

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

計畫名稱

大學生疫苗株及野生株日本腦炎中和抗體含量之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNHN93-04

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

計畫主持人：邱淑媛

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

中華民國 93 年 12 月 31 日

計畫編號：CNHN93-04

計畫名稱：大學生疫苗株及野生株日本腦炎中和抗體含量之研究

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學保健營養系

計畫主持人：邱淑媛

中文摘要

日本腦炎是台灣地區重要的病毒性腦炎之一。本研究以學生為對象，採用溶斑減少中和抗體試驗法進行日本腦炎中和抗體檢測，比較對疫苗中山株抗體呈陽性或陰性個體對疫苗北京株及台灣野外株病毒的中和抗體陽性率，以及北京株抗體呈陽性或陰性個體對台灣野外株病毒的中和抗體陽性率。結果顯示疫苗北京株的中和抗體陽性率較疫苗中山株的中和抗體陽性率更能確實反應個體對野生病毒的中和能力。

Abstract

Japanese encephalitis (JE) is one of the most important encephalitis in Taiwan. This project was to compare seropositive rates of neutralizing antibodies against two JE vaccine strains (Nakayama and Beijing) and Taiwan local JEV strains among college students by plaque reduction neutralization tests. The results indicated that seropositivity against vaccine Beijing strain was the better index than seropositivity against vaccine Nakayama strain to reflect the capability of individuals to neutralize wild Taiwan JEV isolates.

前言

日本腦炎是台灣地區重要的病毒性腦炎之一，病毒由蚊子傳播，每年

的五至十月是流行季節 (Chang, 2002)，病原為黃質病毒屬的 RNA 病毒，可藉由預防接種有效降低感染人數 (Hoke et al., 1988; Gambel et al., 1995)。

台灣地區日本腦炎早期是地區性疾病，民國 57 年之後開始實施預防接種之後即有效降低感染人數。近年來日本腦炎的發生已屬於散發型，平均每年確定病例數約為 30 個 (衛生署統計資料; 黃等 1996; Wu et al., 1999)，但確定病例中卻不乏已完成疫苗接種的年輕人，其中 20~29 歲間的年輕人約佔三分之一 (衛生署統計資料)。

在市場上，人用的日本腦炎疫苗分為中山株、北京株兩種死毒疫苗；及近年來中國研發之 SA-14-4-2 活毒減毒疫苗三種。台灣地區僅使用過中山株與北京株兩種死毒疫苗。中山株為主要使用之疫苗，北京株在 1989-1991 年之間國內曾經短暫使用過 (林, 1996)，但具有較中山株好的中和抗體誘發能力 (洪等, 1994; Ku et al., 1994; Nimmannitya et al., 1995; 許等, 1997)。

日本腦炎疫苗所誘發的抗體，對於同株日本腦炎病毒的保護力優於對抗異株日本腦炎病毒，因此可藉由偵測對不同疫苗株的中和能例加以分辨預防接種時係接受何種疫苗。由於日本腦炎疫苗所誘發的中和抗體含量會隨時間增加而衰退 (張與曾, 1992; Wu et al., 1999; Kurane et al, 2000)，根據日本腦炎預防接種的時程，最後一劑疫苗在小學一年級時施打，距離大學時期已達十年以上，日本腦炎中和抗體

在大學生體內的保護力是否足夠，非常值得注意。最近南台灣地區不同年齡層居民的日本腦炎中和抗體含量以三十歲左右年齡層最低(曾, 2000)，更說明了解該年齡層抗體含量，特別是較少暴露於自染感染中的族群例如學生的必要性。

本研究室過去已根據野外豬的日本腦炎盛行率(Chang, 2002)，選定居住於日本腦炎盛行率高與低不同的地區，以學生為對象，建立中山株中和抗體含量的基本資料(邱, 2003)，但因中山株與野外株抗體陽性率的顯著落差，本研究更進一步將研究對象區分為具備或不具備對中山株的中和能力，再對北京株及本土野生株病毒的中和能力進行比較。

材料與方法

血液樣本

公開徵求 19-22 歲大學生為受試者，限定參加人員居住地為台北市、苗栗縣、南投縣或台南縣。抽血 3 mL，血液於室溫下放置一小時，以 3,000 rpm 轉速離心 10 分鐘，收集血清，-80°C 保存。

中和抗體效價測定

以「溶斑減少中和抗體試驗法(plaque reduction neutralization test, PRNT)」進行(Russell et al., 1967)。測定前兩天先將 BHK-21 細胞懸浮為 5×10^6 /mL 濃度，置於 12 孔細胞培養盤中，以含有 10% 胎牛血清與 1% 抗生素之 MEM 培養基於 37°C、5% CO₂ 下培養。受測血清先於 56°C 去補體 30 分鐘，再於 96 孔盤中以含有 5% 胎牛血清之 PBS 做 10、20、40、80、160、320 倍(或視需要再提高倍數)稀釋。

以含有 5% 胎牛血清之 PBS 做 negative control，以已知抗體效價之血清做 positive control。將稀釋之血清或控制組與日本腦炎病毒(中山株、北京株或野生株 CJN, TN207 (Liu, 2000) 或 CH1392 (Jan et al., 2000)) 做 1:1 的混合，進行中和反應，再將病毒與血清混合液加入兩天前預先培養於 12 孔盤之 BHK-21 細胞上進行吸附，每個濃度的稀釋血清做 2 重複。經病毒吸附之 BHK-21 細胞以含有 1% 甲基纖維素、2% 胎牛血清與 1% 抗生素之 MEM 培養基培養 72 小時，以結晶紫染色，計算溶斑數目。以可使溶斑減少 70% 或以上的血清稀釋濃度作為樣品(個體)的抗體效價，抗體效價大於或等於 10 的個體視為中和抗體陽性，抗體效價小於 10 的個體視為中和抗體陰性。

數據分析

使用 S-PLUS 軟體運算，以 chi-square test 進行顯著性檢定，以 $p < 0.05$ 作為顯著的標準。

結果

疫苗中山株(Nakayama)中和抗體與疫苗北京株中和抗體之關係

在疫苗中山株抗體陰性的個體中，95.1% (78/82) 對北京株呈抗體陰性，4.9% (4/82) 對北京株呈抗體陽性。在中山株抗體陽性個體中，66.7% (132/198) 呈北京株抗體陽性，33.3% (66/198) 呈北京株抗體陰性。相對地，在疫苗北京株中和抗體陽性個體中，高達 97.1% (132/136) 具有中山株中和抗體，僅有 2.9% (4/136) 不具有中山株中和抗體，而在疫苗北京株中和

抗體陰性個體中，有 54.2% (78/144) 不具有中山株中和抗體，但有 45.8% (66/144) 具有中山株中和抗體 (Table 1)。

疫苗中山株(Nakayama)中和抗體與野生株中和抗體之關係

在疫苗中山株抗體陰性的個體中，2.4% (2/82) 對野生株 CJN 抗體呈陽性，1.2% (1/82) 對野生株 TN207 抗體呈陽性，無任何個體對 CH1392 株成抗體陽性。相對地，51.5% (101/198) 對野生株 CJN 抗體呈陽性，37.9% (75/198) 對野生株 TN207 抗體呈陽性，42.9% (85/198) 對 CH1392 株呈現抗體陽性 (Table 2)。在中山株抗體陽性 (男性 39.4%，女性 60.6%) 與中山株抗體陰性 (男性 42.7%，女性 57.3%) 的族群中，男性與女性的比例相當 ($p=0.6112$)。

疫苗北京株(Beijing)中和抗體與野生株中和抗體之關係

在疫苗北京株抗體陰性的個體中，8.3% (12/144) 對野生株 CJN 抗體呈陽性，1.4% (2/144) 對野生株 TN207 抗體呈陽性，0.7% (1/144) 對 CH1392 株呈抗體陽性。相對地，在北京株抗體陽性個體中，67.4% (91/135) 對野生株 CJN 抗體呈陽性，54.8% (74/135) 對野生株 TN207 抗體呈陽性，62.2% (84/135) 對 CH1392 株呈現抗體陽性 (Table 1)。在北京株抗體陽性 (男性 39.0%，女性 61.0%) 與抗體陰性 (男性 41.7%，女性 58.3%) 的族群中，與中山株抗體陽性或陰性的情況類似，男性與女性的比例相當 ($p=0.647$)。

野生株中和抗體與疫苗株(Nakayama)中和抗體之關係

在 132 名對兩株疫苗株中和抗體均呈陽性的個體，總計有 44.7% (59 名) 對三株野生病毒都具有中和抗體 (而對三株野外病毒均具抗體的所有個體即為這 59 名)。另有 22.0% (29 名) 對兩株疫苗株均具抗體的受試者可中和三株野外病毒的其中兩株，有 10.6% (14 名) 可中和三株野外病毒的其中一株，另有 22.7% (30 名) 完全無法中和任一株測試的野生病毒。在 136 名對北京株疫苗中和抗體呈陽性的個體，總計有 43.4% (59 名) 對三株野生病毒都具有中和抗體 (，有 20.6% (28 名) 對兩株疫苗株均具抗體的受試者可中和三株野外病毒的其中兩株，有 11.8% (16 名) 可中和三株野外病毒的其中一株，另有 24.3% (33 名) 完全無法中和任一株測試的野生病毒。在 198 名對中山株疫苗中和抗體呈陽性的個體，總計有 29.8% (59 名) 對三株野生病毒都具有中和抗體，有 15.2% (30 名) 對兩株疫苗株均具抗體的受試者可中和三株野外病毒的其中兩株，有 12.1% (24 名) 可中和三株野外病毒的其中一株，另有 42.5% (85 名) 完全無法中和任一株測試的野生病毒 (Table 3)。

討 論

北京株中和抗體陽性者對中山株病毒保護率為 97.1% (132/136)，相對地中山株抗體陽性者對北京株之保護率為 66.7% (132/198)，兩者比例懸殊 (Table 1)，反應出中山株疫苗在研究族群中較廣泛被使用的事實。然而有鑒於野外病毒株與疫苗株的抗原差異，加上免疫記憶作用，在進行中和抗體力價檢測時使用中山株為材料是否足以忠實反應個體或族群對野外日

本腦炎病毒的免疫狀況，是很值得探討的事。由於台灣地區一直都以中山株為主要的疫苗株，另一疫苗株北京株只曾經短時期被使用，因此較不易產生抗原記憶性的困擾。本研究結果顯示中山株中和抗體陽性族群，對於三株測試的野外病毒中和能力分別都低於北京株中和抗體陽性的族群

(Table 2)，至於對野外株中和能力的呈現方面，「北京株抗體陽性」或「北京株及中山株抗體皆為陽性」個體對任一株或三株測試的野外株的涵蓋性相當，且遠較以「中山株抗體陽性」進行評估更能反應個體對野外病毒的中和能力 (Table 3)。以上研究結果顯示北京株比中山株更適合採用於進行中和抗體含量評估，以預測個體是否對野生病毒具有中和能力。

參考文獻

- Chang KJ. 2002. Seasonal prevalence of anti-Japanese encephalitis virus antibody in pigs in different regions of Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 35:12-16.
- Gambel JM, DeFraités R, Hoke C, Jr Brown A, Sanchez J, Karabatsos N, Tsai T, Meschievitz C. 1995. Japanese encephalitis vaccine: persistence of antibody up to 3 years after a three-dosage primary series. *J Infect Dis* 171: 1074.
- Hoke CH, Nisalak A, Sangawhipa N, Jatanasen S, Laorakapongse T, Innis BL, Kotchasenne SO, Gingrich JB, Latendresse J, Fukai K, Burke DS. 1988. Protection against Japanese encephalitis by inactivated vaccines. *N Engl J Med* 319:608-614.
- Jan LR, Yueh YY, Wu YC, Horng CB, Wang GR. 2000. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 62(4):446-452.
- Ku CC, King CC, C. Y. Lin CY, Hsu HC, Chen LT, Yueh YY, Chang GJ. 1994. Homologous and heterologous neutralization antibody responses after immunization with Japanese encephalitis vaccine among Taiwan children. *J Virol* 44:122-131.
- Kurane I, Takasaki T. 2000. Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine* 18(Suppl 2):33-35.
- Liu JL. 2000. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus genome. Master Thesis, Institute of Epidemiology, College of Public Health, National Taiwan University.
- Nimmannitya S, Hutamai S, Kalayanaroj S, Rojanasuphot S. 1995. A field study on Nakayama and Beijing strains of Japanese encephalitis vaccines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 26:689-693.
- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. 1967. A plaque reduction test for dengue virus neutralization antibodies. *J Immunol* 99(2):285-290.
- Shyu WR, Wang YC, Chin C, Chen WJ. 1997. Assessment of neutralizing antibodies elicited by a vaccine (Nakayama) strain of Japanese encephalitis virus in Taiwan. *Epidemiol Infect* 119:79-83.
- Wu YC, Huang YS, Chien LJ, Lin TL, Yueh YY, Tseng WL, Chang KJ, Wang GR. 1999. The epidemiology of Japanese encephalitis on Taiwan during 1966-1997. *Am J Trop Med Hyg* 61:78-84.

- 林上青。台灣地區不同生態環境國小學童與社區居民的日本腦炎病毒中和抗體血清流行病學研究。台灣大學公共衛生研究所碩士論文。1995。
- 邱淑媛。2003。台灣大專生接受四劑日本腦炎疫苗後產生的病毒中和抗體含量之研究。行政院衛生署研究計劃成果報告 (DOH92-DC-1021)。
- 洪其璧、陳寶輝、林勝育等。日本腦炎預防接種與中和抗體反應之關係調查研究。行政院衛生署預防醫學研究所研究年報。1994;9:24-30。
- 張國井、曾燦璋。1992。台灣地區日本腦炎血清流行病學之研究 (1989年1月~1991年12月)。中華微免雜誌 25:25-37。
- 許麗卿、吳盈昌、林雪蓉、金傳春、何美鄉、盧志葑、許須美、陳國東、洪其璧。1997。台灣北中南東四區山地和平鄉 3-6 歲兒童日本腦炎病毒感染的血清流行病學研究。中華微免雜誌 30:194-206。
- 曾泓富。2000。日本腦炎高危險地區居民血清流行病學研究及流行預測。行政院衛生署研究計劃報告 (DOH89-TD-1008)。
- 黃柏榮、黃耀雄、吳炳輝、吳盈昌、陳國東。1996。日本腦炎病例後遺症調查調查報告。疫情報導 12:35。



Table 1. Distribution of seropositivity of study population according to the responses against vaccine Nakayama strain and vaccine Beijing strain

Seropositivity	Number of individuals		
	N ⁺	N ⁻	Subtotal
B ⁺	132	4	136
B ⁻	66	78	144
Subtotal	198	82	280

A neutralization serotiter 10 and a 70% reduction of plaque numbers in neutralization test was defined as seropositive.

N+, N-, B+ and B- represented seropositively and seronegatively against Nakayama strain and Beijing strain, respectively.

Table 2. Comparison on seropositive rate against JEV wild isolates among college students according to their seropositivity response against two JE vaccine strains--Nakayama and Beijing.

JE wild strains	Seropositive rate % against JE wild strains	
	Nakayama seropositive persons	Beijing seropositive persons
CH1392	42.9% (85/198)	62.2% (84/135)
CJN	51.5% (101/198)	67.4% (91/135)
TN207	37.9% (75/198)	54.8% (74/135)

A neutralization serotiter 10 and a 70% reduction of plaque numbers in neutralization test was defined as seropositive.

JEV wild type isolates: CJN, from human brain in 1998; TN207, from mosquito in 2000; CH1392, from mosquito in 1990.

Table 3. Seropositive rate against JEV wild isolates among college students seropositively against Nakayama or Beijing vaccine strain

Number of wild strain with seropositive response	Seropositive rate % (number of individuals) against wild JEV strains among		
	Nakayama seropositive persons	Beijing seropositive persons	Both Nakayama and Beijing seropositive persons
3	29.8% (59)	43.4% (59)	44.7% (59)
2	15.2% (30)	20.6% (28)	22.0% (29)
1	12.1% (24)	11.8% (16)	10.6% (14)
0	42.5% (85)	24.3% (33)	22.7% (30)

A neutralization serotiter 10 and a 70% reduction of plaque numbers in neutralization test was defined as seropositive.

JEV wild type isolates: CJN, from human brain in 1998; TN207, from mosquito in 2000; CH1392, from mosquito in 1990.