

## 精制甲型肝炎灭活疫苗(YN5 株) 猴试验安全性和免疫原性

马波<sup>1</sup> 胡彩珍<sup>2</sup> 何丽芳<sup>1</sup> 黄果勇<sup>1</sup> 练幼辉<sup>1</sup> 王馨<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 检测精制甲型肝炎灭活疫苗的安全性和免疫原性。方法 甲型肝炎病毒 YN-5 株经 Vero 细胞培养制成精制甲型肝炎灭活疫苗。采用普通狨猴(common marmoset)进行疫苗的安全性、免疫原性和保护力试验。结果 实验疫苗组和对照疫苗组狨猴均有特异抗体产生,对甲型肝炎病毒强毒株的攻击亦有保护作用。结论 该疫苗(YN-5 株)有良好的安全性和免疫原性。

**【关键词】** 普通狨猴;甲型肝炎灭活疫苗;安全性;免疫原性

## Immunogenicity and Safety of Purified Inactivated Hepatitis A Vaccine(YN5 Strain) in Common Marmosets

MA Bo, HU Cai-zhen, HE Li-fang, et al(*Yunnan Wosen Biotech Co., Ltd, Kunming 650033*)

**【Abstract】 Objective** To study the immunogenicity and safety of purified inactivated hepatitis A (HA) vaccine. **Methods** Prepare purified inactivated HA vaccine by the culture of YN5 strain in Vero cells and test for immunogenicity and safety in common marmosets, using imported HA vaccine as control. **Results** Specific HA antibodies were induced in both test and control groups. The vaccine showed protective effect on the marmosets challenged with virulent HA virus strain. **Conclusion** The HA vaccine prepared with YN5 strain showed good safety and immunogenicity.

**【Key words】** Common marmoset; Inactivated HA vaccine; Safety; Immunogenicity

甲型肝炎是我国一种常见的传染病,给人民健康和经济建设带来严重影响。由于我国政府的重视和支持,近年来已研制出甲肝减毒活疫苗并在全中国大规模地使用,取得良好的预防效果。但减毒活疫苗热稳定性较差,存在着毒力返祖和次传播的问题,因此,甲肝灭活疫苗的生产 and 应用日渐受到人们的重视。

最近,云南沃森生物技术有限公司陈尔佳、马波等应用 Vero 细胞适应出一株甲肝病毒 YN5 株,并根据 WHO 的甲肝灭活疫苗生产检定规程初步制备出精制的甲肝灭活疫苗。为验证该疫苗的安全性、免疫原性和保护效果,我们应用普通狨猴(Common Marmoset)进行试验研究,现将结果报告如下。

### 材料与方法

基金项目:国家高技术研究发展专项经费资助项目(2002AA2Z3313),云南省科技计划资助项目(2001XY01)。

作者单位:1 云南沃森生物技术有限公司(昆明 650033);2 广西壮族自治区疾病预防控制中心(南宁 530021)。

作者简介:马波(1973~),男,主管技师,主要从事病毒性疫苗的研制开发。

### 1. 疫苗

精制甲肝灭活疫苗系用 HAV YN5 株 P23 代毒种在 Vero 细胞上采用转瓶培养生产的病毒液<sup>[1]</sup>,经冻超、氯仿抽提、超滤浓缩、柱层析纯化、0.22 μm 过滤除菌、1:4 000 福尔马林灭活及氢氧化铝吸附而成(批号 200102)。每 ml 含 1 600 EU 抗原,经物理外观检查、装量测定、无菌试验、异常毒性试验、内毒素含量测定、Vero 细胞 DNA 残留量测定、鉴别试验、小鼠效力试验、pH 测定、游离甲醛含量测定、Al(OH)<sub>3</sub> 含量测定、2-苯氧乙醇含量测定及残余牛血清含量等项目检测均合格<sup>[2]</sup>。

Merck 苗为 Merck & Co Inc. USA. 产品,50 U/支(成人剂量),批号 B4246。

### 2. HAV 强毒株——Han Z. D. 株

系自 2002 年昆明医院传染病科提供的甲型肝炎急性期病人粪便,制成 20% (w/v) 的悬液(经免疫电镜、ELISA、IFA、中和试验等证实 HAV 阳性),经活性炭吸附、离心等处理后收集上清作为接种物<sup>[3]</sup>。

### 3. 实验动物

1~4 岁的普通狨猴,体重 250~400 g,抗-HAV

阴性,丙氨酸转氨酶(ALT)、草氨酸转氨酶(AST)等肝脏酶活性均属正常者,随机分组。该动物为天津医科大学实验动物科学部提供的甲肝病毒易感动物<sup>[3,4]</sup>。

#### 4. 检测项目

实验动物于 8 周内每周和 16 周内每隔 1 周定期空腹采血,检测血清抗-HAV 和肝功酶活性,接种疫苗及强毒株攻击后每 8 天起 4 周内每 2 天和 4 周后每周收集大便 1 次,进行细胞培养分离或直接 ELISA 检测病毒,于免疫及强毒攻击 0、4、8 后周进行肝穿。免疫后第 9 周实验疫苗肌肉注射 800 EU/0.5 ml(2 只),1 600 EU/ml(2 只),Merck 苗(1 只)以及阴性对照(2 只),同时用 HAV 强毒株-Han. Z. D. 株攻击作保护性试验。

采用四川迈克科技有限公司生产的诊断试剂盒测定 ALT 和 AST 酶活性( $\mu$ L);北京万泰生物药业

有限公司生产的抗体酶标诊断试剂盒检测血清 HAV 总抗体;肝组织病理学检查,以常规石蜡切片,HE 染色,光镜检查。

## 结 果

### 1. 疫苗的安全性和免疫原性

9 只狨猴分别于臀部肌肉接种不同剂量(800 EU/ml)实验疫苗和 Merck 疫苗(50 U/ml)以及疫苗稀释剂(阴性对照组)。9 只狨猴肝功能酶活性除个别有一过性升高外,均在正常范围内,肝穿刺组织病理学检查无异常变化,粪便中未发现有 HAV 排出,除阴性对照组 2 只动物外,疫苗组 7 只动物抗-HAV 均在免疫后第 2 周阳转,抗体效价 9~10 周达到高峰,滴度在 1:256~1:1 024 之间,接种 800 EU/0.5 ml 和 1 600 EU/ml 实验苗与 Merck 苗之间,抗体水平差异无显著意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 精制甲型肝炎灭活疫苗接种狨猴的免疫原性和安全性试验

Tab 1. Immunogenicity and safety of inactivated HA vaccine in marmosets

Vaccine	Dose(EU)	No. of animal	Anti-HAV(week)		Serum enzyme elevation(week)		HAV shedding in stool	Histopathological change in liver
			Positive conversion	Highest titer	ALT	AST		
Experimental	800	M160	2	1:256(9-16)	-	-	-	-
		M170	2	1:256(10)	-	-	-	-
		F192	2	1:256(10)	-	-	-	-
	1 600	M154	2	1:256(9-16)	-	-	-	-
		M176	2	1:1024(10)	-	-	-	-
		M179	2	1:256(9-16)	-	-	-	-
Merck	50(U)	M177	2	1:256(10)	4	-	-	-
Control		M180	-	-	-	-	-	-
		M182	-	-	4	-	-	-

### 2. 疫苗的保护力

免疫第 9 周,抗体效价达高峰时,用 Han Z. D. 株攻击,结果实验疫苗和 Merck 苗免疫的 5 只狨猴除抗-HAV 水平有所升高外,仅个别有 ALT 一过性升高,其他各项肝功酶指标均在正常范围,表明接种疫苗的 5 只狨猴均得到保护。相反,阴性对照组 2 只狨猴诱生的抗体水平与实验组相近,除产生高效

价抗体(1:4 096~1:16 384)外,肝功酶均连续出现异常升高,攻击后第 4 周起出现不同程度的肝组织病理改变,见表 2。接种实验疫苗的 2 只狨猴(M154 和 M160)抗 HAV 水平 8~16 周均维持在 1:256,见表 1。表明实验疫苗与 Merck 苗一样具有可靠的安全性和良好的免疫原性,接种该疫苗的正常狨猴,能抵抗强毒株的攻击。

表 2 精制甲型肝炎灭活疫苗的猕猴保护力试验  
Tab 2. Protective effect of inactivated HA vaccine on marmosets

Vaccine	No. of animal	Anti-HAV(week)	Serum enzyme elevation(week)		HAV shedding in stool	Histo pothological change in liver
			ALT	AST		
Experimental	M170	256/4 096(8) <sup>Δ</sup>	-	-	-	-
	F192	256/4 096(8)	6	-	-	-
	M176	256/4 096(8)	-	-	-	-
	M179	256/16 384(8)	-	-	-	-
Merck	M177	256/4 096(8)	2	-	-	-
Control	M180	0/16 384(8)	4,5,10	2,4,5,6	+	++
	M182	0/4 096(8)	1,2,4,8,10	2,8	+	++

Δbefore challenge/after challenge

## 讨 论

甲型肝炎病毒 YN5 毒株疫苗接种的 6 只猕猴与 Merck 苗接种的 1 只猕猴均在接种后 2 周出现抗-HAV, 9~10 周抗体滴度达 1:256~1:1 024, 肝活检未见病理改变, 说明该疫苗与 Merck 苗一样具有可靠的安全性和良好的免疫原性。两种疫苗均能抵抗野毒株的攻击与 Provost<sup>[4]</sup>、陈统球<sup>[5]</sup> 和李成明等<sup>[6]</sup> 报道的结果相一致。阴性对照组 2 只普通猕猴经甲肝野毒株攻击后出现明显的临床肝炎指征, 其抗体滴度在 1:4 096~1:16 384, ALT 和 AST 连续出现异常升高, 肝脏组织学明显改变, 与练幼辉等<sup>[3]</sup> 报告的结果相似, 证明甲肝病毒 Han Z. D. 株有致病性, 可作甲型肝炎病毒野毒攻击使用。

## 参 考 文 献

- [1] Ashok KS, Robert J P, Sung H L, et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine*, 2001, 19:4557-4565.
- [2] 中华人民共和国药典, 2000. 19:1097.
- [3] 练幼辉, 曹逸云, 黄小琴, 等. 甲型肝炎病毒动物模型研究. *现代预防医学*, 1997, 24(3):303~305.
- [4] Provost PJ, Banker FS, Wade WA, et al. Further evaluation of a live hepatitis A vaccine in marmosets. *J Med Viral*, 1991, 34:227-231.
- [5] 陈统球, 曹逸云, 董德祥, 等. 甲型肝炎灭活疫苗安全性和免疫原性初步观察. *中华微生物和免疫杂志(生物制品专辑)*, 1990, 30~36.
- [6] 李成明, 陈江婷, 万宗举, 等. 甲型肝炎灭活疫苗免疫原性的猴体试验. *中国生物制品学杂志*, 1999, 12(4):221~224.
- [7] Dong D, Lian YH, Chen T, et al. The trial preparation of attenuated live hepatitis A vaccine. *Proc CAMS and PUMS*, 1988, 3(4):199-202.

(收稿日期:2003-06-04, 修回日期:2003-06-30)

## 《环境与职业医学》(原《劳动医学》)杂志 2004 年征订通知

《环境与职业医学》杂志,原名《劳动医学》杂志,创刊于 1984 年,是中华预防医学会系列杂志优秀一等奖期刊,系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办,上海市预防医学研究院、华东区域劳动卫生职业病防治中心协办、国内外公开发行的专业学术期刊(ISSN1006-3617, CN31-1879/R)。编委会由国内 71 名专家、教授(62%为博导、硕导)和来自美、德、日、加、瑞典等国的 14 名国际著名专家组成。自 1996 年至今连续二次均被评为中国预防医学、卫生学类核心期刊,2001 年起被评为中国生物医学核心期刊。是美国 CA 和国内六大科技数据库的来源期刊。刊载内容主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作、环境危害因素及其治理,以及有关环境卫生学研究的学术动态、科研成果和实践经验。包括生态环境、环境毒理、职业病临床、劳动卫生调查、检测技术、化学中毒救援、职业卫生管理、作业环境治理、职防实践、工作环境、环境卫生、环境与健康等方面的论著、述评、综述、讲座、译文、文摘、短篇

报道等。可供广大职业病防治、劳动安全、劳动卫生与环境保护、卫生监督、疾病控制及卫生防疫部门人员、医学院校教学、科研人员参考及图书馆阅览,欢迎订阅。

本刊为双月刊,大 16 开,80 页,每双月 26 日出版,全年定价 54 元(含包装及邮资)。由邮局及自办结合发行,本刊邮发代号:4-568,邮局可办理 2004 年征订工作,编辑部亦随时接受征订,已出版的各期亦可一次补齐。欢迎就近邮局办理订阅,亦可填写本网站的征订单直接订阅。

汇款方式:① 银行汇款:上海市预防医学会;帐号:106178-00304003265;开户:光大银行上海分行长宁支行。

② 邮局汇款:上海市闸北区中兴路 1105 号《环境与职业医学》杂志编辑部,邮编 200070。联系电话:(021)56636600-140,138,137; 传真:(021)56970644; 联系人:忻霞萍,陈凤珍。网址:<http://ldyx.chinajournal.net.cn> Email:[ldyxzz@online.sh.cn](mailto:ldyxzz@online.sh.cn); [hizyxx@online.sh.cn](mailto:hizyxx@online.sh.cn) [zazhi@scdc.sh.cn](mailto:zazhi@scdc.sh.cn)