

精制 Vero 细胞狂犬病疫苗的研制及免疫学效果观察

于伟 刘兆文 钱浩 鲁宏 王宏伟 李福安 龚志勇

【摘要】 目的 以 Vero 细胞为基质,研制新一代精制 Vero 细胞狂犬病疫苗。方法 以 CTN-1V10 为生产毒株,以 < 150 代 Vero 细胞为培养基质,采用转瓶旋转培养,按不同时间收获病毒液,经过澄清、浓缩、纯化、灭活制成精制 Vero 细胞狂犬病疫苗。从以此工艺制备的疫苗中选取一批做为免疫学效果观察的受试疫苗。按暴露后免疫程序接种 63 人,其中受试疫苗接种 33 人,法国维尔博狂犬病疫苗接种 30 人,观察不良反应和测定中和抗体。结果 新研制的精制 Vero 细胞狂犬病疫苗各项指标完全符合 WHO 的有关质量要求。两种疫苗全程免疫后中和抗体阳转率均为 100%,中和抗体受试组为 11.94 IU/ml,维尔博疫苗对照组为 11.69 IU/ml。结论 精制 Vero 细胞狂犬病疫苗不但制造工艺合理,而且副反应轻微,免疫原性良好。

【关键词】 狂犬病疫苗; Vero 细胞; 中和抗体

Studies on the manufacture and immunogenicity of purified rabies vaccines on humans Vero cell YU Wei, LIU Zhaowen, QIAN Hao, et al. Shenyang Ante Biology High-grade Science Technology Company, Shenyang 110005, China

【Abstract】 Objective Using Vero cell as basic cultural material to improve the quality of rabies vaccines and to produce rabies vaccines for humans. **Methods** CTN-1V10 strain were used for production. Vero cell of 150th generation were used for cultivation. Rotating cultivatal method with rotating bottle was used. Fluids with virus were collected at different time. Puritied rabies vaccine was produed on Vero cell after clarification, condensation, purification and extermination. A batch of vaccines made by this techniques were used for immunological observation. Sixty-three people were injected with this rabies vaccine according to the procedure of time of exposure. Thirty of them were injected with vaccines made in France (Verorab) while the others were injected with vaccines to be tested. Side effect and neutralizing antibody were recorded. **Results** The quality of this newly developed rabies vaccines has met the quality set by WHO. After all dosages of injection, the rates of positive antibody were both 100% in two groups. The neutralizing antibody among testing group was 11.94 IU/ml comparing with control as 11.69 IU/ml. **Conclusion** Purified rabies vaccines on Vero cell for humans had reasonable manufacture technique and less little effect with good technological immunogenicity.

【Key words】 Rabies vaccines; Vero cell; Neutralizing antibody

预防接种是防制狂犬病的唯一有效措施,鉴于我国目前使用的浓缩地鼠肾细胞狂犬病疫苗的质量和副反应现状,以及在使用中出现的混乱状态,已不适应日益要求有高质量疫苗的实际需要,以 Vero 细胞为基质制备高效、安全和副反应小的新一代疫苗是当今各国的发展趋势。因此我们于 1993 年在卫生部批准立项的前提下,开始了 Vero 细胞狂犬病疫苗的研制,并于 1998 年取得成功,同年受国家药品监督管理局批准进入人体临床观察,并对精制 Vero 细胞狂犬病疫苗进行了副反应及免疫效果观察。

材料和方法

1. Vero 细胞:来自中国药品生物制品检定所。
2. 毒种:狂犬病毒固定毒 CTN-1V5 为生产毒株,来自中国药品生物制品检定所。
3. 疫苗制备工艺:以 CTN-1V10 为生产毒株,以 < 150 代 Vero 细胞为培养基质,采用转瓶旋转培养,按不同时间收获病毒液,经过澄清、浓缩、纯化、灭活制成 Vero 细胞精制狂犬病疫苗^[1,2],并从此工艺所制备的疫苗中选取一批做为免疫学效果观察的受试疫苗(1 ml/剂)。
4. 对照疫苗:为法国巴斯德·梅里厄生物制品有

限公司生产的商品化 Vero 细胞精制狂犬病疫苗(维尔博疫苗 0.5 ml/剂),冻干,批号 P1336-2。

5. 接种对象及免疫:接种对象为 18~50 岁健康男女志愿者,接种前进行健康检查和免疫前采血,并随机分组:1 ml 受试组共 33 人,法国维尔博疫苗对照组为 30 人,两组均采用暴露后免疫程序(0、3、7、14、28 d)。

6. 副反应:于每针注射后的(当时)、12、24 和 48 h 分别测量体温,并对全身症状,如头晕、恶心、呕吐等 13 项进行问诊,同时检查局部红、肿、硬结等体征,不良反应的判定标准参照文献^[3]方法进行。

7. 免疫学效果观察:在全程免疫后采血清,用小鼠中和试验方法测定中和抗体。并以 WHO 要求 ≥ 0.5 IU/ml 血清为阳转标准,中和抗体测定方法按《中国生物制品规程》^[4]的方法进行。

结 果

1. 疫苗的制备及质量检定:用 Vero 细胞按上述工艺连续生产三批疫苗,进行全面检定。从表 1 可以看出,应用本工艺制备的狂犬病疫苗具有抗原含量高,效力指标 > 2.5 IU/ml;制品纯度高,杂蛋白去除率可达 99.81% 以上,牛血清残留量低于 50 ng/ml,三批疫苗的各项指标均达到 WHO 对传代细胞疫苗的相关要求。并且在中国药品生物制品检定所检定合格的前提下,由国家药品监督管理局指定用 970703 批疫苗作为受试疫苗。

2. 副反应:1 ml 受试组注射受试疫苗 33 人,对照组注射维尔博疫苗 30 人,在整个观察过程中均未发现异常反应和中、重度副反应。1 ml 受试组出现轻微全身反应和轻微局部反应 13 针次,占总注射针次的 7.9%(13/165),总反应人数为 13 人,总反应率 39%,其中全身反应 7 例,局部反应 10 例,反应率分别为 21.2% 和 33.3%;法国维尔博疫苗对照组出现 14 针次,占总注射针次的 9.3%(14/150),总反应人数 13 人,总反应率 43%,其中全身反应 7 例,局部反应 7 例,反应率分别为 21.2% 和 21.2%。如去除主诉症状,仅以临床检查指征统计,两种疫苗均无副反

应发生,经卡方检验, $P > 0.05$, 两组间差异无统计学意义。

3. 免疫学效果:受试组抗体滴度为 11.94 IU/ml (3.8~19.8 IU/ml),阳转率为 100%,其滴度与法国维尔博疫苗对照组抗体滴度 11.69 IU/ml (3.4~34.3 IU/ml) 相近,经统计学分析受试组与对照组抗体水平差异无显著性($t = 0.1608, P > 0.05$)。

讨 论

接种狂犬病疫苗是防制狂犬病唯一有效的措施,虽然我国研制成功的精制地鼠肾细胞狂犬病疫苗比目前使用的浓缩地鼠肾细胞狂犬病疫苗,在安全性及有效性上有了很大的进步,但由于仍是以原代地鼠肾细胞为基质,其制备需人工解剖地鼠,工作量大且成本高,不适于工业化生产。而 Vero 细胞是经 WHO 检定合格并推荐作为生产人用灭活狂犬病疫苗的传代细胞,它不但来源方便,繁殖速度快,保持时间长,容易控制外源因子污染,而且对狂犬病毒敏感,适合大规模生产狂犬病疫苗^[5]。

本文结果表明,我们以 Vero 细胞为基质,以 CTN-1 为毒种,采用浓缩、纯化、灭活工艺制备狂犬病疫苗,工艺合理,质量可靠,适合大规模的工业化生产。所生产的疫苗具有抗原含量高,3 批受试疫苗效力结果分别为 5.84、7.02、6.55 IU/ml,均大于 WHO 规定的 2.5 IU/ml,疫苗纯度高,杂蛋白去除率均在 99.81% 以上,DNA 含量 < 100 pg,各项指标均达到 WHO 的相关质量要求。

本次临床观察结果显示,受试组副反应率为 39%,略低于法国维尔博疫苗对照组的副反应率 43%,观察中大部分副反应为主诉轻微症状,如以客观临床指标衡量,则两种疫苗的副反应率均为“0”,中和抗体阳转率及中和抗体水平是衡量疫苗免疫原性和质量的重要指标,受试组中和抗体(11.94 IU/ml)与法国维尔博疫苗对照组中和抗体(11.69 IU/ml)相近,差异无显著性($P > 0.05$)。两组阳转率均为 100%,表明该精制 Vero 细胞狂犬疫苗副反应率很低,其安全性及有效性可靠。

表1 用 Vero 细胞生产的狂犬病疫苗检定结果

批号	无菌试验	毒性试验	杂蛋白去除率 (%)	效力 (IU/ml)	牛血清蛋白含量 (ng/ml)	DNA 含量 (pg/ml)	热原试验	过敏原试验
970701	合格	合格	99.82	5.84	37.50	< 100	合格	合格
970702	合格	合格	99.81	7.02	25.00	< 100	合格	合格
970703	合格	合格	99.83	6.55	25.00	< 100	合格	合格

参 考 文 献

- 1 钱浩 ,王宏伟 ,鲁宏 ,等.应用柱层析法纯化狂犬病毒的初步研究.中国媒介生物学及控制杂志 ,1997 ,8:460.
- 2 李福安 ,窦志勇 ,潘丽静.狂犬疫苗灭活后 β -丙内酯水解的最佳 pH 值的选择.中国公共卫生杂志 ,1999 ,15:964.
- 3 王声 .免疫预防.见 :连志浩 ,主编.流行病学.第 3 版.北京 :人民卫生出版社 ,1997.179-183.
- 4 卫生部生物制品标准化委员会.人用浓缩狂犬疫苗制造及检定规程.见 :中国生物制品规程 ;一部(1995 年版).第 1 版.北京 :中国人口出版社 ,1996.121-124.
- 5 于伟 ,谭喜君 ,李春英 ,等.应用 Vero 细胞制备狂犬病疫苗最适条件的研究.中国媒介生物学及控制杂志 ,1999 ,10:173.

(收稿日期 2000-09-17)