

封面式樣

計畫編號：DOH88-TD-1082

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

系列使用非活性小兒麻痺疫苗與口服活性小兒麻痺疫苗之免
疫效果研究

研究報告

執行機構：台大醫學院小兒科

計畫主持人：李慶雲

研究人員：黃立民 高全良

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

Abstract

Poliomyelitis is still a major disease of childhood with possible permanent sequel of limb paralysis. As human is the only natural host of poliovirus, it is possible to eradicate poliomyelitis with an excellent vaccine. Taiwan has introduced oral live poliovirus vaccine (OPV) since 1974 and has achieved satisfactory control of this disease. However, live poliovirus vaccine has a major drawback, which is to cause vaccine-associated poliomyelitis. Inactivated poliovirus vaccine (IPV) can overcome the problem of vaccine-associated poliomyelitis, but can not offer herd immunity through the fecal spread of vaccine strain poliovirus. Hence, it is obvious that OPV and IPV are complementary and may be used sequentially to get the maximal benefits. This study was aimed to evaluate the immunologic effect of 2-dose IPV followed by 2-dose OPV in Taiwanese children. We have recruited 59 children into this trial; all of them received IPV at 2 months and 4 months of age, followed by OPV at 6 months and 18 months of age. The first two doses of IPV elicited few adverse reaction, either local or systemic. Before IPV inoculation, 20-40% of study subjects lacked antibody to at least one strain of poliovirus. All subjects developed antibodies to three strains of polioviruses after 2 doses of IPV. We have also collected stool samples from 20 subjects 1 week and 1 month after the 2nd dose of OPV. This is to realize whether vaccine strain poliovirus will be excreted from the stool to fortify the herd immunity.

Key words: poliovirus, vaccine, inactivated poliovirus vaccine, oral poliovirus vaccine

中文摘要

小兒麻痺會引起人類肢體永久性的麻痺現象，所以一直受到醫學界相當的重視。人類是小兒麻痺病毒的唯一天然宿主，所以只要使人類的病例不再發生，就有可能根絕這種疾病，這也是國內與全世界目前正在努力的目標。雖然疫苗可以有效地預防小兒麻痺，但是仍然不可以掉以輕心。國內在民國六十二年開始全面口服小兒麻痺疫苗，至今已達到相當的成果。但口服小兒麻痺疫苗也有其問題，尤其是會引起疫苗關聯性小兒麻痺最為人擔心。非活性小兒麻痺疫苗近年來也有大幅度改善，其性質與口服小兒麻痺疫苗有某種程度的互補。因此先使用非活性小兒麻痺疫苗再接著使用口服小兒麻痺疫苗有許多理論上的優點，一些初步的研究已在其他國家展開。本研究即是要在臺灣地區評估系列使用非活性及口服小兒麻痺疫苗國內三麻一風的免疫效果。本計畫已收集五十九名兒童，在二、四個月大時各接種一劑非活性小兒麻痺疫苗，在六及十八個月大時各接種一劑口服小兒麻痺疫苗，在二、六、七、十八及十九個月各抽血一次以了解這種系列疫苗接種的抗體產生狀況。由接種 DTP 及 IPV 疫苗後副作用看來全身性副作用看來均不會比只接種 DTP 更嚴重。而局部反應也很溫和，只有低比率產生紅腫痛等，而且程度都屬於較輕微者。前兩次血清檢體之抗體檢驗已完成，結果顯示接種 IPV 疫苗前有 20-40% 嬰兒不具至少一型小兒麻痺病毒中和抗體，而接種兩劑 IPV 疫苗後所有嬰兒均產生三型小兒麻痺病毒中和抗體。同時已有二十名兒童在十八個月服用口服小兒麻痺疫苗後一星期和一個月時做糞便培養，以了解小兒麻痺疫苗病毒是否會由腸道排出，加強群體免疫效果。

關鍵詞: 口服小兒麻痺疫苗，非活性小兒麻痺疫苗，免疫效果

小兒麻痺的流行以夏、秋兩季較常見，主要由糞便或鼻咽液傳染。引起小兒麻痺之病毒有第一、二、三共三型，彼此間無交叉免疫力，以第一型最易造成麻痺。四十多年前，小兒麻痺肆虐全球，每年造成數以萬計的麻痺病例。直到 1955 年非活性小兒麻痺疫苗(Inactivated poliovirus vaccine, 簡稱 IPV) 推出，才使小兒麻痺的發生率大幅降低，1962 年口服活性減毒疫苗 (Oral poliovirus vaccine, 簡稱 OPV) 問世後，由於全面預防接種及生活水準提高，此病很快地被控制下來。目前此病的流行主要見於第三世界國家，侵犯對象以幼兒為主 [1,2,3]。國內自 1967 年全面接種口服沙賓疫苗後，此病很快地被控制下來，從 1975 到 1981 年，每年呈報衛生署的病例不到九例。可惜好景不常，1982 年 5 月底至 10 月底，國內因普遍性的忽視了小兒麻痺口服疫苗，而造成了台灣地區有史以來最廣泛的小兒麻痺流行 [4,5]，呈報至衛生署的患者共有 1301 位，其中兩歲以下佔 63%，而送往做病毒培養者 46% 培養出小兒麻痺病毒第一型 [4]。如何加強國人的免疫力，早日根除小兒麻痺，是目前衛生署三麻一風防疫計劃的重點之一。

早期的 IPV 除了疫苗較昂貴，接種不方便外，對消化道的免疫效果也不理想，無法有效阻斷野生病毒的流行，而且幾年就需要追加劑量才能維持較好的保護效果。因此 OPV 問世後很快就取代 IPV，成為小兒麻痺疫苗的主流。OPV 接種容易，接種後很快產生永久免疫力，不僅可形成中和抗體 (neutralizing antibody)，同時也形成 IgA 抗體，對腸黏膜形成很好的保護力，有效阻斷野生病毒的散佈。此外，疫苗在接受者腸道內繁殖後，經由糞便或鼻咽液傳染給接觸者，無形中增加了族群的免疫力。美國、日本等已開發國家藉著全面接種 OPV 已經成功的把此病控制下來，本土病例中已無自然感染的病例，雖然陸陸續續有外來病例發生，但幾乎沒有造成續發病例，顯示 OPV 的接種已經對這些地區的民眾形成很好的保護力 [6]。然而，活性疫苗在繁殖時往往有突變的問題，OPV 也不例外。由於突變造成具有神經毒性(neurovirulence)的病毒增加，導致接受者或和其接觸者發生麻痺症狀，即所謂的疫苗關聯性的小兒麻痺(vaccine associated paralytic poliomyelitis, 簡稱 VAPP)。VAPP 的危險性大約每接種兩百六十萬劑有一例，尤其接種第一劑時，發生率高達五十二萬分之一。其中又以第三型、第二型造成的感染最常見 [6]。事實上 VAPP 已經成為美國等已開發國家本土病例的主要病因 [6]。此外，OPV 的禁忌症之一是免疫不全的患者，但多數患者在兩個月大接種第一劑 OPV 時都還不知道嬰兒有此問題，更增加了 VAPP 的危險性。除此以外，OPV 在某些開發中國家，尤其是熱帶地區，免疫效果不盡理想，可能與其他腸道病毒的干擾、母乳中的抗體、腸道內的抑制素等等有關 [7,8]，這些國家在併用 IPV 以後，才將小兒麻痺控制下來 [9,10]。

基於以上種種顧慮，有些歐洲國家如荷蘭、法國、丹麥、瑞典、芬蘭等全面採用 IPV 做全面預防接種。但丹麥 1961 年爆發小兒麻痺第一型的流行 [11]，芬蘭 1985 年爆發小兒麻痺第三型的流行 [12,13]，顯示單用 IPV 做全面預防接

種無法完全阻斷野生病毒的散佈。1988 年以色列爆發的流行更值得警惕：以色列因為使用 OPV 一直無法完全控制此病的流行，1982 年起全面採用強效 IPV (enhanced potency IPV, 簡稱 eIPV [14]，此種疫苗於 1978 年推出，無論在已開發國家或開發中國家，接種兩劑之後 99% 以上對三病毒型都可產生抗體)，不料 1988 年爆發第一型野生病毒的流行，受害者多在十五歲以上，且接種過三劑以上的 OPV，再次顯示單用非活性疫苗無法完全阻斷野生病毒的散佈，而嬰兒時期接種 OPV 也無法達到終生免疫的效果 [15]。因此，連續接種 IPV-OPV(sequential use of IPV and OPV) 的方法，已成為小兒麻痺防疫的世界趨勢 [16,17]。

採用連續接種 IPV-OPV 的方法可截長補短 [18]：IPV 形成的保護效果，不僅可保護中樞神經不受野生病毒的侵犯，也可減少活性疫苗病毒突變造成 VAPP 的危險。但它對腸道局部保護效果不理想，產生的免疫效果持續時間較短。OPV 則進一步增強免疫效果，產生持續較久的免疫力，而腸道內產生的 IgA 抗體，可有效阻斷野生病毒的散佈，進一步保護族群中未曾接種疫苗、或疫苗無效的人，達到大眾免疫 (herd immunity) 的效果 [18,19,20]。Faden 等人在紐約的研究指出，在二個月、四個月大時分別接種一劑 eIPV，十二個月大時再接種 OPV，對三型小兒麻痺病毒後追蹤血中抗體，90% 以上呈抗體陽性 [2,7,14]。值得注意的是，連續接種 IPV-OPV 的方法也有其潛在的危險。Ogra 等人的研究指出，接種過 IPV 的人再接種 OPV 後，散佈 (shedding) 復歸病毒 (virulent revertant virus) 的比例比只接種 OPV 的人高 [23]。此外，接種 OPV 的時間延後，嬰兒在接種 OPV 前，無法阻斷野生病毒的流傳，可能成為野生病毒散佈的來源。而 OPV 接受者因為先前接種過 IPV，接種 OPV 後排出疫苗病毒的量也大幅降低，原本藉著 OPV 接受者無形中傳佈疫苗病毒的效果也大打折扣。我們參考丹麥、以色列、加薩等國採用連續接種 IPV-OPV 成功的經驗，計劃以兩劑 eIPV 做原始免疫 (primary immunization)，再追加兩劑 OPV，希望藉此提高國人的免疫力，早日根除小兒麻痺。

材料與方法

1. 個案收集與疫苗接種時間表：收集50名兒童，按照下列疫苗接種時間表接種小兒麻痺疫苗，在二個月、六個月、七個月、十八個月、十九個月、三歲時各抽血一次，檢驗抗體：

年齡	二月	四月	六月	七月	十八月	十九月	三歲
IPV	✓	✓					
OPV			✓		✓		
抽血	✓		✓	✓	✓	✓	✓

所抽取的血液在當天即分離出血清，在做抗體檢驗之前，保存在攝氏零下二十度。

2. 疫苗禁忌：有以下病症而不能接種疫苗或因而延誤了原先所訂的接種日程者，排除在本研究之外：(1) 發高燒 (2) 免疫能力受損者 (包括親密接觸者) (3) 正使用腎上腺皮質素或抗癌藥物者 (4) 孕婦。

3. 抗體檢驗：採用中和抗體滴定法 (neutralization antibody titration) 檢驗中和性抗體，方法如下：

(1) 血清先在攝氏56度，30分鐘做去活化處理。

(2) 在微量滴定盤中，用含有10%胎牛血清的MEM(minimal essential media) 溶液將50微升的血清做兩倍的系列稀釋，在 plateshaker 上混合一分鐘。

(3) 各 well 中加入含有 100 TCID₅₀ 的 polio virus type 1,2,3，並做各病毒的 back titration (100 TCID₅₀, 10 TCID₅₀, 1 TCID₅₀, 1/10 TCID₅₀)，以 plate shaker 混合一分鐘。

(4) 在5%二氧化碳、攝氏37度的培養箱中靜置3小時，然後在攝氏4度的冰箱中做隔夜靜置。

- (5) 各 well 加入 50 微升含有 10% 胎牛血清的 MEM 溶液。
- (6) 各 well 加入 25 微升的 HEP-2 細胞懸浮液(濃度: 3×10^5 cell/ml), 並做無病毒的 cell control。
- (7) 置於 5% 二氧化碳、攝氏 37 度的培養箱中 48 小時。
- (8) 48 小時以後, 觀察 HEP-2 細胞有無細胞病變變化 (cytopathic effect)。可以中和病毒感染力達 50% 以上的血清最高稀釋倍數, 為測得的抗體效價。

3. 病毒培養及病毒株鑑定

研究兒童將會在第二劑口服小兒麻痺疫苗 (18 個月時) 後一星期及 28 天時各留一次大便做小兒麻痺病毒培養。若培養陽性, 先以抗體確定是何型的小兒麻痺病毒, 最後再以聚合酶鏈反應確定是否 Sabin 疫苗株[24]。原則上我們將採用 Yang et al. 使用的方法, 抽出病毒 RNA 後, 經過反錄酶反應後進行聚合酶鏈反應。使用的引子如下:

結果

在第一年裏我們一共收集了 55 個嬰兒，均已完成兩劑 IPV 注射及一劑 OPV 口服疫苗。並已在兩個月及六個月時各抽血一次以檢驗三型的小兒麻痺病毒抗体。由於前三劑疫苗都和白喉、百日咳、破傷風三合一疫苗 (DTP) 同時接種，因此無法判斷全身性副作用來自於 IPV 或 DTP，不過局部副作用則可確定是由何種疫苗所引起。由接種 DTP 及 IPV 疫苗後副作用看來全身性副作用看來均不會比只接種 DTP 更嚴重。而局部反應也很溫和，只有低比率產生紅腫痛等，而且程度都屬於較輕微者 (Table 1 and 2)。

目前前兩次血清檢體之抗体檢驗已完成，結果顯示接種 IPV 疫苗前有 20-40% 嬰兒不具至少一型小兒麻痺病毒中和抗体，而接種兩劑 IPV 疫苗後所有嬰兒均產生三型小兒麻痺病毒中和抗体。

爲了解兩劑 OPV 是否可引發細胞性免及腸道的黏膜免疫 (mucosal immunity)，十八與十九個月的血液檢體將會分離出其中淋巴球，利用小兒麻痺病毒刺激看是否會有 T 淋巴球增殖反應 (proliferation)。也將做細胞染色看是否會有 T 淋巴球內 TGF- β (transformation growth factor β)，以了解是否有 Th3 反應與黏膜免疫。

討論

Up to now, we have collected enough number of cases to study sequential use of IPV and OPV. All the 59 cases are proceeding according to protocol. From the profile of adverse reactions we are sure of the safety of IPV immunization. Local reactions due to IPV was very infrequent and mild (Table 2). As IPV was given together with DTP it is hard to get a good grasp of incidences of systemic reactions caused by IPV. However, it is obvious that IPV did not significantly increase the rate of systemic adverse reaction, compared with rates reported in previous studies.

So far, we have shown the safety of IPV followed by OPV. The results also showed that IPV is highly immunogenic and 2-doses IPV immunization is able to induce neutralizing antibodies to all the three types of polioviruses. The results of cellular immunity and mucosal immunity against poliovirus are still pending. After the completion of this project, we should be able to understand the immunogenicity of IPV-OPV sequential vaccination program in Taiwan children. The information should be valuable for the policy making.

結論

接種兩劑 IPV 疫苗後所有嬰兒均產生三型小兒麻痺病毒中和抗体

建議

宜繼續研究 IPV-OPV 系列接種的免疫效果，以了解是否可在台灣推廣

References

1. Wright PF, Kim-Farley RJ, de Quadros CA, et al. Strategies for the global eradication of poliomyelitis by the year 2000. *NEJM* 325 (25): 1774-9, 1991.
2. Melnick JL. Poliomyelitis: Eradication in sight. *Epidemiol Infect* 108:1-18, 1992.
3. Plotkin SA and Mortimer EA. *Vaccines*. 2nd ed. 1994.
4. Kim-Farley RJ, Rutherford G, Lichfield P, Hsu T, et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis, Taiwan. *Lancet* 8: 1322-4, 1984.
5. Jacob TJ. Poliomyelitis in Taiwan: lessons for developing countries. *Lancet* I: 872-3. 1985.
6. Strebel PM, Sutter RW, Cochi SL, et al. Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus associated disease. *Clinic Infect Dis* 14: 568-79, 1992.
7. Domok I, Balayan MS, Fayinka OA, et al. Factors affecting the efficacy of live poliovirus vaccines in warm climates. *Bull World Health Organ* 51: 333-47, 1974.
8. Patriarca PA, Wright PF, Jacob JT. Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine in developing countries: Review. *Rev Infect Dis* 13: 926-39, 1991.
9. Tulchinsky T, Abed Y, Shaheen S, et al. A ten-year experience in control of poliomyelitis through a combination of live and killed vaccines in two developing areas. *Am J Public Hlth* 79: 1648-52, 1989.
10. Lasch EE, Abed Y, Abdulla K, et al. Successful results of a program combining live and inactivated poliovirus vaccines to control poliomyelitis in Gaza. *Rev Infect Dis* 6 (Suppl. 2): S467-70, 1984.
11. von Magnus H, Petersen I. Vaccination with inactivated poliovirus vaccine and oral poliovirus vaccine in Danmark. *Rev Infect Dis* 6 (Suppl. 2): S471-4, 1984.
12. Leinikki PO, Pasternack A, Mustonen J, et al. Paralytic poliomyelitis in Finland. *Lancet* ii: 507, 1985.
13. Hovi T, Huovilainen A, Kuronen T, et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: Widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet* I:1427-32, 1986.

14. Simoes EAF, Padmini B, Steinhoff MC, et al. Antibody response of infants to two doses of inactivated poliovirus vaccine of enhanced potency. *Am J Dis Child* 139: 977-80, 1985.
15. Slater PE, Orenstein WA, Morag A, et al. Poliomyelitis outbreak in Israel in 1988: a report with two commentaries. *Lancet* 335:1192-8, 1990.
16. Hull HF, Lee JW. Sabib, Salk, or sequential? *Lancet* 247:630, 1996.
17. Faden H. Poliovirus vaccination: A Trilogy. *J Infect Dis* 168: 25-8, 1993.
18. McBean AM, Modlin JF. Rationale for the sequential use of inactivated poliovirus vaccine and live attenuated poliovirus vaccine for routine poliomyelitis immunization in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 6: 881-7, 1987.
19. Modlin JF. Mucosal immunity following oral poliovirus vaccine and potency inactivated poliovirus vaccine immunization. *Pediatr Infect Dis J* 10: 976-8, 1991.
20. Plotkin SA. Current issues in evaluating the efficacy of oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine immunization. *Pediatr Infect Dis J* 10:979-81, 1991.
21. Faden H, Modlin JF, Thoms ML, et al. Comparative evaluation of immunization with live attenuated and enhanced-potency inactivated trivalent poliovirus vaccines in children: systemic and local immune responses. *J Infect Dis* 162: 1291-7, 1990.
22. Faden H. Results of a clinical study of polio vaccine: the Buffalo experience. *Pediatr Infect Dis J* 10: 973-5, 1991.
23. Ogra PL, Faden HS, Abraham R, et al. Effect of prior immunity on the shedding of virulent revertant virus in feces after oral immunization with live attenuated poliovirus vaccines. *J Infect Dis* 164:191-4, 1991.
24. Yang CF, De L, Holloway BP, Pallansch MA, Kew OM. Detection and identification of vaccine-related poliovirus by the polymerase chain reaction. *Virus Res* 1991;20:159-79.

Table 1. Systemic reactions after IPV and DTP vaccination

	Dose 1 (N=59)	Dose 2 (N=59)
Irritability	19	6
Anorexia	16	5
Sleepiness	6	2
Vomiting	0	0
Crying	4	0

Table 2. Local reactions after IPV vaccination

	Dose 1 (N=59)	Dose 2 (N=59)
Pain		
grade 1	4	0
grade 2	0	0
total	4	0
Erythema		
grade 1	1	0
grade 2	0	0
total	1	0
Induration		
grade 1	6	0
grade 2	1	0
total	7	0