

計畫編號：DOH96-DC-1402

行政院衛生署疾病管制局九十七年度科技研究發展計畫

建構我國流感病毒疫苗接種之臨床試驗研究團隊
—以民眾流感接種之抗體反應為模型

研究報告

執行機構：台北榮民總醫院

計畫主持人：李建賢

研究人員：李壽東 黃信彰 湯仁彬 詹宇鈞等

執行期間：97年1月1日至98年3月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、中文摘要	(3)
二、英文摘要	(4 - 5)
三、前言	(6 - 8)
四、材料與方法	(9 - 16)
五、結果	(17 - 25)
六、討論	(26 - 28)
七、結論與建議	(29 - 30)
八、參考文獻	(31 - 32)
九、圖、表	(33 - 38)
十、附錄	(39 - 41)

共 (41) 頁

一、中文摘要：

流行性感冒（簡稱流感）雖為古老之傳染病，但流感防治工作已成為全球性主要工作，預防流感的方法除了增強自身的免疫抵抗力，與流行季節期間避免曝觸之外，接種疫苗是其中關鍵性的一環。但由於流感病毒基因本身具有高度變異之特性，使得流感疫苗之施打需年年為之。台灣地區自民國 87 年 10 月開始，每年針對高危險群民眾，由衛生署補助施打流感疫苗，然而疫苗施打後之保護作用與疫苗施打者本身之免疫狀態須要評估。加以近年發生人禽流感病毒流行，雖然目前禽流感疫苗使用於人類仍處於研發階段，為因應國人疫苗自給自足之政策及未來禽流感疫苗施打之評估，實有必要建立一套國人基礎流感疫苗接種血清反應之資料庫及監測系統。

本計畫除了因應疾管局要求建構流感疫苗臨床研究團隊及建立我國流感病毒抗體監測分析系統，並將分析民眾一般流感疫苗接種後之血清抗體反應。

本研究計畫實施方法及步驟分為三大方向：(一)疫苗之施打及臨床狀態評估與檢體收集。(二)流感病毒之分離鑑定及疫苗施打者血清免疫反應之實驗室評估。(三)新型（禽）流感病毒之偵測監控。

依計畫至 2008 年 12 月共施打 275 名（小孩 83 人、成人 192 人）受測者，佔預估值之 91.7%，經評估並抽取施打前血清，第二次血清抽取至 2009 年 2 月止共完成小孩 66 人、成人 175 人。於 97 年 10 月 20 日獲得疾管局當季流行株抗原及抗體後，共已完成 241 例血球凝集抑制反應（HI）之測試。分析發現血清轉換因子在今年疫苗針對當季流行株，所有群組均達 SCF 2.0-2.5 之目標，H1N1 以及 H3N2 亞型之血清轉換率皆未達 30-40%之目標（Flu B 亞型則是只有幼童組未達到），而所有受試者在接受疫苗接種前之血清保護率皆偏低（<50%），但於疫苗施打後皆有抗體上升之趨勢，除幼童組 H₁ 亞型及 FluB 與老年組 H₁ 及 H₃ 亞型外，均可達歐盟之標準。

本年內並未發現新型流感病毒株，但培養結果得知類疫苗株之流感病毒之前已在社區中流行。

此計畫除了有助於了解流感疫苗對台灣地區的民眾到底產生多少的保護力，探知台灣地區本土流行株的感染情形與是否已產生抵抗力，且藉由本計畫以建構一個臨床研究團隊及疫苗血清反應之監測系統。

關鍵詞：流行性感冒病毒、疫苗、抗體、免疫反應

二、英文摘要：

Although influenza (Flu) is an old infectious disease, it will cause pandemic and requires global cooperation for control and prevention. In addition to the avoidance of exposure during the flu season and increasing the host immunity vaccination has been the most effective modality for preventing influenza epidemics. However, due to the genetic variability of the influenza it requires vaccination every year. Our Department of Health supported influenza vaccination for high risk people since October 1998, but the protection rate and the host immune responses after the vaccination had not been well evaluated. Furthermore, the epidemics of human avian influenza epidemics urge the research for avian influenza vaccine. In addition, it is our governmental policy to produce important vaccines by ourself. Therefore, it is imperative to establish a surveillance system and data base for evaluating the vaccine immune responses for our people.

This project will follow the Taiwan CDC requirements to establish a clinical research team for flu vaccine evaluation and a surveillance system and to evaluate the immune responses after seasonal influenza vaccination. The procedures and steps include: 1. collecting and evaluating the clinical data and serum samples after vaccination, 2. laboratory tests for host immune responses, and 3. monitoring the possible new emerging influenza viruses.

According to our schedule we had accomplished the vaccination for 275 people (83 children and 192 adults, 91.7% of the estimated number) and had collected their sera before vaccination. As of February 10, 2009, the second serum sampling had collected 241 paired sera. The seasonal flu antigens and

control antibodies were offered by Taiwan CDC on October 20, 2008 and we had tested 241 paired sera by hemagglutinin inhibition (HI) test. The results indicated that the seroconversion rates (SCR) toward the seasonal flu strains were rather low except among the adult and senior groups tested by the FluB type. Furthermore, the seroconversion factors (SCF) all fulfill the 2.0-2.5 targets. Nevertheless, the pre-immunized seroprotection rates (SPR) were generally lower than 50% but increased after vaccination among the tested groups. However, the post-immunized SPR in children tested for the A type H1 subtype and B type and the senior groups for the A type H₁ and H₃ subtypes did not fulfill the CPMP criteria. We did not obtain any new variant of influenza viruses in the year but found that the vaccine-like strains had circulated in our society.

We hope that this project will help to understand the host immune responses and the protection rate of the vaccination. In addition, we can establish a clinical research team for flu vaccine evaluation and a surveillance network for evaluating the immune responses.

Key words : influenza virus, vaccine, antibody, surveillance

三、前言

流行性感(流)為一種核糖核酸(RNA)病毒引起之感染症，其流行可遠溯自希臘羅馬時代，十六世紀已有類似流(感)流行的確實描述，自 1580 年至 20 世紀初，共三十多起大流行，包括 20 世紀期間，總共有 1918 年、1957 年、1968 年以及 1977 年的大流行，其中尤以 1918 年所謂“Spanish flu”的全球流行，造成至少 2 千萬人以上的死亡最為慘重，且死亡年齡層以二十至四十歲青壯年為主，更是對社會及經濟造成巨大衝擊 [1,2]。

歐美先進國家自 1940 年代流(感)疫苗上市以來，即鼓勵如老人及心肺疾病患者等高危險群每年定期接種。由於免疫力較差者如老年人或慢性病患者等，如果罹患流(感)，比較容易發生肺炎、急性支氣管炎、腦炎、中耳炎、肌炎、抽搐及憂鬱症等併發症，並增加住院率及致死率 [3,4]。根據美國疾病管制中心的建議 [5-7]，易產生流(感)併發症的高危險群，如 65 歲以上的老人、6 個月至 2 歲的幼兒、慢性呼吸道疾病、慢性心臟病、慢性腎臟疾病、免疫能力缺陷、其他代謝疾病、居住於安養機構的老人與健康照護提供者等，應該每年接受流(感)疫苗的接種。

在台灣地區，基於維護老人健康，避免老年人因罹患流(感)導致嚴重併發症或死亡，衛生署特於民國 87 年首度試辦「65 歲以上高危險群老人流(感)疫苗接種先驅計畫」，針對該計畫之後續評估結果，亦顯示流(感)疫苗確為安全、有效之疫苗，對於我國住在安養機構、養護機構、長期照護機構及榮民之家之老人，確可減少 54% 因肺炎或其他心肺疾病住院之機率，對於過去 1 年曾經住院者而言，更可減少 75% 因肺炎或心肺疾病住院之機率。有鑑於此，乃繼續推展本計畫，逐年擴大實施對象，並自 90 年起，開放所有 65 歲以上老人免費接種。而於 92 年度，為因應流(感)對 SARS 疫情之可能衝擊，亦將醫療機構之醫護等工作人員納入接種對象，另為因應亞洲地區爆發之禽流(感)疫情，乃針對禽畜養殖、屠宰、販賣、運送、化製等相關人員提供免費接種服務，期能預防病毒基因重組可能引發新型病毒之危機。93 年度，經考量 SARS 與禽流(感)之可能發生或流行季節與國內人類流(感)流行季節相當，其初期感染症狀相近，而醫療機構之醫護等工作人員，除第一線接觸病人外，同時肩負照顧病人之重責，為預防其遭受感染或造成傳染，也為避免發燒等症狀引起臨床診斷之混淆，仍比照 92 年度，將醫療機構之醫護等工作人員及衛生等單位之防疫相關人員，列入計畫優先施打對象；另亦考量 2 歲以下年齡小之嬰幼兒感染流(感)住院之比例不亞於 65 歲以上老人及其他流(感)高危險群，93 年度起，計畫對象增加 6 個月以上 2 歲以下之幼兒；另為避免人類、禽類流行性感(流)病毒之感染，造成基因重組，產生新型毒力增強且可人傳人之病毒，進而引發大流行，導致嚴重症狀或合併症及死亡，故亦將養禽(雞、鴨、鵝)業、養豬業、禽畜屠宰、禽畜運輸、禽畜活體屠宰兼販賣等

業之工作人員及中央、地方實際參與動物防疫人員列入接種對象，期能達到事先預防扼阻流感之傳播及引發流行。

自 1948 年起，世界衛生組織 (world health organization, WHO) 建立了一套全球監測系統，共涵蓋了八十多國，一百多個流感監測中心，及位於美國、英國、澳洲及日本的研究中心實驗室，於每年二月及九月將各種研究結果加以回顧，作為世界衛生組織及疫苗公司對來年選擇疫苗株的參考。自 1977 年 WHO 建議流感疫苗應包括兩種 A 型(H3N2 及 H1N1)及一種 B 型流感疫苗株，並且每年略作修正，北半球使用的疫苗株於二月選定，而南半球國家疫苗株，則於九月選定。有關使用疫苗的時機與應注意事項，由於流行性感冒好發於冬季，且疫苗保護期一般四到六個月，因此北半球國家最好接種時機為十月到十一月中旬，以使疫苗於數週內發生效益，而疫苗的有效率依人口數之不同，約在 30~80%之間。一般接種流感疫苗常見幾種副作用，如：注射部位疼痛，紅腫，肌肉痛等，多屬輕微，偶見發燒，但若對蛋之蛋白質或疫苗其他成分過敏者，不予接種，以免發生嚴重過敏反應，年齡太小(小於六個月)亦不宜接種，孕婦則建議經專科醫師評估，而有發燒或急性疾病者，則建議延後接種 [8]。

根據過去前瞻性研究指出，流感疫苗接種在安養中心的老年人可以降低 60~70% 病發肺炎的機率，並且可以減少 60~70% 之死亡率 [9]。Govaert 等之雙盲臨床試驗發現，老年人接受流感疫苗接種可降低一半血清學上或者是臨床上流感之發生率 [10]。Gross 等之統合分析(meta-analysis)研究發現，流感疫苗接種可以減少至少一半的呼吸系統疾病、肺炎及因肺炎併發症而住院之機會，另外也預防了 68% 的死亡率 [11]。Nichol 等之追蹤研究發現，社區之 65 歲以上老人接種流感疫苗除了可減少一半因肺炎併發症而住院之機會，也減少了三分之一因鬱血性心衰竭而住院之機會，同時也使得所有死因之死亡率降低了一半，這樣的結果支持老人接種流感疫苗可以直接的增進健康，也間接的減少了整體醫療費用的支出 [12]。而對年輕人的研究也發現可減少上呼吸道疾病的發生率，及因病請假的頻率。因此，國外研究皆證實，施打流感疫苗對於民眾、家庭及社會而言，是符合預防醫學的目的及經濟效益。

過去認為流感病毒在禽鳥類雖具備所有血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經胺素 (neuraminidase, NA) 之亞型，但卻無禽鳥的流感病毒 (禽流感病毒) 直接侵襲人類致病之證據。直至一九九七年於香港發生一位三歲幼童因感染禽流感而死於雷氏症候群 (Reye's syndrome) 之併發症，並於其氣管抽取物之培養中分離出八段基因均為禽鳥來源之 H5N1 亞型病毒，自此禽流感病毒可直接感染人類之臨床病例方得確認 [13,14]。而市售雞隻糞便中也因檢出 H5N1 病毒而遭撲殺逾一百五十萬隻。2003 年初香港再度發生 H5N1 致死病例，隨後更有越南、泰國、柬埔寨、印尼等十數國發生高病原性 (highly pathogenic avian influenza, HPAI) H5N1 人禽流感致死病例，使得禽流感

是否會再度引起如一九一八年之大流行成為全世界及世界衛生組織極度關切之議題，而流感的診斷與治療，亦再度受到重視 [15,16]。

由於抗病毒藥物研發的成功使得流感的治療與預防進入新的時代，但流感疫苗的研發與應用仍是預防流感的重要手段。然而疫苗施打後之保護作用隨當年世界衛生組織(WHO)建議之流感病毒疫苗株是否能準確預測當季本土流行株而不同，同時疫苗施打者本身之免疫狀態亦可能影響疫苗反應。加以近年禽鳥類流感病毒已証實能夠直接感染人類，並可能因此造成再一次流感病毒在人類大流行。有鑑於世界性大流行發生時，全球疫苗可能發生短缺，屆時各國是否具備自行研發生產疫苗的能力，將嚴重影響國人建康的維護。因此，流感疫苗自製並自給自足是重要的政策。然而上游的研發必需落實於下游的臨床試驗，因此如何建構本國自己的臨床研究團隊是一個重要的課題。雖然目前禽流感疫苗使用於人類仍處於研發階段，為因應未來禽感疫苗施打之評估，實有必要建立一套國人基礎流感疫苗接種血清反應之資料庫及監測系統，同時建構由此系統衍生之臨床試驗研究團隊，以期透過此團隊之持續合作與運作，能將國內流感疫苗之研發成果，早期進入臨床試驗階段，達到疫苗自給自足的目標。

目前對於臨床流感疫苗之上市規範，參照歐盟之指引(the guide-lines of the European Committee for Proprietary Medicinal Products, CPMP)，每年流感疫苗重新換照之標準為：就 18 至 60 歲之成人而言，血清轉換率(SCR)須大於百分之四十，血清轉換因子(SCF)須大於 2.5，而血清保護率(SPR)須大於百分之七十[17]。

台灣自 1998 年成為亞洲地區第一個全面針對高危險老年族群提供免費流感疫苗注射的國家[18]，對於疫苗成效的評估，在近年幾篇論文研究均顯示對於疫苗接種者，可降低老年人因上呼吸道疾病至門診的看病率[19]，對於主要致死因死亡率(major cause-specific mortality)的降低也有強烈之相關[20]，對於一般危險性的族群也有降低約 20% 住院率的成效[21,22]，然而由於台灣的病毒株變異性與世界衛生組織推測的疫苗株一致性變異頗大，以 1997 至 2004 年間台灣本土流行株與 (WHO) 建議株之比較，一致性介於 47%—82% 之間，且疫苗建議株常早於疫苗接種前即已在台灣流行[23]，因此有必要對國人接受流感疫苗接種前後的血清學變化進行追蹤研究。

四、材料與方法：

97 年度

受試對象

第一年度受試對象，共分成三組，每組目標樣本數為約 100 人，共 300 人：

- (1) 成人：18 歲以上，60 歲以下民眾
- (2) 老人：60 歲以上民眾
- (3) 幼童：5 歲以下，且 3 歲以下幼童將約佔 50 人

計畫主要納入條件：

- (1) 受試者願意遵守試驗所需之返診與記錄。
- (2) 受試者或其法定代理人必須同意填寫並簽署受試者同意書。

計畫主要排除條件：

- (1) 過去六個月內曾接受流感疫苗接種者。
- (2) 過去一週內曾有急性發熱性症狀。
- (3) 過去 72 小時內有上呼吸道的急病，包括一般感冒或鼻塞等症狀。
- (4) 對雞蛋及雞蛋蛋白質或對試驗藥物類似的疫苗過敏。
- (5) 有疑似流感的發燒症狀（溫度大於 38.5 度）及下列四症狀其中兩種：頭痛，肌肉／關節酸痛（例如：肌痛及關節痛），喉嚨痛及咳嗽。
- (6) 懷孕、哺乳中，以及在試驗期間可能懷孕的婦女。
- (7) 過去三個月之內曾使用類似試驗藥物或曾參與其他臨床試驗。
- (8) 本身有免疫不全，抑制免疫力或接觸家中有抑制免疫力的成員。
- (9) 過去三個月之內有氣喘或使用支氣管擴張藥物的記錄。
- (10) 過去一個月之內曾經接種或在將來一個月內可能會接種活性病毒疫苗。
- (11) 過去二個月之內曾接種非活性疫苗。
- (12) 過去三個月之內曾輸入任何血中產物，包括免疫球蛋白。
- (13) 任何醫師認為可能干擾對疫苗之評估的狀況。
- (14) 有任何一般需要接種非活性疫苗的慢性疾病。

受試者統計分析和採樣標準

依據 95 年的研究資料，注射流感疫苗前，18-60 歲成人之 B 型血清保護率為 29%，60 歲以上之 B 型血清保護率為 39.6%；注射流感疫苗以後，18-60 歲成人之 B 型血清保護率為 63.3%，60 歲以上之 B 型血清保護率為 60.4%。若以疫苗注射後之血清保護率至少需達到 70% 為目標，在第一型統計誤差設為 0.05(雙尾檢定)，假設經過疫苗注射後之血清保護率從 60% 增加到 70% 之情形下，欲達成統計檢力為 90%，最少所需之研究個案數為 250 人。此樣本數的估算是利用 PASS 2004 版本之單組比例分布之模組求得。因此，本研究計畫擬收集 300 名研究個案(兒童、成人及老人組各 100 名)將足以達到本研究所設定之目標。

疫苗施打與檢體收集

- (1) 本計畫經台北榮民總醫院人體試驗委員會核准後實施 (IRB: 97-03-21A) 在試驗前，醫師將針對受試者的身體狀況進行評估，以初步確定適合本研究計畫。取得受試者或其法定代理人的同意與簽署同意書之後，醫師將詳細詢問受試者的病史，並做身體檢查。
- (2) 若確定受試者符合本試驗計畫之條件，於疫苗注射前抽取靜脈血 10ml (幼童為 3-5 ml)，抽血後，為受試者注射流感疫苗於上臂 (幼童注射依仿單說明)。
- (3) 為預防並即時處理接種後發生率極低的立即型嚴重過敏反應，接種後應於接種單位或附近稍做休息並觀察至少 30 分鐘，無恙後再離開。接種後如有持續發燒、嚴重過敏反應如呼吸困難、氣喘、眩昏、心跳加速等不適症狀，立即緊急醫療處置，並以電話通報當地衛生局或疾病管制局。
- (4) 接種後第三週，受試者回診接受身體檢查，醫師將詳細詢問受試者於疫苗注射後是否產生任何副作用與不適並記錄於個案資料單。此外，再次抽取靜脈血 10ml (幼童為 3-5 ml)。
- (5) 上述所有血清樣本取得後，皆立即送至本院病毒科離心處理，以疾管局提供之本土流行株之抗原測量血清抗體效價。(疾管局於 2007 年 11 月 6 日提供本土流行株之抗量及對照血清)

個案追蹤

- (1) 第一次追蹤：接種後第三週回診，並再次採集血清。
- (2) 若個案有任何不適，隨時回診治家庭醫學部門診，進行全身身體評估。有類流感症狀即行採樣培養及 RT-PCR 檢查，並於當時及 3-4 週後抽取靜脈血 10ml (幼童為 3-5 ml) 評估。
- (3) 每位個案至少追蹤半年，第三個月及第六個月以電話訪問為主要追蹤方式，並記錄於個案記錄表。
- (4) 對於血清反應異於常態之受試者 (如 HI 效價異常高，或具保護效價但仍得到流感者)，將進行血清中和抗體之確認 (目前無此個案)。

流感病毒抗體偵測

流行性感冒病毒紅血球凝集抑制試驗 (HI)，此試驗可用於受試者抗體測定及病毒的分型。

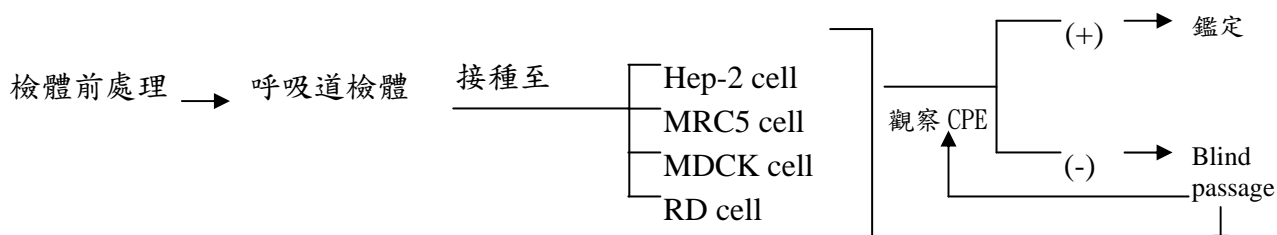
- 1.1 紅血球懸浮液製備：抽天竺鼠或雞血於阿氏抗凝劑中，混合均勻。血球用無菌雙層紗布過濾，用 pH7.2 PBS 洗三次，並製成 10% 儲存懸浮液，置 4°C 冰箱備用，但不得超過一週。做試驗時配成 0.75% 懸浮液，即 0.75 mL 10% 紅血球和 19.25 mL PBS PH 7.2 混合。
- 1.2 紅血球凝集效價測定：用感染過之組織培養液或蛋羊膜腔尿囊液，於 U-plate 上，以 PBS (PH 7.2) 做 2 倍稀釋。自第二列起加 0.025 mL PBS

於所有井孔(well)中。第一列加 0.05mL 病毒抗原。用 0.025 mL 微量稀釋器，做連續稀釋。加 0.025 mL PBS 於所有井孔(well)中。加 0.05 mL 的 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液至所有井孔中。並做三個井孔(well)的紅血球對照：0.05 mL 紅血球加 0.05 mL PBS。用微量振盪器混合均勻。加蓋，放室溫或 4°C 冰箱一小時。結果判讀：最高稀釋倍數能產生部分或完全紅血球凝集現象者，也就是 1 個凝集單位(1 HA unit)，做 HI 試驗則取 4 個凝集單位(4 HA unit)。

- 1.3 紅血球凝集抑制試驗(HI)：將各型特異性抗血清(Type Specific Antiserum)，從 1/10 開始做 2 倍稀釋，即自第二行至第六行，每個井孔(well)，加 0.025 mL PBS。加 0.05 mL 抗血清或病人血清(處理過)於第一行，用 0.025 mL 微量稀釋器混合稀釋之。加 0.025 mL 4 個凝集單位(4 HA unit)的病毒抗原至每個井孔(well)。用微量振盪器混合均勻，將病毒和血清混合液置室溫作用一小時。加 0.05 mL 之 0.5% 天竺鼠紅血球懸浮液至每個井孔(well)中，微量振盪器混合均勻，加蓋置室溫或 4°C 冰箱，1~2 小時。試驗同時，須包括抗原的反滴定效價(Back Titration)，抗血清對照及紅血球對照。
- (A) 抗原效價反測(Ag Back Titration)：從第二行至第六行洞(well)，各加 0.025 mL PBS。第一行加 0.05 mL，4 個血球凝集單位(4 HA unit)的稀釋病毒。用 0.025 mL 微量稀釋器混合稀釋之。每個井孔(well)再加 0.025 mL PBS。每個井孔(well)加 0.05 mL 0.75% 天竺鼠血球懸浮液。混合均勻，置 4°C 冰箱或室溫 1-2 小時。
- (B) 血清對照：0.025 mL 血清加 0.025 mL PBS 和 0.05 mL 紅血球。
- (C) 各型特異性抗血清(Type-Specific Antiserum)：抗血清 2 倍稀釋。加 0.025 mL 相同之標準病毒於各個井孔(well)，混合置室溫作用一小時。加 0.05 mL 之 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液至所有井孔(well)。用微混合器混合均勻，加蓋置 4°C 冰箱或室溫，1-2 小時。
- (D) 紅血球對照：0.05 mL PBS 加 0.05 mL 之 0.75% 天竺鼠紅血球懸浮液。
- (E) 結果判讀：與某一型特異性抗血清，有最高抑制紅血球凝集效價作用者之稀釋濃度。
- (F) 病毒株之選用宜包含標準株及當季流行株。本計畫以當季流行株為抗原，以 HI 1:40 為具血清保護效力。

流感病毒分離與鑑定

1. 病毒培養



- i. **流感病毒培養**：將由含有病毒粒子之病毒液 200 ul 與 1mL 病毒培養用細胞培養基（不含胎牛血清）充分混合，經 0.45 μm 過濾膜過濾後，接種至 MDCK 細胞株，培養 3-10 天後以 3000rpm 離心 15 分鐘已收取病毒液，並將離心沉澱之疑似感染細胞加入 1mL PBS 混合均勻後，滴入 21 孔玻片。玻片經 Acetone 固定後，以 Influenza A 及 Influenza B 之單株抗體（monoclonal antibody）進行間接免疫螢光染色法（indirect immunofluorescence assay, IFA）染色，並以螢光顯微鏡進行鏡檢，當細胞出現蘋果綠（apple green）螢光則判定為流感病毒陽性。

2. 病毒鑑定：

- (1) Respiratory viruses (follow DAKO system – direct FA)：抹片固定→風乾→加螢光抗體 10 1→置於 wet chamber 中 37°C, 15 分鐘→以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘→風乾，封片觀察。
- (2) Enterovivuses & Respiratory viruses (follow Chemicon system – indirect FA)：抹片固定→風乾→加螢光抗體 10 1→置於 wet chamber 中 37°C, 15 分鐘→PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘→風乾→加二次抗體 10 1→置於 wet chamber 中，37°C, 15 分鐘→以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘→風乾，封片觀察。

1 操作步驟

1.1 檢體處理

1.1.1 swab 檢體

以 1.5ML 0% EMEM(0% 維持培養基)稀釋後，經無菌過濾器 (0.45 μm Millipore 的濾膜)，將濾液存放 4°C 冰盒上的無菌小瓶中。

1.1.2 CSF

檢體內加入適量的 0% EMEM 稀釋，混合均勻。接種於細胞上。

1.1.3 blood

直接用無菌吸管吸取 Buffy coat，加 1.5mL 0% EMEM，接種於細胞上。

1.1.4 組織

先加入 2mL 0% EMEM 以均質器(homogenizer)磨碎後，以 2,000rpm，4°C,10 分鐘，離心，取上清液，無菌過濾之。濾液接種於細胞上。

1.2 接種

1.2.1 無菌吸管吸取檢體濾液 0.1mL~0.3mL，接種到長成單層細胞的狗腎細胞株 (MDCK)。但狗腎細胞株 (MDCK) 在接種前需先使用約 3mL PBS 清洗胎牛血清，再更換不含胎牛血清 (0% EMEM + Trypsin bovine pancreas) 之培養基。

1.2.2 隔日觀察細胞，確定沒受標本的毒素(Toxicity)或接種標本引起的污染，即換 1.5mL 新的 0% EMEM + Trypsin bovine pancreas 培養基。

1.3 病毒生長觀察

1.3.1 培養在狗腎細胞 (MDCK) 的檢體，取其培養液 0.05mL，加 0.5% 天竺鼠紅血球(Guinea pig)0.05mL 混合，放室溫 45 分至 1 小時觀察血球凝集(Hemagglutination)。每週一至二次、兩週後沒有陽性又不見細胞病變產生則以滅菌處理清洗試管。若得 HA 陽性，則刮下細胞，離心 1000rpm、10 分鐘。上清液至無菌小管中，保存於 -70°C 冰箱。以剩餘約 0.3mL 培養基打散沉澱細胞，作成抹片，以丙酮固定後做 FA 試驗，鑑定病毒。或以血球凝集抑制試驗(Hemagglutination inhibition) 鑑定病毒。

1.4 病毒鑑定

1.4.1 血球凝集試驗(Hemagglutination Test)

許多病毒含有血球凝集素(Hemagglutinin)，如流行性感冒病毒、副流行性感冒病毒、腮腺炎病毒等，能使不同動物的紅血球凝集。利用此特性可以測知病毒存在與否，也可大致定量病毒，其實驗步驟如下：天竺鼠(Guinea pig)紅血球以 PBS (PH 7.2) 洗三次，製成 0.5% 紅血球懸浮液。以 0.05mL，0.5% 天竺鼠紅血球與接種過標本的 MDCK 細胞試管中的培養液 0.05mL 混合均勻在 V 型微量滴定盤上。靜置室溫 1 小時後，觀察是否有血球凝集現象。同時作對照組比較，以 PBS 代替培養液，作為陰性對照組(Negative Control) 及含有凝集素的培養液為陽性對照組(Positive Control)。

1.4.2 直接免疫螢光抗體染色 (要搭配陽性、陰性對照組)：刮下病變細胞，作成抹片。在空氣中自然乾燥。浸入 -20°C 的丙酮固定 10 分鐘。取出風乾，加入螢光抗體，放在 37°C 作用 30 分鐘 (放在 wet chamber 內)。將抹片放入 PBS 中，浸泡 5 分鐘。共 2 次。用蒸餾水沖洗一次。乾燥之。滴上 mounting fluid，蓋上蓋玻片，用螢光顯微鏡觀查結果。

1.4.3 血球吸附試驗(Hemadsorption Test, Had)：有些不會使細胞產生病變的病毒，有血球凝集素，可與某些動物的紅血球上的接受器結合，而使紅血球吸附在細胞上。其實驗步驟如下：天竺鼠(Guinea pig)的紅血球以 PBS (PH 7.2)洗三次後，製成 0.5% 紅血球懸浮液。以漢克溶液(Hank's solution)洗培養過標本的 MDCK 細胞一次。照第二步驟洗未接種標本的 MDCK

細胞做對照用。加 1mL 0.5% 天竺鼠紅血球於第 2 與第 3 步驟處理過的試管中。靜置試管於 4°C 冰箱，20 分鐘。顯微鏡下觀察血球是否吸附在細胞上。做完 HAd 的試管，吸除紅血球液，並用 Hank's 液，將細胞上之紅血球洗掉。每支試管重新加入 1.5mL (0% EMEM+Trypsin)，繼續培養。一周後再做 Had (即第 5,10,15 天)。

建構我國流感病毒疫苗接種之臨床試驗研究團隊

一以民眾流感接種之抗體反應為模型

年度目標及查核點

96 年

年度目標	查核點
完成 96 年度流感施打及血清收集 150 例以上	96 年 10 月
完成 96 年度流感施打及血清收集 270 例以上 完成 96 年度施打者血清免疫反應測試 150 例以上	96 年 12 月

97 年

年度目標	查核點
完成 96 年度施打者個案追蹤及檢體血清免疫反應測試 300 例	97 年 4 月
完成 97 年度流感施打及血清收集 150 例以上	97 年 10 月
完成 97 年度流感施打及血清收集 270 例以上，反應測試 270 例以上 二年檢驗結果評估及資料整合分析(原申請 98 年 3 月底繳交完整結案報告)	97 年 12 月

預計完成工作項目：

1. 流感疫苗施打
2. 施打者之健康狀態評估與追蹤
3. 計算疫苗之臨床保護效力及一般血清免疫反應
 - A. 血清轉換率 (The seroconversion rate, SCR)：受試者接種後 HI 產生 4 倍以上增加之百分比
 - B. 血清轉換因子 (The seroconversion factor, SCF)：疫苗注射後紅血球凝集抑制試驗 (HI) 增加之倍數
 - C. 血清保護率 (The seroprotection rate, SPR)：受試者接種後 HI \geq 1:40 之百分比
4. 對於疫苗施打者在六個月之內再度得到類流感症狀，實施病毒培養及評估
5. 偵測新型流感病毒或變種新病毒

五、結果報告：

1. 流感疫苗施打：

本計畫疫苗於 97 年 9 月 23 日取得，第一例於 97 年 9 月 25 日實行施打。本次流感疫苗幼童及成人接種廠牌相同，為巴斯德流感疫苗 (VAXIGRIP, 2008/2009 STRAINS) 所使用之疫苗株依世界衛生組織 (WHO) 之建議為 2008-2009 年 (北半球) 流行性感冒季節所建議之病毒株：

A/Brisbane/59/2007 (H₁N₁) – like strain:

A/Brisbane/10/2007 (H₃N₂) – like strain:

B/Florida/4/2006 – like strain ;

施打劑量於成人每 0.5 毫升劑量之疫苗內含各種建議病毒株之凝血素 (haemagglutinin) 各 15 μ g；施打劑量於幼童每 0.25 毫升劑量之疫苗內含各種建議病毒株之凝血素各 7.5 μ g，施打途徑為肌肉注射 (im)。

2. 施打者之年齡層分布及性別比例：

本年度預計施打之受測人數為 300 人—100 位幼童，200 位成人，至 2009 年 2 月 10 日止，已完成施打人數：幼童為 83 人，成人為 192 人，達預計人數 300 人之 91.7 %；截至 2009 年 2 月 10 日，所有施打人數之年齡分布以 10 歲為群組間距，除了 5 歲以下之幼童為 83 人，其餘每個群組大多約為 20 ~ 30 人左右 (圖一)；將所有受試者依年齡區分為幼

童 (0 ~ 5 歲) , 成人 (18 ~ 未滿 60 歲) , 老年人 (60 歲以上) , 則幼童有 83 人 , 成人有 112 人 , 老年人有 80 人 (圖二) ; 目前收案人數男女比率約略相當 (男性 126 人 , 女性 149 人) 。截至目前為止 , 已完成二次血清收集約為 241 人 , 未再提供二次血清部分之原因分析如圖 3 。

3. 流感疫苗施打之反應與分析：

本計畫原針對接受疫苗施打者實施施打前及施打後之血清抗體免疫反應分析 , 依原計畫將利用血球凝集抑制法 (HI test) 進行比較分析 , 共施打 275 例 , 順利取得施打前血清檢體 , 然則因流感疫苗施打時程均定於秋末冬初 , 國內流感疫苗整體採購施打時程至九月底才正式進行 (第一位施打者為 97 年 9 月 25 日 , 國內老人流感疫苗施打於 10 月 1 日正式實施) , 除不易於短短 2-3 個月內完成全部疫苗反應評估外 , 部份受試者無法依約定返診提供第二次血清。今僅就目前可分析之具配對血清之部分分析 ; 且因疾病管制局於 10 月 20 日將當季流行株 (H1N1 、 H3N2 與 Flu B 之當季流行株序列與 WHO 建議之疫苗株相似 , 然而 H3N2 之當季流行株基因序列變異由疾管局資料顯示較不穩定 , 變化較大) 之抗原製備完成交予本單位 , 即立即評估其血球凝集 (HA) 效價 , 當天偵測其 HA 力價 , 測出來之結果如表一 : H1N1 (A/Brisbane/59/2007-like) HA 力價為 1 : 8 , H3N2 (A/Brisbane/10/2007-like) HA 力價為 1 : 8 , Flu B (B/Florida/4/2006 lineage-like) HA 力價為 1 : 128 , 與疾管局所附之力價

略有差異，其中僅有 Flu B 抗原量較充足，可以偵測所有檢體，其餘不足的抗原量則由本單位進行增殖以補強。

本年度共已收集到含施打前後受試者免疫血清對有 241 人，幼童、成人及高齡者分佈如表二，偵測受試者之注射疫苗前後的抗體變化，將所得 HI 力價數據依歐盟規格(表三)就血清轉換率 (seroconversion rate)，血清轉換因子 (seroconversion factor)，血清保護率 (seroprotection rate) 來分析疫苗注射的效果，其數據和分析分別如下：

(1) 血清轉換率 (seroconversion rate)：

歐盟規格之血清轉換率為成人 (18-60 歲) 高於 40%，老年人 (>60 歲) 高於 30%；以不同年齡層做幼童、成人、老年人的分組，其中僅有成人組及老年人組的 Flu B 分別到達 40.7% 及 52.6%，具有明顯的意義 (表四)；幼童組對於 H1N1、H3N2、Flu B 之血清轉換率分別為 35.7%、36.9%、38.1%。比較各組之血清轉換率發現對 H3 亞型之血清轉換率以老年組最差 (具統計意義)，而對 Flu B 之血清轉換率以幼童組最差 (但不具統計意義)。若將幼童組再細分為 2 歲以下以及 2-5 歲兩組來比較 (表五)，2 歲以下者針對 H1N1 及 H3N2 之血清轉換率分別高達 66.7% 和 50%，反應高於 2-5 歲者的 32.0% 和 35.6%，Flu B 的血清轉換率則是兩者相近，分別為 33.3% 與 38.6%，但因目前 2 歲以下個案數較少 (抽血不易)，因此無法顯示統計意義。

(2) 血清轉換因子 (seroconversion factor) :

血清轉換因子之數值為各受試者免疫後之 HA 力價除以免疫前 HA 力價所得之抗體力價增加倍數，將所有受試者增加的倍數結果作平均值，再加減 1 個標準差。從分析數據顯示，各組針對 H1N1、H3N2、Flu B 血清轉換因子數值均達標準 (表四)，且各組間之統計比較無顯著之意義。

(3) 血清保護率 (seroprotection rate) :

當抗體力價到達 1 : 40 被認為具有血清保護力。與 96 年結果略有不同之處在於：96 年成人及高齡組在注射疫苗前之血清保護率已達 80 % 以上，注射後更可達到 100 %；幼童組除了 H3N2 之血清保護率與成人組相當外，其餘在注射疫苗前血清保護率較低，尤以 Flu B 為顯著，僅有 31.7 %，即使在疫苗注射後亦只到達 60.3 %。總體而言，96 年除了幼童組 Flu B 外 (35 %)，各組在疫苗施打前之血清保護率均高 (> 60 %)。而今年結果在注射前，三組三種型別之注射前保護率均未達 50%，在注射疫苗後針對 H1N1 的血清保護率，僅有成人組到達 81.7% 合於歐盟之標準 (表四)；針對 H3N2，三組受試者的血清保護率除高齡組略低外(59.6%)，可達歐盟標準；針對 Flu B 則只有幼童組未達歐盟標準 (60.3%)。將幼童組再分為 2 歲以下以及 2-5 歲兩個族群 (表五)，針對 H1N1 僅有 2 歲以下者達到標準

(83.3%)，針對 H3N2 僅有 2-5 歲者達到標準 (74.6%)，針對 Flu B 兩者皆未達歐盟標準。

4. 施打者追蹤評估

對於疫苗施打者之後續追蹤及再度得到類流感症狀之評估方面，由於每年度流感疫苗之施打時程均於歲末，最早施打之個案於 9 月 25 日接受 2008-2009 年流感疫苗之接種，至 10 月中下旬為第二次血清抗體評估，因此須至 2009 年 3 月底左右才能獲得施打六個月後之評估結果，但計畫經費已終止，人員已離職後續追蹤有困難，希望若有後續計畫能依以下各種可能狀況逐一探討並陸續收案：

- (A) 因其他非流感病毒之感染而產生類流感症狀。
- (B) 雖施打具保護作用之流感疫苗株，但未產生保護性抗體。
- (C) 雖施打流感疫苗株且產生保護性抗體，但仍受其他亞型流感感染
(可能為新型流感)。
- (D) 雖施打具保護作用之流感疫苗株且產生保護性抗體，但仍受同型流感株感染 (可能為變種病毒且變異處位於其他基因點)，由全基因序列分析找出可能變異處。

5. 偵測新型流感病毒或變種新病毒：

流感病毒由於本身基因組合與結構之不穩定性，極易發生突變及重組，造成新種流感病毒流行。尤以近來證實具各種流感 A 型亞型之禽鳥

可直接感染人類，如何早期偵測新種病毒之浮現為防疫要務之一。本實驗室於 97 年 1-10 月間病毒培養檢體總量為 3448 例，其中共培養呼吸道病毒 57 例而流感 A 型共 6 例 (H₁N₁ 6 例)，B 型共 31 例，副流行性感冒病毒 20 例，至今尚未發現人類禽流感或新型流感病毒。但由於 2008-2009 年 (北半球) 流行性感冒季節所建議之病毒株：

A/Brisbane/59/2007 (H₁N₁) — like strain:

A/Brisbane/10/2007 (H₃N₂) — like strain:

B/Florida/4/2006 — like strain ;

依本實驗室及疾管局公佈過去 10 個月間之分離流感病毒株分析可知

A/Brisbane/59/2007 (H₁N₁) 已在 2008 年初 (1-3 月) 有過一波流行，而

A/Brisbane/10/2007 (H₃N₂) 之 A 型流感病毒株也已在台灣地區有散在性

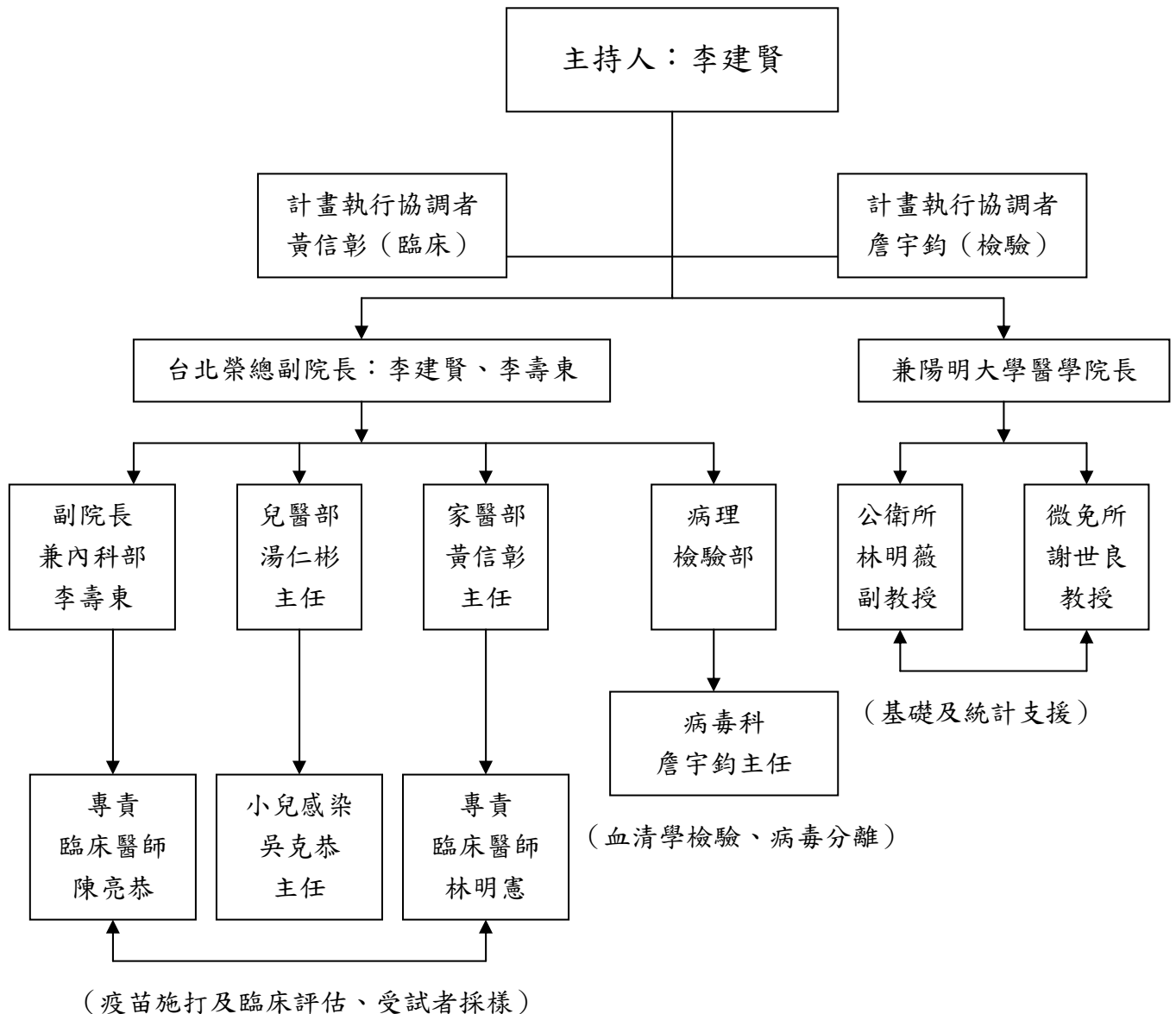
流行，而流感 B 亞型之 Florida 病毒株也曾在年中有流行株之分離。所幸

本實驗室尚未分離出新型流感病毒株，不過本計畫將持續實施監測，以

期早日發現新種流感病毒株。

建構流感疫苗組織團隊

本計畫由計畫主持人（李建賢副院長）總其成，負責各部門間運作協調及管控，若有必要加入新疫苗研究方案也可由主持人啟動新計畫。對於各研究單位（或部門）之職司，簡要介紹如圖示，由於榮陽團隊長久來合作密切且位置接近，擬透過定期會議（必要時邀請其他專家提供專業意見），使臨床團隊運作順暢。



建構流感疫苗臨床研究團隊成員介紹

本計畫「建構我國流感病毒疫苗接種之臨床試驗研究團隊成員介紹」目的在配合國家疫苗自給自足醫療政策，建構我國臨床試驗團隊，希望藉由本計畫以建構一個完整之臨床試驗及監測系統並能迅速配合基礎疫苗研發，進入臨床試驗階段，俾利未來國內外禽流感受疫苗研發成果或發生大流行時，能快速進行相關臨床試驗研究。

李建賢副院長，本計畫由台北榮民總醫院李副院長建賢擔任計畫總主持人，統籌協調整個計畫規範與執行，由於李副院長長期致力於醫學及醫院管理的研究並兼任國立陽明大學醫學院院長和老年醫學中心主任等要職，且參與人類副甲狀腺幹細胞株之建立、核災急救責任醫院及核災醫療救護隊建置及關渡社區醫學服務世代追蹤研究計畫多項計畫之督導與執行，對於社區醫療及基礎研究均有貢獻，必能連繫院內各相關科部，帶領團隊各專業人員，進行流感疫苗試驗標的之研發及疫苗施打之評估。建立一套國人基礎流感疫苗接種血清反應之資料庫及監測系統，建構一個完整之臨床試驗監測系統。

李壽東副院長，為台北榮總副院長兼內科主任，曾參與多項疫苗臨床計畫例如：A 型肝炎疫苗試種者之長期追蹤計畫、B 型肝炎疫苗接種追蹤計畫及 C 型肝炎病毒基因體分析與長期臨床病程之相關性等，對於本計畫中之疫苗追蹤與分析具有完整的構思與實際的臨床經驗。

湯仁彬主任，為台北榮總兒童醫學部主任，長期關注於小兒感染及抗體的研究，並擔任國科會疫苗研究的成員之一，在計畫中負責兒童個案收集與監督，並主導小兒疫苗之施打及追蹤。

黃信彰主任，為台北榮總家庭醫學部主任，多年來配合政府之流感疫苗計畫之施打及追蹤並提高疫苗接種效率，亦積極從事疾病之預防工作，並參與 GSK 禽流感受疫苗及社區老人健康篩檢及追蹤管理計畫等多項計畫，負責本計畫中成人個案收集與監督，亦具有疫苗施打之臨床專業。

詹宇鈞主任，為台北榮總病毒科主任，專長內科學、分子生物學、分子病毒學、及感染症。負責本計畫執行與督導流感病毒之分離鑑定及疫苗施打者血清免疫反應之實驗室評估，多年來致力於研究開發分子生物學之快速診斷及從事臨床病毒學之研究，提供臨床醫師正確病毒流行資訊，曾加入衛生署流感疫苗計畫，完成多次追蹤血清之效價變化及評估施打者之血清免疫狀態和流感疫苗保護力。同時病毒實驗室為疾病管制局病毒合約實驗室之一，且通過美國病理學會 CAP 認證，具實驗室管理及實務操作之豐富經驗。

謝世良所長，任職於國立陽明大學微生物及免疫學研究所是免疫學專家，負責

本計畫中流感病毒疫苗之免疫學反應研究分析，能對增強宿主對疫苗反應之改善，提出專家經驗及改善之道。

林明薇副教授，任職於國立陽明大學公共衛生研究所是流行病學專家，將協助本計畫公共衛生方面及疫苗抗體反應之分析與統計。

吳克恭主任，任職於台北榮總兒童醫學部小兒感染科，專長小兒感染，負責協助兒童個案收集與血清採集工作。

陳亮恭醫師，任職於台北榮總家庭醫學部，具有家庭醫學及預防醫學等專業背景，負責協助本計畫協調、個案收集、個案資料彙整與成果分析。

林明憲醫師，任職於台北榮總家庭醫學部，具有社區醫學及老人醫學等專業背景，負責協助本計畫協調、個案收集、個案資料彙整與成果分析。

蔡正賢技師，任職於台北榮總病毒科，長期參與各項病毒之鑑定及培養，並曾前往美國 CDC 接受流感訓練，是資深的醫檢專家，負責執行流感病毒之分離鑑定及疫苗施打者血清免疫反應之實驗室評估

翁文松技師，任職於台北榮總病毒科，長期參與各項病毒之鑑定及培養，並具疫苗血清抗體測試之實務經驗，執行流感病毒之分離鑑定及疫苗施打者血清免疫反應之實驗室評估。

六、討論：

本計畫之實施重點在針對一般民眾（包括幼童、成人及高齡者）實施疫苗施打及血清反應監測。本次計畫於疫苗施打前約二個月即開始招募受試者，然在疫苗施打部分，由於每年流感疫苗之施打常於 9、10 月間開始，對於希望在年度計畫內（12 月之前）收集完成配對血清並測試，時程十分緊湊，不易在年度時限內完成全部測試。本組至 2009 年 2 月已完成預估人數 91.7% 之施打率，目前此臨床研究團隊架構運作尚稱平順，然歷年流感疫苗之施打率常隨年度疫情及媒體宣傳而有波動。至於對新型流感疫苗（如禽流感疫苗）之招募及施打因屬新疫苗之測試，必須經過更嚴苛之人體試驗審查及擔負更多潛在風險，比照其他世界級藥廠之研發，可能需要更多經費及人員之投入。目前已知有國際藥廠與台大及本院相關成員進行跨國合作，可見此計畫預期達到建構流感疫苗臨床試驗之醫療團隊之成效已逐漸展現。

計畫內受測者之年齡性別分布已先經統計學家建議就幼童、成人及高齡者之分佈而收案，本計畫之實施重點在針對一般族群實施監測，因此男女比例及各年齡層之分佈約略相當，然則 18-60 歲此組群之女性比例稍高（女性:男性約為 1.46:1），較之前期計畫對流感高危險族群（如女性護理人員及高齡者）之分佈有所不同，可以減低因年齡性別異常分佈可能影響後續之血清免疫分析，對於建構流感疫苗反應之監測網，以提供防疫單位更早察查疫苗施打之不足，並避免可能新疫情之擴大發生希望有所助益。

有關血清反應監測部分，我們初步發現本年度疫苗施打前受測者以 HI 試驗，無論是幼童組、成人組或是老年人組，在疫苗注射前之血清保護率皆低於 50%，其中又以老年人針對 H1N1 的 13.5% 最低，可能由於 97 年間並無大規模之流感流行，一般民眾原存在之抗體效價因而偏低，但是在接受疫苗注射後，三組之血清保護率皆提升了 20% 以上，其中又以成人組針對 Flu B 增加了 45.4% 的血清保護率以及老年人針對 Flu B 及 H1N1 分別增加了 50% 及 44.2%（疫苗接種後針對 Flu B 的

血清保護率為 89.7 %，H1N1 為 57.7 %)，顯示接受今年度流感疫苗接種有助於針對當季流行性感冒的免疫力提升，但是在 H1 之老年組，其施打後之保護力並未達歐盟標準，宜密切監控是否有此型流感疫情之發生。將三組受試者之血清保護力進行比較發現：

- 1) H1H1：老年人組在接受疫苗接種前之血清保護率相對其他兩組是有顯著差異的低。
- 2) H3N2：三組在疫苗注射前後之血清保護率皆無顯著差異；在注射前，2 歲以下受試者較 2-5 歲者顯著較低。
- 3) Flu B：幼童組在接受疫苗注射後之血清保護率相對其他兩組是有顯著差異的低。

依過去研究發現在疫苗注射前，除在幼童組外，成人及老年人之施打前血清保護率均高 (>70%)，而今年之施打前保護率均偏低，是否與每年流感疫情有相關，值得進一步研究。

血清轉換率之分析發現，僅有老年人組針對 Flu B 的血清轉換率達到歐盟有意義之標準 (52.6 %)，而成人組針對 Flu B 勉強達到歐盟之標準(40.7 %)，就三組受試者比較的結果，針對 H1N1 三組的血清轉換率並沒有顯著差別，針對 H3N2 老年人組有顯著較低的情況，針對 Flu B 老年人則較高，但未達統計意義。是否今年度 WHO 建議之病毒株對受施打者引發之免疫反應效力有所不同，抑或製造商之佐劑成分有所改變 (例如全面使用不含汞之疫苗)，亦有待進一步研究分析。

又此現象是否因為台灣地區歷年均有不同規模之流感流行，而反覆暴露於流感病原體者其抗體免疫反應較不明顯而造成，也有待後續追蹤。至於血清轉換因子之平均值在各組各亞型中均能達到歐盟 2.0 至 2.5 數值之要求，也支持本年度疫苗施打應能提供一定之保護效力。

本年度抗原測試中，發現由疾管局所提供之當季流行株抗原在凍存後其效價並未有顯著改變，不過由疾管局所測試之 HA 力價與本單位即時複測試之力價有部分差異，除了 H1 及 Flu B 力價相當，而 Flu B 之抗

原較充足可以完成所有實驗外，其餘需由使用單位自行再產製，考量若因後續試劑量不足以因應所有之 HI 反應所需，以致於各單位必須自行增殖以完成目標偵測數量，易造成額外時間花費及人力投入。如能即時提供充分抗原予使用單位，對於將來若有流感或禽流感之疫情爆發時需要短時間大量測試的情況將有助益。

本年度研究與前一年最大之差異在於往年在幼童族群中一般對疫苗注射之反應較佳（血清轉換率及血清轉換因子），但幼童在未注射前之血清保護率較低，可能反應出較少機會暴露於流感病毒之感染，而成人雖然對於流感疫苗反應不如幼童，但因注射前之血清保護率已至少達 80%，遠高於疫苗發照所需之 60-70% 保護率，因此疫苗注射之附加效益可能有限。而今年各組施打前之血清保護率均偏低（< 50%），可能反應出年中無顯著流感大流行，雖然三種建議之疫苗株早已在本國發現，但因無大規模流行，一般人尚未具保護性抗體，使疫苗施打之效益得以顯現（由施打後大部分組別達到歐盟血清保護率之標準），但仍需嚴密監測未達保護率之 H1 老年組。

七、結論與建議：

1. 有關感疫苗施打部分至 2009 年 2 月中止，已完成預定施打人數之 91.7%，其中 241 例完成兩次血清之採集 (87.6%)。由於流感疫苗之施打均集中於 9、10 月間，易導致結案報告匆促及準備不及，建議往後結案報告於翌年 2、3 月間呈現，較能得到完整的結果。
2. 本計畫合併去年結果已建立院內追蹤流感疫苗施打後之監測系統架構 (由家醫部及兒童醫學部負責受試者之招募及施打，由病理檢驗部病毒科負責疫苗血清反應之檢驗)，另外對於高齡安養機構之疫苗施打成效追蹤及與國外藥廠之疫苗合作開發，未來研擬另行計畫與本院高齡醫學中心合作，長期追蹤部分 (100 至 150 名) 高齡疫苗施打者之血清免疫反應，以了解高齡危險群之疫苗施打成效。同時對幼童族群，本計畫已連續二年運作幼童組之監測系統，可了解目前疫苗政策是否有修正之空間。本院依計畫建構出我國流感病毒疫苗接種之臨床試驗研究團隊，此系統將有助於未來新型流感 (如禽流感) 疫苗之臨床研究與評估。
3. 就施打後血清免疫反應結果之分析，以 3 週為抽血間隔所得之流感疫苗陽性反應率 97 年度整體相當低，依照歐盟對上市疫苗之要求，本年度疫苗受試者對當季病毒株除 Flu B 在成人及老年組之血清轉換率達到標準外，H1 及 H3 亞型之疫苗反應均差。部份可能原因為疫苗之製備每年均需經重新選株、製備，因此各批次

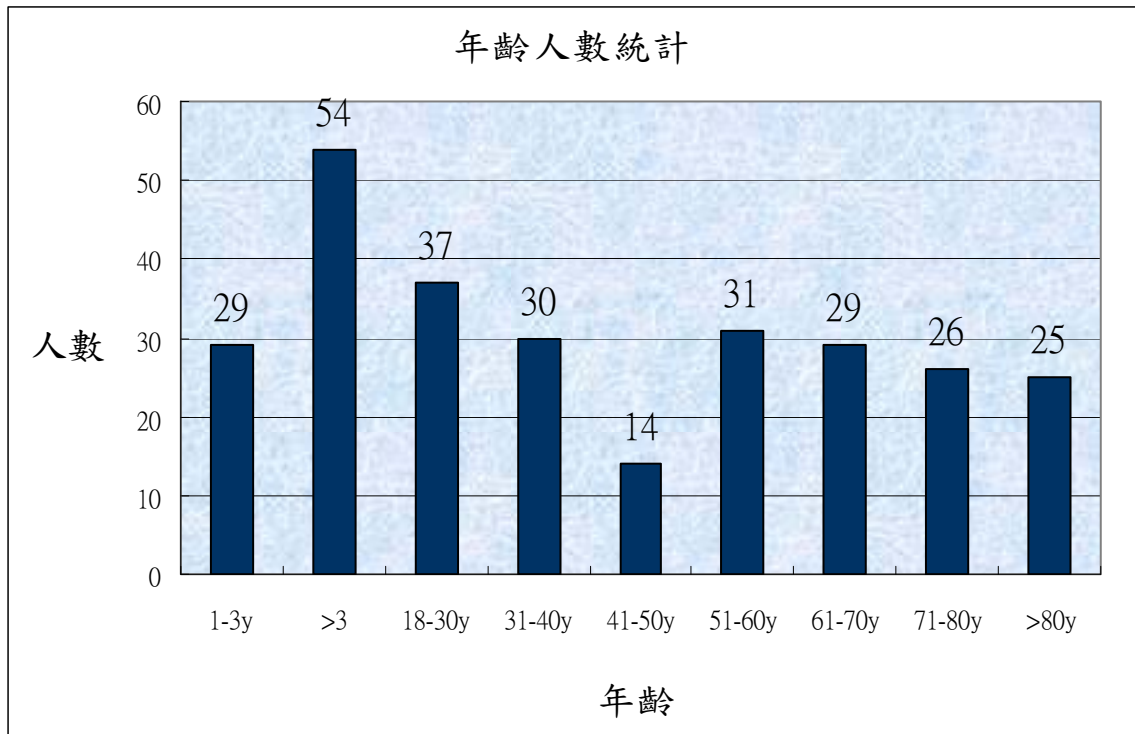
4. 本年度觀察針對特異流感抗原之 HI test 與去年研究之血清免疫反應吻合度並不高。最大差異在施打前之各組血清保護率有極大差異，是否源於各年度流感流行之規模影響一般群眾具備施打前血清保護率之比率差異，有賴建立長期之流感血清流行病學之追蹤，因此建議應建立逐年疫苗施打成效之追蹤機制，以提供疫苗政策之參考。
5. 至目前為止尚未培養出新型流感病毒株，2007-2008 年建議之疫苗病毒株已在施打前有社區陽性培養報告，本計畫相關之友計畫（由台大執行）對流感監測將比較一般人對當季病毒株與疫苗株血清效價之異同，有助於更加了解疫苗施打之時程是否合乎防疫需要。

八、參考文獻：

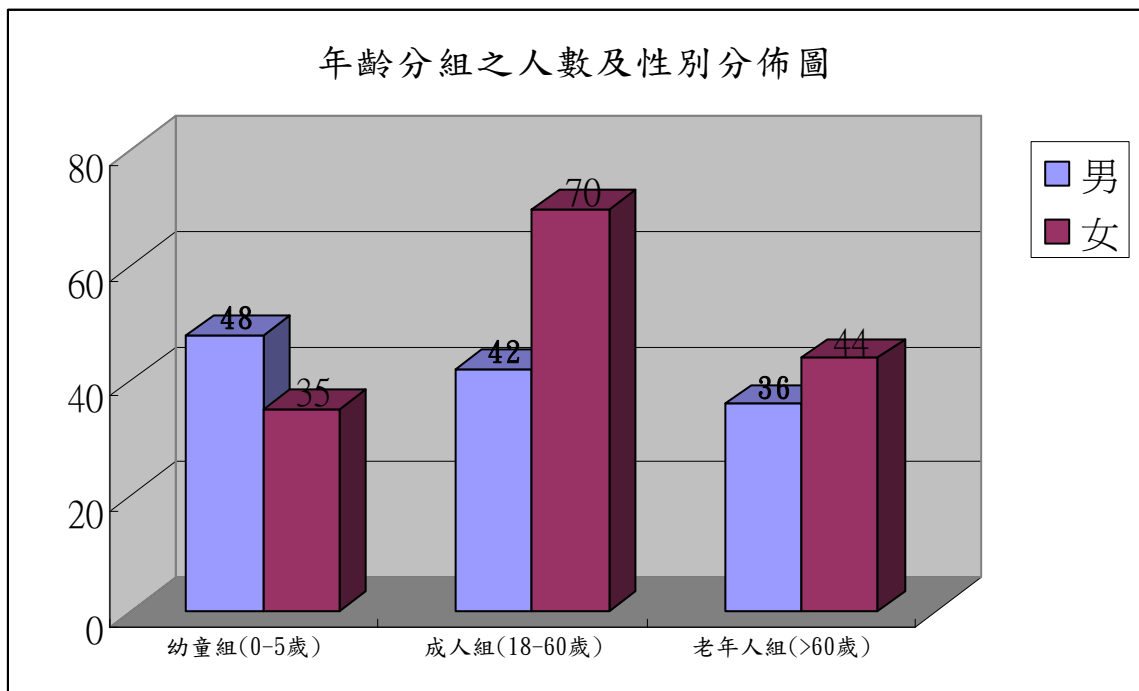
1. Cifu A, Levinson W. Influenza. JAMA. 2000; 284: 2847-9.
2. Cox NJ; Subbarao K. Influenza. Lancet. 1999;354:1277-82.
3. Palache AM. Influenza vaccines. A reappraisal of their use. Drugs. 1997;54:841-56.
4. Zimmerman RK, Ruben FL, Ahwesh ER. Influenza, influenza vaccine, and amantadine/rimantadine. J Fam Pract. 1997;45:107-22.
5. Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2004;53(RR-6):1-40.
6. Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Bridges CB; Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2005;54(RR-8):1-40.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: influenza vaccine supply and recommendations for prioritization during the 2005-06 influenza season. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2005 Sep 2;54:850.
8. Couch RB. Prevention and treatment of influenza. N Engl J Med. 2000;343:1778-87.
9. Strassburg MA, Greenland S, Sorvillo FJ, Lieb LE, Habel LA. Influenza in the elderly: report of an outbreak and a review of vaccine effectiveness reports. Vaccine. 1986;4:38-44.
10. Govaert TM, Thijs CT, Masurel N, Sprenger MJ, Dinant GJ, Knottnerus JA. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals. A randomized double-blind placebo-controlled trial. JAMA. 1994;272:1661-5.
11. Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. Ann Intern Med. 1995;123:518-27.
12. Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T. The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community. N Engl J Med. 1994;331:778-84.
13. Claas EJ, Osterhaus AE, Van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet. 1998;351:472-7.
14. Subbarao EK, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. Science. 1998;279:393-6.

15. Peiris JSM, Yu WC, Leung CW, Cheung CY, Ng WF, Nicholls JM et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*. 2004;363:617-9.
16. The Writing Committee of World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *N Engl Med*. 2005;353:1347-85.
17. Robert B. Belshe, M.D., Frances K. Newman, M.S., Joan Cannon, R.N., et al. Serum Antibody Responses after Intradermal Vaccination against Influenza. *N Engl J Med*. 2004;351:2286-94.
18. Chen YH, Lior SH, Chor CC, et al. Influenza and pneumococcal vaccination of the elderly in Taiwan. *Vaccine*. 2004 Jul 29;22(21-22):2806-11.
19. Tsai YW, Huang WF, WenYW, Chen PF. The Relationship between Influenza Vaccination and Outpatient Visits for Upper Respiratory Infection by the Elderly IN Taiwan. *Value Health*. 2007 Mar-Apr;10(2):117-27.
20. Wang CS, Wang ST, Lai CT, Lin LJ, Chou P. Impact of influenza vaccination on major cause-specific mortality. *Vaccine*. 2007 Jan 26;25(7):1196-203.
21. Wang ST, Lee LT, Chen LS, Chen TH. Economic evaluation of vaccination against influenza in the elderly: an experience from a population-based influenza vaccination program in Taiwan. *Vaccine*. 2005 Mar 14;23(16):1973-80.
22. Wang CS, Wang ST, Lai CT, Lin LJ, Lee CT, Chou P. Reducing major cause-specific hospitalization rates and shortening hospital stays after influenza vaccination. *Clin Infect Dis*. 2004 Dec 1;39(11):1604-10.
23. Hsieh YC, Chen HY, Yen JJ, et al. Influenza in Taiwan: seasonality and vaccine strain match. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005 Aug;38(4):238-43.

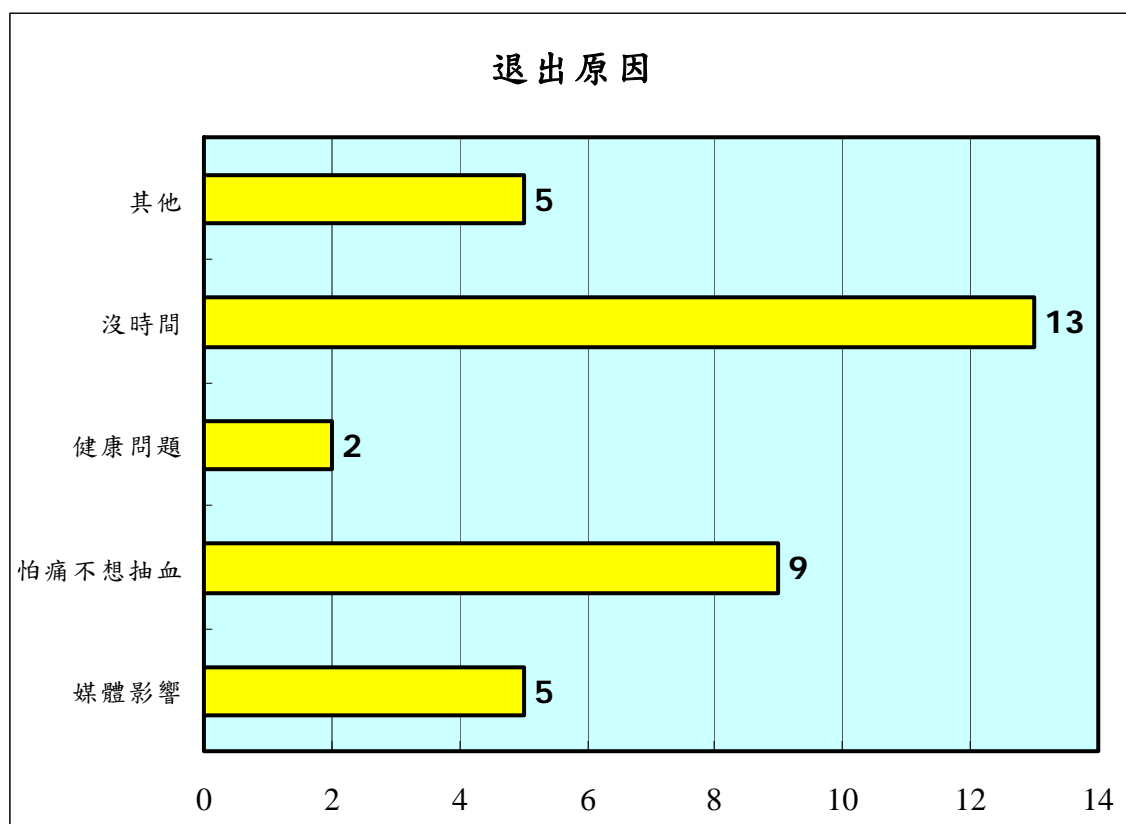
圖一、2008 年度流感計畫受試者年齡分布圖



圖二、幼童組、成人組、老年組之人數及性別分佈



圖二、未能完成二次血清收集之原因



表一、 疾管局提供之流感抗原量及力價與本單位實際測量之比較

	A/Brisbane/59/2007-like lineage (H1N1)	A/Brisbane/10/2007-like lineage (H3N2)	B/Florida/4/2006-like lineage
當季病毒株名稱	A/Taiwan/951/2007	A/Taiwan/480/2008	B/Taiwan/29/2008
實際容量	50 ml	55 ml	45 ml
疾管局測試力價	1 : 16	1 : 128	1 : 64 or 1 : 512
本單位測試力價	1 : 8	1 : 8	1 : 64 or 1 : 128

表二、 研究個案基本資料

	2 歲以下 N=6	2-5 歲 N=59	5 歲以下 N=65	成人組 N=87	60 歲以上 N=78	P 值
性別 (男)	6 (100.0%)	33 (55.9%)	39 (60.0%)	30 (34.5%)	35 (44.9%)	0.002
年齡	1.8 ± 0.4	4.2 ± 0.8	4.0 ± 1.1	39.9 ± 13.0	75.5 ± 9.6	<0.001

表三、 歐盟規格之血清轉換率 (seroconversion rate)，血清轉換因子 (seroconversion factor)，血清保護率 (seroprotection rate)

Table 1. The guidelines of the European Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) (annual relicensure of influenza vaccines)

Criterion	Adult (18-60)	Elderly (>60)
sero-conversion rate	40%	30%
Sero-conversion factor	2.5	2.0
Sero-protection rate	70%	60%

Sero-conversion rate: percentage of 4-fold increase of HAI

Sero-conversion factor: ratio of HAI titers post-immunization/pre-immunization

Sero-protection rate: percentage of HAI titer ≥ 40

Belshe RB, et al. NEJM 2004, p2286-94

表四、幼童組、成人組以及老年人組針對流感當季流行株之抗體偵測比較

	5 歲以下	成人組	60 歲以上	P 值 ^a	P 值 ^b	P 值 ^c	P 值 ^d
	N=56	N=82	N=52				
H1 注射前血清保護率	23 (41.1%)	39 (47.6%)	7 (13.5%)	0.001	0.452	0.001	0.003
H1 注射後血清保護率	35 (62.5%)	67(81.7%)	30(57.7%)	0.005	0.020	0.005	0.754
H1 血清轉換率	20 (35.7%)	23 (28.0%)	13 (25.0%)	0.443	0.443	0.851	0.318
H1 注射前血清 Titer (GMT)	25.0	31.8	16.8				
H1 注射後血清 Titer (GMT)	63.2	68.7	34.1				
H1 血清轉換因子	6.7 ± 18.0	4.9 ± 11.0	2.7 ± 2.6	0.234	0.484	0.073	0.104
	N=65	N=86	N=78				
H3 注射前血清保護率	27 (41.5 %)	30 (34.9%)	27 (34.6%)	0.630	0.506	1.000	0.498
H3 注射後血清保護率	47 (72.3%)	61 (70.9%)	46 (59.6%)	0.157	0.997	0.149	0.137
H3 血清轉換率	24(36.9%)	26 (30.2%)	13 (16.7%)	0.020	0.490	0.064	0.010
H3 注射前血清 Titer (GMT)	27.5	23.5	23.1				
H3 注射後血清 Titer (GMT)	66.7	50.9	38.6				
H3 血清轉換因子	3.9 ± 5.1	3.5 ± 7.2	2.9 ± 7.4	0.673	0.684	0.617	0.359
	N=63	N=86	N=78				
FluB 注射前血清保護率	20 (31.7%)	34 (39.5%)	31 (39.7%)	0.546	0.421	1.000	0.420
FluB 注射後血清保護率	38(60.3%)	73 (84.9%)	70 (89.7%)	<0.001	0.001	0.486	<0.001
FluB 血清轉換率	24(38.1%)	35 (40.7%)	41(52.6%)	0.166	0.880	0.172	0.123
FluB 注射前血清 Titer (GMT)	17.3	23.9	24.8				
FluB 注射後血清 Titer (GMT)	42.3	63.8	70.6				
FluB 血清轉換因子	4.6 ± 6.5	4.8 ± 8.4	4.6 ± 5.2	0.986	0.904	0.884	0.994

P 值^a: 三組比較

P 值^b: 5 歲以下及成人組相比

P 值^c: 成人組及 60 歲以上相比

P 值^d: 5 歲以下及 60 歲以上相比

表五、幼童組針對流感當季流行株之抗體偵測比較

	2 歲以下	2-5 歲	P 值
	N=6	N=50	
H1 注射前血清保護率	2 (33.3%)	21 (42.0%)	1.000
H1 注射後血清保護率	5 (83.3%)	30 (60.0%)	0.393
H1 血清轉換率	4 (66.7%)	16 (32.0%)	0.172
H1 注射前血清 Titer (GMT)	22.5	25.3	
H1 注射後血清 Titer (GMT)	100.8	59.8	
H1 血清轉換因子	5.3 ± 3.0	6.8 ± 19.0	0.848
	N=6	N=59	
H3 注射前血清保護率	0 (0.0%)	27 (45.8%)	0.037
H3 注射後血清保護率	3 (50.0%)	44 (74.6%)	0.335
H3 血清轉換率	3 (50.0%)	21 (35.60%)	0.662
H3 注射前血清 Titer (GMT)	14.1	29.5	
H3 注射後血清 Titer (GMT)	44.9	69.5	
H3 血清轉換因子	4.2 ± 3.1	3.9 ± 5.2	0.910
	N=6	N=57	
FluB 注射前血清保護率	0 (0.0%)	20 (35.1%)	0.164
FluB 注射後血清保護率	2 (33.3%)	36 (63.2%)	0.204
FluB 血清轉換率	2 (33.3%)	22 (38.6%)	1.000
FluB 注射前血清 Titer (GMT)	10.0	18.4	
FluB 注射後血清 Titer (GMT)	31.8	43.5	
FluB 血清轉換因子	4.7 ± 5.6	4.6 ± 6.7	0.985

附錄一

建構我國流感病毒疫苗接種之臨床試驗研究團隊—

以民眾流感接種之抗體反應為模型

年度執行進度

97 年

月份	執行進度
1 月	與疾管局協商榮民受試者人數，申請人體計畫實驗審核。
2 月	目前所收集之血清可用於前後對照的共有 273 人，所完成的偵測數為：H1N1 77 件，H3N2 79 件，Flu B 79 件。測試抗原不足與 CDC 協調取得。
3 月	3 月 4 日與家醫科以及陽明大學公衛所召開共識會議。將疾管局提供的所有抗原全數進行 HI，目前所完成的偵測數：H1N1 222 件，H3N2 272 件，Flu B 185 件。
4 月	4 月 15 日參加 CDC 流感疫苗研發計畫會議並做第一期進度報告。檢送人體計畫實驗覆審資料。
5 月	通過人體試驗委員會 IRB 審核（編號：97-03-21A）。開始受試人員招募，目前已募集 10 位本年度參與研究之受試者。
6 月	繳交第二期進度報告，協調招募受試者榮民部份為 50 人。
7 月	7 月 9 日參加 CDC 流感疫苗研發計畫會議並做第二期進度報告。目前已募集 43 位(成人)、45 位(小兒)參與本年度研究之受試者。
8 月	7 月 29 日召開流感計畫第二次共識會議。預計在板榮招募榮民受試者 50 人，並對前往大陸榮民部份進一步問卷評估。
9 月	9 月 23 日收到流感疫苗成人組 250 劑，當天即展開流感疫苗施打，另 9 月 25 日收到流感疫苗兒童組 200 劑，自 9 月 25 日止施打人數：一般民眾 51 位，榮民 17 位，共計 68 位受試者。
10 月	10 月 22 日止施打人數為 227 位受試者，10 月 21 日收到疾病管制局血清疫苗研製中心寄來之疫苗病毒株。
11 月	11 月 25 日止已收到之受試者 454 個血清檢體，並完成去除紅血球交叉反應之前處理，另已完成之檢體抗體力價偵測數目為 H ₁ N ₁ 132 例，H ₃ N ₂ 175 例，Flu B 174 例。
12 月	12 月 11 日止已收到之受試者 491 個血清檢體，並完成去除紅血球交叉反應之前處理，另已完成之檢體抗體力價偵測數目為 H ₁ N ₁ 181 例，H ₃ N ₂ 224 例，Flu B 222 例。

附錄二：審查意見及回覆

計劃編號：DOH96-DC-1402

計劃名稱：建構我國流感病毒疫苗接種之臨床試驗研究團隊—以民眾流感接種之抗體反應為模型

致審查委員：

感謝委員對本計畫研究成果報告的指教，有關委員的指正部份，現一一回覆如下：

審查意見 1：

1. p.18 所述「HA 力價，該院與疾管局所附不盡相符」應檢討，以利後續類似計畫之進行。(97)
2. p.19 及 p.36 顯示 H1、H3 之 sero-conversion rate 小於標準，原因應檢討改善。(97)
3. 注射疫苗之後之臨床保護力為何是重要的課題，但礙於研究期限，未能有充分時間觀察，頗為可惜。可考慮要求補充報告。(97)
4. 對施打者追蹤成效評估之部份未見敘述，請補充。(97)
5. 收案人數 275 人，但完成二次血清收集者為 241 人，有 34 人未能完成，應說明。(97)
6. 建議於報告書中追加記載「本計劃經台北榮民總醫院人體試驗委員會 (IRB) 同意後實施」(本人相信應有經過 IRB 同意後才實施)。(97)
7. 應補述「接種何種疫苗、劑量、給藥途徑」。(97)
8. 施打疫苗之臨床保護效力 (clinical outcome) 是重要的 end point，以後類似的研究宜將此點列入分析，不只是觀察 immunogenicity。
9. p.9-10「材料與方法」中應補述本計劃經人體試驗委員會核准後實施。
10. 應補述注射何種疫苗、劑量、及注射途徑。

意見回覆 1：

1. 有關 HA 力價與原疾管局提供之力價有所出部分，經檢討可能在運送或病毒去活化處理過程使 HA 抗原之不穩定性增加而造成誤差加大，後續類似計畫將注意抗原之穩定性問題。
2. 有關 H₁、H₃ 血清轉換率 (Sero-conversion rate) 小於歐盟標準之問題，由於本計畫使用為當季流行株而非疫苗株，因此設若疫苗株與當季流行株之抗原性有差異時，未必能產生理想之血清轉換率，又因不同年齡之免疫反應力不同，血清轉換率也會有差異。
- 3.8 有關疫苗施打後之實際臨床保護力之追蹤觀察，礙於原實驗設計重點、研究時程及人力 (計畫已於 97 年 12 月 31 日終止且研究助理已離職)，不克進行長期追蹤，感謝委員指導，往後若有類似研究，會將此項列入 end point 進行追蹤。
4. 施打者追蹤部分，因計畫經費已終止，人員已離職後續追蹤有困難。
5. 部分未能完成二次血清收集之原因分析如圖 3，主要為受試者沒時間不願再提供二次血或父母親不願小孩再忍痛抽血等，基於尊重受試者意願，未再勉強抽血。

6.9 已於報告書相關部分加入「本計畫經台北榮民總醫院人體試驗委員會核准後實施」(97. P10)。

7.10 疫苗之品牌、劑量及給藥途徑已補述 (97. P17)。

審查意見 2：

97 年度進入研究計 275 名，研究報告繳交時稱二次血清收集 p.18 約為 241 人，研究個案資料顯示僅 230 人 (p.34 表二 65+87+78)，實際測試 229 人 (表四下最多為 65+86+78)。是否仍有未完成者？如抗原能再獲得是否能完成所有測試，使報告內容更完整

意見回覆 2：

由於歷年疫苗施打始於 9 月底至 10 月初，經採集施打後血清進行測試已近年底 (計畫於 97 年 12 月 31 日日終止，人事經費無法再動支)，因此時程甚為緊迫，部份檢體宥於抗原不足及人力不足，無法於結案報告前完成 (經檢討發現有二位幼兒年齡大於 5 歲而未列入分析，另有 9 位配對血因抗原及人力因素未及完成)，然對統計分析影響不大，因助理已離職，懇請委員准予結案。