

编号: 0109

科学技术成果报告

乙型肝炎疫苗的制备及研究（初报）

科学技术文献出版社

目 录

疫苗制作及鉴定方法.....	(1)
一、抗原提纯.....	(1)
二、抗原纯度鉴定.....	(2)
三、疫苗灭活条件.....	(4)
四、疫苗抗原性的鉴定.....	(5)
五、灭活疫苗的一般毒力鉴定.....	(6)
乙型肝炎疫苗的预防接种研究.....	(8)
疫苗皮内试验的免疫诊断分型及治疗乙型肝炎初步情况.....	(13)
一、疫苗皮试诊断分型的初步观察.....	(13)
二、疫苗治疗乙型肝炎初步情况.....	(15)
总结.....	(17)
附件 应用区带密度梯度超速离心法大量分离提纯血清HBsAg制备疫苗.....	(19)

乙型肝炎疫苗的制备及研究

北京医学院附属人民医院

疫苗制作及鉴定方法

乙型肝炎是一种常见多发病，严重地危害劳动人民的健康，影响劳动生产力。目前对乙型肝炎还缺乏有效的防治措施。近几年来，由于推广和普及了乙型肝炎较敏感的检测方法，发现社会上乙型肝炎的发生率日渐增高，因此，控制乙型肝炎的传染，研制有效的防治药物、方法，就成为我们医务人员的迫切任务。

北京医学院附属人民医院检验科肝炎免疫组于1975年上半年，在设备简陋、经验缺乏的情况下，试制出了乙型肝炎疫苗。通过动物试验和初步临床试用，证明这种疫苗无毒性、无传染性、有免疫力，对乙型肝炎的预防，特异性诊断分型以及特异性治疗都取得了一定的效果。

一、抗原提纯

1. 抗原来源：从血库献血员中挑选无肝炎史 HBsAg (乙型肝炎表面抗原) 阳性的血清，(达到对流电泳滴度 1:16 以上)，同时 HBe-Ag (e 抗原) 检测阴性的献血员的血清作为来源，因为这样的来源本身传染力就低。

2. 抗原提纯方法：提纯各个步骤均经无菌操作完成。

第一步 (参见图 1)：以 HBsAg 阳性的血浆或血清经饱和硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 初提。为避免旦白大量丢失，在加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液以前，血浆或血清用生理盐水先作 1:1 稀释，加药时应注意慢滴。要用密闭装置，保持无菌。最后浓缩程度则根据其滴度判定，一般要求在 1:8 以上，所以要在浓缩前后分别测定其滴度。

目前用胃酶消化代替过去加温 78°C 1 小时的方法，其优点为损失 HBsAg 少，同时在酸性条件下，对 HBsAg 本身具有灭活作用，抗原之浓度仍可保持，经过实用效果很好。

第二步 (参见图 2)：经过上述浓缩的 HBsAg，再在无菌条件下过葡聚糖凝胶 G-200 所装的凝胶柱，过柱速度不宜太快，流速控制在每小时 2—3 毫升。然后，分管收集，作以下几步检查，以证实第一高峰下来的旦白是较纯的 HBsAg，作为疫苗的基本原料。

最近又建立了氯化铯密度梯度离心方法提纯抗原，这样产量可进一步提高，杂旦白减少，且氯化铯有灭活作用 (见附件)。

第一步 硫酸铵沉淀及胃酶消化

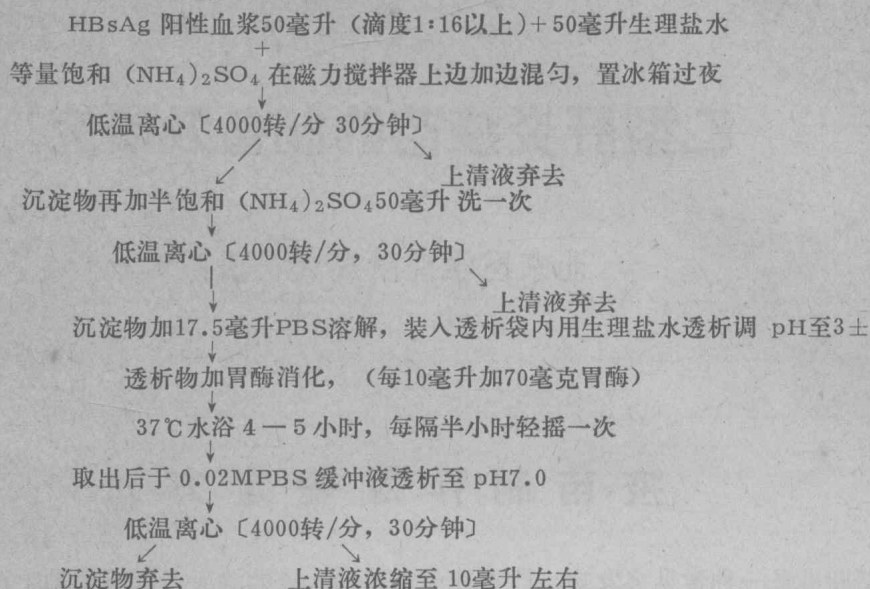


图 1

第二步 凝胶柱分离

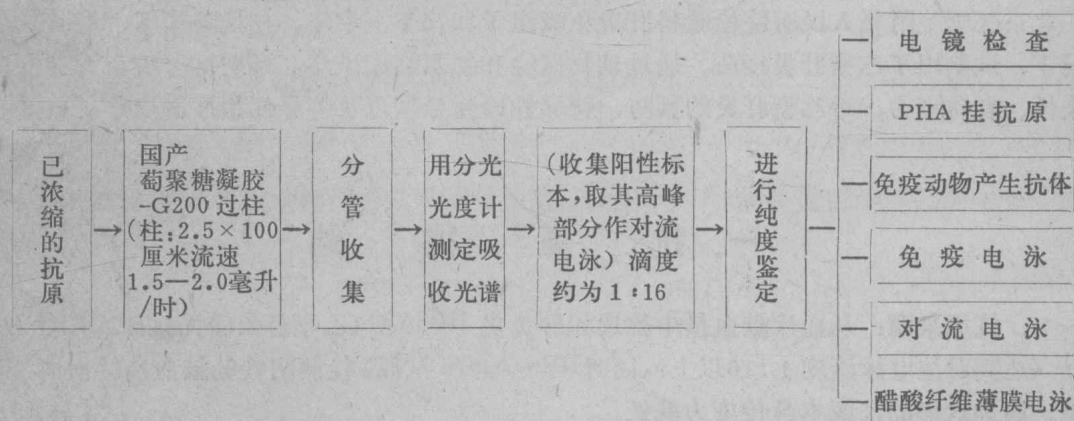


图 2

二、抗原纯度鉴定

提纯的 HBsAg 经过以下几项试验, 初步证明其纯度合格后, 即可作疫苗的材料。

1. 分光光度计鉴定 (参见图 3): 分部收集下来的各管均测定 HBsAg, 其中 7—14 管用对流电泳测定是阳性, 同时用 280 毫微米波长分光光度计比色达高峰, 光密度最高 0.90000。从第 15 管开始, 已测不出 HBsAg 的蛋白。因此, 收集高峰管及临近高峰前后几管混合一起作为纯抗原, 其产量为 100 毫升血浆或血清, 可生产对流电泳 1:16 (RPHA 法 1:512) 滴度的 30—40 毫升, 测旦白含量为 154 微克/0.5 毫升, 这提示溶液中还有其他人的血清旦白, 在纯化过程中仍附在 HBsAg 上, 第二个高峰是其它旦白则不必收集。

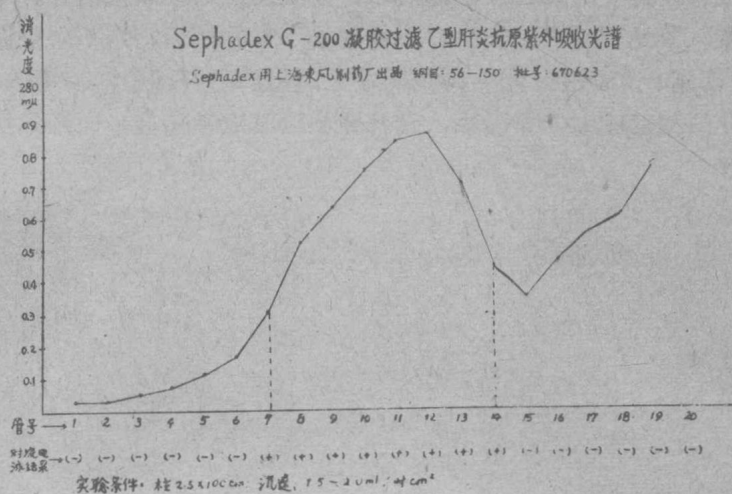


图 3

2. 醋酸纤维薄膜电泳 (参见图 5): 将抗原作醋酸纤维薄膜电泳, 结果表明, 纯抗原只有一条位于 β 蛋白部位的染色带, 符合HBsAg所泳动的部位, 只见一条带, 说明其它杂蛋白很少。如果HBsAg浓度太低, 则醋酸纤维薄膜电泳后显示不清, 可再作浓缩。



图 4 醋酸纤维薄膜电泳 (模式图)

7—14管均测得明显的沉淀线, 然后再分别测定其滴度。

4. 免疫电泳 (参见图 6): 将提纯前后的溶液分别作免疫电泳, 上孔为提纯前的抗原作的免疫电泳呈现有较多沉淀线, 下孔为, 经葡聚糖凝胶G-200过滤后的溶液作免疫电泳, 结果没有明显的沉淀线, 因为用抗正常人的羊血清作抗血清, 没有抗HBs, 故应该没有沉淀线。这也说明用此法提纯的抗原纯度符合要求。

5. 用提纯的抗原来致敏醛化血球: 以PHA (用被动血凝的方法检测表面抗体) 方法检测抗HBs (乙型肝炎表面抗体) 来反证。因为PHA的方法测抗-HBs必须用纯的HBsAg

3. 对流电泳 (参见图 4): 用琼脂作支持物, 用对流电泳法检测抗原纯度 (所用之抗血清为生研所生产之马血清)。收集之



图 5 对流电泳 (模式图)

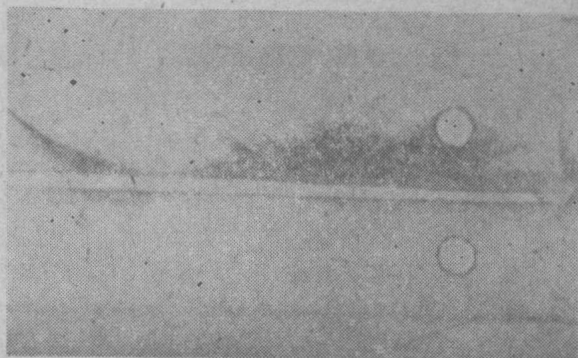


图 6 免疫电泳模式图

经多次试验证明没有非特异的且白，因此抗原挂在醛化血球上效果很好。

6. 电镜检查（参见图7、8、9、10）：将收集下来的抗原，用不同浓度的甲醛灭活后，经5万转/分高速度离心2小时，用5万倍的放大照出的电镜图象，表明为均匀一致的小颗粒，无其它杂质，因浓度较大未作稀释，大部分小颗粒成堆集聚，仔细寻找，未发现有大颗粒。

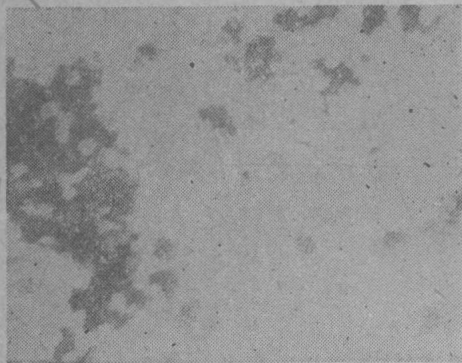


图7 提纯之抗原，未经甲醛灭活后的电镜图形

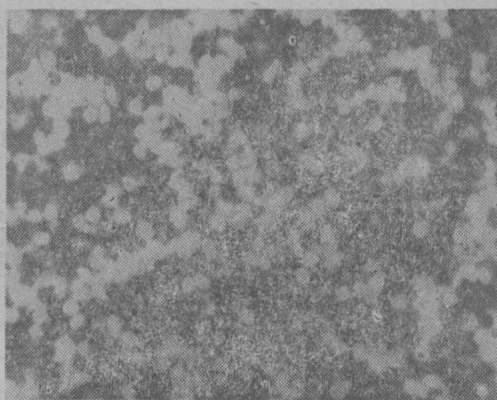


图8 提纯之抗原，用0.1%甲醛灭活后的电镜图形

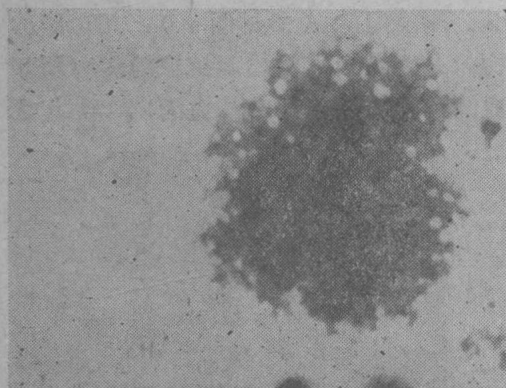


图9 提纯之抗原，用0.5%甲醛灭活后的电镜图形

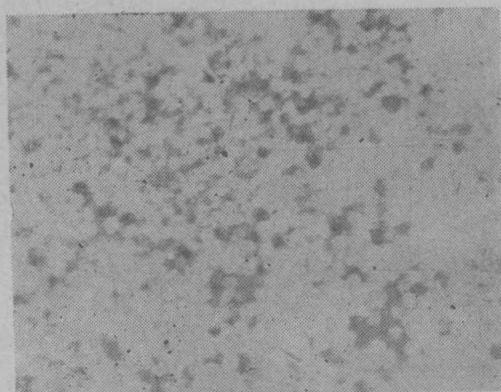


图10 提纯之抗原，用1%甲醛灭活后的电镜图形

这一结果表明，用健康带毒者的血作为疫苗的来源较好，因为基本上没有大颗粒，传染力较小。

三、疫苗灭活条件

病毒疫苗灭活条件一般均采用加温或甲醛灭活的办法。为保证疫苗无传染性保留抗原性，对甲醛的浓度选择了三种不同浓度，即以市购的甲醛作100%计算，加入0.2%、0.5%、1.0%三种不同浓度，经过反复探索与实践，最后选用了1.0%甲醛灭活。

在试验过程中考虑到如将原浓甲醛一下倾入疫苗内，会造成病毒外壳凝固，而达不到灭活之目的，因此加入的办法最好是先将原浓甲醛稀释一倍，然后缓慢滴加入疫苗内，滴加及振荡时间为1小时，温度为20℃，使其浓度由低到高，最后达1.0%。这样就既可达到彻底

灭活，又能保存其免疫性的目的。

四、疫苗抗原性的鉴定

采用不同浓度甲醛灭活的疫苗，通过动物试验或其他检查，证明有免疫性。

(1) **对流电泳**：用灭活以后的疫苗再分别作对流电泳（参见图11）。三种不同浓度甲醛灭活的疫苗均在对流电泳上呈现沉淀线，说明几种浓度不同的甲醛灭活之疫苗保有其抗原性。同时对流电泳的滴度亦无变化。

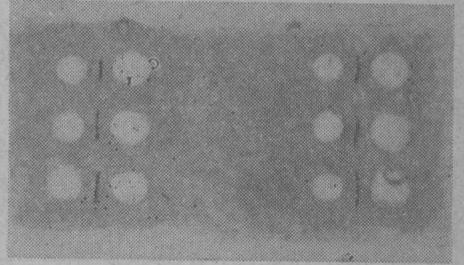


图11 不同浓度甲醛灭活疫苗的对流电泳模式图

(2) **荷兰猪试验**：用0.2% 甲醛灭活疫苗后，注射荷兰猪三只，每只一次臀部皮下注射0.5毫升，十二天以后加强一次。注射后产生抗体的时间及滴度见图12，该图表明了注射疫苗一周后，第一次抽心血用PHA法测抗-HBs三只均为阳性，第三周再抽心血用对流法检测抗体仍为阳性，因为没有测滴度又无法与PHA比较，故图中未标出（另有一只因抽心血死亡，未记在内）。随后又分别在注射疫苗后36天、58天、73天取血，用PHA法检测抗-HBs仍为阳性。从曲线上可以看出给荷兰猪注射0.2% 甲醛灭活疫苗，均能产生抗体，证明疫苗有免疫原性。同样地给注射1.0% 甲醛灭活疫苗，也产生了抗体，抽血时间同上，结果表明（见图13）抗体均在注射疫苗1—3周后产生，但其持续的时间还不太长，可能与注射的量及

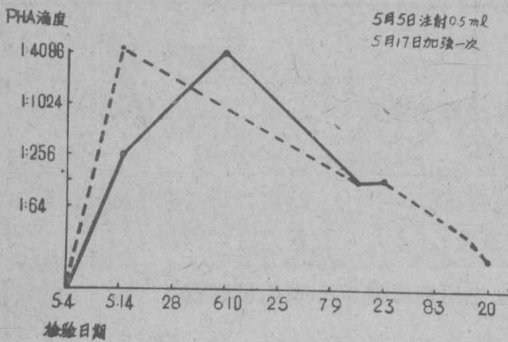


图12 0.2% 甲醛灭活

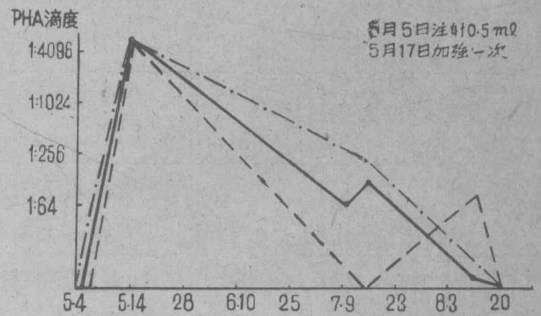


图13 1% 甲醛灭活疫苗

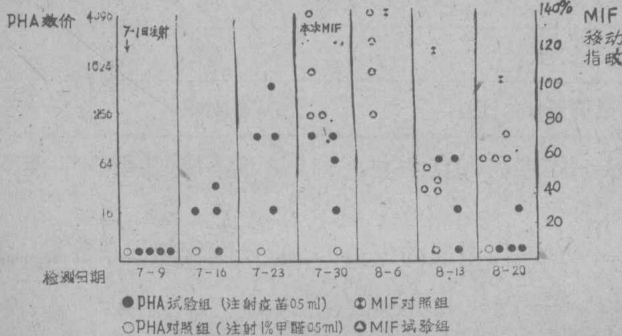


图14 疫苗灭活后用家兔作免疫性鉴定

次数有关。因此灭活后的疫苗有免疫性是肯定的，即使是1.0% 甲醛那样大的浓度也可以产生抗体。

3. 家兔免疫性鉴定试验（见图14）：在初步选择1.0% 甲醛灭活后，用四只家兔作试验组，另一只作为对照。在注射疫苗前均取耳血测定PHA、IAHA（免疫吸附粘连试验）及肝功能均得正常结果。注射后第一周有三只已产生抗体，第二周抗体滴度更高，而对

照的一只始终未测出抗体，这说明给动物注射1.0% 甲醛灭活疫苗，无论是荷兰猪还是家兔

均能产生抗体。

在试验同时也取了兔血测MIF（白细胞移动抑制试验），在整个试验过程中开始几次

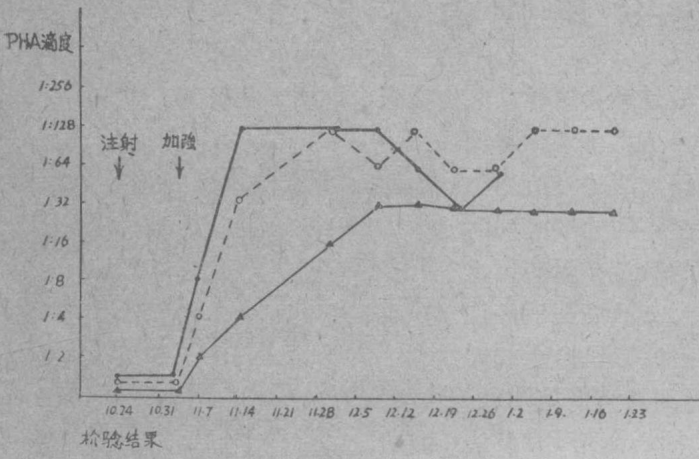


图15 甲醛灭活疫苗保存三个月以上免疫家兔产生抗体情况

未测，后几次实验动态观察证明，正常家兔移动指数，每次测定均有差别。试验组中，当抗体产生后，白细胞移动指数由高而低，这说明出现特异性细胞免疫。为了进一步鉴定用1.0%甲醛的浓度灭活的疫苗，其时间长短是否影响其免疫力，我们将制作的疫苗置于4℃冰箱内存放三个月后，重复上述试验，定期观察抗体产生情况，如图15所见，仍有很强的免疫性。

五、灭活疫苗的一般毒力鉴定

由表1可以看出，按照常规检测毒力，其结果均符合疫苗要求的标准。

表1 一般毒力鉴定

种 类		方 法	结 果
小白鼠 5 只		体重18克左右，于尾静脉注射1%甲醛疫苗0.5毫升	观察二周，生长良好
大白鼠 3 只		于背部皮下注射0.2%甲醛疫苗0.5毫升	观察二周，生长良好，局部皮肤无溃烂现象
3 只		于背部皮下注射1%甲醛疫苗0.5毫升	
细 菌 培 养	厌 氧 培 养	在疫苗最后封口前取少量先用葡萄糖肉汤增菌	未生长细菌
	肝 斜 面 培 养	同 上	同 上
	霉菌培养（沙保格）	同 上	同 上
	普 通 血 培 养	同 上	同 上
病 理 检 查		荷兰猪·大白鼠肝肾组织切片	无病理改变

（1）毒性试验：挑选正常小白鼠5只，体重在18克左右，每只从尾静脉注射灭活疫苗0.5毫升，观察2周，生长良好，无一死亡。

另用大白鼠二组各三只，分别用含0.2%及1.0%甲醛的疫苗0.5毫升作背部皮下注射，观察2周均未见有局部溃烂等现象。

（2）灭菌试验：将所有收集的试管，抽样检测作各种细菌培养，包括厌气培养，肝斜面培养，霉菌培养，普通血培养等等，且均在增菌后种培养基，结果未见细菌生长，表明所有操作过程均达到无菌要求。

(3) 病理检查：为了进一步鉴定疫苗注射后对动物有无病理变化，分别在不同时间将注射疫苗的荷兰猪处死，作了肝、肾的病理检查，如图16、17、18、19、20、21病理结果所示：肝、肾组织均为正常，没有致病性病变。

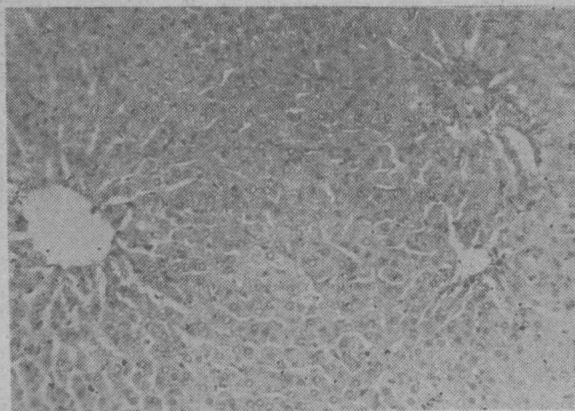


图16 0.2%甲醛灭活抗原免疫豚鼠肝脏病理切片图形

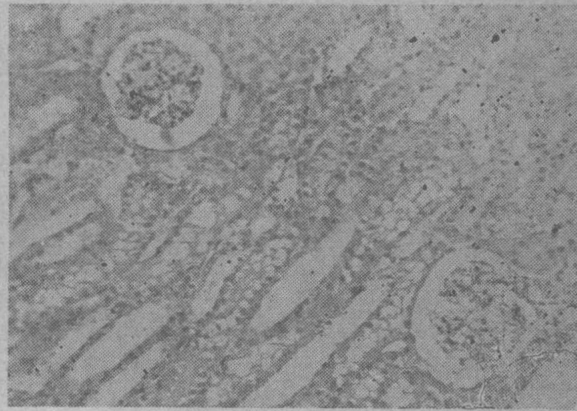


图17 0.2%甲醛灭活提纯之抗原免疫豚鼠肾脏病理切片图形

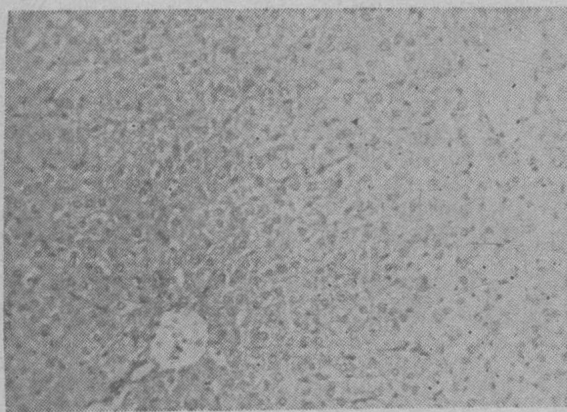


图18 1%甲醛灭活提纯之抗原免疫豚鼠肝脏病理切片图形

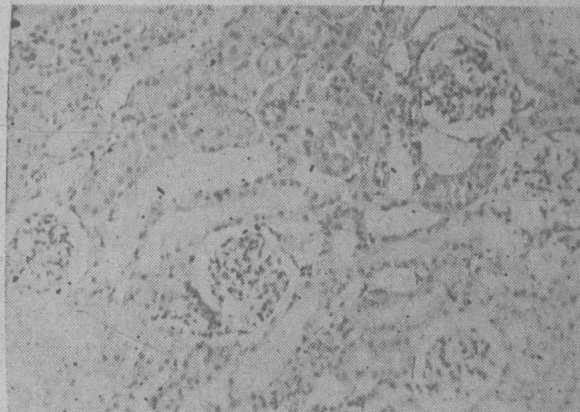


图19 1%甲醛灭活提纯之抗原免疫豚鼠肾脏病理切片图形

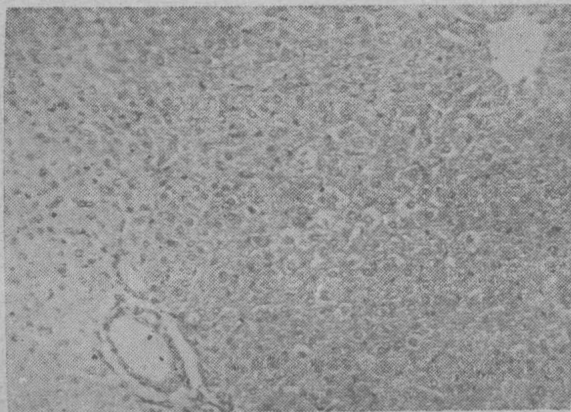


图20 正常豚鼠肝脏病理切片图形

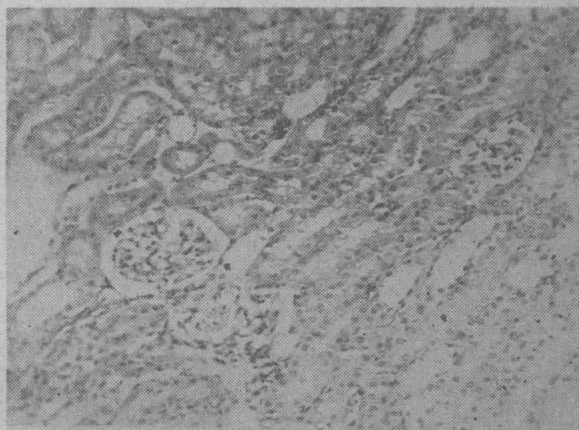


图21 正常豚鼠肾脏切片图形

最近已建立了DNA聚合酶的检测方法，作为鉴定疫苗安全性的一项指标。

根据以上结果表明，疫苗一般毒力检查都合格，能保证已灭活疫苗无细菌污染，无其他毒性反应，可以应用于人体。

乙型肝炎疫苗的预防接种研究

自1975年8月以来，已先后有五批25名正常人在自己身上注射了疫苗，第1、2例由于注射次数较少，未产生抗体，其余的人经过两年多的观察，有6名产生了抗体，且在细胞免疫功能方面，都有不同程度提高。以上25名正常人均未发现HBsAg阳性或GPT增高。

表2 例 1

日 期	注射量	GPT	TTT	IAHA HBsAg	PHA HBsAb	MIF
注射前	0.3毫升			(—)	(—)	
75.8.29						
9.2		32	4	(—)	(—)	1.00
9.9		52	4	(—)	(—)	1.08
9.16		80	4	(—)	(—)	0.98
9.23		20	4	(—)	(—)	
10.6		59	4	(—)	(—)	
76.3.16				(—)	(—)	
6.29		56	6	(—)	(—)	
77.1.7				(—)	(—)	

表3 例 2

日 期	注射量	GPT	TTT	IAHA HBsAg	PHA HBsAb	MIF	体 温	肝 大	其 他
注射前	0.4毫升	55	3	(—)	(—)		36.5℃	肋下3厘米	注射局部发痒
75.10.10									
10.21		80	3	(—)	(—)	1.01	36.6℃	肋下3厘米	注射局部发痒
10.28		57	2	(—)	(—)		36.7℃	同 上	
11.7		80	3	(—)	(—)		36.3℃	同 上	
11.15		35	3	(—)	(—)	0.79	36.6℃	同 上	
11.18		75	3	(—)	(—)	0.95	36.6℃	同 上	
12.2		80	2	(—)	(—)	1.04	36.5℃	同 上	
76.1.29		80		(—)	(—)			同 上	
2.6		75		(—)	(—)			同 上	

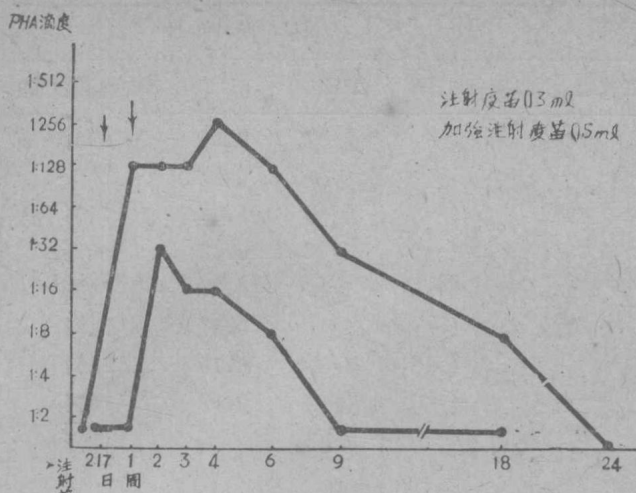


图22 第二组——疫苗人体免疫抗体产生情况

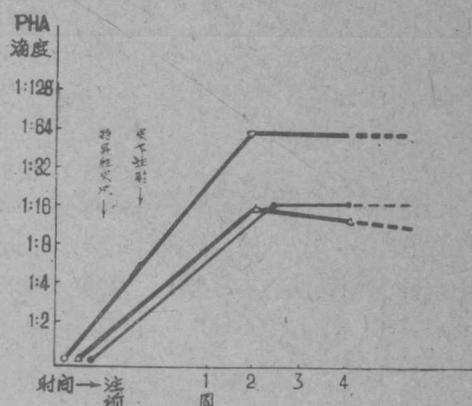


图23 第三组正常人疫苗免疫抗体产生情况

经过几批试验结果证明，用疫苗人体注射产生了免疫反应，25名正常人注射时间虽然不同，均未发现不良反应，特别是没有HBsAg出现，或GPT的升高。事实说明，高浓度的甲醛灭活是可以保证其安全的，而且疫苗剂量掌握得好，即可以产生相应的特异性抗体，对肝炎病毒的侵袭能起保护作用。

表2：个体试验结果，每次检测均未发现有被感染的指标。只有些低温反应，可能是注射蛋白的反应，很快即恢复正常。正常人接受此灭活的抗原后也与肝炎病人一样可有特异性反应，根据免疫的规律，接着应该产生抗体，但由于当时注射的剂量较少，而且也只是有一次，所以追踪多次未见抗体出现。也可能由于抗体产生是较晚的，而我们在后期复查的间隔时间较长，所以就有漏掉的可能性。超声波反应，注射前与注射后间隔一年多，反而有好转现象，说明疫苗本身没有对肝脏起致病反应。

表3：第二个人体试验，除同样未发现有感染现象外，其MIF在一定时间内被抑制，说明反应更好。但同样也没有产生抗体。究其原因与前一例相同。该例过去有过敏体质表现，经常有过敏性鼻炎史。注射疫苗后虽出现有局部致痒现象，观察其全身无皮疹或其它疹子，所以考虑与疫苗本身无关。

表4、表5：在总结上二例个体试验后，又选择了体质较好的7名。经注射疫苗后，其结果除无毒性反应、细胞免疫功能均有提高外，有2名在注射第二次前，已经产生了特异性抗体，用PHA检测滴度为1:64及1:32，最高一次1:256且连续检测出抗体维持三个月左右。其中有一例现仍有极少量滴度1:4→1:8不定（见图23）。该二例在注射前各种肝炎检测指标均为正常，由于只注射一次即有特异性体液免疫的出现，追问病史，分别在1959年、1973年有短期GPT升高的历史，因此可以说明这一次抗原的进入是起了回忆反应，所以很快地产生了特异性抗体，也提示我们今后使用疫苗时应该注射两次以上，才能使免疫功能起反应。

表6：六名医务人员的检测结果：这六名除检查一般肝功能以外，还作皮内试验，包括非特异性及特异性皮内试验二项，首先观察其机体免疫功能，同时还可作为将来鉴定接种疫苗后产生保护力的一种方法。该六人PHA（植物血凝素皮肤试验）皮试正常、疫苗皮试阴性，

表4 四名正常人疫

日期	注射量	冯 × ×**				马 × ×			
		IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验	IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验
注射前		(-)	(-)	0.98	78%	(-)	(-)	0.75	69%
76.2.17	0.3毫升								
2.24	0.5毫升	(-)	1:128	1.09	69%	(-)	(-)	1.03	72%
3.4		(-)	1:128	0.58	79%	(-)	1:32	0.87	60%
3.11		(-)	1:128			(-)	1:16	0.77	74%
3.18		(-)	1:256	0.65	62%	(-)	1:16	0.87	71%
4.1		(-)	1:128			(-)	1:8	0.75	71%
4.20		(-)	1:32			(-)	(-)	0.88	73%
6.30		(-)	1:8						
77.1.6		(-)	(-)						

* 注射前后肝功检查均正常，故表中未列入。

表5 三名正常人疫

日期	注射量	朱 × ×			
		IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验
注射前		(-)	(-)	0.60	79%
76.10.12	0.3毫升				
10.21		(-)	(-)		
10.28		(-)	(-)		62%
11.11	0.5毫升	(-)	(-)	0.80	59%
11.25		(-)	(-)	0.68	42%
12.3		(-)	(-)	0.80	67%
77.1.6		(-)	(-)	1.00	58%

* 注射前后肝功检查均正常，故表中未列入。

表6 六名正常人疫

日期	注射量	刘 × ×			邓 × ×		
		RPHA	PHA	MIF	RPHA	PHA	MIF
注射前		(-)	(-)	1.00	(-)	(-)	1:00
77.6.3	0.5毫升						
注射后二周		(-)	(-)	0.86	(-)	1:16	0.83
注射后四周		(-)	(-)		(-)	1:32	
第二次注射	1毫升						
第二次注射后二周		(-)	1:4	1.00	(-)	1:16	0.87

* 注射前均作过特异性皮试，注射前后肝功能检查均正常，故表中未列入，各种检查指标，现仍继

苗免疫动态观察*

李 × ×				吴 × ×			
IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验	IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验
(-)	(-)	1.03	79%	(-)	(-)	1.00	74%
(-)	(-)	1.08	64%	(-)	(-)	0.97	60%
(-)	1:2	0.93	82%	(-)	(-)	0.89	58%
(-)	(-)	0.87	86%	(-)	(-)	0.80	52%
(-)	1:2	0.78	76%	(-)	1:2	0.93	64%
(-)	(-)	0.84	64%	(-)	1:2	0.99	54%
(-)	(-)	1.10	76%	(-)	(-)		

** 注射一周即出现抗体,故未再加强注射。此例以后继续观察PHA仍有时呈1:8。

苗免疫动态观察*

王 × ×				陈 × ×			
IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验	IAHA	PHA	MIF	E玫瑰花试验
(-)	(-)	0.70	82%	(-)	(-)	0.90	74%
(-)	(-)			(-)	(-)		
(-)	(-)	0.85	56%	(-)	(-)	0.78	54%
(-)	(-)	0.79	59%	(-)	(-)	0.75	47%
(-)	(-)	0.74	76%	(-)	(-)	0.76	31%
(-)	(-)	0.50	64%	(-)	(-)	0.50	61%
(-)	(-)	0.98	71%	(-)	(-)	0.90	56%

苗免疫动态观察*

杨 × ×			王 × ×			关 × ×			陈 ×		
RPHA	PHA	MIF	RPHA	PHA	MIF	RPHA	PHA	MIF	RPHA	PHA	MIF
(-)	(-)	1.00	(-)	(-)		(-)	(-)		(-)	(-)	
(-)	1:64	0.85	(-)	(-)	0.94	(-)	(-)	1.00	(-)	1:16	0.90
(-)	1:64		(-)	(-)		(-)	(-)		(-)	1:32	
(-)	1:64	0.90	(-)	(-)	0.76	(-)	(-)	0.94	(-)	1:16	0.84

续观察。

给予预防接种，结果，三名在注射后二周测出抗体为阳性（见图23），现仍在连续追踪观察之中。从这一结果说明，我们第一次给以皮试是小剂量的接受了 HBsAg，然后再每人注射 0.5 毫升于皮下，很快就产生了特异性免疫效应，这就证实了机体对 HBsAg 的免疫

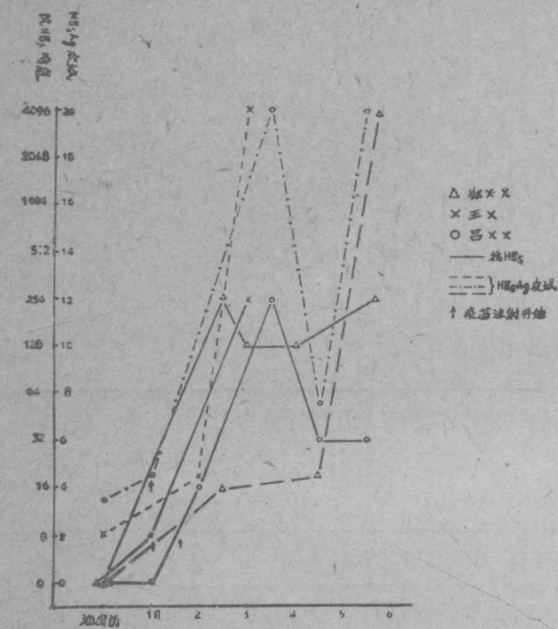


图24 3例抗体产生情况与皮试反应关系

性，肝功（GPT、TTT）血清HBsAg，抗HBs，HBeAg 抗 HBe之检测均正常者，每月皮下注射疫苗一次，每次0.5毫升，注射 1—4 次不等者共31例，见表 7。

从表 7 可见31人经不同次数的疫苗注射后，在15岁以上的年龄组中产生不同滴度（1:8—256）的抗 HBs 者18人占 58%，15岁以下的儿童 6 例尚未见抗 HBs 产生，待继续观察。疫苗注射后18例首次出现抗HBs的时间见表 8，一般最早出现者可在 2 周左右。

表 7 31例健康人疫苗注射后产生抗 HBs 情况

年 龄	性 别	例 数	抗HBs	%	总 阳 性 率	
15岁以上	男	11	7	63.6	72%	58%
	女	14	11	78.5		
15岁以下	男	4	0	0		
	女	2	0	0		

表 8 18例疫苗注射后首次产生抗HBs时间

首次产生抗HBs时间 剂量（毫升）	二 周 0.1皮内或0.5皮下	一 个 月 0.5皮下	二个月 0.5	三个月 0.5	四个月 0.5	总 数
例 数	11*	4	2	1	0	18

* 其中10例均经一次皮内注射后产生了特异性抗体

18例出现抗HBs者,疫苗皮试均呈阳性反应,附三例抗HBs产生情况与皮试反应见图24。未出现抗HBs者疫苗皮试均呈弱阳性反应。说明机体反应出的细胞免疫功能与体液免疫功能是比较一致的,当然抗HBs到底多高的滴度可以确保不被肝炎病毒传染,而达到保护作用,还需继续观察。最近我们对11名接受过疫苗皮试的健康者用IAHA的方法检测抗HBc均为阴性,说明均未因注射疫苗而感染此病毒,同时我们也把密切接触肝炎的健康家属未作预防接种者,做为对照,观察其感染发病率,以资对比。

疫苗皮内试验的免疫诊断分型及治疗乙型肝炎初步情况

目前肝炎除应认为是一种病毒传染病外,并认为其与机体免疫有关,尤以乙型肝炎,除病原(HBV)研究有很快的进展外,人体的内因对疾病的预后起着重要的作用,近年来更多的材料报导,患者的细胞免疫功能对疾病起着重要作用。我们设想用肝炎疫苗进行免疫诊断分型,并对部分病例进行特异性免疫治疗,从而作为消灭肝炎的一种手段,即运用祖国医学“同病异治”的观点进行诊断及治疗。

一、疫苗皮试诊断分型的初步观察

疫苗皮内试验:应用乙型肝炎疫苗经倍比稀释8倍,取0.1毫升于右前臂皮内注射,经24小时后观察局部红斑反应情况,测量纵横直径毫米的总数除以2为标准,以测定其特异性细胞免疫功能,红斑反应判定标准见表9。

表9 红斑反应判定标准(以毫米为单位)

皮 试 种 类 \ 反 应 结 果	阴 性	弱 阳 性	阳 性	强 阳 性
肝 炎 疫 苗	0	5 以 下	5—10	10以上
植 物 血 凝 素	0	14 以 下	14—22	22以上

我们对某工厂及医院内密切接触者做健康普查,以及各种不同肝病病人共584例做了皮试,结果见表10。

健康组241人中有115人(47.7%)肝炎疫苗皮试反应为阴性,75例(31.1%)为弱阳性,51例(21.2%)为阳性,此组中有6人测得抗HBs,而其皮试有3人为阴性,1人弱阳性,2人阳性,可能与每个人感染乙型肝炎病毒的剂量,时间,以及本人免疫功能的反应不同而有所差别,所以将来在健康检查中,应测定皮试,再做HBsAg及抗HBs的检测。凡此三项指标均阴性者有必要予以自动免疫,即注射乙型肝炎疫苗,加强特异性细胞免疫功能,以期达到预防肝炎的目的,其中某工厂工人204人在疫苗注射后半年轻复查,196例中无一例GPT增高或出现HBsAg阳性,新出现抗HBs者有12人,这说明即使皮内接受少量的疫苗亦能产生免疫反应,同时,为时半年还能测出抗HBs。

表10 HBsAg 皮试反应结果

临床类别	皮 试 反 应						
	总例数	阴 性		弱 阳 性		阳 性	
		例 数	%	例 数	%	例 数	%
健 康 者	241	115	47.7	75	31.1	51	21.2
肝 炎 接 触 史 者	59	25	42.4	22	37.3	12	20.3
肝 炎 史 者	28	11	39.3	14	50	3	10.7
急 性 乙 型 肝 炎	22	3	13.6	8	36.4	11	50
乙 型 迁 延 性 肝 炎	101	23	22.8	49	48.5	29	28.7
慢 性 乙 型 肝 炎	58	2	3.4	25	43.1	31	53.4
抗 原 血 症	19	2	10.6	7	36.8	10	52.6
健 康 携 带 者	56	3	5.4	28	50	25	44.6
总 数	584	184	31.5	228	39	172	29.5

有肝炎接触史的共59例，其疫苗皮试阴性者有25例（42.4%），弱阳性反应者22例（37.3%），阳性反应12例（20.0%），其皮试结果与健康组相似。为说明密切接触程度与感染的关系，将59例有肝炎接触史者分为二组观察：一般接触者38例；家族中密切接触者21例，一般接触史中有2例HBsAg阳性，疫苗皮试均呈阴性反应。另二例抗HBs阳性者，疫苗皮试也阳性，而家族密切接触的21例中有7例HBsAg阳性（33.3%），其6例疫苗皮试阴性，1例弱阳性，因此皮试阴性之HBsAg携带者有可能做为传染源存在，21例中未发现抗HBs阳性者，说明家族密切接触者的感染率远较一般接触者为高。故在这类家庭中，及时给予疫苗预防接种，加强其免疫功能，预防感染，并切断传染源，减少带毒者，在肝炎预防上将起重要作用。

有肝炎史的28人中HBsAg均阴性，疫苗皮试阴性者11例（39.3%），弱阳性14人（50%），阳性反应3人（10.7%），另测得抗HBs者1人，由此可见，肝炎治愈后HBsAg均已被清除，机体尚有一定的特异性免疫回忆反应。当然有肝炎史者并不皆为乙型肝炎，但从皮试反应所见，可认为有部分是乙型肝炎。

急性肝炎22例中3例（13.6%）疫苗皮试阴性，8例（36.4%）弱阳性，11例（50%）阳性，将来从免疫反应的不同来观察病情的预后转归，是否有所差别，是有意义的。

乙型迁延性肝炎101例中72例（71.3%）呈阴性反应及弱阳性反应，说明乙迁肝大部分细胞免疫功能低下，慢性活动性肝炎58例仅2例（3.4%）皮试阴性，25例（43.1%）弱阳性，31例（53.4%）呈阳性反应，慢性活动性肝炎大部分是由于免疫功能失调的结果，此二者均符合国内外报导。

乙型迁延性肝炎及慢性肝炎由于免疫功能低下或失调而HBsAg长期不阴转，可能为引起肝功损害的主要病因和进一步扩大传染范围的原因。此外患者HBsAg持续阳性对预后转归可能亦起着主要作用，如转为肝硬化，甚至肝细胞癌。

肝炎后抗原血症的19例中2例（10.6%）疫苗皮试阴性，7例（36.8%）弱阳性，10例（52.6%）阳性，此组肝功虽已恢复，但HBsAg并未被清除，病情是否巩固，有否复发致肝功异常之可能有待追踪。

健康携带者56例，其中31例疫苗皮试呈阴性及弱阳性占（55.4%），阳性（44.6%）

者25例，此组临床尚未发病与细胞免疫耐受或麻痹有关，但不少作者认为所谓健康携带HBsAg者，实质有二分之一的人是有病的，此组带毒患者应用肝炎疫苗治疗作为抗原加强刺激T细胞，增强其特异性免疫功能而释放淋巴因子等清除抗原并促进B细胞分化繁殖成浆细胞从而产生特异性抗体，以达到清除抗原的目的。

植物血凝素皮内试验，用于测定非特异性细胞免疫功能，同时应用于健康者及各种肝病患者，其结果绝大部分呈阳性反应，仅1例健康者及1例患者为阴性，4例健康者呈弱阳性反应。

因此从以上情况看来，疫苗皮内试验结合临床及化验检测，对确定密切接触肝炎的健康者是否应予疫苗接种，以及对各种肝病进行免疫诊断分型，从而指导临床的不同治疗措施，采用“同病异治”的原则上，是有一定价值的。即细胞免疫功能低下者用提高免疫治疗，相反免疫功能亢盛者可以抑制免疫制剂治疗。以其提高临床疗效。

二、疫苗治疗乙型肝炎初步情况

应用肝炎疫苗治疗乙型慢性迁延性肝炎（下称迁肝）及部分慢性活动性肝炎（下称慢肝），均经肝炎疫苗皮试呈阴性或弱阳性反应的免疫指标后，并于治疗前先检测血清之抗补体，做为免疫复合物存在与否的客观指标（但此法尚不理想），治疗目的在于促进患者机体特异性免疫功能的加强，达到能清除体内HBsAg，恢复肝功能，解放劳动生产力为社会主义建设服务。

（一）分组治疗及方法：

甲组：按特异性细胞免疫功能低下，肝功大多数异常者：用疫苗皮下注射每月一次，每次0.5毫升，非特异性细胞免疫功能低下者及部分用疫苗治疗后，其特异性细胞免疫功能未增强者，合并应用辅酶Q₁₀或左旋四咪唑治疗，治疗后每月复查七项（GPT，TTT，HBsAg，抗HBs，HBeAg抗HBe抗补体）化验及两种皮试反应，以观察疗效。

乙组：与甲组所不同的是应用稀释8倍的肝炎疫苗取0.1毫升皮内注射每两周一次，其它与甲组同。

（二）疗效观察：见表11，表12。

74例治疗达三个月后肝炎疫苗皮试反应说明细胞免疫功能有提高，恢复正常者45例，49例GPT升高的患者有7例下降（GPT平均下降50—100单位以上），恢复正常者5例，血清HBsAg滴度下降至1:64及以下者有8例，阴转3例，HBeAg阳性37例中15例阴转，74例中的49例继续治疗至五个月时肝功及血清HBsAg继续有不同程度改善，总计74例中经3—5个月治疗后细胞免疫功能大部分提高，GPT恢复正常者10例，下降者20例，血清HBsAg滴度下降者19例，阴转者8例（1—4个月阴转）。目前仍在继续治疗观察中，因时间尚短对疗效

表11 74例迁慢肝治疗三个月观察

时 间 项 目	特异性细胞免疫功能（HBsAg皮试）		GPT			血清HBsAg滴度（RPHA法）			eAg	
	低 下	正 常	正 常	下 降	升 高	阳 性	阴 性	下 降	阴 性	阳 性
治 疗 前	74	0	25	0	49	74	0	0	37	37
治 疗 后	29	45	30	7	37	63	3	8	52	22