanized) 所取的骨髓細胞明顯受到登革病毒感染。

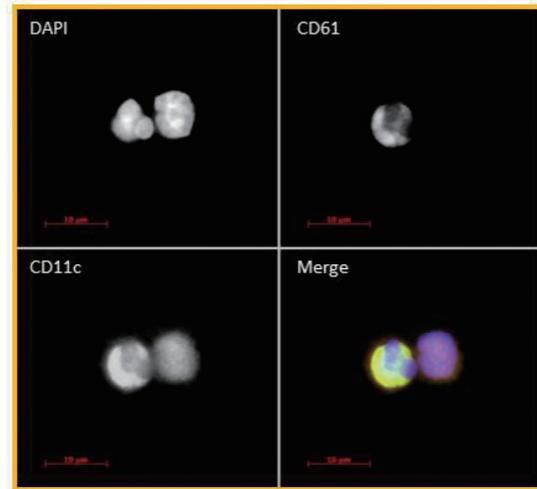
具有人類登革熱臨床症狀的動物模式非常困難。近年來，相關醫學研究知識的進步，提供我們可嘗試進行新的實驗研究策略，例如將人類的骨髓細胞轉殖到缺乏免疫力的小鼠身上的方法，研究結果顯示，將人類的新鮮骨髓細胞移植到缺乏免疫力的小鼠體內，經過一段時間的培育，讓小鼠的骨髓有人類骨髓細胞的存在，此時抽取小鼠的骨髓細胞進行體外登革病毒的感染，則可發現到移植後的小鼠骨髓細胞可被登革病毒感染（圖一），此實驗結果進一步驗證了感染登革病毒會引起人體骨髓細胞量變化的現象。

造成低血小板症的原因很多，其中之一是受登革病毒感染所引起，因為登革病毒可以直接攻擊血小板並造成血小板的活化<sup>13-15</sup>，進而引起



圖二 登革病毒感染骨髓巨核前驅幹細胞。將新鮮取得的猴子骨髓細胞以低量的登革病毒感染，細胞於感染後 12 小時取出，進行細胞核 (藍色)、巨核前驅幹細胞表面標誌 (綠色) 和登革病毒抗原 (紅色) 的染色。結果顯示只有巨核前驅幹細胞可以偵測到登革病毒的抗原。

細胞的功能喪失，例如產生血小板機制受損導致周邊血血小板低下症。還有另一種可能是受感染的造血幹細胞、血小板、巨核前驅幹細胞或巨核細胞會被樹突細胞吞噬，因此可能使得吞噬細胞被登革病毒感染（圖三）。此外，目前雖然無明確的證據顯示被登革病毒感染的幹細胞有可能受到病毒的控制並分化成樹突細胞，但有文獻指出帶有巨核細胞生物標誌的樹突細胞其抗原表現能力不受到影響<sup>19</sup>。這些結果隱喻登革病毒可能會持續性存在於骨髓幹細胞中，而不會造成這些細胞的凋亡。



圖三 登革病毒感染的巨核前驅幹細胞表現出樹突細胞的標誌。將新鮮取得的猴子骨髓細胞以低量的登革病毒感染，細胞在感染後 12 小時取出，進行細胞核（藍色）、巨核前驅幹細胞表面標誌（綠色）和樹突細胞的表面標誌（紅色）的染色。結果顯示感染的巨核前驅幹細胞表現樹突細胞的標誌，且有可能被樹突細胞吞噬。

早期的文獻報導，被登革病毒感染過一次的人，其登革病毒抗體的活性可長達 20 年之久，推測其可能原因是健康人體內有登革病毒潛伏感染<sup>20</sup>。更早期的報導也曾指出，有不顯性登革病毒的帶原感染者存在，因為將不顯性感染者取出的血漿，輸到健康者身上會引起登革熱<sup>21</sup>。最近也有報導指出來自疫區的健康捐血者，可以被偵測到有登革病毒的存在<sup>22,23</sup>。更新的報導指出，存在於無臨床症狀感染者身上的病毒，可藉由蚊子傳播至健康者身上<sup>24</sup>。雖然目前沒有明確的實驗證

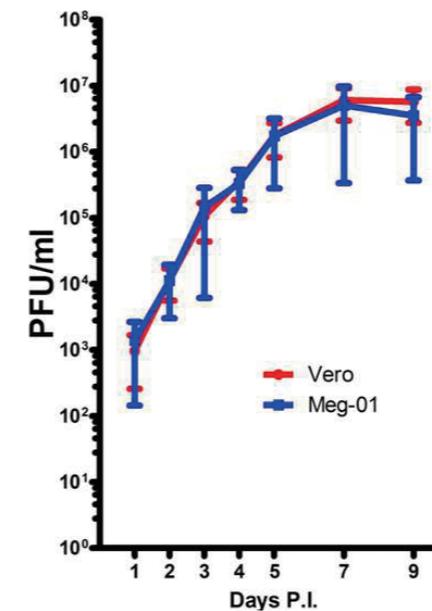
據得知登革病毒是否會長期生存於不顯性的健康感染者體內，但是體外組織細胞培養被登革病毒感染的人類初代骨髓幹細胞或猴子初代睪丸細胞，在感染後可以長達九個月都能釋放出少量具有感染能力的病毒<sup>25,26</sup>。這暗示登革病毒有可能存在於不顯性健康感染者體內很長的時間，也可能造成輸血安全的隱憂。由於幹細胞具有自我增生和分化的獨特性，且自我保護免疫系統不是很完整，在綜合相關的研究結果可以推測，幹細胞極易受到登革病毒感染且可能會長期存活，並在其分化和分裂的時候重新活化登革病毒的產生，造成不顯性登革病毒感染者有持續性的登革病毒帶原的可能。

登革病毒屬於黃病毒科的一員，與其他科病毒最不一樣的地方是其具有四種血清型。若病患感染某一血清型病毒會對此血清型病毒有長時間的免疫力，然而對其他血清型病毒卻只有短暫的保護力，故可能不久後再感染不同血清型之病毒，即所謂的二次感染<sup>27</sup>。在台灣所看到的重症出血性登革熱，主要為單一血清型病毒的初次感染。但是在登革熱高度流行的疫區，例如東南亞的泰國，交叉感染不同血清型的登革病毒卻是造成其出血性登革熱重症的主要因素<sup>28</sup>。雖然引起出血性登革熱的重症風險因子如糖尿病患者、年幼及年長者、或其他慢性病帶原者是高危險群，其造成的原因並不清楚。但綜觀不同國家所看到的不同案例，意謂著造成出血重症的因子可能會因區域性的不同而有所差異<sup>29-31</sup>。另外，雖有文獻報導指出不同血清型的交叉感染的情況下，體內的抗體並不能完全中和新一波不同血清型登革病毒的感染，並有可能加重登革熱的臨床症狀<sup>3</sup>。但是對於為何登革熱臨床症狀會出

現在被登革病毒二次感染者的身上，且即使這些個體在初次感染後已經有登革病毒的抗體存在於體內，卻在下一波的感染時仍然出現臨床症狀，其詳細的機制仍不清楚。此現象讓我們意識到，在有打過疫苗的個體，未來得到登革病毒感染時有臨床症狀加重的可能性，此為發展登革疫苗早期的隱憂<sup>32,33</sup>。然而超過 20 年的追蹤以及最近登革疫苗的臨床試驗顯示，打過疫苗後人體感染登革病毒所導致之加重臨床症狀惡化的可能性極低<sup>34,35</sup>，此登革疫苗的有效性卻是有限的。由於登革病毒具有四種血清型，因此登革病毒專一性中和抗體的量是評估疫苗有效性非常重要的指標，但要如何有效評估具有專一性保護效力的登革疫苗，將是目前急需研究的主题。另外，最近有文獻指出人體內流竄的登革病毒的型態有別於傳統利用非洲綠猴腎細胞培養出的病毒<sup>36</sup>，這也暗示著要精確評估登革疫苗的有效性保護，必須使用人體內對等細胞所產生出來的病毒來中和。

從登革病患體內抽取骨髓細胞，以驗證該細胞受到登革病毒感染後的變化是最直接的方法，然而登革病患的檢體取得不易，因為登革病患容易有出血的現象，抽取骨髓細胞會增加病患的風險。由於幹細胞也會循環於周邊血中，其取得相對容易，只是正常人的周邊血幹細胞的數量是有限的，而替代的方法為利用模式細胞可被誘導並分裂及分化成血小板特性的細胞，如巨核前驅細胞株來進行此方面的研究。與非洲綠猴腎細胞相比的初步結果顯示，巨核前驅細胞株也非常容易被登革病毒感染，且其被感染的效率與非洲綠猴腎細胞相等（圖四）。因此利用此模式細胞株進行研究，可用來進一步探討被登革病毒感染

的巨核前驅幹細胞如何喪失製造血小板的功能和機制，並可了解登革病毒如何控制被感染的巨核前驅幹細胞的分化和分裂的機制。這些研究所得到的訊息可做為嶄新登革疫苗、抗病毒藥物和登革熱動物模式的研究和開發。



圖四 巨核前驅幹細胞非常容易被登革病毒感染。巨核前驅幹細胞 Meg01 和非洲綠猴腎細胞 Vero 各別以相同低量的登革病毒感染，在感染後不同時間取出其上層液並進行病毒量的分析。

## 參考文獻

1. Pong G. 2015. Dengue human challenge model: Is there a risk caveat? Persistent infection of dengue virus. *J Virol Emerg Dis.* 1(2): doi <http://dx.doi.org/10.16966/jved.108>
2. WHO. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. 2012.
3. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015; **385**:453-65.
4. Noisakran S, Onlamoon N, Songprakhon P, Hsiao HM, Chokeyhaibulkit K, Pong GC. Cells in dengue virus infection in vivo. *Adv Virol.* 2010; **2010**:164878.
5. Bierman HR, Nelson ER. Hematodepressive virus diseases of Thailand. *Ann Intern Med.* 1965; **62**:867-84.
6. Nelson ER, Tuchinda S, Bierman HR, Chulajata R. Haematology of Thai haemorrhagic fever (dengue). *Bull World Health Organ.* 1966; **35**:43-4.
7. Tsai JJ, Liu LT, Chang K, Wang SH, Hsiao HM, Clark KB, Pong GC. The importance of hematopoietic progenitor cells in dengue. *Ther Adv Hematol.* 2012; **3**:59-71.
8. Chan KW, Watanabe S, Kavishna R, Alonso S, Vasudevan SG. Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. *Antiviral Res.* 2015; **123**:5-14.
9. Clark KB, Onlamoon N, Hsiao HM, Pong GC, Villinger F. Can non-human primates serve as models for investigating dengue disease pathogenesis? *Front Microbiol.* 2013; **4**:305.
10. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, Pong GC. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood.* 2010; **115**:1823-34.
11. Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Clark KB, Villinger F, Ansari AA, Pong GC. Infection of bone marrow cells by dengue virus in vivo. *Exp Hematol.* 2012; **40**:250-9.e4.
12. Clark KB, Noisakran S, Onlamoon N, Hsiao HM, Roback J, Villinger F, Ansari AA, Pong GC. Multiploid CD61+ cells are the pre-dominant cell lineage infected during acute dengue virus infection in bone marrow. *PLoS One.* 2012; **7**:e52902.
13. Noisakran S, Gibbons RV, Songprakhon P, Jairungsri A, Ajariyakhajorn C, Nisalak A, Jarman RG, Malasit P, Chokeyhaibulkit K, Pong GC. Detection of dengue virus in platelets isolated from dengue patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009; **40**:253-62.
14. Noisakran S, Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Hsiao HM, Songprakhon P, Angkasekwini N, Chokeyhaibulkit K, Villinger F, Ansari AA, Pong GC. Role of CD61+ cells in thrombocytopenia of dengue patients. *Int J Hematol.* 2012; **96**:600-10.
15. Simon AY, Sutherland MR, Pryzdial EL. Dengue virus binding and replication by platelets. *Blood.* 2015; **126**:378-85.
16. Tsai JJ, Jen YH, Chang JS, Hsiao HM, Noisakran S, Pong GC. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J Innate Immun.* 2011; **3**:530-40.
17. Honda S, Saito M, Dimaano EM, Morales PA, Alonzo MT, Suarez LA, Koike N, Inoue S, Kumatori A, Matias RR, Natividad FF, Oishi K. Increased phagocytosis of platelets from patients with secondary dengue virus infection by human macrophages. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; **80**:841-5.
18. Alonzo MT, Lacuesta TL, Dimaano EM, Kurosu T, Suarez LA, Mapua CA, Akeda Y, Matias RR, Kuter DJ, Nagata S, Natividad FF, Oishi K. Platelet apoptosis and apoptotic platelet clearance by macrophages in secondary dengue virus infections. *J Infect Dis.* 2012; **205**:1321-9.
19. Saito K, Hirokawa M, Inaba K, Fukaya H, Kawabata Y, Komatsuda A, Yamashita J, Sawada K. Phagocytosis of codeveloping megakaryocytic progenitors by dendritic cells in culture with thrombopoietin and tumor necrosis factor-alpha and its possible role in hemophagocytic syndrome. *Blood.* 2006; **107**:1366-74.
20. Hotta S. Pathogenesis and immunity of dengue infection in man. *Kobe J Med Sci.* 1972; **18**:199-210.
21. Scott H. A history of tropical medicine. pp.808-819. London: Edward Arnold & Co., 1939.
22. Stramer SL, Linnen JM, Carrick JM, Foster GA, Krysztof DE, Zou S, Dodd RY, Tirado-Marrero LM, Hunsperger E, Santiago GA, Muñoz-Jordan JL, Tomashek KM. Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. *Transfusion.* 2012; **52**:1657-66.
23. Stramer SL. The potential threat to blood transfusion safety of emerging infectious disease agents. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2015; **13**:420-2.
24. Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, Huy R, Tarantola A, Scott TW, Sakuntabhai A, Buchy P. Asymptomatic humans transmit dengue virus to

- mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; **112**:14688-93.
25. Hotta S, Evans CA. Cultivation of mouse-adapted dengue virus (type 1) in rhesus monkey tissue culture. *J Infect Dis*. 1956; **98**:88-97.
26. Nakao S, Lai CJ, Young NS. Dengue virus, a flavivirus, propagates in human bone marrow progenitors and hematopoietic cell lines. *Blood*. 1989; **74**:1235-40.
27. Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Wallingford, UK: CABI. First ed., 1997.
28. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol Spectrum*. 2014; **2**:AID-0022-2014.
29. Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008; **233**:401-8.
30. Perng GC, Chokephaibulkit K. Immunologic hypo- or non-responder in natural dengue virus infection. *J Biomed Sci*. 2013; **20**:34.
31. Tsai JJ, Chokephaibulkit K, Chen PC, Liu LT, Hsiao HM, Lo YC, Perng GC. Role of cognitive parameters in dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *J Biomed Sci*. 2013; **20**:88.
32. Sinha G. Sanofi's dengue vaccine first to complete phase 3. *Nat Biotechnol*. 2014; **32**:605-6.
33. Perng GC, Lei HY, Lin YS, Chokephaibulkit K. Dengue vaccines: challenge and confrontation. *World J Vaccine*. 2011; **1**:109-30.
34. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SR, Ismail HI, Chotpitayasunondh T, Chua MN, Luong CQ, Rusmil K, Wirawan DN, Nallusamy R, Pitisuttithum P, Thisyakorn U, Yoon IK, van der Vliet D, Langevin E, Laot T, Hutagalung Y, Frago C, Boaz M, Wartel TA, Tornieporth NG, Saville M, Bouckennooghe A; CYD14 Study Group. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014; **384**:1358-65.
35. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, Reynales H, Costa MS, Morales-Ramírez JO, Carrasquilla G, Rey LC, Dietze R, Luz K, Rivas E, Miranda Montoya MC, Cortés Supelano M, Zambrano B, Langevin E, Boaz M, Tornieporth N, Saville M, Noriega F; CYD15 Study Group. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*. 2015; **372**:113-23.
36. Hsu AY, Wu SR, Tsai JJ, Chen PL, Chen YP, Chen TY, Lo YC, Ho TC, Lee M, Chen MT, Chiu YC, Perng GC. Infectious dengue vesicles derived from CD61+ cells in acute patient plasma exhibited a diaphanous appearance. *Sci Rep*. 2015; **5**:17990.

## 第六節

# C 型凝集素 CLEC5A 在登革 致病機制的角色

陳斯婷 吳明芳 黃雅蘭

黃明停 謝世良

黃病毒（亦稱黃質病毒，包含登革病毒）可透過 C 型凝集素 CLEC5A 引起嚴重發炎反應及大量細胞激素釋放（也稱細胞激素風暴），阻斷 CLEC5A 可以在沒有影響抗病毒免疫情況下減少發炎反應，因此 CLEC5A 的拮抗性抗體有極大的潛力成為治療登革病毒及各種黃病毒引發的發炎反應及各種臨床症狀。

## 黃病毒造成的人類疾病

黃病毒屬包含約 70 種病毒，而主要造成人類疾病的黃病毒為黃熱病毒、登革病毒、西尼羅河病毒、日本腦炎病毒及蜱傳腦炎病毒<sup>1,2</sup>。黃病毒的遺傳物質是正股 RNA，包裹在由鞘膜蛋白組成之二十面體內。外層則有從宿主細胞來的雙層脂膜，膜上含有形成二聚體之病毒鞘膜蛋白及膜蛋白。黃病毒顆粒大小約為 37-50 nm，且所有的黃病毒在抗原性、基因性及 3D 立體結構皆十分相似。

多數的黃病毒感染症狀輕微，但也可能發生嚴重的無菌性腦膜炎、腦炎、或出血。可引起腦炎的黃病毒包含有聖路易腦炎病毒、西尼羅河病毒、日本腦炎病毒、墨雷河谷腦炎病毒、蘇聯春夏季腦炎病毒。約有 20% 感染西尼羅河病毒的病患出現西尼羅河熱，約 1% 的病患發展成腦炎、腦膜炎、或腦膜腦炎。另一方面可造成出血的黃病毒為登革病毒及黃熱病毒。登革病毒感染是世界上最主要的醫療衛生議題之一，每年有高達 1 億登革熱及 30 萬登革出血熱病例發生。登革熱又稱為骨痛熱，其症狀包含持續 6-7 天的高燒、頭痛、紅疹、骨頭痛<sup>3</sup>。二次感染不同血清型的登革病毒則有可能導致登革出血熱及登革休克症候群；由於第一次感染所產生的非中和性交叉抗體可促使病毒進入巨噬細胞，此現象也稱抗體依賴性增強作用，亦是導致脈管系統破裂、內出血及血漿滲漏的主要因素之一<sup>4-7</sup>。黃熱病毒感染可造成嚴重的系統性疾病，如肝臟、腎臟、心臟衰竭及出血，感染後死亡率高達 50%。由於黃熱病毒感染常造成肝臟損傷並導致黃疸發生，因而得名。目前並無特定療法治療黃病毒感染，僅能以支持療法治療。而針對黃熱病毒、日本腦炎病毒、蘇聯春夏季腦炎病毒已有疫苗可施打。四價登革疫苗已開

發，然而登革疫苗是否能在二次感染病患中引發對四種血清型病毒相同反應仍然未知，而能提供多長的保護效果也待進一步證實。

### 醣基化與黃病毒毒性

許多證據顯示鞘膜蛋白醣基化參與在黃病毒感染造成的致病機轉。登革病毒鞘膜蛋白含有兩個位於 N 端的醣基化位置，在 Asn-67 及 Asn-153。Asn-153 醣基化在大多數的黃病毒中是高度保留的，而 Asn-67 則是登革病毒專屬的醣基化位置<sup>8</sup>。然而之前的研究顯示第二型登革病毒僅有 Asn-67 醣基化，第一型登革病毒則保有 Asn-67 及 Asn-153 兩個醣基化位置<sup>9</sup>。因此 Asn-67 及 Asn-153 是否在四種血清型的登革病毒皆被醣基化仍須進一步確認。

登革病毒鞘膜蛋白 Asn-67 醣基化對於病毒繁殖是不可或缺的。沒有 Asn-67 醣基化的第二型登革病毒可以感染哺乳動物細胞且可以轉譯及複製病毒基因，但卻無法在哺乳動物細胞株產出具有感染力的病毒顆粒，而同樣的病毒卻可以在蚊子細胞株 C6/36 生產出病毒顆粒。此外缺少 Asn-67 醣基化的登革病毒感染未成熟樹突細胞的比例下降，顯示醣基化與未成熟樹突細胞表面大量表現之 CLEC4L/DC-SIGN 與 CLEC4M/DC-SIGNR 結合相關<sup>10</sup>。而這項結果也與冷凍電子顯微鏡觀察到的 CLEC4L 可與第二型登革病毒結合相符<sup>11</sup>。

將第二型登革病毒鞘膜蛋白 Asn-153 醣基化位置之胺基酸改變成 Gln 造成病毒對 BHK 細胞株的感染力下降，但不影響對 C6/36 細胞株感染力。顯示 Asn-153 醣基化調控對哺乳動物細胞及蚊子細胞的感染

力。相反的，西尼羅河病毒 Asn-154 醣基化（相當於登革病毒 Asn-153 位置）對 BHK 及 C6/36 細胞株感染力下降<sup>12</sup>。以上結果顯示登革病毒 Asn-153 或西尼羅河病毒 Asn-154 醣基化在個別病毒中扮演不同角色。

對第四型登革病毒而言，小鼠適應病毒株 H241 對小鼠是高度神經毒性，而相同病毒株但非小鼠適應則沒有神經毒性。若將非小鼠適應病毒株之鞘膜蛋白 Thr-155 或 Ala-144 以 Ile 取代則可將 Asn-153 醣基化去除，而產出之病毒則像小鼠適應株病毒一樣具有神經毒性，顯示 Asn-153 醣基化與小鼠的致病性有關<sup>13</sup>。

對西尼羅河病毒而言，紐約病毒株的鞘膜蛋白醣基化決定了病毒神經毒性。為了研究西尼羅河病毒鞘膜蛋白醣基化與致病性的相關性，將小鼠腹腔巨噬細胞感染不同株病毒後分析腫瘤壞死因子 (TNF)- $\alpha$  及介白素 (IL)-1 $\beta$  產生。發現帶有醣基化的西尼羅河病毒可以造成 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  分泌量及病毒複製上升，顯示 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  表現與西尼羅河病毒鞘膜蛋白醣基化相關<sup>14</sup>。值得注意的是西尼羅河病毒顆粒與次病毒顆粒可與 CLEC4L 及 CLEC4M 結合。不像登革病毒有兩個醣基化位置，西尼羅河病毒僅有 Asn-154 醣基化，因此西尼羅河病毒與 CLEC4L 及 CLEC4M 結合極有可能是透過 Asn-154<sup>15</sup>。因此登革病毒與西尼羅河病毒似乎是透過不同位置的醣基與 CLEC4L 及 CLEC4M 結合。

## C 型凝集素 CLEC5A 與黃病毒感染

儘管研究證實黃病毒可感染單核球、巨噬細胞、樹突細胞、內皮細胞等，然而關於黃病毒於動物體內宿主細胞複製的資訊有限。近期有許多研究已證實髓系細胞在登革病毒感染的致病性很重要。研究指出，登革病毒可以在人類皮膚樹突細胞 - “朗格罕細胞”<sup>16</sup> 以及來自急性感染之病患所分離出之血液單核球 / 巨噬細胞內複製<sup>17</sup>。黃病毒複製過程中的雙股 RNA 複製中間產物可刺激樹突細胞及巨噬細胞分泌發炎細胞激素及干擾素。然而最近科學家才發現登革病毒是如何進入到樹突細胞與單核球 / 巨噬細胞，以及宿主細胞如何辨識登革病毒。

利用分子生物學技術與基因重組蛋白工程，我們團隊成功發展出嶄新的技術平台，並利用此平台快速篩選出病毒的受體以作為治療的標靶。利用這個技術，我們找到一個能夠與登革病毒相結合的受體 CLEC5A。

### 1. CLEC5A 與登革出血熱 / 登革休克症候群

CLEC5A 是第二型穿膜蛋白，屬於 C 型凝集素超家族，在穿膜區域含有一帶電胺基酸，可與 DAP12 結合。DAP12 含有一個 ITAM 區域，在自然殺手細胞中以非共價鍵連結活化亞型的 MHC class I 受體<sup>18</sup>。不像典型的 C 型凝集素區域，CLEC5A 包含“自然殺手 T 細胞 C 型凝集素區域”，可在沒有鈣離子存在下與醣類結合<sup>19</sup>。值得注意的是，可辨識真菌細胞壁  $\beta$  葡聚醣並調控對真菌免疫反應的 C 型凝集素 CLEC7A/Dectin-1 也含有自然殺手 T 細胞 C 型凝集素區域，同樣可以在沒有鈣離子及鎂離子的情況下與聚醣結合<sup>20</sup>。我們發現

CLEC5A 能與登革病毒直接結合，並且在登革病毒及日本腦炎病毒感染宿主所造成的發炎反應扮有極重要的角色<sup>19,21</sup>。

CLEC5A 與登革病毒結合不會導致病毒進入細胞，而是藉由 CLEC5A 誘發 DAP12 磷酸化及刺激前發炎細胞激素分泌。阻斷 CLEC5A 與登革病毒的結合可抑制前發炎細胞激素分泌但不影響 IFN- $\alpha$  產生。顯示 CLEC5A 是負責前發炎細胞激素產生之訊號傳遞受體。

為了研究 CLEC5A 在登革出血熱 / 登革休克症候群中扮演的角色，利用第二型登革病毒 (新幾內亞 C-N 或 PL046 病毒株) 感染 STAT1 缺損小鼠做為動物模式，在小鼠引起類似登革出血熱 / 登革休克症候群之嚴重發炎反應及大量細胞激素釋放 (也稱細胞激素風暴)。STAT1 缺損小鼠在感染第二型登革病毒後可觀察到嚴重的皮下出血、神經受損、休克等症狀。這些嚴重的症狀可歸因於：(1) STAT1 主要活化 IFN 訊息傳遞<sup>22</sup>；(2) TAM 受體酪胺酸激酶的負回饋是依靠 STAT1<sup>23</sup>；(3) 當西尼羅河病毒鞘膜蛋白與 CLEC4L 結合後能透過活化 STAT1 調控之訊息傳遞鏈導致 TLR3 的表現量及細胞激素下降。因此 STAT1 缺損可強化 TLR3 調節之訊息傳遞而強化細胞激素的產生<sup>24</sup>。在如此嚴重的發炎反應下，注射抗 CLEC5A 單株抗體可抑制登革病毒引起之血漿滲漏、皮下及主要器官出血，登革病毒感染之 STAT1 缺損小鼠約有 50% 的存活率。這些結果顯示，在巨噬細胞阻斷 CLEC5A 調節之訊息傳遞鏈可減少前發炎激素產生，並且不影響抗病毒免疫之 IFN- $\alpha$  分泌。

## 2. CLEC5A 與 NALP3 發炎體的活化

持續地發高燒是登革病人最典型的臨床症狀之一，然而內源性熱原 (Endogenous pyrogen) 的來源，例如 IL-1 $\beta$ ，及參與 IL-1 $\beta$ /IL-18 活化的發炎體及其下游半胱胺酸天冬胺酸酶 -1 (Cysteine aspartate protease, caspase-1) 其訊號傳遞路徑均未可知。巨噬細胞在巨噬細胞株落刺激因子 (Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 及顆粒球 - 巨噬細胞株落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 的影響下會分別分化成 GM-M $\Phi$  及 M-M $\Phi$ 。我們發現登革病毒可以誘發 GM-M $\Phi$  (發炎型巨噬細胞) 產生大量的 IL-1 $\beta$  及 IL-18，同時引起細胞的死亡，然而 M-M $\Phi$  (靜止型巨噬細胞) 即使利用脂多醣體 (LPS) 進行驅動的動作，亦無法在登革病毒感染時誘發 IL-1 $\beta$  及 IL-18 的產生，此觀察驗證了 GM-M $\Phi$  及 M-M $\Phi$  對登革病毒的不同反應，同時登革病毒亦可誘發發炎型巨噬細胞內 IL-1 $\beta$ 、IL-18 及與半胱胺酸天冬胺酸酶 -1 相關之 NLRP3 基因的轉錄，且當 CLEC5A 此一與登革出血熱及日本腦炎病毒感染相關的 C 型凝集素之訊號被壓制後，則 NLRP3 發炎體的活化及半胱胺酸天冬胺酸酶 -1 調控之細胞死亡 (pyroptosis) 均會受到抑制，因此登革病毒可藉由 CLEC5A 來活化 NLRP3 發炎體。所以相較於靜止型巨噬細胞，發炎型巨噬細胞被認為在登革病毒的致病性中扮演一更關鍵性的角色<sup>25</sup>。

## 3. CLEC5A 與蝕骨細胞活化及‘斷骨痛’症狀

巨噬細胞以及樹突細胞是登革病毒感染的主要標的細胞，然而登革病毒是否也會感染蝕骨細胞，之前尚未被探討。蝕骨細胞

(osteoclast) 為骨組織中的巨噬細胞，其平常生理作用在於維持骨骼平衡。然而蝕骨細胞是否會被黃病毒病染，進而參與登革病毒感染引起的致病機轉中仍不是很清楚。我們的研究顯示，登革病毒能夠感染蝕骨細胞，並且在感染後，產生與巨噬細胞相似數量的細胞激素與感染性病毒體。有趣的是，登革病毒透過 CLEC5A 誘使蝕骨細胞分泌細胞激素以及轉錄因子 NFATc1 的核轉移現象。而進一步在小鼠活體模式中發現，登革病毒感染後，骨組織發生暫時性的發炎作用，同時也增加蝕骨細胞的蝕骨作用以及從骨組織中釋放出來的 C-端肽 I 型膠原蛋白 (CTX-1)。因此，我們也發現登革病毒感染 CLEC5A 基因缺損小鼠或是野生型小鼠感染登革病毒後再給予拮抗型 CLEC5A 單株抗體有助於減緩蝕骨活性增加現象，且血清中也偵測到較少量的 CTX-1。因此我們的研究顯示，登革病毒能夠感染蝕骨細胞並且暫時性的增加蝕骨活性，未來也將值得探討蝕骨活性增加與登革熱患者的臨床症狀。

登革病患者典型的臨床症狀之一包含骨痛現象的發生，此症狀無法被非固醇類的抗發炎藥所舒緩，因此登革病毒感染也被稱為“骨痛熱”。然而迄今，登革病患者中，觀察到肌肉和關節極其疼痛的詳細機制仍不清楚。至今許多文獻顯示，增加蝕骨活性會導致在發炎組織中其疼痛的感覺，並且透過無害的刺激所引起的發炎反應也可造成疼痛的發生<sup>26</sup>。此外增加蝕骨活性常伴隨著骨痛現象的發生，此因素可能是因為活化的蝕骨細胞透過分泌氫離子導致環境酸化所致<sup>27</sup>，另外蝕骨細胞活性的增加也與完全弗氏佐劑誘導的骨痛現象有關<sup>27</sup>，並參與在癌症<sup>28</sup>、類風溼性關節炎和骨質疏鬆症中的骨痛現象<sup>29</sup>。根據上述文獻，

我們推測，登革病毒感染造成蝕骨細胞活性增加並導致骨組織中發炎反應的現象，將可能造成病患劇烈疼痛的感覺。

迄今，只有非常少的人類病毒（如麻疹病毒和人類免疫缺陷病毒）被探討於病毒對於蝕骨細胞的感染和調控其細胞分化<sup>30,31</sup>。然而，病毒是否會感染蝕骨細胞並且增加其蝕骨活性等相關文獻至今並沒有被報導過。在我們動物模式中發現，登革病毒會感染蝕骨細胞，並且在蝕骨細胞內複製，同時也會增加其蝕骨活性，進而導致骨組織中的平衡被破壞掉。此外，在登革病患者中也分析到其血清中的 CTX-I 的數量有增加的趨勢，顯示其蝕骨活性有增加的趨勢。根據上述結果顯示，在登革病患者中的疼痛現象，可能是因登革病毒活化蝕骨細胞進而破壞骨平衡所致。

除了登革病毒，arthritogenic alphaviruses 包括 Rosa River virus (RRV) 和屈公病毒 (CHIKV) 已經被報導出參與誘發關節痛，甚至在屈公病毒感染的患者身上也發現關節部分的骨病變<sup>32</sup>。然而其分子機制仍不清楚，直到 Chen's 團隊指出，RRV 可以感染成骨細胞並促進其 IL-6 和 RANKL 的表現，然而其 RANKL 的誘餌受體 -OPG 的表現量是下降的，並在 RRV 感染的小鼠中發現，因增加了 RANKL/OPG 的比例，導致蝕骨細胞的活性增加和骨流失現象，IL-6 的中和性抗體則可防止因 RRV 感染所誘使小鼠骨流失現象<sup>33</sup>。相較於 alphaviruses 病毒，在登革病毒感染後其 OPG 的比例是上升的<sup>34</sup>。過去文獻發現，OPG 可以與溫韋伯氏因子 (von Willebrand factor) 結合，進而防止血小板互動，和透過中和 TRAIL 與 RANKL 來調節宿主免疫反應。因此 RRV 與登革病毒似乎使用不同的路徑去增加蝕骨活性進而擾亂骨平衡。

## 以 CLEC5A 為目標治療登革病毒感染

控制嚴重反應兩難之處在於抑制發炎細胞激素釋放同時也會減少抗病毒免疫反應。類固醇在控制嚴重急性呼吸道症候群病毒蔓延及死亡率是無效的。Toll like receptors (TLRs) 參與在前發炎激素（如 TNF- $\alpha$ ，IL-6）及抗病毒細胞激素 (type I IFNs) 產生，因此在控制病毒引起之發炎反應方面，TLRs 並不是適當的目標。相反的，C 型凝集素成員沒有參與在 IFN 產生，因此阻斷病毒與凝集素的交互作用能減輕由於登革出血熱及登革休克症候群造成之組織受損並提高病患生存率，甚至有可能抑制其他黃病毒引起之發炎疾病。由於黃病毒的結構相似（包含西尼羅病毒及茲卡病毒），因此 CLEC5A 的拮抗性抗體有極大的潛力成為治療各種黃病毒引發的發炎反應及各種臨床症狀。

## 結論

目前已越來越清楚知道多種受體及細胞內感應器參與在宿主與致病原交互作用中。除了 TLRs，C 型凝集素、TREMs、TLTs 在辨識致病原相關分子模式也是可能之目標。考慮到醣基化是最平常也最複雜之後轉譯修飾且致病原表面包裹著醣體，因此先天免疫受體與致病原的第一次接觸是透過蛋白質與多醣體的交互作用。雖然在急性病毒感染時，病毒引起之出血熱致病機轉仍未知，但相信細胞激素風暴在嚴重致病之疾病中扮演關鍵性角色。我們近期的實驗證實登革病毒可與 CLEC5A 結合，且有可能也與其他非 TLRs 直接結合。登革病毒可透過 CLEC5A 引起大量細胞激素產生，阻斷 CLEC5A 可以在沒有影響抗病毒免疫情

況下減少發炎反應。進一步利用抗 CLEC5A 拮抗單株抗體保護小鼠免於登革病毒引起之出血及休克症候群。因此將前發炎反應與抗病毒免疫反應分隔開，在未來提供了更佳治療病毒感染的方式。我們的研究進一步證實了在黃病毒感染的發病機制中 CLEC5A 的重要作用。在我們過去研究發現 CLEC5A 在登革感染誘使的出血性休克以及 NLRP3 發炎體活化過程中扮演要角，若處以拮抗 CLEC5A 抗體中止 CLEC5A，則可以抑制登革病毒或日本腦炎病毒感染所引起的死亡<sup>19,21,25</sup>。此現象進一步在動物模組中證實，相較於處以 isotype control 的控制組小鼠，處以抗 CLEC5A 的拮抗單株抗體小鼠其運動與活動力並沒有受到病毒感染的影響，因此顯示施打抗 CLEC5A 的拮抗單株抗體，可以防止因病毒感染引起的癱瘓。在將來，阻斷 CLEC5A 也許可以成為解除登革熱患者劇烈疼痛感覺的新策略。

## 參考文獻

1. Burke DS, Monath TP. Flaviviruses. *Fields Virology*, 4th ed., 2001. vol. 1: pp. 1043-1126.
2. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*. 2004; **10**:S98-109.
3. Wilder-Smith A, Schwartz E. Dengue in travelers. *N Engl J Med*. 2005; **353**:924-32.
4. Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L, Burke DS. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1989; **40**:444-51.
5. Bunyaratvej A, Butthep P, Yoksan S, Bhamarapavati N. Dengue viruses induce cell proliferation and morphological changes of endothelial cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997; **3**:32-7.
6. Rothman AL, Ennis FA. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 1999; **257**:1-6.
7. Burke DS, Kliks S. Antibody-dependent enhancement in dengue virus infections. *J Infect Dis*. 2006; **193**:601-3; author reply 603-4.
8. Heinz FX, Allison SL. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res*. 2003; **59**:63-97.
9. Johnson AJ, Guirakhoo F, Roehrig JT. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology*. 1994; **203**:241-9.
10. Mondotte JA, Lozach PY, Amara A, Gamarnik AV. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *J Virol*. 2007; **81**:7136-48.
11. Pokidysheva E, Zhang Y, Battisti AJ, Bator-Kelly CM, Chipman PR, Xiao C, Gregorio GG, Hendrickson WA, Kuhn RJ, Rossmann MG. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*. 2006; **124**:485-93.
12. Hanna SL, Pierson TC, Sanchez MD, Ahmed AA, Murtadha MM, Doms RW. N-linked glycosylation of West Nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *J Virol*. 2005; **79**:13262-74.
13. Kawano H, Rostapshov V, Rosen L, Lai CJ. Genetic determinants of dengue type 4

- virus neurovirulence for mice. *J Virol.* 1993; **67**:6567-75.
14. Shirato K, Miyoshi H, Kariwa H, Takashima I. The kinetics of proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages infected with envelope protein-glycosylated or non-glycosylated West Nile virus. *Virus Res.* 2006; **121**:11-6.
  15. Davis CW, Nguyen HY, Hanna SL, Sánchez MD, Doms RW, Pierson TC. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol.* 2006; **80**:1290-301.
  16. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000; **6**:816-20.
  17. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol.* 2002; **76**:9877-87.
  18. Bakker AB, Baker E, Sutherland GR, Phillips JH, Lanier LL. Myeloid DAP12-associating lectin (MDL)-1 is a cell surface receptor involved in the activation of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; **96**:9792-6.
  19. Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, Lee CK, Chiou TW, Wong CH, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature.* 2008; **453**:672-6.
  20. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature.* 2001; **413**:36-7.
  21. Chen ST, Liu RS, Wu MF, Lin YL, Chen SY, Tan DT, Chou TY, Tsai IS, Li L, Hsieh SL. CLEC5A regulates Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and lethality. *PLoS Pathog.* 2012; **8**:e1002655.
  22. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell.* 1996; **84**:443-50.
  23. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 2007; **131**:1124-36.
  24. Kong KF, Delroux K, Wang X, Qian F, Arjona A, Malawista SE, Fikrig E, Montgomery RR. Dysregulation of TLR3 impairs the innate immune response to West Nile virus in the elderly. *J Virol.* 2008; **82**:7613-23.
  25. Wu MF, Chen ST, Yang AH, Lin WW, Lin YL, Chen NJ, Tsai IS, Li L, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood.* 2013; **121**:95-106.
  26. Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth.* 2001; **87**:3-11.
  27. Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, Wang L, Iwata K, Yoneda T. Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone.* 2006; **39**:1107-15.
  28. Honore P, Mantyh PW. Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy. *Pain Med.* 2000; **1**:303-9.
  29. Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou NA. Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2002; **41**:1232-9.
  30. Reddy SV, Kurihara N, Menea C, Landucci G, Forthal D, Koop BA, Windle JJ, Roodman GD. Osteoclasts formed by measles virus-infected osteoclast precursors from hCD46 transgenic mice express characteristics of pagetic osteoclasts. *Endocrinology.* 2001; **142**:2898-905.
  31. Modarresi R, Xiang Z, Yin M, Laurence J. WNT/beta-catenin signaling is involved in regulation of osteoclast differentiation by human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir: relationship to human immunodeficiency virus-linked bone mineral loss. *Am J Pathol.* 2009; **174**:123-35.
  32. Manimunda SP, Vijayachari P, Uppoor R, Sugunan AP, Singh SS, Rai SK, Sudeep AB, Muruganandam N, Chaitanya IK, Guruprasad DR. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; **104**:392-9.
  33. Chen W, Foo SS, Rulli NE, Taylor A, Sheng KC, Herrero LJ, Herring BL, Lidbury BA, Li RW, Walsh NC, Sims NA, Smith PN, Mahalingam S. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; **111**:6040-5.
  34. Djamiatun K, van der Ven AJ, de Groot PG, Faradz SM, Hapsari D, Dolmans WM, Sebastian S, Fijnheer R, de Mast Q. Severe dengue is associated with consumption of von Willebrand factor and its cleaving enzyme ADAMTS-13. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; **6**:e1628.

## 第七節

# 登革研究 動物模式

陳文裕 伍安怡

我們對於登革病毒的致病機制至今尚未有全盤的了解，因此學者們建立了許多動物模式，包括非人類靈長類動物模式及小鼠動物模式，以期能更進一步了解登革致病機轉，甚或應用至疫苗或抗病毒藥物之測試。

## 前言

登革熱是一種藉由蚊子傳播登革病毒所引起的傳染性疾病，好發於熱帶及亞熱帶等地區。埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 是其主要的傳播媒介。過去 50 年來，登革熱好發率上升、傳播範圍有逐漸擴大的趨勢，因此，登革熱已經成為重要的傳染性疾病之一<sup>1</sup>。然而，我們對於登革病毒的致病機制尚未有全盤的了解，為了解其致病機制，學者們建立了許多動物模式，包括非人類靈長類動物模式及小鼠動物模式。在這個章節中，我們會簡單介紹目前發展出的動物模式。

### 非人類靈長類動物模式 (Non-human Primate Models)

最初使用靈長類動物模式來研究登革病毒致病機制始於西元 1931 年，Simmons 等人利用蚊子將登革病毒由猴子傳播至猴子身上<sup>2</sup>。此後，許多登革病毒的研究便利用猴子作為動物模式。皮下注射登革病毒至猴子後，登革病毒可以在猴子體內進行複製，雖然其複製狀況比在人類體內要低得多；但即使如此，被感染的猴子並沒有明顯的臨床症狀<sup>3-5</sup>。近幾年來，將高劑量的登革病毒以靜脈注射方式感染猴子，可以看到猴子在感染後有點狀出血 (petechiae)、血腫 (hematomas) 及凝血異常 (coagulopathy) 的現象產生，但卻依然沒有其他像是發燒、食慾減退、昏睡等臨床症狀<sup>6</sup>。雖然非人類靈長類動物沒有完全反映出登革病人的臨床症狀，但此動物模式對於研究登革病毒所引起的宿主免疫反應及測試登革疫苗的效力仍有相當大的助益。

## 小鼠動物模式 (Mouse Models)

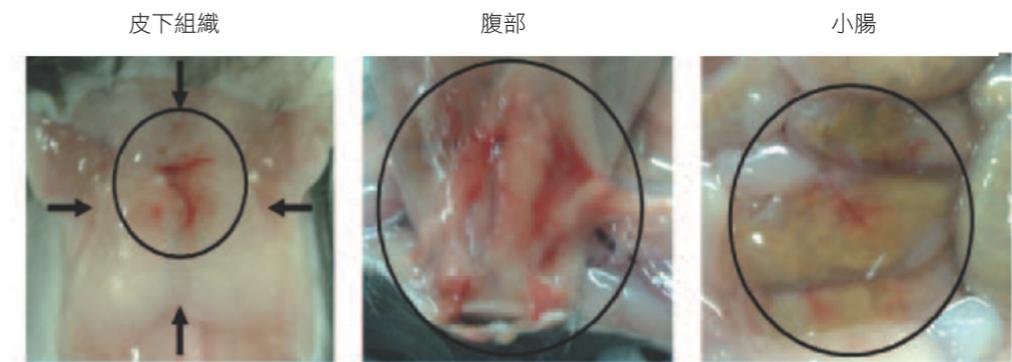
雖然小鼠並非登革病毒的自然宿主，但因研究小鼠的免疫試劑容易取得、小鼠的生命週期短、飼養價格相對便宜，操作上也較為方便，因此，小鼠成為最多學者使用的動物模式。小鼠模式又分為免疫健全 (immunocompetent) 及免疫缺陷 (immunodeficient) 小鼠：

### 1. 免疫健全小鼠

許多不同近親品系 (inbred strains) 的免疫健全小鼠被用於登革病毒的研究，例如：C57BL/6、BALB/c、A/J 品系等<sup>7-10</sup>。由於這些小鼠的免疫系統是健全的，在注射登革病毒後，可以誘導出完整的免疫反應，像是先天免疫反應、B 細胞及 T 細胞反應，對於研究登革病毒所引起的宿主反應是很好的工具。但由於小鼠並非登革病毒的自然宿主，因此通常需要注射很高的登革病毒劑量來引發免疫反應，登革病毒也只會短暫地複製。

出血是登革熱常見的臨床症狀。我們實驗室以皮內注射方式將高劑量的第二型登革病毒 (16681) 注射至免疫健全的 C57BL/6 品系小鼠背部，注射後三天可以在注射部位局部位置 (但非注射點) 及全身都觀察到出血的現象 (圖一)；以同樣方式注射 UV 去活化的登革病毒或日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus) 並不會觀察到小鼠有出血現象，顯示皮內注射病毒所造成的小鼠出血是登革病毒所特有的現象。將小鼠出血組織進行蘇木素 - 伊紅染色 (H&E stain) 後發現有紅血球外滲，此為血管滲漏的徵兆。而在有出血現象的小鼠中，其血液中血小板的數量也較健康的小鼠要少，這也反映了登革病人的臨床症狀<sup>7</sup>。我們之後利用此登革小鼠出血動物模式探討了登革病

毒的致病機制，發現出血組織中有很多的巨噬細胞浸潤，而巨噬細胞及腫瘤壞死因子 (TNF) 與登革病毒所造成的小鼠出血十分相關。將小鼠出血組織進行免疫螢光染色，結果顯示浸潤的巨噬細胞為產生腫瘤壞死因子的細胞。在體外實驗系統中的結果顯示登革病毒會刺激巨噬細胞產生腫瘤壞死因子，而腫瘤壞死因子增強了登革病毒所誘導的內皮細胞凋亡<sup>8</sup>。



圖一 免疫健全 C57BL/6 品系小鼠的出血現象。在小鼠背部的四個位置 (如箭頭所示) 以皮內注射方式將高劑量的登革病毒注射至 C57BL/6 品系小鼠，三天後觀察小鼠的皮下組織、腹部及小腸是否有出血現象<sup>7</sup>。

### 2. 免疫缺陷小鼠

在免疫缺陷小鼠中，雖然某部分的免疫反應是缺失的，但也因為如此，登革病毒可以在這樣的小鼠中複製地較好，所引發的症狀通常較免疫健全小鼠來得明顯，實驗所需注射的病毒量也較低。常用的免疫缺陷小鼠品系包括干擾素 alpha/beta 受體缺失 (IFN  $\alpha/\beta$

receptor-deficient)、AG129、STAT1 缺失 (STAT1-deficient) 小鼠等。干擾素 (interferon) 是宿主抵抗病毒感染的重要因子，干擾素受體缺失會導致宿主清除病毒的能力下降。將登革病毒以靜脈注射方式注射至干擾素 alpha/beta 受體缺失小鼠中，會造成小鼠死亡及病毒血症 (viremia) 現象。小鼠的肝臟、小腸及骨髓中可以測到登革病毒，血清中也有細胞激素 TNF 及 IL-10 產生<sup>11</sup>。AG129 小鼠是第一型干擾素 (type I interferon) 及第二型干擾素 (type II interferon) 受體同時缺失的小鼠，此種小鼠注射登革病毒後，亦會造成小鼠死亡及病毒血症現象，更會造成小鼠脾臟腫大及癱瘓等<sup>12</sup>。STAT1 全名為 Signal Transducers and Activators of Transcription 1，為干擾素下游重要的訊息傳遞分子，STAT1 缺失會使得干擾素所產生的抗病毒反應減弱。登革病毒感染 STAT1 缺失 (STAT1-deficient) 小鼠後，會造成小鼠死亡。B 細胞、自然殺手細胞 (NK cell)、巨噬細胞 (macrophage) 及樹突細胞 (dendritic cell) 也有活化的現象，亦會造成腸道出血及輕微癱瘓<sup>13,14</sup>。有些學者利用擬人化小鼠 (humanized mouse) 作為研究登革病毒的致病機制，像是擬人化 NOD-scid *IL2r $\gamma$  null* 小鼠。將表現人類 CD34 造血幹細胞分離出來後注射至輻射照射過的 NOD-scid *IL2r $\gamma$  null* 小鼠，此小鼠體內便會有人類的免疫細胞，更貼近人類的免疫系統<sup>15</sup>。登革病毒感染此種小鼠後，小鼠會有病毒血症、血小板數量低下、發燒及紅斑等臨床症狀<sup>15</sup>。免疫缺陷小鼠模式整理如表一。

表一 免疫缺陷小鼠模式

小鼠	IFN $\alpha/\beta$ receptor-deficient <sup>11</sup>	AG129 <sup>12</sup>	STAT1-deficient <sup>13</sup>	Humanized NOD-scid <i>IL2r<math>\gamma</math> null</i> <sup>15</sup>
病毒株	DENV-2 D220	適應小鼠 (mouse-adapted) 的 DENV-2 NGC	DENV-2 PL046	DENV-2 K0049, 429557, 328298, IQT2913, 1349, ArA6894, DakArA1247, PM33974
感染途徑/劑量 (PFU/小鼠)	靜脈注射/ 10 <sup>5</sup> ~10 <sup>7</sup>	腹腔注射/ 10 <sup>6</sup>	靜脈注射/ 10 <sup>7</sup> 或 10 <sup>8</sup>	皮下注射/ 10 <sup>6</sup>
症狀	死亡	✓	✓	
	血小板過低			✓
	血清/局部腫瘤壞死因子上升	✓		
病毒偵測	病毒斑測試	血清	✓	✓
		脾臟	✓	✓
		肝臟		✓
		腦	✓	✓
即時聚合酶鏈鎖反應	血清	✓		✓
	肝臟	✓		

PFU: plaque-forming unit, 斑點形成單位

## 結論

合適的動物模式對於研究登革病毒的致病機制及疫苗的發展是十分重要的。利用上述的非人類靈長類動物模式及小鼠動物模式，學者們找出了不同面向的登革致病機制。每種動物模式都有其優缺點，了解其應用及限制將會幫助我們更了解登革病毒。

## 參考文獻

1. Wilder-Smith A, Schwartz E. Dengue in travelers. *N Engl J Med*. 2005; **353**:924-32.
2. Simmons JS, St John JH, Reynolds FHK. Experimental studies of dengue. *Philippine J Sci*. 1931; **44**:1-247.
3. Marchette NJ, Halstead SB, Falkler WA Jr, Stenhouse A, Nash D. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. *J Infect Dis*. 1973; **128**:23-30.
4. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. I. Clinical laboratory responses to primary infection. *J Infect Dis*. 1973; **128**:7-14.
5. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. II. Clinical laboratory responses to heterologous infection. *J Infect Dis*. 1973; **128**:15-22.
6. Onlamoon N, Noisakran S, Hsiao HM, Duncan A, Villinger F, Ansari AA, Perng GC. Dengue virus-induced hemorrhage in a nonhuman primate model. *Blood*. 2010; **115**:1823-34.
7. Chen HC, Hofman FM, Kung JT, Lin YD, Wu-Hsieh BA. Both virus and tumor necrosis factor alpha are critical for endothelium damage in a mouse model of dengue virus-induced hemorrhage. *J Virol*. 2007; **81**:5518-26.
8. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*. 2008; **82**:12312-24.
9. Shresta S, Kyle JL, Robert Beatty P, Harris E. Early activation of natural killer and B cells in response to primary dengue virus infection in A/J mice. *Virology*. 2004; **319**:262-73.
10. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; **35**:33-42.
11. Orozco S, Schmid MA, Parameswaran P, Lachica R, Henn MR, Beatty R, Harris E. Characterization of a model of lethal dengue virus 2 infection in C57BL/6 mice deficient in the alpha/beta interferon receptor. *J Gen Virol*. 2012; **93**:2152-7.
12. Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol*. 1999; **73**:783-6.
13. Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E. Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol*. 2005; **175**:3946-54.
14. Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, Lee CK, Chiou TW, Wong CH, Hsieh SL. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 2008; **453**:672-6.
15. Mota J, Rico-Hesse R. Humanized mice show clinical signs of dengue fever according to infecting virus genotype. *J Virol*. 2009; **83**:8638-45.

## 第六章

# 抗登革病毒治療與預防之 研發策略



## 第一節

# 對抗登革病毒的 策略與藥物發展

余佳益 林宜玲

在沒有專一性抗病毒藥物可用的情況下，科學家對於抗登革病毒的策略可大致分為三類：(1) 以病毒為標的，直接抑制登革病毒的複製；(2) 以宿主細胞為標的，阻斷登革病毒使用細胞資源進行複製；(3) 以宿主細胞為標的，降低登革病毒對宿主細胞造成的傷害，以期未來能發展出有效的抗病毒藥物。

在號稱醫藥發達的今天，世上僅有少數的藥物能專一性地抑制特定的病毒，例如愛滋病毒和流感病毒等。而每年對台灣民眾造成威脅的登革病毒，除了『支持性療法』之外，我們竟無有效的抗病毒藥物與之抗衡。在本章節中，我們將從宿主細胞對抗登革病毒的先天免疫出發，探討對抗登革病毒的可能策略與困難，並回顧抗登革藥物的發展現況。

### 對抗登革病毒的先天免疫系統：干擾素

1950 年代科學家們發現，在少量病毒感染的情況下，細胞會分泌出一種具有“干擾”病毒生長能力的特殊因子，也就是今日我們所熟知的干擾素 (interferon; IFN)。目前已知的干擾素可粗略分成三大類，幾乎所有具有細胞核的人類細胞都能產生第一型干擾素 (Type I IFN)，其在人類對抗病毒的先天免疫系統中扮演著不可或缺的角色。

干擾素的抗病毒功能並非直接作用在病毒本身，而是藉由活化一連串的訊息路徑，使細胞產生出各式各樣的抗病毒蛋白去攻擊病毒。首先，細胞表面的干擾素受體 (IFN receptor) 在接受到干擾素的結合後，附著在干擾素受體細胞內側的 Jak/Tyk 激酶會被活化，進而啟動轉錄因子 STAT1/STAT2 (Signal Transducers and Activators of Transcription 1/2)，使得細胞提高抗病毒蛋白的產量或活性，而達到抑制病毒的複製。例如：核糖核酸水解酶 L (RNase L) 被活化後可切割破壞病毒的基因體；活化的蛋白激酶 R (protein kinase R; PKR) 則可藉由抑制細胞內蛋白質的合成，阻止病毒的複製。然而，病毒是絕對細胞內寄生物，干擾素

所誘發的抗病毒功能也會使被感染的細胞受傷，甚至死亡。因此，細胞誘發干擾素的過程受到嚴格的調控，才不會對生物個體造成傷害。

近年來的研究指出，干擾素的誘發肇始於細胞偵測到統稱為 PAMP (pathogen associated molecular patterns) 的病原體相關分子。PAMP 是病原體特有的分子結構，通常在演化上具有高度保留性，且不存於宿主中，才能讓細胞做為敵我辨識的依據；例如：RNA 病毒複製時會產生的雙股 RNA 結構 (dsRNA)，以及革蘭氏陰性菌外膜成份之一的脂多醣 LPS (lipopolysaccharide) 等。而細胞則是透過不同的模式辨識受體 PRR (pattern recognition receptors) 來偵測與辨別各式各樣的 PAMP。當 PRR 偵測到 PAMP 時，便會把活化的訊號傳遞給下游的轉介分子 (adaptors)，這些訊號會統整並召集與活化特定的蛋白激酶 (protein kinase)，而對不同的轉錄因子造成程度各異、強度不一的活化，使得最終產生出的干擾素，在種類、濃度、總量上都有所不同。而這一系列的訊號傳遞也讓細胞可以調節抗病毒策略、抗病毒蛋白的種類與強度，以面對入侵的各式病毒。

### 登革病毒對抗干擾素的策略

科學家在十多年前即發現，如果將細胞預先培養在含有第一型干擾素的培養液中，細胞會具有良好的抗登革病毒能力；如果細胞是在被登革病毒感染後才給予第一型干擾素，治療登革病毒感染的結果便差強人意<sup>1</sup>。這意味著，雖然干擾素可以有效對抗登革病毒，但登革病毒似乎也演化出策略來對抗宿主細胞的抗病毒系統。

另外，相較於同屬黃病毒屬的日本腦炎病毒，人類細胞被登革病毒感染後，只能產生出少量的干擾素。顯示登革病毒演化的策略之一為：降低干擾素的產生，以避開宿主的抗病毒機制。目前已知細胞可以透過 RIG-I、MDA5、TLRs 等各式不同的 PRR 來偵測登革病毒的感染，但登革病毒在細胞內複製時，病毒 dsRNA 會隱藏在細胞的膜狀結構<sup>2</sup>，使得 PRR 偵測不到登革病毒，而降低干擾素產生。另外也發現，在含有登革病毒蛋白酶 NS2B3 的細胞中，這些外來的病毒核酸仍無法順利地誘發干擾素的產生，而且這個能力與登革病毒蛋白酶的酵素活性息息相關<sup>3,4</sup>；顯示細胞內存在著登革病毒蛋白酶的受質，而此受質的切割與否，決定了登革病毒感染的細胞是否能成功產生干擾素。我們的研究團隊發現，登革病毒被 PRR 偵測到的訊號無法順利傳給下游二個十分重要的轉介分子 MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein；又稱為 IPS-1、VISA、或 Cardif) 以及 MITA (mediator of IRF3 activation；又稱為 STING 或 TMEM173)；這是因為 MAVS 會被登革病毒活化的半胱胺酸蛋白酶 (caspase) 所切割<sup>5</sup>，而 MITA 則是被登革病毒自身所攜帶的病毒蛋白酶 NS2B3 所切割<sup>4</sup>，進而造成誘發干擾素合成訊息無法傳遞。有趣的是，鼠類的 MITA 能抵抗登革病毒的切割降解，因此仍具有誘發干擾素產生與抑制登革病毒的能力<sup>4,6</sup>；這或許也是登革病毒無法有效感染小鼠，以及登革相關研究一直受限於缺乏良好的小鼠動物感染模式的可能原因之一。

然而，登革病毒對抗干擾素系統的策略並不止於此。先前提到過，使用第一型干擾素治療已被登革病毒感染的細胞，其效果並不令人滿意；這原因就在於登革病毒也會造成細胞內負責啟動抗病毒基因的轉錄

因子 STAT2 降解，使得即便在感染後給予干擾素，也無法順利啟動抗病毒基因的表現，來阻止登革病毒的複製。令人意外的是，登革病毒竟是利用病毒 RNA 複製酶 NS5 去召集細胞自身的 UBR4 分子對 STAT2 進行降解<sup>7</sup>，意味著登革病毒複製酶 NS5 仍有許多未知的功能尚待釐清。總括而言，或許是干擾素所誘發的抗病毒策略，對登革病毒有相當良好的抑制效果，所以登革病毒演化出不只一種策略去抑制干擾素的產生、以及抑制干擾素後續的作用。若有藥物能減低登革病毒抑制干擾素系統的能力，那或許宿主自身的免疫系統就能有效地清除登革病毒的感染；然而，登革病毒致病的原因十分複雜，這樣的策略會不會反而使病患曝露在嚴重的細胞激素風暴 (cytokine storm) 之下，仍尚待研究釐清。

### 對抗登革病毒相關疾病的策略

在沒有專一性抗病毒藥物可用的情況下，面對登革病患大多採取適當的支持性療法；即便目前學界對登革病毒的致病原因仍有眾多看法，但臨床上病患血中的病毒含量，和病情的嚴重程度是有高度相關的。因此，如何降低、甚至阻斷登革病毒於患者體內的複製，便成為發展抗病毒藥物的首要考量之一。另外，病毒依賴細胞內的資源進行複製，在感染過程中或結束後可能對宿主細胞造成傷害；因此，對抗登革病毒的策略可大致分為三類：(1) 以病毒為標的，直接抑制登革病毒的複製；(2) 以宿主細胞為標的，阻斷登革病毒使用細胞資源進行複製；(3) 以宿主細胞為標的，降低登革病毒對宿主細胞造成的傷害。分

述如下：

(1) 以病毒為標的，直接抑制登革病毒的複製。

登革病毒是一個單股正向 RNA 病毒，其複製策略為：病毒 RNA 進入細胞質後，像宿主 mRNA 一樣進行轉譯，先做出一個大的 polyprotein，再藉由自身或宿主的蛋白酶切割成十個病毒蛋白，而這些病毒蛋白就是登革病毒複製的主要工具。由於這十個病毒蛋白僅存於登革病毒感染的細胞中，因此若能針對這些病毒蛋白發展出專一性的抑制劑，理論上，即可在不影響宿主細胞、或是對宿主細胞的傷害降到最低的情況下，抑制病毒的複製。而在這十個病毒蛋白中，非結構蛋白 5 (NS5) 和非結構蛋白 3 (NS3) 最常被當成藥物標的。主要原因為其具有酵素活性、易於評估、且相對保留性高。登革病毒 NS5 蛋白是一種 RNA 依賴型 RNA 複製酶 (RNA-dependent RNA polymerase ; RdRp)，是所有黃病毒科 (Flaviviridae) 中分子量最大、相似性最高的病毒蛋白；藉由評估 RdRp 的酵素活性，科學家們發現 N-sulfonylanthranilic acid 類衍生物能結合在 NS5 的 RNA 通道 (RNA tunnel) 上，進而阻礙登革病毒 RNA 的複製<sup>8</sup>。另一類以 NS5 為標的，具有抑制登革病毒 RNA 複製的化合物則是核苷類似物 (nucleoside analogue)，如 balapiravir (RG1626)、R1479 等<sup>9,10</sup>。

登革病毒蛋白 NS2B3 複合體則是另一個具有多重酵素活性的分子，目前已知具有蛋白水解酶 (protease)、RNA 解旋酶 (helicase)、NTP 水解酶 (NTPase) 等活性。NS2B3 蛋白水解酶負責切割、處理眾多具功能性的病毒蛋白，為登革病毒複製所必需；因此，阻斷蛋白水解酶酵素活性便能有效地抑制登革病毒。另外，相較於解旋酶或

NTP 水解酶活性，蛋白水解酶活性分析的方法較為多樣、簡便，可藉由快速大量的系統性篩選，有效率地找出具有抗登革病毒潛力的藥物。因此，長期以來，不論在業界或學界，蛋白水解酶酵素活性總是抗登革病毒藥物的首選目標。如 recombinant retrocyclin 1<sup>11</sup>、BP13944<sup>12</sup>、 $\alpha$ -ketoamides<sup>13</sup>、quinoline containing compounds<sup>14</sup>、WCW-NH2<sup>15</sup> 等都是以登革病毒蛋白水解酶為標的，具有抗登革病毒潛質的藥物。

除了針對特定登革病毒酵素設計的篩選系統之外，近來也有不少科學家藉由其它的篩選系統，來測試現有的化合物是否具有抗登革病毒的潛質。例如：以登革病毒次基因體複製子報導系統 (subgenomic DENV-replicon reporter system)，科學家們發現一個名為 SDM25N 的  $\delta$  鴉片類受體拮抗劑 ( $\delta$  opioid receptor antagonist)，能作用在登革病毒非結構蛋白 4B (NS4B)<sup>16</sup>；另一個針對登革病毒造成的細胞病變所設計的高通量篩選系統，則是在近 20 萬個化合物中找到了一個能抑制登革病毒 capsid 結構蛋白的化合物 ST-148<sup>17</sup>。除此之外，也有人嘗試直接針對病毒設計藥物；例如：利用短肽來拮抗登革病毒外套膜蛋白 (envelop protein)，進而抑制登革病毒的感染<sup>18</sup>；以及針對登革病毒具專一性的 RNA 序列設計的短小干擾性 RNA (siRNA)，對登革病毒的複製也有不錯的抑制效果<sup>19</sup>。至於其它的策略，例如針對 NS5 的甲基轉移酶、或是專一性地抑制登革病毒 RNA 轉譯，則仍待更進一步研究。

(2) 以宿主細胞為標的，阻斷登革病毒使用細胞資源進行複製。

登革病毒基因體在細胞內可表現出十個病毒蛋白，其它複製的

必需因子則高度仰賴宿主細胞提供，而抑制這些因子的功能、或是阻止病毒去利用這些因子，也就順理成章地成為另一個抗病毒策略。而干擾素所誘發的抗病毒蛋白，也有許多是利用這樣的抗病毒策略；例如 OAS-RNaseL 系統就是在活化後，藉由降解病毒 RNA，使其無法利用宿主資源進行轉譯；而 dsRNA 所活化的蛋白激酶 R 則是藉由關閉 (shutdown) 宿主細胞內的蛋白質轉譯，而抑制病毒的複製。所以，若能促進細胞內干擾素系統的活化，理論上也能有效地抑制登革病毒；直接給予干擾素、或是給予干擾素系統活化物，如 5'-ppp RNA<sup>20</sup>、Rhodiola<sup>21</sup> 或 PIKA<sup>22</sup>，就是採取這樣的策略。若能更加瞭解哪些細胞因子是登革病毒複製所必需的，我們便有機會研發出更多的抗登革病毒策略。

然而，相較於十個登革病毒蛋白，人類宿主細胞所擁有的基因數和蛋白質種類都遠大過於登革病毒，要找到特定參與登革病毒複製的細胞因子有如大海撈針；因此，另一種策略就是反其道而行，利用已知的化合物直接進行篩選，找出具有抗登革病毒潛質的藥物，再回溯其可能的作用機制，作為設計與改善抗登革藥物的策略；藉由這種方式，我們除了能快速發展抗登革藥物，也有機會對舊有的藥物賦予抗登革病毒的新功能。這種「老藥新用」(drug repurposing) 的概念在國內也有不錯的研究成果，例如臨床上用於治療噁心、嘔吐的藥物 PCZ (prochlorperazine)，便被發現可以藉由抑制病毒進入到細胞的過程，進而發揮抗登革病毒的能力<sup>23</sup>。

(3) 以宿主細胞為標的，降低登革病毒對宿主細胞造成的傷害。

就感染性疾病的角度而言，前述二大類抗登革藥物的出發點，

是以主動的方式抑制登革病毒的感染與複製，在降低病毒量的情況下，應可減輕病毒所造成的疾病。但如果不從抑制病毒的角度來切入，而以控制登革病毒所造成的疾病或死亡，或許也是一個可行的策略。以干擾素作用中的轉介因子 MAVS 為例，MAVS 缺陷的小鼠雖無法產生干擾素，但相較於干擾素受體 (IFN receptors) 缺乏的小鼠，MAVS 的缺陷小鼠在被登革病毒感染後，反而不會造成小鼠的死亡<sup>24</sup>；我們團隊在細胞實驗中進一步證實，MAVS 在登革病毒的感染過程中，除了能夠調控干擾素的產生，同時也促進了細胞自殺的訊息，而導致細胞病變<sup>5</sup>。耐人尋味的是，這些有趣的現象與粒線體的動態平衡有著高度相關；我們最近的研究指出，登革病毒蛋白酶可以藉由切割細胞內的粒線體融合素 (mitofusins; MFN1 及 MFN2)，來調控粒線體的動態平衡，並藉此更進一步影響 MAVS 調控的抗病毒與細胞自殺的訊息強度<sup>25</sup>。因此，或許以保護細胞或個體免於病毒毒殺的大前提之下，再發展其它的抗登革病毒藥物，會是一個相對安全的策略。而在這架構之下，由於登革病毒蛋白酶除了參與病毒複製的過程，同時也切割了許多重要的細胞因子，而這樣的毒力因子，未來也可能成為對抗登革病毒相關疾病的主要標的之一。

隨著環境變遷與氣候極端化的影響，每年受登革病毒感染威脅的人口有愈來愈多的趨勢，抗登革藥物的研發已是刻不容緩的重要議題；即便目前學界對於登革病毒確切的致病機制仍有不同的觀點，發展安全又有效抗登革藥物的重要性，絕不亞於登革疫苗的研發，值得更多關切與投入。

## 參考文獻

- Diamond MS1, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J Virol.* 2000; **74**:4957-66.
- Uchida L, Espada-Murao LA, Takamatsu Y, Okamoto K, Hayasaka D, Yu F, Nabeshima T, Buerano CC, Morita K. The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Sci Rep.* 2014; **4**:7395.
- Rodriguez-Madoz JR, Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex. *J Virol.* 2010; **84**:9760-74.
- Yu CY, Chang TH, Liang JJ, Chiang RL, Lee YL, Liao CL, Lin YL. Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *PLoS Pathog.* 2012; **8**:e1002780.
- Yu CY, Chiang RL, Chang TH, Liao CL, Lin YL. The interferon stimulator mitochondrial antiviral signaling protein facilitates cell death by disrupting the mitochondrial membrane potential and by activating caspases. *J Virol.* 2010; **84**:2421-31.
- Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, Maringer K, Bernal-Rubio D, Shabman RS, Simon V, Rodriguez-Madoz JR, Mulder LC, Barber GN, Fernandez-Sesma A. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog.* 2012; **8**:e1002934.
- Morrison J, Laurent-Rolle M, Maestre AM, Rajsbaum R, Pisanelli G, Simon V, Mulder LC, Fernandez-Sesma A, García-Sastre A. Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS Pathog.* 2013; **9**:e1003265.
- Niyomrattanakit P, Chen YL, Dong H, Yin Z, Qing M, Glickman JF, Lin K, Mueller D, Voshol H, Lim JY, Nilar S, Keller TH, Shi PY. Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel. *J Virol.* 2010; **84**:5678-86.
- Klumpp K, Lévêque V, Le Pogam S, Ma H, Jiang WR, Kang H, Granycome C, Singer M, Laxton C, Hang JQ, Sarma K, Smith DB, Heindl D, Hobbs CJ, Merrett JH, Symons J, Cammack N, Martin JA, Devos R, Nájera I. The novel nucleoside analog R1479 (4'-azidocytidine) is a potent inhibitor of NS5B-dependent RNA synthesis and hepatitis C virus replication in cell culture. *J Biol Chem.* 2006; **281**:3793-9.
- Nguyen NM, Tran CN, Phung LK, Duong KT, Huynh Hle A, Farrar J, Nguyen QT, Tran HT, Nguyen CV, Merson L, Hoang LT, Hibberd ML, Aw PP, Wilm A, Nagarajan N, Nguyen DT, Pham MP, Nguyen TT, Javanbakht H, Klumpp K, Hammond J, Petric R, Wolbers M, Nguyen CT, Simmons CP. A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *J Infect Dis.* 2013; **207**:1442-50.
- Rothan HA, Han HC, Ramasamy TS, Othman S, Rahman NA, Yusof R. Inhibition of dengue NS2B-NS3 protease and viral replication in Vero cells by recombinant retrocyclin-1. *BMC Infect Dis.* 2012; **12**:314.
- Yang CC, Hu HS, Wu RH, Wu SH, Lee SJ, Jiaang WT, Chern JH, Huang ZS, Wu HN, Chang CM, Yueh A. A novel dengue virus inhibitor, BP13944, discovered by high-throughput screening with dengue virus replicon cells selects for resistance in the viral NS2B/NS3 protease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; **58**:110-9.
- Steuer C, Gege C, Fischl W, Heinonen KH, Bartenschlager R, Klein CD. Synthesis and biological evaluation of alpha-ketoamides as inhibitors of the dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorg Med Chem.* 2011; **19**:4067-74.
- Deng J, Li N, Liu H, Zuo Z, Liew OW, Xu W, Chen G, Tong X, Tang W, Zhu J, Zuo J, Jiang H, Yang CG, Li J, Zhu W. Discovery of novel small molecule inhibitors of dengue viral NS2B-NS3 protease using virtual screening and scaffold hopping. *J Med Chem.* 2012; **55**:6278-93.
- Prusis P, Junaid M, Petrovska R, Yahorava S, Yahorau A, Katzenmeier G, Lapins M, Wikberg JE. Design and evaluation of substrate-based octapeptide and non substrate-based tetrapeptide inhibitors of dengue virus NS2B-NS3 proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; **434**:767-72.
- van Cleef KW, Overheul GJ, Thomassen MC, Kaptein SJ, Davidson AD, Jacobs M, Neyts J, van Kuppeveld FJ, van Rij RP. Identification of a new dengue virus inhibitor that targets the viral NS4B protein and restricts genomic RNA replication. *Antiviral Res.* 2013; **99**:165-71.
- Byrd CM, Dai D, Grosenbach DW, Berhanu A, Jones KF, Cardwell KB, Schneider C, Wineinger KA, Page JM, Harver C, Stavale E, Tyavanagimatt S, Stone MA, Bartenschlager R, Scaturro P, Hruby DE, Jordan R. A novel inhibitor of dengue virus

- replication that targets the capsid protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; **57**:15-25.
18. Alhoot MA, Rathinam AK, Wang SM, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. *Int J Med Sci.* 2013; **10**:719-29.
19. Subramanya S, Kim SS, Abraham S, Yao J, Kumar M, Kumar P, Haridas V, Lee SK, Shultz LD, Greiner D, N M, Shankar P. Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress dengue virus infection and associated proinflammatory cytokine production. *J Virol.* 2010; **84**:2490-501.
20. Goulet ML, Oagnier D, Xu Z, Paz S, Belgnaoui SM, Lafferty EI, Janelle V, Arguello M, Paquet M, Ghneim K, Richards S, Smith A, Wilkinson P, Cameron M, Kalinke U, Qureshi S, Lamarre A, Haddad EK, Sekaly RP, Peri S, Balachandran S, Lin R, Hiscott J. Systems analysis of a RIG-I agonist inducing broad spectrum inhibition of virus infectivity. *PLoS Pathog.* 2013; **9**:e1003298.
21. Diwaker D, Mishra KP, Ganju L, Singh SB. Rhodiola inhibits dengue virus multiplication by inducing innate immune response genes RIG-I, MDA5 and ISG in human monocytes. *Arch Virol.* 2014; **159**:1975-86.
22. Zhang P, Wu S, Li L, Liang Z, Li Y, Feng L, Huang X. Adjuvant PIKA protects hepatoma cells from dengue virus infection by promoting a TBK-1-dependent innate immune response. *Arch Virol.* 2013; **158**:829-38.
23. Simanjuntak Y, Liang JJ, Lee YL, Lin YL. Repurposing of prochlorperazine for use against dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2015; **211**:394-404.
24. Perry ST, Prestwood TR, Lada SM, Benedict CA, Shresta S. Cardif-mediated signaling controls the initial innate response to dengue virus in vivo. *J Virol.* 2009; **83**:8276-81.
25. Yu CY, Liang JJ, Li JK, Lee YL, Chang BL, Su CI, Huang WJ, Lai MM, Lin YL. Dengue virus impairs mitochondrial fusion by cleaving mitofusins. *PLoS Pathog.* 2015; **11**:e1005350.

## 第二節

# 登革疫苗發展 現況

朱雅婷 萬書彤 林以行

接種疫苗被認為是對抗疾病威脅且具經濟效益的有效方法，近幾年許多登革疫苗的研發正快速進展中，除了有進入臨床試驗者，亦有在部分國家上市者，但仍有安全性及有效性的考量。如何發展出安全又有效的登革疫苗仍是挑戰。

## 前言

登革病毒是一種具有四種血清型並會透過病媒蚊傳播至人類的病毒，主要盛行在熱帶和亞熱帶地區。隨著交通工具的便利以及人口越來越密集，登革病毒傳播的速度也越來越快，已成為全球很重要的公衛議題。由於登革病毒致病機制相當複雜，並且沒有適當的動物模式，使得疫苗及抗病毒藥物發展相當的困難。然而，接種疫苗被認為是對抗疾病威脅且具經濟效益的有效方法之一，因此仍有許多科學家致力於登革疫苗的研發。目前已有一些疫苗候選者被開發並進行臨床試驗或臨床前動物試驗，活病毒疫苗目前雖已發展至臨床階段但仍有許多問題存在，例如：四種血清型不相等的免疫原性，以及在四價製劑中不同血清型病毒之間互相干擾。基於安全的疑慮，除了減毒疫苗外，非病毒疫苗也開始被提出。目前開發中的疫苗包含：活性減毒疫苗 (live attenuated virus vaccines)、活性嵌合病毒疫苗 (live chimeric virus vaccines)、去活化疫苗 (inactivated virus vaccines)、活性重組疫苗 (live recombinant vaccines)、去氧核糖核酸疫苗 (DNA vaccines)、以及次單位疫苗 (subunit vaccines)<sup>1</sup>。(表一)

### 一、活性減毒疫苗

活性減毒疫苗保有可引發後天性免疫反應對抗結構與非結構蛋白的能力，但要有效避免活性減弱病毒可能再複製而致病的風險。在臨床前研究中，早期是將從系列繼代 Primary Dog Kidney (PDK) 細胞篩出的登革減毒株，注射於恒河猴體內測試其病毒血症及免疫反應。泰

國 Mahidol 大學研究者及美國 Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) 研究團隊藉由細胞培養開發各型減毒登革疫苗。所生產的四價登革疫苗製劑被使用在泰國成人與小孩身上進行第一、二階段臨床試驗。試驗結果顯示並非所有受試者的血清反應皆可轉化到四種血清型，因此，終止更進一步的臨床試驗。美國 WRAIR 研究團隊繼而與 GlaxoSmithKline (GSK) 合作生產的四價登革疫苗 (TDEN) 在第二期臨床試驗研究中，似乎是安全並且具有免疫原性，然而，保護效果還需要更進一步評估<sup>2-4</sup>。

更先進的方式是針對病毒基因進行定向位點突變，進而造成病毒毒性弱化。美國衛生研究院利用此技術開發四價活性減毒疫苗 (live attenuated tetravalent vaccine, LATV)，他們將四種血清型登革病毒的基因 3 端非轉譯區 (3'-untranslated region) 剔除 30 個核苷酸而造成毒性弱化，命名為 LATV  $\Delta$ 30，混合置備成四種候選疫苗 TV001 至 TV004，第一階段臨床試驗結果顯示給予一劑疫苗後，在所有血清型中血清陽性率可達 90%，然而有皮疹 (rash) 等副作用<sup>5</sup>。由於 TV003 對四種血清型登革病毒產生較一致的血清陽性反應，他們將 TV003 繼續進行第二階段評估。但是現階段只有 21 位完成 TV003 的測試，而且是在非登革疫區進行，真正的效果如何，仍需要等待在登革疫區進行測試<sup>6</sup>，最近又發展出 TV005 與 TV003 做比較。

### 二、活性嵌合病毒疫苗

賽諾菲 (Sanofi) 公司所研發的登革熱疫苗 (CYD-TDV) 是使用已

獲許可的黃熱病毒 17D (YFV-17D) 疫苗為骨幹，各自表達四種血清型登革病毒的結構性蛋白質（前驅膜蛋白及套膜蛋白，prM/E），已經完成大規模第三期臨床試驗。試驗結果顯示，該疫苗針對四種血清型登革熱之整體有效性在 30.2~60.8% 之間，且對第二型保護力不佳<sup>3,7-11</sup>。這是目前進展最快的登革疫苗，並以商品名 Dengvaxia® 分別在 2015 年 12 月及 2016 年初於墨西哥、巴西、薩爾瓦多及菲律賓取得上市許可。然而基於它的毒性副作用的考量，目前只許可使用在 9-45 歲的年齡層<sup>6</sup>。

武田製藥 (Takeda Pharmaceuticals) 研發的四型嵌合登革疫苗 (TDV 或稱 DENVax) 是將 DENV-1, -3, -4 的 prM/E 基因逐一取代活性減毒 DENV-2 的 prM/E 基因，在第一期臨床試驗顯示安全性，但免疫力仍是偏向於對 DENV-2 有較好的抗體反應<sup>12</sup>。目前已進到第二期臨床試驗。

### 三、去活化疫苗

去活化疫苗相較於活病毒疫苗具備兩項優點：不會恢復病毒毒性所以較安全，以及對於四價疫苗較容易引發平均的免疫反應。然而，此類疫苗仍存在於一些問題，包含缺乏針對非結構蛋白的免疫性，以及需要佐劑來增加免疫原性。已有研究指出去活化第二型登革疫苗在老鼠及猴子試驗中顯示具有免疫原性和保護效果，與佐劑混合使用能夠引發更高的中和性抗體來對抗病毒毒性<sup>13,14</sup>。

### 四、活性重組、DNA 和次單位疫苗

由於分子生物技術的發展，使得活性重組、DNA 以及次單位疫苗也運用在登革疫苗的研究。

美國海軍醫學研究中心 (U.S. Navy Medical Research Center) 先前進行 DENV-1 單一型 DNA 登革疫苗第一期試驗，所得到的中和性抗體反應成效不佳<sup>15</sup>。因此測試四價 DNA 疫苗並且採用 Vaxfectin® 佐劑<sup>16</sup>，效果仍須評估。

一般來說，以登革病毒的套膜蛋白 (envelope proteins, E) 為最常被用來當作的免疫原。某些活性病毒載體，例如：腺病毒 (adenovirus)、甲病毒 (alphavirus)、牛痘病毒 (vaccinia virus) 可直接進入宿主的載體，用於表現登革病毒的套膜蛋白，將進一步評估做為疫苗的可能性。除此之外，從酵母菌以及昆蟲細胞所表現的重組套膜蛋白也已經被用在動物體內測試其免疫原性及保護效果<sup>17,18</sup>。

登革病毒套膜蛋白的第三區塊 (envelope protein domain III, EDIII) 為受體結合位，並可引起中和性抗體的產生<sup>19</sup>。為了發展四價次單位疫苗，國家衛生研究院疫苗中心研究團隊已製備四種血清型之 E 蛋白第三區塊同源胜肽序列 (consensus peptide sequence) 的蛋白 (cEDIII)。他們的研究顯示，cEDIII 在小鼠模式中可以有效引起對抗四種血清型登革病毒的中和性抗體產生<sup>20</sup>，在非人的靈長類動物模式中則是有針對第二型登革病毒的中和性抗體產生<sup>21</sup>。另外研究指出重組 EDIII 蛋白接上一個脂蛋白 (lipoprotein) 訊號分子 (recombinant lipo-EDIII) 比單純的 EDIII 蛋白混合鋁鹽佐劑更能夠有效引發中和性抗體的產生<sup>22</sup>。研究也證實混合此四價疫苗和鋁鹽佐劑所產生的登革疫苗 (lipo-cEDIII) 能夠中

和四種血清型的登革病毒並引起記憶性免疫反應<sup>23</sup>。然而最近研究指出 EDIII 的專一性抗體在病人血清中無法持續大量表現，在細胞實驗中也只能部分中和病毒<sup>24,25</sup>，因此，以 EDIII 為基礎的疫苗仍需要更進一步的研究與評估。

由於登革病毒非結構性蛋白一 (nonstructural protein 1, NS1) 不是登革病毒顆粒的結構成分，因此不會引發抗體依賴性增強作用 (Antibody-dependent enhancement, ADE)。ADE 是指第一次感染所產生的抗體在第二次感染不同型登革病毒時，因無法有效中和病毒，反而透過此抗體使登革病毒大量感染宿主。抗登革病毒 NS1 抗體因為可活化補體去將受登革病毒感染的細胞裂解而具有保護效果<sup>26,27</sup>。許多研究指出被動免疫小鼠抗登革病毒 NS1 抗體或給予對抗登革病毒 NS1 的 DNA 疫苗、利用重組牛痘病毒所表現的登革病毒 NS1 以及主動免疫小鼠登革病毒 NS1 皆可以有效對抗登革病毒的感染<sup>1</sup>。然而，在體內及體外實驗發現抗登革病毒 NS1 抗體會交叉反應到宿主蛋白而有致病的副作用<sup>28</sup>。因此，以登革病毒 NS1 為基礎的疫苗需要去除或修飾會與宿主交叉反應的部分才能符合疫苗的安全性。在我們的研究中，發現與宿主蛋白序列相似的部位在登革病毒 NS1 蛋白的 C 端，因此我們將 C 端進行修飾並測試其免疫原性、致病性和保護效果。研究結果顯示 C 端修飾後的登革病毒 NS1 仍具有跟全長登革病毒 NS1 相似的免疫原性，但並不會引發與宿主蛋白交叉反應的致病副作用<sup>29</sup>。更進一步，被動免疫小鼠抗 C 端修飾後的登革病毒 NS1 抗體也能對抗登革病毒的感染，有效提供保護力<sup>30</sup>。另一方面我們也正致力於研發以奈米複合物為佐劑，包裹著 C 端修飾後的登革病毒 NS1 來當作新型疫苗，初步研究

結果也顯示給予小鼠以奈米複合物包裹 C 端修飾後登革病毒 NS1，比起一般的用於人類佐劑鋁鹽而言，所引發的抗體反應不但較高而且更為持久，因此具有長時間的保護效果。以修飾後登革病毒 NS1 為基礎或再搭配 EDIII，並且以奈米複合物為佐劑增強免疫效果，這樣的疫苗雖仍需進一步的研究與評估，但可提供登革疫苗另一具前瞻性的發展路徑。

表一、登革候選疫苗種類

疫苗類型	疫苗候選者	策略	發展階段
活性減毒疫苗	TV003/TV005	將四種血清型登革病毒的3端基因剔除30個核苷酸，並混合製成四價疫苗	第二期臨床試驗
活性嵌合疫苗	Dengvaxia (CYD-TDV)	以黃熱病毒17D病毒株為骨幹，再分別嵌合四種血清型登革病毒的prM及E蛋白	第三期臨床試驗，並於部分國家上市(墨西哥、巴西、菲律賓、薩爾瓦多)
活性嵌合疫苗	TDV (或稱DENVax)	以DENV-1, -3, -4的prM/E基因逐一取代活性減毒DENV-2的prM/E基因	第二期臨床試驗
次單位疫苗	1. DEN-80E 2. lipo-EDIII 3. modified NS1	1. 以套膜蛋白(E protein)為主 2. 重組套膜蛋白第三區塊再接上一個脂蛋白訊號分子 3. 以非結構性蛋白1 (non-structural protein 1, NS1)為主，再將NS1與宿主蛋白相似的序列進行修飾	動物試驗

## 參考文獻

1. Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS. Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci.* 2013; **20**:37.
2. Thomas SJ, Rothman AL. Trials and tribulations on the path to developing a dengue vaccine. *Vaccine* 2015;**33**:D24-31.
3. Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2015;**15**:745-59.
4. Watanaveeradej V, et al. Safety and immunogenicity of a rederived, live-attenuated dengue virus vaccine in healthy adults living in Thailand: a randomized trial. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;**91**:119-28.
5. Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC, Tibery C, Sabundayo BP, Shaffer D, Talaat KR, Hynes NA, Wanionek K, Carmolli MP, Luke CJ, Murphy BR, Subbarao K, Whitehead SS. A single dose of any of four different live attenuated tetravalent dengue vaccines is safe and immunogenic in flavivirus-naive adults: a randomized, double-blind clinical trial. *J Infect Dis.* 2013; **207**:957-65.
6. Kirkpatrick BD, Whitehead SS, Pierce KK, Tibery CM, Grier PL, Hynes NA, Larsson CJ, Sabundayo BP, Talaat KR, Janiak A, Carmolli MP, Luke CJ, Diehl SA, Durbin AP. The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model. *Sci Trans Med.* 2016;**8**:330ra36
7. Guy B, Lang J, Saville M, Jackson N. Vaccination against dengue: challenges and current developments. *Annu Rev Med.* 2016; **67**:387-404.
8. Sabchareon A, et al. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2012;**380**:1559-67.
9. Capeding MR, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014;**384**:1358-65.
10. Villar L, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med.* 2015;**372**:113-23.
11. Hadinegoro SR, et al. Efficacy and long-term safety of a dengue vaccine in regions of endemic disease. *N Engl J Med.* 2015;**373**:1195-206.
12. Osorio JE, et al. Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus-naive healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect Dis.* 2014;**14**:830-8.
13. Putnak R, Barvir DA, Burrous JM, Dubois DR, D'Andrea VM, Hoke CH, Sadoff JC, Eckels KH. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J Infect Dis.* 1996; **174**:1176-84.
14. Robert Putnak J, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Houg HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garçon N, Gheysen D, Kanesa-Thasan N, McDonell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine.* 2005; **23**:4442-52.
15. Beckett CG, et al. Evaluation of a prototype dengue-1 DNA vaccine in a Phase 1 clinical trial. *Vaccine.* 2011;**29**:960-8.
16. Raviprakash K, et al. A dengue DNA vaccine formulated with Vaxfectin® is well tolerated, and elicits strong neutralizing antibody responses to all four dengue serotypes in New Zealand white rabbits. *Hum Vaccines Immunother.* 2012;**8**:1764-8.
17. Clements DE, Collier BA, Lieberman MM, Ogata S, Wang G, Harada KE, Putnak JR, Ivy JM, McDonell M, Bignami GS, Peters ID, Leung J, Weeks-Levy C, Nakano ET, Humphreys T. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine.* 2010; **28**:2705-15.
18. Collier BA, et al. The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine.* 2011;**29**:7267-75.
19. Murphy BR, Whitehead SS. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol.* 2011; **29**:587-619.
20. Leng CH, Liu SJ, Tsai JP, Li YS, Chen MY, Liu HH, Lien SP, Yueh A, Hsiao KN, Lai LW, Liu FC, Chong P, Chen HW. A novel dengue vaccine candidate that induces crossneutralizing antibodies and memory immunity. *Microbes Infect.* 2009; **11**:288-95.
21. Chen HW, Liu SJ, Li YS, Liu HH, Tsai JP, Chiang CY, Chen MY, Hwang CS, Huang CC, Hu HM, Chung HH, Wu SH, Chong P, Leng CH, Pan CH. A consensus

- envelope protein domain III can induce neutralizing antibody responses against serotype 2 of dengue virus in non-human primates. *Arch Virol.* 2013; **158**:1523-31.
22. Chen HW, Liu SJ, Liu HH, Kwok Y, Lin CL, Lin LH, Chen MY, Tsai JP, Chang LS, Chiu FF, Lai LW, Lian WC, Yang CY, Hsieh SY, Chong P, Leng CH. A novel technology for the production of a heterologous lipoprotein immunogen in high yield has implications for the field of vaccine design. *Vaccine.* 2009; **27**:1400-9.
23. Chiang CY, Liu SJ, Tsai JP, Li YS, Chen MY, Liu HH, Chong P, Leng CH, Chen HW. A novel single-dose dengue subunit vaccine induces memory immune responses. *PLoS One.* 2011; **6**:e23319.
24. Midgley CM, Bajwa-Joseph M, Vasanaathana S, Limpitikul W, Wills B, Flanagan A, Waiyaiya E, Tran HB, Cowper AE, Chotiyarnwong P, Grimes JM, Yoksan S, Malasit P, Simmons CP, Mongkolsapaya J, Screaton GR. An in-depth analysis of original antigenic sin in dengue virus infection. *J Virol.* 2011; **85**:410-21.
25. Williams KL, Wahala WM, Orozco S, de Silva AM, Harris E. Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. *Virology.* 2012; **429**:12-20.
26. Schlesinger JJ, Brandriss MW, Walsh EE. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. *J Gen Virol.* 1987; **68**:853-7.
27. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms *Nat Rev Immunol.* 2011; **11**:532-43.
28. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, Lin YS. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *J Formos Med Assoc.* 2013; **112**:3-11.
29. Chen MC, Lin CF, Lei HY, Lin SC, Liu HS, Yeh TM, Anderson R, Lin YS. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol.* 2009; **183**:1797-803.
30. Wan SW, Lu YT, Huang CH, Lin CF, Anderson R, Liu HS, Yeh TM, Yen YT, Wu-Hsieh BA, Lin YS. Protection against dengue virus infection in mice by administration of antibodies against modified nonstructural protein 1. *PLoS One.* 2014; **9**:e92495.

## 第七章

# 實驗室之外，科技知識的 建立與溝通——登革熱不 熱，有什麼關係？

楊倍昌 何宗憲

## 一、前言

科學知識是現代社會控制疫病的基礎。台灣教育普及，在國際學生能力評量計畫主辦的全球性 65 個國家及經濟體中學生能力評量（包括國中、五專及高中職）的成績一向不差<sup>1</sup>。2009 年的成績排名在閱讀方面是第 23 名、數學第 5 名、科學第 12 名。2012 年的檢測結果排名在閱讀方面是第 8 名、數學第 4 名、科學第 13 名；算是中上的資質。在【科學素養】方面，2009 年台灣學生平均分數，與德國並列第 12 名；2012 年科學素養第 13 名，退步 1 名，仍舊高於經濟合作暨發展組織<sup>2</sup>會員國平均。以每萬人所產出的科學專業文章的平均數量來算，台灣的績效也不遜色，約略與法國、德國、義大利、日本等績優國家相近<sup>3</sup>。雖然在知識的本質上，這些國家的成就是否相當還可以再討論<sup>4</sup>，至少就科學認知及呈現方式來說，基礎算優良。

在這個基礎上，我們對於流行疫病的控制是否讓人滿意？科學家最新的研發成果，是否有效的讓台灣社會大眾瞭解，進而成為解決問題的推力？

2015 年秋天，拜登革熱疫情之賜，「你家噴藥了嗎？」，成了台南人打招呼的常用語。起初，這年暖冬，讓南台灣疫情延燒不退。之後，也是因為這個冬天有史以來的超級寒流襲台，不僅讓追雪行動攻佔了所有的媒體版面，農漁業損失慘重。除了滯銷的冬衣突然大發利市之外，最高興的應該是南台灣負責登革熱防疫的衛生官員。攝氏五、六度的寒冷天氣讓病媒蚊消失無蹤，有效的斬斷疾病傳播途徑，總算讓這次登革熱的疫情退燒落幕。

回顧這個熱騰騰、記憶猶新的案例，它如何反應出我們的科學基底？在防疫上可加強的項目是什麼？

## 二、科技溝通的虛與實

### A. 急診室裡的<sup>5</sup>

#### 案例一

急診室裡來了個騎車摔傷的阿伯。收案登錄紀錄：清醒、體溫正常、破皮撕裂傷。醫生問診、處理時，阿伯說：「前幾天就覺得全身酸痛、很疲倦、還有眼窩痛喔。啊，會不會是那個人家說的登革熱？要不要就辦住院齣？聽人說，有那個登革熱檢驗，來給它驗一下！」

A 醫生：「阿伯啊，你有發燒，應該不是登革熱啦。」

阿伯說：「啊，那有怎麼辦？那有你負責喔？」

A 醫生：「啊??」

主治醫師接手：「阿伯，安捏甘賀，登革熱快篩自費 300 元，如果是陽性反應，免收錢，可以接受嗎？」

……快篩結果出來：還果真的是陽性反應。

阿伯說：「你看齣。啊，我這個摔車跌倒是不是跟登革熱有關係？」

**案例關鍵議題：無病徵，疾病的診斷責任**

#### 案例二

急診室裡來了病人，自述：酸痛、很疲倦。「我得了登革熱了！來驗一下！」

……快篩結果：陰性反應。

病人：「你們的檢驗不準啦。聽人說有那個比較準的登革 PCR，

別家都有喔，你們有沒有？再驗一下吧！」

**案例關鍵議題：期待落差與專業不信任**

### 案例三

家屬：「病人剛剛發燒，一小時了。」

B 醫生：「看症狀，可能是感冒。」

家屬：「可是他昨天有被蚊子叮到啊！」、「我有在網路上看到報導，你們怎麼都沒做？」

**案例關鍵議題：知識的來源與正確性**

### 案例四

國中一年級的學生，篩檢結果 NS1 陽性，有登革熱典型的臨床症狀，已經通報，並約好回門診時間。

隔天，媽媽又帶小朋友回急診。因為被拒絕，不能到學校上課。希望醫師能開立證明，登革熱不會傳染，可以去上學。媽媽跟小朋友，說著，說著竟然就都哭了。

C 醫生：「是可以開證明啦，登革熱不會由人來傳染。生病，精神不好其實上課效果也不佳，趁機休假一下也不錯啦。只是，你同學會被你嚇到喔。你要不要考慮一下呢？現在他們都會怕你，你要趁機嚇他們一下啊？」

小朋友，噗哧，笑了出來。

**案例關鍵議題：不確定性產生的群體壓迫**

## B. 媒體上的

**案例一、專家憂，染登革熱，未發病估 9 萬人。**

疫情延燒登革熱疫情壓不住，……衛福部疾管署昨公布最新統計，全台單日新增四百二十六例本土登革熱，累計已破九千例大關；疫情最嚴峻的台南日增三百六十二例，累計八千零二十二例，高雄九百三十六例，最快今成為入夏以來第二個破千例的縣市，本島僅剩台東未淪陷。尚有三十四名登革熱患者住加護病房，累計十八例死因與登革熱相關，另二十六例死因待審。中華民國防疫學會理事長王任賢昨說，國外研究證實感染登革熱後未發病者，約是發病者的九到十倍，合理推測目前全台約九萬例隱性病例，他呼籲疫情失控的台南應全面清除孳生源，不該只針對熱區清孳，行政院日前預估今年登革熱病例將破三萬例，他警告：「若未全面清孳，五萬例都有可能。」蘋果日報 2015 年 09 月 14 日。

頭條要聞：【蔡明樺、劉嘉韻、劉榮輝／連線報導】

**案例關鍵印象：只有警告、威嚇內容的目的是什麼？為什麼需要強調引用“國外”研究資料？**

**案例二、台南里長自救，募鹽、自製防蚊包。**

仁德區成功里長鄭晴而用里民捐贈的粗鹽及噴蚊劑，13 日由國軍協助在里內水溝全面撒鹽；東區崇誨里長趙洪芝也自製防蚊藥包分送里民。「抱怨沒資源，不如自己想辦法。」鄭晴而說，「市長賴清德說我們坐在同一艘船，但我感覺自己是抱著浮木在海上

漂。」東區崇誨里長趙洪芝也說，今年的登革熱非常嚴重，該里也有確診病例，里民人人自危，但未獲得資源與協助，只好靠自己。台南副市長顏純左自掏腰包印製 3 萬張登革熱衛教卡，昨天在中西區長陳勝楠等人陪同下巡視防疫狀況。他在小康市場發衛教卡時，卻遭一名陳姓魚販嗆聲。這位魚販聽到顏純左提醒穿長袖防蚊，當場怒罵「發張卡，蚊子就不會叮人嗎？穿長袖衣褲，叫我怎麼工作？攤商有這麼好騙嗎？」隨即將卡片撕碎丟地上。

中國時報 2015 年 09 月 14 日。【曹婷婷／台南報導】

**案例關鍵印象：水溝全面撒鹽是什麼“資訊”？報導無理嗆聲，維護了那一種知的權益？**

**案例三、號召全國宮廟，同步鳴炮響應。**

全台登革熱病例突破一萬五千例，全民防疫之際，中華道教聯合總會將於廿六日起一連三天，在疫情最嚴峻的台南市舉辦「奉玉旨台灣天狗熱禳瘟消災代天巡狩祈安遶境」活動，有卅家宮廟共襄盛舉，並號召全國各宮廟於廿六日上午八時八分，一同在各自的廟埕鳴炮響應，以炮化煞，藉由宗教信仰的力量，陪伴台灣民眾共同對抗登革熱。……三天遶境期間，南鯤鯓代天府也將提供一百台斤平安鹽，隨著隊伍至各區定點宮廟供民眾免費索取，除瘟制煞；沿途也會有宣傳車宣導「巡、倒、清、刷」四大防疫要點。自由時報 2015 年 09 月 25 日。【劉婉君／麻豆報導】

**案例關鍵印象：誰能提供安定的力量？走頭無路的恐慌是怎麼產生的？**

### 三、疫病經驗及傳承的斷裂

台灣地處亞熱帶，曾經被視為瘴癘之地，病源、病媒多<sup>6</sup>。由日治期的黑死病、霍亂，之後的根絕瘧疾、B 型肝炎防治，到 2003 年，冠狀病毒感染併發非典型肺炎（嚴重急性呼吸道症候群，SARS）流行，算得上經驗豐富。依理而言，對抗登革熱疫情應該已遊刃有餘。很難想像到現今還需要請出神明繞境，以安定人心。

SARS 對於台灣的醫療、公衛體系有諸多衝擊及事後檢討。楊志良及林雨靜的分析報告中，有幾項實質建議<sup>7</sup>，其中：

宣導上，除提升民眾警覺外，重點應放在強調可以預防及可以痊癒，而不應強調此疾病為無藥可醫、無疫苗可用。給予民眾正面、積極的防疫觀念，才能提升民眾及社區參與防治工作。

在人類防治疾病的歷史上，不論是早期的麻瘋病，或是二十年前的愛滋病，只要疾病被污名化，便不易受到控制。SARS 病患被污名化，引發民眾驚慌、逃避、躲藏，甚至自殺，絕對無法有效控制。這是流行病防治與公共衛生的最基本原則。

我國花在預防、研究方面的費用過少，反而過份強調醫療的重要。若能在宣導、教育民眾等方面多加著力，相信對於未來的傳染病，乃至於其他疾病的防治，都能有顯著的幫忙。

就執行的層面而言，這些議題的業務都落在社會科技溝通上。它的重點是：應強化社會溝通，而且透過大眾媒體的資訊應該要避免兩件事：恐嚇民眾和疾病的污名化。

隨著現代資訊社會的發展，媒體的力量擴張到讓人矚目的境界。媒體本身的影響力，使它足以和行政、立法、司法權力單位抗衡，幾

乎自成第四權，讓人期待它應該承擔相當大的社會責任。可惜的是對於目前台灣的媒體人，專業性仍然有不如人意之處。黃俊儒寫了一本很有指標意義的書：《別輕易相信！你必須知道的科學偽新聞》。「偽」字特別用紅色印刷，標示出書本要挑戰的主軸：「(台灣?) 媒體呈現的科學不僅大有學問，也大有問題，市面上充斥的科學偽新聞，就像黑心食品一樣，必須有人為社會大眾一一揭發」<sup>8</sup>。

雖然背負著負面的印象，2011年台灣的公眾對於資訊來源的調查發現，超過80%的人依靠電視和網絡。報紙和雜誌的影響力是6.3%和3.7%。最令人驚訝的是，不到1%的人由政府相關部門獲得科學知識。對科學認知態度的全國調查結果顯示，62%的民眾相信任職於國家學術機構(學校、研究單位)的科學家，大約有16%的人相信非營利組織所提供的資料，相信記者的人只佔3%。不相信記者，卻依賴他們提供資訊；相信科學家的話，卻不積極利用他們的知識。一般人掛在口頭上的「聽人家說、有在網路上看到報導」，多半是單向接受資料，卻無法進一步分析內容的意義。也就是說，民眾依賴權威，但是很容易受到公眾媒體的價值傾向所影響<sup>9</sup>。這種傾向反應在醫病溝通上，就容易造成「你們的檢驗不準啦。聽人說有那個比較準的，再驗一下」，「我得了登革熱了，來驗一下！」，這類溢出醫學專業的要求。

SARS 疫情緊張之際，李明亮曾說：「我自從當了署長之後，就很少看報、看電視或聽廣播，華昌宅令我對台灣媒體完全地失望，連我知道明明有錯的事，都可能出現在報紙頭條，我怎麼知道其他消息是否為真？」<sup>10</sup> 可是之後，他還是靠著電視聯播「防疫最前線」的機會，與學有專精的學者一起，完整而正確的向民眾說明疫情，讓人在這場

看不見的敵人的防疫戰爭中，依然充滿希望。當時，幾乎有九成的台灣民眾看過這個節目，而且滿意度達到八成。最後他還是靠著記者會上一句「民眾可以慢慢恢復正常的生活了」<sup>11</sup>，讓驚慌的社會注入活水，突破而出。

對於之前的媒體案例，如果問「專家憂，染登革熱未發病佔9萬人、疫情延燒，登革熱疫情壓不住」會有什麼正面、積極的意義？當無法提供正確而有效的作為，專家表達憂慮要幹什麼？「台南里長自救，募鹽、自製防蚊包」，之類的消息，除了引起政治效應之外，有什麼正確的知識可言？以炮化煞、平安鹽，是宗教信仰，其中夾帶宣導「巡、倒、清、刷」科學防疫要點，成了文化大雜燴。以楊志良及林雨靜所建議媒體資訊應避免的「疾病恐嚇和污名化」這兩件事來評議這些登革熱疫情相關的報導，「不正式、恐嚇和污名化」報導的問題改善不多。至於急診室裡的對話也顯示，光有一般的科學基礎，光有運用現代資訊蒐尋科技的能力，仍不足以應付傳染病的威脅。

#### 四、科技溝通，科學研究走向社會的最後一哩路

科學研究除了知識上的趣味性之外，還有利用厚生的期待。醫療知識本身更是帶有強烈的應用取向。醫學研究的成果最終還是希望能讓社會大眾瞭解、接受、並獲得利益。在 SARS 疫情期間，科學知識透過「防疫最前線」聯播節目發揮及時的效果，見證了正規媒體溝通的效用。雖然它很有效率，不過登革熱這類的疫情不像 SARS 那麼激烈，一般不必成立類似的緊急媒體平台。而且，科技溝通也不能只限於緊

迫的時候才進行。在 SARS 之後、在登革熱之後，以老辦法進行的工作，可做的事，之前都已經完成。新的作為，應該找尋新的認知立場與執行策略。

#### A. 各自的立場與侷限

事不關己的時候，總可以設想個「理想狀態」來要求別人。我們可以直覺的要求閱聽人自己要放亮眼睛，獨立思考，不要迷糊，甘心被騙；可以責備媒體記者缺乏專業，混淆視聽；可以批評科學家躲在象牙塔裡，沒有擔起社會責任。這種提醒“現狀有問題”的工作，已經在台灣社會持續多年。如果是只要引起民眾注意，只用常識就可以避免的事情，多半也已經解決了。留下的問題，多半是需要有更深層次的思辨，才有辦法提出對策。

科學知識之生產而能影響社會，至少是科學家、傳播媒介（媒體記者）、大眾讀者等等三類人群之間的互動與溝通。不同的群體各有自己的習性，各自的強項。

對讀者來說，總是偏好在最短時間內了解事件。懶人包因之而生。只是，越簡化的資訊，就越不精確，最容易讓人誤解原意。尤其是科學知識牽涉特定專業，不是光依據常識就可以判斷對錯<sup>12</sup>。此外，以台灣公眾找尋資訊的主要網路來源為例<sup>13</sup>。利用「登革熱」這樣的關鍵字在 Google 搜尋，2016 年 2 月 5 日的結果出現約 1,250,000 筆資料，以「登革熱 台南」的關鍵字則約有 669,000 筆資料。就算是「疫情延燒不退」的關鍵字搜尋也出現 351,000 筆資料。這麼龐大的資訊，猶如一大群飛舞的麻雀，撲面而來，擾亂知覺。其中充斥著廢話、流言、

置入行銷、懶人包，一般讀者其實不易分辨其中所夾雜的假科學、偽科學。在自由、放任的狀況下，這些垃圾資訊並不會自動消失。況且，病急亂投醫，跟聽偏方的心態一樣，都只是希望得到安全感。急診室裡偏離醫學知識的對話，所反應的只是生病的不安情緒當下，不易冷靜分辨真假的現況罷了。

媒體人、記者所擅長的資訊傳播是一種結合認知心理學的專業。他們自己不可能不知道常受指責的媒體亂象。問題是，報導當下發生的事情是記者的職業要求。在迅速報導，不能開天窗的壓力下，如果沒有人協助，他們的知識背景不一定能熟悉特定的科學內容，又如何能寫得出得體的新聞呢？1988 年報紙登記管制解禁之前，各家報紙平日出版的張數只有三大張。現在一份報紙就可達二十六張全開版面，一百零四頁。在只有三台電視台的年代，能上電視報導是相當難得的機會。現在的有線電視節目有上百台，二十四小時，不間斷的播出。在時間與人力緊繃的結構性問題之下，期待有好節目來填滿這些新增的空間，恐怕不是觀眾表達失望，或是勸告媒體記者應自律，就可以解決。

至於科學家的養成教育是以研究、發現新知為主軸。科學知識包含許多細節及瑣碎的辨證。這些內容，常常讓人覺得無趣、難以理解。此外，科學家之間習以為常的批判、溝通方式也與一般的聊天不同。專家與非專家之間的爭議，不見得是以處理專家之間爭議的方式來解決；在科學社群中有效的了結 (closure) 機制，在科學社群之外不一定有效<sup>14</sup>。如何介紹這些零碎的知識，讓大眾聽得懂，並且覺得不枯燥，並不是科學家的強項。依照科學慣例而長篇大論的嘮叨，說不定還會

有反效果。一如民眾素養調查結果顯示，不到 1% 的人由政府相關部門獲得科學知識<sup>15</sup>。實際上，衛生福利部對於防治登革熱也製作了宣導影片，其拍攝也蠻精美的<sup>16</sup>。可惜的是，官網上的點閱率，並不理想。這訊息所呈現的另一層意涵是：只靠科學專業、制式的公告方式並不符合一般民眾的閱讀習慣。

在考慮讀者、媒體記者、科學家三者的特質下，顯然要有效的傳遞正確的科學觀念，並非靠各自努力就可以。

## B. 新議題與對策

就科技溝通的目標而言，在投資龐大的研發經費，建立知識之後，缺了讓民眾了解科學成果的有效作為，終究還是缺了臨門一腳。但是光憑藉著自由想像就想要發展出有效的溝通方式，提出適合在地情境的策略，並不符合科學解決問題的方法。現代科學的成功，所依靠的不是運氣，而是行動之前的相關研究、仔細分析、提供證據。與其感嘆群眾不理性、媒體報導不專業、科技溝通成效不彰，不如在進行科學研究案當下，同時嵌入一些針對「溝通」相應議題的研究，一併開發有效的方法。以投資報酬率來看，這樣的經費規劃應該也是合理、合宜的。

針對台灣社會的需求，我們認為至少要加強三個互相支援、補充的研究方向：

1. 如何將短期、密集的科技溝通，分散成為固定而持續的工作。  
一般而言，人依賴習慣的行動最為迅速。平日所累積的經驗化為常識後，才有辦法將疫病的慌亂降低。如果平時都沒聽過台

灣自己在登革熱問題上的研究成果，臨時被問，大概也只能用“國外研究證實”這麼籠統的答案來應付一下。

2. 如何建立媒體溝通的正式管道 / 發表平台，提升影響力。

醫學中心、研究機構應該想辦法將社會溝通視為常態的工作與責任，定期發表相關的研究成果，推廣科學講座，建立「正確資訊」的來源。當新疫情出現時，這些有信譽的平台才有可能快速轉成正確消息的來源，指引有效的防疫措施。科學家如果不主動提供資訊，非本行的人又如何了解最新的科技成就呢？在 2015 年登革熱疫情流行時，台南市府有一套完整的流程<sup>17</sup>。成功大學在學校官網上也成立了登革熱防疫專區<sup>18</sup>，並主動協助臨近社區，體現大學應承擔社會的責任。如何結合成功大學的研究團隊在登革熱相關致病機轉、治療、疫苗等議題上豐富的研究成果，以建立民眾信心，值得多加把勁。

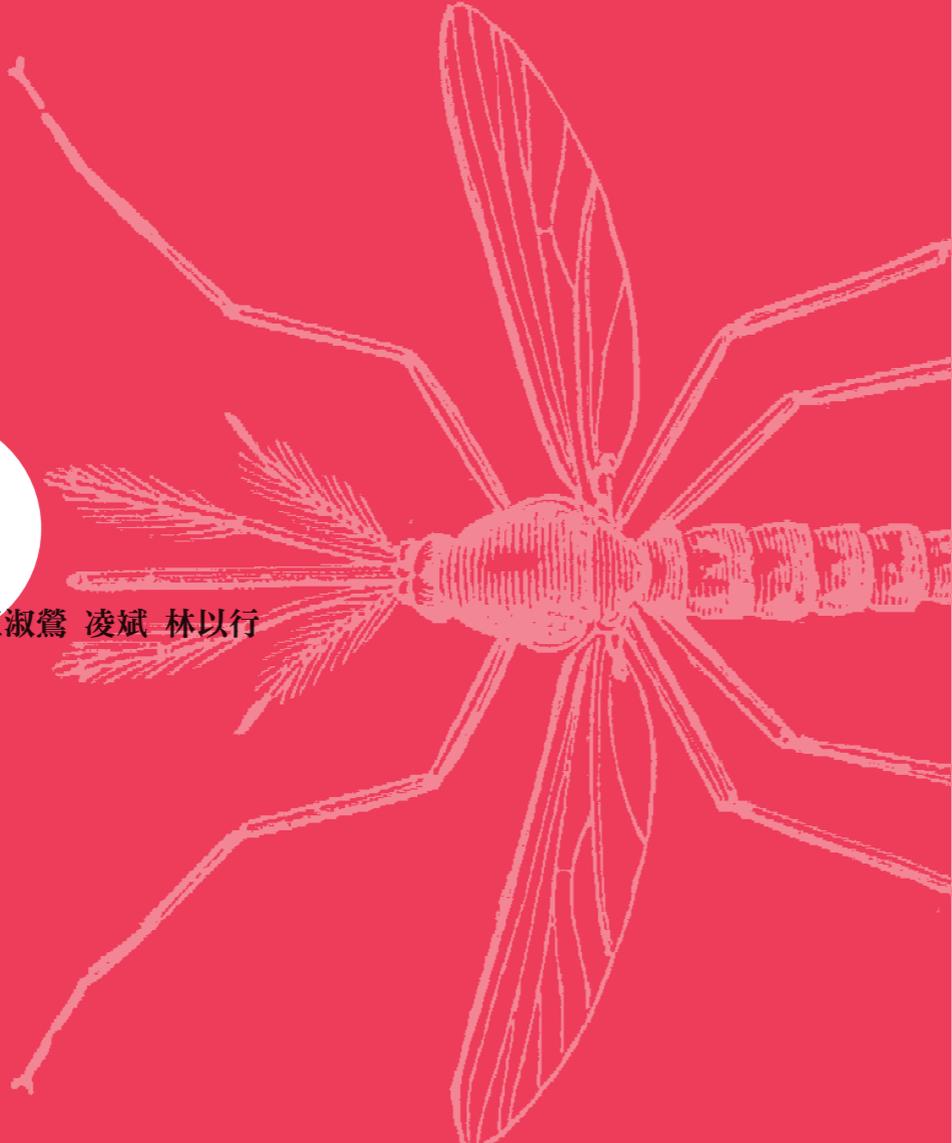
3. 如何培養科技溝通的人才及合作團隊。

將冷硬的科學知識，轉換成符合一般人可以理解的表達方式也是一門典型跨領域的學問。人很難樣樣精通，在各擁專業之下，集體思考、合作才是成功的關鍵。也許個人會有缺漏，但是透過群體的智慧，也可以創造出驚人的成就。以 Discovery, National Geography, BBC<sup>19</sup>, NHK 這類富有教育意義的知識性節目為例，它們的成功，不只是財力雄厚，其背後的製作群更是分工細緻，各有專業，而不是要求每個人都精通十八般武藝，獨立作戰。

## 參考文獻

1. 2010 年 12 月 7 日教育部中等教育司發稿。國際學生能力評量計畫 (Programme for International Student Assessment, 簡稱 PISA) 主辦的全球性學生評量結果。2012 PISA 成果，取自 <http://www.edu.tw/pages/detail.aspx?Node=1088&Page=21949&wid=ddc91d2b-ace4-4e00-9531-fc7f63364719&Index=1>。
2. 經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, 簡稱 OECD) 於 1961 年成立，目前擁有 30 個會員國，大部分為工業國家，國民總生產毛額占世界 3 分之 2 以上。2001 年台灣以「中華台北」(Chinese Taipei) 名稱成為多個委員會之觀察員。
3. 資料依據 U.S. National Science Board, “Science and Engineering Indicators 2012”。
4. 質與量之間的差別各有不同的見解。請參考黃樹仁 2007 「小國的學術困境：台灣社會科學研究、教學與評量的反省」，《台灣社會研究季刊》65:117-80。
5. 依 2015 年秋冬時期，國立成功大學附設醫院，急診室裡的發生的實際案例改寫。
6. 郁永河，裨海記遊。(郁永河，楊蘇之，遇見 300 年前的台灣：裨海紀遊。圓神出版社，2004 年)
7. 楊志良、林雨靜：SARS 防疫缺失與影響之分析報告。國政分析，國家政策研究基金會，2003/06/20。
8. 黃俊儒，序文，《別輕易相信！你必須知道的科學偽新聞》，2014，時報文化出版，頁 16。
9. Wu, K. C., Shien, P. P., Tsai, C. Y., Chao, D., Chou, C. Y., Wu, Y. Y., Liu, C. J., Chiu, H. L., Hung, J. F., & Huang, T. C.\*, 2012, An investigation of Taiwan's public attitudes toward science and technology. International Journal of Science Education, Part B, 2(1), 1-21. Lee YU et al 2012, National Sun Yat-sen University Research Center for Promoting Civic Literacy. Result of civic scientific literacy survey in Taiwan 2012 (conference report, Aug 15<sup>th</sup>, 2012).
10. 李樹人：走過 SARS。台北，2009 年，歐巴尼紀念基金會出版，頁 44。
11. 李明亮：非典型委員會 ---- 防 SARS 委員會實錄。自由時報電子新聞網 - 自由廣場，中華民國 92 年 7 月 27 日。
12. 楊倍昌，認知與相信。In:《看不見的工具：像生物學家一樣思考》。2008 年，台南，醫學、科技與社會研究中心 / 麗文文化出版。
13. 如註腳 9。

14. Sergio Sismondo，專家知識與公眾對科學的理解。In：科學與技術研究導論，林宗德翻譯，2007 年，國立編譯館 / 群學出版，頁 292。楊倍昌，2016，知識辯證的微觀動態：當代生物科學期刊如何接受一篇論文？《科技、醫療與社會》，出版編印中。
15. 如註腳 9。
16. <http://www.cdc.gov.tw/diseaserel.aspx?treeid=7E28957DA254AA0B&nowtreeid=7EBACE3C9CDC8E93&id=77BFF3D4F9CB7982>。
17. 台南市衛生局 -- 登革熱專區：[http://health.tainan.gov.tw/tnhealth/Medical/Medical.aspx?Medical\\_Index=4&Medical\\_Class=0](http://health.tainan.gov.tw/tnhealth/Medical/Medical.aspx?Medical_Index=4&Medical_Class=0)
18. 成功大學官網登革熱防疫專區 <http://web.ncku.edu.tw/files/11-1000-17008.php?Lang=zh-tw>
19. 蔡明燁，2015，台灣與國際的接軌：跨科際思維與科學傳播。In：界定跨科技，蔡明燁、王驥懋、唐功培等人編，台北，教育部。文中對於英國 BBC 如何與大學合作，有深入的描述與分析。



## 結語

張志鵬 王淑鶯 凌斌 林以行

---

登革熱已是一個全球性的嚴重傳染疾病。2014 和 2015 年在台灣南部爆發嚴重疫情。去年台南的第一個本土病例發生在五月，接著的將近一整年登革熱成為揮之不去的夢魘。科技部生科司有鑒於登革熱在台灣嚴重疫情，於是規劃將登革台灣經驗、防疫措施、研究成果、社會層面影響等編撰成一本提供多面向內容的登革相關書籍。在去年發生第一例一年之後的 2016 年五月發表，期許藉由這本書的出版，鑑往知來。

今年 (2016) 三月在台南已有第一個本土病例，比去年還提早兩個月，是一個警訊。如何在疫情爆發前提供防疫策略，預作防範和準備，是重要課題。尤其是對於登革熱可能發展為本土性疾病更需小心防範。

台灣登革疾病有其特殊性，以年長者為主，尤其是高血壓、糖尿病和腎臟病患者，以致於造成高死亡率，不同於東南亞的兒童與較年輕族群的感染。因此需剖析台灣登革熱流病特點，並提升醫療照顧效益。為了和其他國家的登革經驗做比較並且彼此學習，國際合作也相當重要。舉其中一些合作例子，如與馬來亞大學、新加坡大學、泰國曼谷 Chulalongkorn 大學、泰國曼谷 Mahidol 大學附設 Siriraj 醫院、廣州中山大學、美國 Emory 大學、加拿大 Dalhousie 大學等，在臨床和基礎研究都有密切的合作關係。朱真一教授在 2016 年成大醫訊 26 期 (三) 發表一篇內容豐富的文章「台南早期的登革熱文獻」，其中提到 1926-1931 年出血性的病例，11 病例中 9 例是 4-11 歲的小孩，6 例死亡及 2 例重症都是小孩。台灣早期的嚴重病例根據報導似乎是兒童居多，是否由於社會經濟及衛生醫療環境的變遷，時至今日成為以年長者為主，值得探討。

在編撰這本登革專書做各種回顧時，對於已逝黎煥耀教授在登革熱研究的貢獻更深感崇敬之思。黎教授是台灣登革熱研究的先驅者，帶動台灣近二十年來在登革致病機制研究的蓬勃發展。他曾於 2008 年編輯出版一本英文登革專書“Dengue Disease” (ISBN: 978-81-308-0290-9, Research Signpost)，21 章全由台灣的科學家撰寫。賴明詔院士在序言中精闢陳述：“Taiwan has been a stronghold for Dengue research. ...It is rare that there is such a concentration of Dengue researchers in a small country like Taiwan. It is even rarer that these scientists together will contribute to a book like this”。該登革病毒的專書代表台灣登革研究對此領域的貢獻。我們也於 2014 年應邀撰寫一篇 Dengue E-Book chapter，主題為“Lessons learned from dengue - Focus on Taiwan”，Chapter 3，pages 49-64，刊登於“Dengue fever: transmission, diagnosis & surveillance”，edited by Jamie Whitehorn and Jeremy Farrar, Future Medicine Ltd.，將台灣經驗介紹給全世界相關領域的臨床和研究工作者。

黎煥耀教授於 2011 年帶領研究團隊在教育部邁向頂尖大學計畫下於成功大學成立全國第一個「傳染性疾病及訊息研究中心」。該中心是由國立成功大學醫學院、生物科技學院、成大醫院、國家衛生研究院感染症與疫苗研究所、及長庚醫學院等研究聯盟結合而成。登革熱的致病機制及疫苗藥物研究是其中重點領域之一。在國內外基礎和臨床專業研究人員及醫師積極合作之下，至今在致病機轉的研究、快篩試劑和治療性抗體的研發等方面已有具體進展。

為了達到早期診斷、早期治療的目的，在科技部的經費支持下，

自行研發的快篩試劑已接近產品階段，期能提供醫界更經濟且準確的登革快速檢驗試劑，不再需要向國外購買並且可以輸出到其他國家。抗登革藥物和抗體的研發在科技部經費支持下也有進展，期許能提供嚴重登革出血熱的治療策略。登革疫苗須要對於四種血清型達到類似有效的保護效果，否則引起安全性的顧慮。目前雖有登革疫苗進入臨床試驗者，亦有在部分國家上市者，但仍有安全性及有效性的考量，因此發展安全有效的登革疫苗仍是刻不容緩的努力目標。

登革熱的防疫及相關研究須有長期穩定的政策支持，以及長期資源投入，否則難以永續經營。尤其需要積極培育新世代對於登革病毒及其病媒蚊具有熱忱的研究及防疫專業人才，從事感染症的防治，將好的政策加以落實，期許能將登革威脅降到最低。尤其最近與登革病毒同為黃病毒科屬的茲卡病毒，同樣是以埃及斑蚊和白線斑蚊做為傳播媒介，是需要慎防的新興傳染病。雖然兩種疾病的主要特徵不盡相同，一為出血、一為感染神經系統，但有類似的症狀如頭痛、發燒、關節痛和皮疹等。登革病毒的相關臨床和研究經驗，對於茲卡病毒的瞭解，可提供一定程度的幫助。

本書的出版是許多人同心協力投入的共同成果，在此致上深深感謝。

登革熱的台灣經驗：從流行病學及臨床到基礎科學的新視野：科技部台灣重要新興感染症研究計畫成果報告 / 王淑鶯等著。 -- 初版。 -- 台北市：科技部台灣重要新興感染症研究計畫辦公室出版：科技部發行，2016.05

面；公分

ISBN 978-986-04-8675-9(平裝)

1. 登革熱

412.4923

105007743

# 登革熱<sup>(的)</sup> 台灣經驗

從流行病學及臨床到基礎科學的新視野

科技部台灣重要新興感染症研究計畫成果報告

發行者 科技部

出版者 科技部台灣重要新興感染症研究計畫辦公室  
台北市和平東路二段 106 號 02-2737-7992

著者 王淑鶯、伍安怡、朱雅婷、何宗憲、何慈娟、余佳益、李英瑞、  
吳明芳、林以行、林宜玲、林秋烽、金傳春、凌斌、莊詠鈞、陳文裕、  
陳泓如、陳斯婷、陳嘉玲、陳錦生、張志鵬、舒佩芸、黃明停、黃雅蘭、  
彭貴春、葉才明、萬書彤、楊倍昌、詹大千、廖經倫、劉校生、劉清泉、  
謝世良、羅玉枝(依姓氏筆畫排序)

執行編輯 林以行  
台南市大學路 1 號 成大醫學院；電話(公)：886-6--2353535 ext5646

美術編輯 翰堂設計事業有限公司

承印 翊立印刷有限公司

出版日期 2016 年 5 月初版