

· 狂犬病预防与控制 ·

人用狂犬病疫苗的去、现在和未来

王继麟 严家新

早在 1885 年 路易·巴斯德证明狂犬病毒能通过兔神经系统重复传代而减毒,并制备出有效的疫苗首次用于人体免疫,从而开创了人用狂犬病疫苗的发展史。人用狂犬病疫苗的发展经历了从传统的神经组织疫苗到现行的以组织培养疫苗为主的过程,并且正在应用现代生物技术不断改进和发展。

一、早期使用的传统疫苗^[1-3]

1885 年巴斯德尝试用感染狂犬病毒固定毒的兔脊髓干燥后制成减毒活病毒,给一名 9 岁男孩进行 13 次连续、毒力剂量逐渐增加的暴露后处理获得了成功。1908 年 Fermi 通过在室温下用 1% 酚处理脑组织改进了巴斯德的方法,但悬液中仍有高达 100 MLD₅₀ 的残余毒力。1911 年 Semple 在此基础上作了进一步改进,将脑组织悬液于 37℃ 用酚固定、灭活,制备了无毒性的 Semple 疫苗。1925 年 Hempt 通过补加乙醚处理,进一步确保了疫苗的无毒性。使用 Semple 疫苗后严重的神经麻痹事故的发生率在 1/500 ~ 1/2 000 间,这种疫苗目前在发展中国家仍在广泛使用。我国自 1949 年起,一直使用由羊脑制备的 Semple 疫苗,直至 1980 年停止使用,由原代地鼠肾细胞疫苗取代。

1955 年 Fuenjalida 和 Palacios 在智利建议用狂犬病毒脑内接种 3 ~ 5 日龄的新生鼠,并在接种后 4 d 收脑制备新生鼠脑(SMBV)疫苗。在这个阶段的鼠脑神经组织仅能发现少量髓磷脂。80 年代的一项对 296 759 人暴露后处理的官方报道中,有 14 人产生接种后的并发症。该疫苗在过去 40 多年里在南美洲广泛使用。

1955 年 Peck 建议让狂犬病毒在鸡或鸭胚卵黄囊中生长,制备鸭胚疫苗(DEV)以降低神经麻痹事故的发生。该疫苗在美国和其他国家用作狂犬病暴露后处理并广泛使用了 27 年,很少观察到严重的副作用。但人二倍体细胞疫苗问世后经比较显示 DEV 效力有限,它的最大生产国美国 1982 年停止使用。1985 年 瑞士血清疫苗研究所通过区带离心除去疫苗中的鸟类蛋白,生产纯化的鸭胚疫苗(PDEV),该疫苗现在在亚、非、南美一些国家使用。

包括新生鼠脑疫苗在内的神经组织疫苗主要存在着下列问题:免疫原性弱,含有神经麻痹因子,其中有的含有残余的活感染病毒。另外,山羊和绵羊用于疫苗生产可能会被潜伏病毒感染。因此,WHO 专家委员会在第七次报告(1984 年)中支持限制和放弃生产脑组织疫苗,并极力提倡使用灭

活的细胞培养疫苗。

二、WHO 当前推荐使用的疫苗^[1-6]

1. 人二倍体细胞疫苗(HDCV):1964 年 Wiktor 在 Wistar 研究所首次描述 HDCV,并进一步通过比较试验最终将来源于 Semple 疫苗生产用 PM 狂犬病毒株适应到 WI-38 人二倍体细胞株(后来又适应到 MRC-5 细胞株)。培养病毒经澄清、加热和 β-丙内酯灭活、冻干制备成疫苗。该疫苗于 1974 年首次获准生产,并于 1978 年开始商品化。HDCV 不含任何神经毒因子,并不含任何外源动物杂质,因而可以解释它在重复注射后较好的耐受。采用 NIH 法检测疫苗的稳定性证实,疫苗在 4℃ 和 37℃ 放置一个月后,无明显差异。进一步将 5 批效价为 4.3 ~ 5.6 的疫苗 4℃ 存放 3 年半,所有批号滴度均大于 2.5 IU/剂。

早期调查发现,HDCV 预防接种后 1 月或 3 月达到抗体峰值(10 IU 左右),随后便逐渐降低,但 1 ~ 2 年内滴度始终大于 0.5 IU,通过 1 ~ 3 年内加强免疫后,抗体滴度迅速增加 10 ~ 15 倍,肌肉注射和皮下注射途径相近。

HDCV 的问世使人们对传统疫苗免疫原性的评价有了根据。Shah 等证实 2 ~ 4 针 HDCV 接种人体后获得的抗体反应与 14 针 Semple 疫苗相当,Cost-Berger 通过志愿者分别注射 3 针 HDCV 和 SMBV,发现前者诱生的抗体反应是后者的 5 倍。通过 HDCV 和 DEV 比较也证实后者仅具有有限的效力。Bahmanyar 在当时得出的结论是,在人体试验中所使用的任何疫苗的免疫原性都无法和 HDCV 相比。人二倍体细胞(HDC)为正常核型细胞,无致癌性,并且由于 HDCV 所具有的高免疫原性和良好的耐受性,目前在美国、加拿大、大多数欧洲国家和几个亚洲国家使用,这使其成为评价任何一种人用新疫苗的标准疫苗。

HDCV 的缺点在于 HDC 不太容易培养,而且狂犬病毒在 HDC 上培养的病毒滴度相对较低,仅能在空间有限的细胞瓶内培养,这使得疫苗的价格非常昂贵。在美国,用 HDCV 暴露后处理一个疗程费用高达一千多美元;而在巴基斯坦,用 Semple 疫苗进行全疗程处理只需 2.5 美元,这样就限制了该疫苗在发展中国家使用。

2. 原代细胞培养疫苗:

(1) 地鼠肾细胞疫苗(PHKCV):用地鼠肾细胞组织培养狂犬病毒发展灭活疫苗首先由 Kissling 提出并由 Fenje 进一步发展,将 SAD 狂犬病毒固定毒适应到地鼠肾细胞(PHKC)上生产灭活的疫苗,并获得成功。1968 年该疫苗在加拿大批准用于人体加强和暴露前接种。

在前苏联 Selimov 采用 SAD 株在不同动物细胞传代获得的 Vnukovo32 株适应到 PHKC 上,并用于生产由叙利亚地鼠肾制备的紫外线灭活疫苗。后来采用离心纯化对这种疫苗进行了改进。

我国的 PHKCV 由卫生部武汉生物制品研究所林放涛领导的小组研制而成。开始实验所用毒种为北京株兔脑固定毒,经“混合细胞培养法”在 PHKC 上适应,连续传 50~60 代适应成功,再经豚鼠脑和 PHKC 交替 3 次传代的毒株称为 aG 株。aG 株病毒在 PHKC 上培养收获,福尔马林灭活,加 Al(OH)₃ 佐剂。疫苗规定效价为 1.3~2.5 IU,经超滤浓缩后,浓缩疫苗效价须 ≥ 2.5 IU。经临床试验证明,各种剂型的 PHKCV 在人体中的抗体反应均优于羊脑 Semple 疫苗。

该疫苗于 1980 年在我国获得国家卫生部批准的生产文号,取代 Semple 疫苗。在过去的十多年里,我国生产的 PHKCV 是世界上累计生产量最大的狂犬病疫苗,高峰年份每年此类疫苗的产销量超过 500 万人份。目前,我国各生产单位正逐步采用改进的浓缩-精制 PHKCV。

(2) 狗肾细胞疫苗: Van Wezal 等 1978 年使用狂犬病毒 PM 株适应到狗肾细胞,并使用了微载体以使疫苗大规模生产。疫苗对暴露前后的人体接种实验在荷兰进行,获得的免疫反应和 HKCV 具可比性,并于 1980 年获准在荷兰生产。

(3) 鸡胚细胞疫苗: Kando 1965 年将 Flary HEP 株适应到鸡胚细胞,培养病毒经 β-丙内酯灭活、浓缩、冻干(后采用区带离心纯化加以改进)制备成疫苗并在日本商品化生产。1983 年 Barth 等从上述日本疫苗分化出一种用 Flary LEP 株适应到鸡胚细胞上的纯化鸡胚细胞疫苗(PCECV)。培养病毒采用 β-丙内酯灭活,并经蔗糖梯度区带离心纯化和浓缩。该疫苗目前由德国 Chiro Behring GmbH 公司生产。人体暴露前后的临床试验结果表明,疫苗的免疫效果和 HDCV 相当,并且不会诱导针对鸡细胞蛋白的抗体,使用该疫苗仅产生轻微的局部反应。PCECV 现已在欧、亚、非、南美 20 多个国家获准使用。1997 年 10 月 FDA 批准该疫苗进入美国市场。

上述原代细胞培养疫苗具有的一个优点是不必冷冻保存细胞种。由于在发展中国家常常发生停电或难以保证液氮供应,保存细胞种源比较困难。但每批疫苗须检查培养器官源的杂质(细菌、支原体、病毒),并且动物器官的可用量是限制工业化生产的因素。

3. 传代细胞系疫苗:

(1) Vero 细胞疫苗: 1984 年由法国 Merieux 研究所研制成功。制备过程中采用了使细胞贴附在微载体上悬浮培养的微载体技术以便进行工业化大罐培养。该疫苗使用的病毒株与 HDCV 相同,为 PM1503-3M。收获的病毒经超滤浓缩、密度梯度离心、β-丙内酯灭活制成冻干疫苗。早期研究证实,在 100 个接种的实验动物体内没有肿瘤和转移,每剂疫苗的残余细胞 DNA 量小于 50 pg,疫苗的稳定性极好,和 HDCV 相似。80 年代和最近的大量实验证实无论用作暴露前人体免疫或暴露后处理,Vero 疫苗均获得了很好的免疫效果。

由于 Vero 细胞较 HDC 能生产较高的狂犬病毒滴度,并可利用微载体技术进行工业化大罐培养,因而其价格较 HDCV 便宜。目前使用 Vero 细胞已累积生产 1 亿剂脊髓灰质炎疫苗,2 000 万剂狂犬病疫苗和 100 万剂口服脊髓灰质炎疫苗,证实该细胞疫苗的安全性。但是用 Vero 细胞制备疫苗须在低细胞代数使用以确保无致瘤性,且残余细胞 DNA 量须小于 100 pg/剂。

由于该疫苗进口价相对较高,因此,我国从 1995 年开始进行色谱纯化的人用 Vero 细胞疫苗的研制。制备过程中使用的病毒株是适应到 Vero 细胞的狂犬病毒 CTN-1。目前已有包括卫生部上海生物制品研究所在内的多家生物制品研究所研制成功,并获得生产文号,以逐步取代我国现行的 PHKCV。

(2) BHK 细胞疫苗: 早在 70 年代就有利用悬浮生长的 BHK 细胞感染 Flary LEP 株病毒生产灭活的兽用狂犬疫苗的报道。进入 90 年代后,法国巴斯德研究所将生物反应器应用到 BHK 细胞悬浮培养,制备一种实验狂犬病疫苗。制备时使用了一种 PV-Paris/BHK-21 狂犬病毒适应株,并采用了一种新的无血清培养基,这种实验疫苗在小鼠体内获得了满意的保护活力。他们进一步使用这种简单的 BHK 狂犬病疫苗在人类志愿者中进行了初步试验,证实该疫苗有好的免疫原性和耐受性。注射给地鼠后完整的 BHK 细胞是致瘤的,但当以病毒灭活的浓度用 β-丙内酯处理细胞后,这种肿瘤原性便被除掉。另外,通过现有的纯化技术,残余的细胞 DNA 可降到最低量。BHK 细胞是狂犬病毒的高产细胞,可在生物反应器中大规模培养,这一途径有助于那些希望开始制备细胞疫苗的发展中国家生产兽用和人用狂犬病疫苗。

4. 免疫程序: 对暴露前疫苗接种,WHO 建议在 0、7 和 28 d 于三角肌注射三剂疫苗,并每两年加强一剂。对暴露后患者的 WHO 接种方案为在 0、3、7、14、30 和 90 d(最后一剂非强制)于三角肌注射 5~6 剂 1.0 ml/剂疫苗,咬伤严重的患者在 0 d 注射人或马的狂犬病免疫球蛋白。一项简化的接种计划即 2-1-1 程序为 0 d(当天)于两臂的三角肌各注射一剂 1.0 ml 疫苗,7 和 21 d 各注射 1 剂。皮内免疫程序主要在泰国等发展中国家使用,于 0、3、7 d 分别在两个部位皮内各注射一剂 0.1 ml 疫苗,30 和 90 d 再分别注射一剂。该程序只适用于大的中心或发生群体暴露时,多个个体同时免疫合用一支疫苗以降低治疗费用。

三、发展中的新型人用狂犬病疫苗^[7-11]

利用基因重组技术,狂犬病毒中起主要免疫作用的糖蛋白及核蛋白已在不同的载体系统中得到表达。这些载体包括痘病毒、腺病毒、杆状病毒、质粒 DNA 等。还作了以植物为表达系统制备可食疫苗的尝试。其中有些疫苗有望最终发展成为安全有效的人用基因工程疫苗。

以痘病毒天坛株或哥本哈根株为载体,已分别或共同表达了狂犬病毒糖蛋白及核蛋白,在动物体内的实验证明具有很好的免疫效果,并已获准在北美和欧洲的野生动物中进

行大范围口服免疫,取得很大的社会经济效应。但对其潜在的安全问题的疑虑,使这类疫苗尚不适于直接作人用疫苗。以痘苗病毒高减毒株 NYVAC、ALVAC 和 TROVAC 等为基础构建的新型载体可能使这个问题得到解决。其中 NYVAC 是从哥本哈根株中删除了与毒力相关的 14 个基因而获得的。用 NYVAC 表达狂犬病毒糖蛋白后在小鼠、狗、猫等动物中证实安全有效并抵抗致死剂量的狂犬病毒攻击。

以金丝雀痘病毒(CPV)为代表的禽痘病毒不能在哺乳细胞中增殖,利用禽痘病毒构建的重组体能在人及其他哺乳动物中诱生保护性免疫应答而不形成感染病毒颗粒。用空斑纯化方法从 CPV 减毒疫苗株 Kanapox 获得的一个克隆 ALVAC 为高减毒株,并已用作载体表达了狂犬病毒糖蛋白,在动物体内证实了其安全性和免疫原性。在此基础上,Cadoz 等于 1992 年,Fries 等于 1996 年用这种非复制的表达狂犬病毒糖蛋白的金丝雀痘病毒(ALVAC-RG)以不同剂量($10^{5.5}$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^{3.5}$ TCID₅₀)各免疫 5 名志愿者,结果除 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 组外,均可诱生具有保护作用的中和抗体,并诱生了细胞免疫应答,且所有志愿者接种后仅在注射部位有轻微不适。试验结果显示,ALVAC-RG 具有发展成为人用疫苗的潜力。

在国内,李萍等将狂犬病毒糖蛋白单独或与核蛋白共同在缺失了与毒力相关的基因片段的痘苗病毒中得到表达。该重组病毒在鸡胚细胞中保持原有的增殖能力而在人源细胞中几乎不增殖。动物实验结果表明,这两株非复制重组痘苗病毒具有良好的免疫原性和安全性。

以人腺病毒 5 型作载体已成功地构建了表达狂犬病毒糖蛋白的重组体。无论采用外周途径或经口服免疫,该重组体在小鼠、狗、浣熊和狐狸体内均产生了良好的免疫应答。为了降低该载体可能的致病性,已将腺病毒 E1 区缺失。以该复制缺陷型腺病毒作载体表达狂犬病毒糖蛋白,不仅增加了疫苗的安全性,并且在成年小鼠和新生鼠上经不同途径免疫,都产生了高滴度的血清 IgG 和粘膜 IgA 抗体。

利用杆状病毒作载体表达狂犬病毒糖蛋白或核蛋白的重组体已成功构建。以昆虫细胞为宿主的重组杆状病毒表达外源蛋白的效率特别高。目前用亲和色谱法从重组杆状病毒感染的昆虫细胞中成功地纯化了狂犬病毒核蛋白。但是,由于糖蛋白所具有的“不可溶”特性,从重组杆状病毒的表达产物中纯化糖蛋白的努力尚未获得成功,这也限制了将其进一步发展成为人用亚单位疫苗。另外,虽然纯化的亚单位疫苗具有安全、无毒等优点,但它的免疫原性相对较弱。因此,一些学者尝试利用脂质体、生物可降解微球、免疫刺激复合物(ISCOM)等作为狂犬病亚单位疫苗载体以提高免疫反

应,收到很好的效果。

目前,狂犬病毒糖蛋白已在番茄中得到表达。另一项研究表明,用表达狂犬病毒糖蛋白的重组植物病毒感染菠菜后,通过口腔喂食小鼠刺激了 IgG 和 IgA 抗体产生,并减轻了狂犬病毒鼻内感染后引起的临床症状。虽然目前在可食性植物中狂犬病毒糖蛋白的表达水平还相当低,但是,一旦表达水平方面的技术障碍得到克服,这将是一条有前景的生产人用狂犬病疫苗的途径。

(本文得到法国巴斯德·梅里厄生物制品有限公司的资助,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Clark HF, Wiktor TJ, Koprowski H. Human vaccination against rabies. In: Geoghe MB ed. The natural history of rabies. Vol. II. Academic Press. Inc. New York, 1974. 341-369.
- 2 Roumiantzeff M, Ajjan N, Branche R, et al. Rabies vaccine produced in cell culture: production control and clinical results. In: Applied virology. Academic Press. Inc. New York, 1984. 241-296.
- 3 Meslin FX, Kalplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. WHO, Geneva, 1996.
- 4 Dreesen DW. A global review of rabies vaccines for human use. Vaccine, 1997, 15 (suppl): S2-S6.
- 5 Meltzer MI, Rupprecht CE. A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part 1: Global impact and rabies in humans. Pharmacoeconomics, 1998, 14: 365-383.
- 6 Lalosevic D, Stankov S, Lazarevic-Ivanc L, et al. Immunogenicity of BHK-rabies vaccine in human volunteers. Med Pregl, 1998, 51 (suppl 1): 17-19.
- 7 Cadoz M, Strady M, Meignier B, et al. Immunization of humans using a novel vector: Canarypox expressing rabies glycoprotein. Lancet, 1992, 339: 1429-6925.
- 8 李萍,朱家鸿,严家新,等.狂犬病毒糖蛋白及核蛋白在非复制型痘苗病毒天坛株中的共同表达.中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20: 481-484.
- 9 Wang Y, Xiang Z, Pasquini S, et al. The use of an E1-deleted, replication-defective adenovirus recombinant expressing the rabies virus glycoprotein for early vaccination of mice against rabies virus. J Virol, 1997, 71: 3677-3683.
- 10 Fu ZF, Dietzschold B, Schumacher CL, et al. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cell is efficacious as a vaccine. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88: 2001.
- 11 Modelska A, Dietzschold B, Sleysh N, et al. Immunization against rabies with plant-derived antigen. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 2481-2485.

(收稿日期: 2000-10-09)