

编 号: 0189

内 部

科学技术成果报告

狂犬病疫苗的研究

科学技术文献出版社

目 录

第一部份 人用狂犬病疫苗的研究.....	(1)
前言.....	(1)
一、狂犬病固定毒“北京株”在地鼠肾细胞培养中的适应及其生物学性状.....	(1)
(一) 材料和方法.....	(2)
(二) 实验经过和结果.....	(3)
(三) 狂组毒“aGT”和“a”株的生物学性状.....	(4)
(四) 讨论.....	(8)
(五) 小结.....	(9)
二、组织培养人用狂犬病疫苗的试制.....	(10)
(一) 材料和方法.....	(10)
(二) 实验结果.....	(11)
(三) 狂犬病组织培养灭活疫苗实验室定型图解.....	(17)
(四) 人体接种观察.....	(18)
(五) 讨论.....	(18)
(六) 小结.....	(19)
三、组织培养人用狂犬病疫苗健康人群与疯动物咬伤患者接种反应及效果观察.....	(22)
I. 组织培养人用狂犬病疫苗健康人群接种反应观察和血清抗体测定.....	(22)
(一) 接种对象.....	(22)
(二) 材料与方法.....	(23)
(三) 结果.....	(24)
(四) 讨论.....	(26)
(五) 小结.....	(28)
II. 组织培养狂犬病灭活疫苗疯狗咬伤患者接种效果观察.....	(28)
(一) 材料与方法.....	(28)
(二) 结果.....	(30)
(三) 讨论.....	(32)
(四) 小结.....	(34)
第二部份 兽用狂犬病弱毒细胞培养冻干疫苗研究.....	(35)
前言.....	(35)
一、BHK ₂₁ 细胞系.....	(35)
二、病毒分离.....	(35)
三、细胞增殖培养试验.....	(36)
四、LEP/BHK 注射狗安全及血清中和抗体效价测定.....	(37)
五、LEP/BHK毒素注射绵羊、家兔安全性观察和注射小白鼠安全剂量测定.....	(38)
六、冻干苗的试制.....	(40)
七、冻干毒的保存期试验.....	(41)

八、LEP/BHK 毒特异性检查	(42)
九、野外免疫试验	(42)
十、结语	(43)
十一、冻干疫苗生产及检验试行规程	(43)
参考文献	(45)

狂犬病疫苗的研究

第一部份 人用狂犬病疫苗的研究

武汉生物制品研究所
卫生部药品生物制品检定所
兰州生物制品研究所
长春生物制品研究所

前 言

狂犬病是一种人畜共患的严重传染病,自古以来多认为是必死之症,而传统作为自动免疫预防的疫苗,又不是百分之百有效,且因疫苗内含大量脑神经组织成分,可导致严重的中枢神经系统合并症。为此,制备安全高效的理想疫苗成为多年来的迫切愿望。采用组织培养方法制备狂犬病疫苗是解决这一问题的的重要途径。

我国目前已培养出一株适应于地鼠肾组织培养的人用狂犬病毒种。自1972年开始试制酚灭活疫苗,并曾在湖南、广西进行人体接种观察。但是用酚灭活的原制疫苗效力及稳定性不理想。1978年5月起,改进灭活方法,采用福尔马林灭活,以硫柳汞作防腐剂,并加入增效剂,经超滤浓缩和氢氧化铝佐剂等各种方法处理,制成高效和稳定的佐剂疫苗、超滤浓缩疫苗与超滤浓缩佐剂疫苗,在湖北、湖南、江苏等省进行了人体接种,获得满意效果。

一、狂犬病固定毒“北京株”在地鼠肾细胞培养中的适应及其生物学性状*

早在1913年,Levaditi等^[1]第一次成功地将狂犬病毒培养在离体的脊髓神经细胞上,并进行传代。1936—37年,Webster^[2]、Kanagawa^[3]、Schultz等^[4]曾用小白鼠、鸡、兔胚胎组织块培养狂犬病毒,获得一定的结果。四十年代仍有不少人进行这方面的工作,但都未能排除在脑神经组织上培养。直到1958年,Kissling^[5]才首次将狂犬病毒成功地培养在非神经组织的地鼠肾单层细胞上,为狂犬病组织培养疫苗的问世奠定了基础。此后,很多学者对狂犬病的组织培养进行了大量的工作^[6-20],采用了不同的培养方法。他们将狂犬固定毒或街毒适应于多种细胞上,如地鼠肾、狗肾、猴肾、鸡胚成纤维细胞、人二倍体细胞、BHK—21传代细胞株等,企图培植出既能高度适应于非神经组织的细胞,又能保持良好的

* 本实验病理学检查由湖北医学院病理教研组承担

免疫原性的组织培养狂犬病毒株，为大量生产组织培养狂犬病疫苗创造先决条件。近几年来，不少作者曾以人二倍体细胞组织培养疫苗（HDCV）免疫人体，结果抗体反应与保护性良好，反应轻微^[21,22]。

为了解决现行的人用羊脑组织狂犬病疫苗接种后的神经合并症，于1965年开始用北京株狂犬固定毒，通过地鼠肾细胞适应传代，初步获得了一株既能适应于原代地鼠肾细胞，又具有和北京株固定毒有相仿的免疫原性的狂犬病组织培养毒株，并投入试制疫苗和人群观察。现将此毒株的适应传代经过及其生物学性状叙述如下。

(一) 材 料 和 方 法

1. 动物

小白鼠（11—13克），豚鼠（120—140克用于传代，300—450克用于检定），家兔（1.5—2.0公斤），狗（10—20市斤），猴（2—3岁）。

2. 狂犬病毒株

北京株固定毒（用于适应传代和检定），济南株和兰田株街毒（用于检定）。

3. 人用狂犬病羊脑疫苗

国内生产的灭活狂犬病疫苗（用于比较检定）。

4. 地鼠肾单层细胞

以2—3周龄的金地鼠，按常规法取肾，制成细胞悬液，一般用4—6天的单层细胞进行毒种的传代适应试验。生长液成份 5—10%小牛血清，0.25%水解乳蛋白Hanks液，内含青、链霉素或卡那霉素各100单位，pH为7.1—7.2。维持液成份 0.2%白蛋白SM₁液，内含100单位卡那霉素。

5. 中和抗体测定法

按血清变量，病毒定量法进行中和抗体测定，先将抗体稀释成不同浓度如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ ……等，然后加入等量的31—316个LD₅₀的狂犬固定毒于37℃水浴进行中和，再将中和后的材料注射小白鼠，每只脑腔0.03ml，计算小白鼠的狂犬病发病率，求出能保护50%小鼠生存的最高血清稀释度，即为其效价。对照组应求出中和毒的实际毒力，如毒力 $< 31LD_{50}$ 或 > 316 个LD₅₀时，试验应全部重试。

6. 病理切片检查法

（1）取样：狗和猴分别取六块标本，即小脑、顶叶皮质、间脑、延脑、两侧阿蒙氏角各一块。小鼠和豚鼠则各取三块，即小脑一块，相当于阿蒙氏角同一平面的脑组织（包括大脑和间脑）两块。

（2）制片、染色：按常规进行。小脑及阿蒙氏角加做曼氏染色（Mann's stain），以观察尼氏小体。

（3）病理变化的分类：分为四类。

I类：有尼氏小体者。

II类：血管周围浸润（淋巴细胞套），胶质细胞弥漫增生及胶质细胞结节形成。

III类：脑软化灶形成，神经细胞重症变性嗜神经细胞象（Neuronophagis）或显著的脑膜的炎性细胞浸润。

IV类：神经细胞轻症变性（神经细胞急性肿胀，虎斑溶解）或轻度的脑膜的炎性细胞浸

润, 以及个别小灶性出血。

(4) 病理变化的分级: 本试验的动物标本按“重”、“中”、“轻”三级进行分级, 其标准如下:

重级: 以Ⅱ类病变为主, 分布部位广泛(一般各部位均能发现), 几乎每低倍视野均能发现病变, 或某一、二处病变特别严重。

中级: 以Ⅱ类病变为主, 分布部位和病变程度介于重和轻级之间, 多见于阿蒙氏角及脑干, 病变容易发现。

轻级: 以Ⅱ类病变为主, 分布部位较少, 多见于阿蒙氏角或脑干, 一般病变须寻找多个低倍视野才能发现。

(二) 实验经过和结果

1. 狂犬病组织培养毒株“aG”的来源

北京株狂犬病兔脑固定毒在本所按常规法传100代之后, 适应于原代地鼠肾细胞而获此株狂犬病组织培养毒株(下称狂组毒)。

2. “aG”株狂组毒适应传代的经过

用北京株兔脑固定毒分四系进行适应传代, 其中包括兔或鼠脑和地鼠肾单层细胞交替传代及单在地鼠肾单层连续传代两种方法, 即HK(地鼠肾单层细胞) $\rightleftharpoons$ 鼠或兔脑交替传代法和HK $\rightarrow$ HK $\rightarrow$ HK……连续传代法。各系毒株之间, 生物学性状并非完全相似, 但有一个共同点, 即经10—40代传代之后, 毒力很难超过 10^{-4} 的水平(小鼠脑腔法)。因此, 从数株毒种中选出性能较佳的“a”系毒种继续进行重点适应传代。现将由“a”系传出的“aG”株狂组毒的适应传代经过可分为三个阶段, 现简述如下:

(1) 第一阶段: 参考 Wiktor^[14]法, 先以北京株兔脑固定毒感染2—3周龄地鼠肾单层细胞, 置36—37℃培养48小时左右, 换上维持液, 继续培养到两周左右(其间换液1—2次)弃去上清液, 将感染狂组毒的地鼠肾单层细胞以0.25%胰酶消化, 做成细胞悬液, 然后加入适量新鲜的未感染病毒的正常地鼠肾细胞, 混匀, 再置于36—37℃培养48小时左右, 换上维持液继续培养两周左右(其间换液1—2次), 然后, 再同上法以胰酶消化, 加正常新鲜细胞继续培养(此法称消化混合培养法)。如此连续传四代之后(即8—4A株), 小鼠脑腔毒力为 10^{-2} — 10^{-3} /0.03ml。

(2) 第二阶段: 将8—4A株的上清液, 即认为可能易于适应于HK的活力较强的病毒液(毒力达 10^{-3} 以上), 直接种入5天左右的正常HK上, 培养于37℃环境下, 定期测毒力, 求出病毒繁殖的高峰期, 一般每隔10天至20天, 以感染狂组毒的培养液在HK上传代一次, 这样继续传代的结果, 培植出一株狂组毒株称“a”株, 如表1—1。从表1—1可见, 此株病毒在10代之前毒力一直较低, 病毒繁殖高峰期长达20天左右, 到37—43代期间, 毒力才上升到 10^{-4} — $10^{-4.5}$, 病毒繁殖高峰期缩短为8—10天, 传代44代之后, 毒力基本稳定在 $10^{-4.5}$ 左右, 病毒繁殖高峰期维持在5—7天之间, 这个阶段可认

表1—1 “a”株毒种适应株传代中毒力变化情况

代数	毒力(小鼠脑腔法)	毒力高峰期(天数)
1—10	$10^{-1.0}$ — $10^{-2.0}$ — $10^{-3.5}$	15—20—30
11—14	$10^{-3.5}$ — $10^{-4.0}$	15
15—36	$10^{-3.0}$ — $10^{-3.5}$	15
37—43	$10^{-4.0}$ — $10^{-5.5}$	8—10
44—68	$10^{-4.5}$ 左右	5—7

为北京株固定毒开始逐渐适应于HK,毒力增高,病毒繁殖周期缩短。其中值得注意的一点是:尽管狂组毒在HK上连续传至数十代之多,但始终未发现其具有独特的病变。HK即使在病毒繁殖高峰期,仍然和对照组的健康HK一样,细胞透亮,形态良好,经两周以上的培养之后,细胞才因老化而呈堆状,变圆或拉网,逐渐脱落。

(3) 第三阶段:狂组毒“a”株依上法传到68代,基本情况仍和40多代相同,毒力未见上升,病毒繁殖高峰也未见进一步缩短,同时也仍然没有细胞病变出现。这种性状和北京株固定毒在兔脑中传几百代仍然保持一定的潜伏期和毒力的特点颇为相似。

为了进一步提高“a”株的毒力,将第55代的“a”株毒种通过豚鼠脑腔交替传代,即一代组织培养和一代豚鼠脑内接种交替进行,使豚鼠脑腔高度繁殖而毒力达 10^{-6} 以上的豚鼠脑组织悬液直接感染正常的HK。结果,在交替传至三代之后,HK组织培养液的毒力水平提高到 $10^{-4.5}$ — $10^{-5.5}$,个别批号甚至可达 $>10^{-5.5}$ 的高度。这株狂组毒称为“aG”株。

“aG”株再种到地鼠肾细胞后称为“aGT”株。

由于“aG”株狂组毒具备了高度适应于原代HK的性能,并能产生与固定毒感染的羊脑相仿的毒力水平,因而可用此毒株进行全面检定并试制灭活的狂犬组织培养疫苗。

(三) 狂组毒“aGT”和“a”株的生物学性状

1. 对实验动物的致病性

以定量的狂犬固定毒(稀释成相当于狂组毒的滴度)“a”和“3aG₂T”株狂组毒培养液,3aG₂株狂组毒的豚鼠脑组织悬液等材料对实验室动物如小白鼠、豚鼠、兔、狗、猴进

表1-2 三株狂犬固定毒致病性比较

动物名称	注射途径	材料滴度	狂 犬 病 发 病 数*			
			北 京 株 固 定 毒	“a”株 狂 组 毒	“3aG ₂ T”株 狂 组 毒	“3aG ₂ ”株 狂 组 毒
豚 鼠	皮 下 肌 肉	2.0毫升(10^4)	3/7	0/23	0/46	1/8
		0.5毫升(10^4)	3/7	1/24	0/50	1/8
小白鼠	皮 下	0.5毫升(10^4)	2/8	0/33	0/126	4/20
	肌 肉	0.03毫升(10^4)	3/10	0/13	0/136	2/20
	腹 腔	0.5毫升(10^4)	2/10	0/34	0/87	1/10
家 兔	脑 腔	0.2毫升(10^4)	100%	6/29	0/4	2/6
	皮 下	2.0毫升(10^4)	0/2	0/2	0/4	—
	肌 肉	1.0毫升(10^4)	0/2	0/2	0/4	—
狗	脑 腔	0.3毫升(10^4)	28/28	1/11	2/18	4/40
	皮 下	28毫升(10^6) (2毫升 $\times$ 14)	0/5	—	0/15	—
猴	皮 下 肌 肉 脑 腔	28毫升(10^5)	2/5	0/2	0/5	—
		(2毫升 $\times$ 14)				
		10毫升(10^4)	—	0/2	—	—
		0.3毫升(10^4)	100%	2/2	—	—

* 分母为注射动物数,分子为发狂犬病动物数

行致病性状比较，详见表1—2。

(1) 对外周神经的致病性：固定毒对小白鼠和豚鼠的皮下、肌肉、腹腔感染力保持在20—30%。而“a”株和“3aG₂T”株狂组毒在表面上似乎对实验动物感染力大大下降。但当“3aG₂T”株组织培养液传回豚鼠脑之后（如3aG₂），又立即部分恢复对小鼠和豚鼠的外周感染力。

表1—2指出：两株狂组毒对猴皮下感染力似乎比固定毒有所减弱，但二者对家兔、狗的外周神经基本都失去感染力。

(2) 对中枢神经系统的致病性：两株狂组毒“a”和“3aG₂T”对小白鼠、豚鼠、猴的中枢感染力仍然保持100%致病，但发病潜伏期比北京株有所延长。对兔和狗脑腔感染力比北京株大幅度下降（仅占10—20%），如“a”株在兔脑腔和组织培养单层交替传代数次之后，家兔的发病潜伏期由5—7天延长到13—14天，临床症状如兴奋或全身麻痺的程度明显减轻，个别家兔在发病后，仅呈现轻度麻痺、共济失调、迟钝、竖毛、进食量少等现象，经数天后能自然复原，脑内毒力亦大大下降。

总之，上述两株狂组毒对实验室动物的各种注射途径致病性虽比北京株有所下降，但似乎仅是量变而非质变。“a”和“3aG₂T”株之间的致病力基本上是相似的，后者经豚鼠脑腔交替传代后，毒力有所提高，但致病力改变不大。

2. 组织病理变化

狂组毒“3aG₂T”株感染狗、猴后，将狗、猴的脑子进行病理切片检查（结果详见表1—3）。

表1—3 狂组毒“3aG₂T”北京株固定毒和羊脑疫苗对狗、猴引起的脑病理变化

动物	注射途径	接种材料		狂犬病		脑内病变(%)				备注
		名称	滴度	死亡数	%	重	中	轻	阴	
狗	脑腔	3aG ₂ T ₁	4.76—6.0	3/34	9	15	21	51	12	接种材料后，1—3月定期剖杀数只狗，检查脑病变
		3aG ₂ T ₂	4.5	1/6	17	16	0	50	33	
		北京株固定毒	4.0—4.7	13/13	100	64	9	9	18	
狗	皮下	3aG ₂ T ₁	5.33	0/8	0	0	0	0	100	接种材料后，1、2、3、6和7月定期剖杀数只狗、检查脑病变
		羊脑疫苗	0	0/8	0	0	0	0	100	
		北京株固定毒	6.0	0/5	0	0	0	0	100	
猴	皮下	3aG ₂	5.0	0/5	0	0	0	0	100	接种材料后，1和2月定期剖杀数只猴，检查脑病变
		北京株固定毒	4.25	2/5	40	0	20	20	60	
		羊脑疫苗	0	0/5	0	0	0	20	80	

(1) 狗脑腔感染狂组毒和北京株固定毒之后，除观察狂犬病发病率之外，还将每只狗脑进行组织切片检查。结果，北京株固定毒对狗引起的病理变化，“重”者占64%，狂组毒则占15—16%。“轻”度病变，前者占9%，后者却占50—51%。

(2) 北京株固定毒，羊脑疫苗和狂组毒皮下感染狗，其脑内均无病理变化。

(3) 狂组毒皮下感染五只猴子，猴均未发狂犬病，脑内也未发现病变。羊脑疫苗虽是灭活的疫苗，也能使1/5的猴子脑内产生轻度的病变。固定毒皮下感染猴子，能使40%猴发狂犬病，脑内也产生“中”和“轻”度的病变。

3. 狂组毒“3aG₂T”株免疫狗、猴后中和抗体产生的情况

以狂组毒、北京株固定毒和山氏羊脑疫苗免疫狗、猴，定期测定其血清中的中和抗体，加以比较，详见表1—4。

表1—4 狂组毒、北京株固定毒和羊脑疫苗免疫狗、猴的中和抗体水平

动物	免疫途径	试验材料及其毒力或效价	中和抗体滴度(几何平均数)					
			7天	14天	21天	30—34天	40—60天	>60天
狗	皮下	3aG ₂ T 10 ^{-5.33-5.50}	22	433	683	310	186	38
		羊脑疫苗7118 186200	<20	91	221	154	246	21
		固定毒(活) 10 ^{-4.0-5.0}		46	119	226	75	<10
猴	皮下	3aG ₂ T 10 ^{-5.0}	<10	203	313	220		
		羊脑疫苗干72—3 346,700	<10	52	50	77		
		固定毒(活) 10 ^{-4.12}	<10	51	46	<40		

(1) 狂组毒免疫狗后第七天，中和抗体就开始上升(达1:14)，羊脑疫苗一般需在免疫后10—14天才能产生较明显的抗体。在免疫后第14—21天，狂组毒的中和抗体平均水平也比羊脑疫苗为高，一个月后，二者滴度相仿，维持到60天抗体均开始下降。活的固定毒免疫狗，并未使狗产生更好的免疫效果。

(2) 狂组毒免疫猴，其产生的中和抗体水平也比羊脑疫苗高，前者平均抗体在第14天便可达1:313，并维持这个高度达一个月之久，活的固定毒皮下免疫猴子，虽未使猴子发狂犬病，但亦未见能激起比羊脑灭活疫苗更高的中和抗体。这点与在狗体上的实验结果是一致的。

3aG₂T采用四针法免疫狗、猴，即于第1、2、3、10天各注射一次，每次注射7.0毫升；羊脑疫苗用14针法，即每日一次，连续14天，每次2.0毫升；固定毒狗采用14针法，猴即用四针法免疫。

(3) 从以往的实验资料也可同样证实，“a”株狂组毒对豚鼠、狗、猴亦都能激起和羊脑疫苗相仿的中和抗体水平。

4. 狂组毒“a”株，“3aG₂”株和北京株固定毒的免疫原性之间的关系

应用小白鼠做交叉中和试验和交叉保护力试验进行比较测定，详见表1—5。

(1) 以狂组毒“a”株和以北京株固定毒制备的山氏羊脑疫苗免疫小白鼠，然后，分别以活的“a”株和“固定毒”交叉攻击。从二者的保护指数看来，抗原性是很相似的，没有明显变异。

(2) 以两株病毒的特异性抗血清进行交叉中和试验。表1—5指出：狂组毒“3aG₂T”、“3aG₂”株和北京株的交叉中和指数分别为4571、5495和10000。所以，进一步说明狂组毒和固定毒之间抗原性是相仿的。

5. 保护性测定

(1) 先免后攻法：即先以一定量的疫苗免疫豚鼠，狗、猴，然后于免后24天、30天或45天，再以“济南”株街毒进行肌肉攻击。观察狂组毒对动物的保护能力，攻街毒后观察2个月判结果。详见表1—6。

表1—5 两株狂组毒和北京株固定毒的交叉保护和中和试验

实验号数	试 验 材 料	交 叉 保 护 指 数		交 叉 中 和 指 数	
		攻击毒“a”株	攻 击 毒 “北京株”	抗北京株血清	抗“aG”株血清
1	“a”株 羊脑疫苗	8128 2,291	6310 9.772		
2	“a”株 羊脑疫苗	23,990 23,990	63,100 309,000		
3	“3aG ₂ T”株 “3aG ₂ ”株 北京株固定毒			4571 5495	10,000

表1—6 比较狂组毒“a”株和羊脑疫苗对豚鼠、狗和猴的保护力（先免后攻法）

动 物	免 疫 材 料	免 疫 方 法	狂犬病 死亡数	动 物	免疫材料毒力及效价	免 疫 方 法	狂犬病 死亡数	备 注
豚	“a”株	4针法	0/4	狗	“a”株 $10^{-4.0}$ — $10^{-4.5}$	14针法和 4针法	1/22	四针法：即 于1,2,3,10 天各注射 7.0毫升。
	“a”株	14针法	0/4		羊脑疫苗186200,346700	14针法	1/8	
	羊脑疫苗	4针法	0/5		对 照 组	—	10/10	
鼠	羊脑疫苗	14针法	0/5	猴	“a”株 $10^{-4.0}$ — $10^{-4.5}$	14针法	0/8	14针法：即 连续注射14 天每日2.0 毫升。
	对照组 (未免疫)		3/4		羊脑疫苗186200,346700	14针法	0/5	
					对 照 组	—	4/5	

表1—7 比较狂组毒“a”“3aG₂T”株和羊脑疫苗对狗的保护力（先攻后免法）

动 物	免疫和攻 击的间隔	攻击毒名称	免 疫 材 料 及 其 毒 力 或 效 价	狂犬病死亡率 (%)	备 注
狗	5分— 24小时	济南株和 兰田株 街 毒	“a”株 $10^{-3.76}$ — $10^{-5.33}$ 羊脑疫苗107200—616000 对 照	9/24(37.5%) 9/17(52.9%) 10/12(83.3%)	(1) 本结果系三次实 验的累积数 (2) 狗的第一次实验 采用攻击毒后5 分钟,立即开始 免疫治疗,其余 的均为攻毒后24 小时开始免疫
狗	24小时	济南株 街 毒	“3aG ₂ T” $10^{-3.76}$ — $10^{-5.33}$ 羊脑疫苗107200—616000 对 照	11/46(23.9%) 4/23(17.3%) 10/22(45.4%)	

表1—6指出：无论从豚鼠、狗或猴的保护力看来，“a”株狂组毒均具有和山氏羊脑疫苗有相仿的保护能力。

(2) 先攻后免法：先以狂犬街毒肌肉感染狗，经5分钟或24小时之后，再用狂组毒

“a”或“3aG₂T”株进行免疫，狂组毒用四针法或二针法免疫狗，四针法即于第1、2、3、10天各注射一针，每针7毫升。二针法即第一日注射4毫升第七日注射2毫升，而羊脑疫苗注射14针，每日注射2毫升，连续14日，观察两个月。详见表1—7。

表1—7指出：经“a”株狂组毒免疫的狗，狂犬病死亡率为37.5%。羊脑疫苗组为52.9%。经“3aG₂T”狂组毒免疫的狗，狂犬病死亡率为23.9%，羊脑疫苗为17.3%，这些结果可以认为，狂组毒和北京株固定毒制备的山氏羊脑狂犬疫苗对狗抗街毒攻击的能力也是相仿的。

6. 狂组毒 “3aG₂T” 株的纯毒检查

(1) 将“3aG₂T”株(毒力=10⁻⁵)加入精制抗狂犬马血清(效价为1:3890)，使血清最后浓度成1:50，置4—8℃冰库20—24小时后，接种豚鼠、家兔、小白鼠和乳小白鼠，结果如表1—8所示。所有的实验动物在接种上述材料之后三周，均健存。

(2) 将上述经抗狂犬血清中和过的材料(3aG₂T)接种于原代鸡胚细胞、原代地鼠肾细胞及传代的FL细胞株上，每四天收半量培养液盲传一代，共三代，取第三代培养液按表1—8的方法接种乳鼠(皮下、脑腔各一窝)、豚鼠(脑内及肌肉各2只)及家兔(脑内2只)，观察三周，全部动物均健康。由此可以认为，“3aG₂T”狂组毒并未污染外来的野毒。

表1—8 “3aG₂T”株狂组毒纯毒试验

动物名称	动物体重(克)	动物只数	注 射		观察三周后
			途 径	剂 量 (ml)	
豚 鼠	140—160	2	脑 内	0.1	健 康
	140—160	2	肌 肉	0.5	健 康
家 兔	1公斤左右	2	脑 内	0.2	健 康
小白鼠	11—13	4	脑 内	0.03	健 康
乳 鼠	一 窝	8	脑 内	0.01	健 康
乳 鼠	一 窝	7	皮 下	0.1	健 康

(四) 讨 论

1. 关于毒种的纯度问题

“a”株狂组毒虽在原代HK上传五、六十代之多，但始终未发现有其独特的细胞病变。HK感染“aG”毒种之后，6—8天毒力可达10⁻⁵—10^{-5.5}/0.03毫升，但此单层细胞仍然保持和正常对照细胞相似的特点：细胞贴壁紧，透明度良好，培养两周之后才开始变圆，呈堆状或拉网状，逐渐脱落。所以，在“aGT”株适应过程中，无法筛选出单个克隆(Clone)的病毒颗粒进行纯化工作。从“3aG”株对海猪、小白鼠外周神经的致病性能看来，此株病毒可能含有两种以上的致病力强弱不一的颗粒，如“a”株在未经豚鼠脑腔交替传代之前，对小白鼠、豚鼠、狗、兔、猴的外周神经感染力几乎全部丧失。但当在豚鼠脑内交替传代三次之后，个别豚鼠便重新出现外周神经有致病能力的现象来。此外，含这几种致病性不同的颗粒的毒株，经数十代传代之后，仍然保持一定的毒力水平和与原北京株固定毒相仿的免疫原性。

2. 关于毒种的毒力水平和培养条件

“a”株狂组毒在HK上传五、六十代之后，毒力水平仍然保持在10^{-4.5}左右，不再上升

到和羊脑固定毒株相仿的毒力高度, 这和kissling^[5、6]用原代地鼠肾单层细胞适应狂犬固定毒的情况相似, 这对制备疫苗是不利的。Wiktor等^[14、15]用人二倍体细胞 (WI-38) 株进行狂犬固定毒的适应传代, 他们认为二倍体细胞比原代地鼠肾单层细胞优点多, 毒力也高些, 又可避免异种细胞引起的不良反应。

kissling^[6]认为影响狂组毒毒力水平的重要原因之一是培养温度的因素。狂组毒在 HK 上培养的过程较长, 在更换维持液之后, 若改用 33—34°C 培养, 可能会获得较佳的结果。Wiktor 等介绍用 32°C 更适宜些。Selimov 等^[18]认为转动培养比静置培养更有利, 因为转动培养可增加氧含量, 促进细胞代谢, 有助于病毒繁殖, 可提高一定的毒力水平。亦有人主张在狂组毒培养过程中, 加鱼精蛋白, DEAE—葡聚糖……等, 以提高毒力。总之, 若认真综合上述因素, 加以改进, 很可能将狂组毒的滴度自 10^{-5} 提高到 10^{-6} 左右, 这样就给疫苗生产创造更有利的条件。

3. “aGT” 株狂组毒免疫原性和北京株固定毒

“aGT” 株狂组毒免疫原性和北京株固定毒相比, 基本上相仿或略优。如 “aGT” 株给狗免疫后第七天, 便可测出中和抗体, 而羊脑疫苗则需 10—14 天^[23]。对猴的抗体反应值也比羊脑疫苗为高。peck 等^[24]曾报告, 鸭胚狂犬疫苗按常规法免疫, 仅能使猴子产生 1:10—1:85 左右的中和抗体水平。其他的学者也普遍认为鸭胚疫苗免疫力偏低, 所以, 也可以设想狂组毒比鸭胚疫苗为优越。Sikes, Koprowski 等^[20]报告用浓缩的人二倍体组织培养疫苗, 可使猴在免疫后 8 天中和抗体便可达 1:100 以上, 一个月可高达 1:1000 以上。近年来人体接种的血清抗体反应与效果观察, 获得了较为满意结果^[22]。因此将原制的组织培养疫苗进行浓缩, 其实验室与人体观察的初步结果也较满意, 确是一个重要的方向。

(五) 小 结

我国已初步成功地培植出一株既适应于原代地鼠肾细胞, 又具有象北京株固定毒相仿的免疫原性的组织培养狂犬病疫苗毒株。此株毒株较目前生产羊脑疫苗用的北京株固定毒的致病力已有明显降低, 神经外途径感染实验室的动物如小鼠、家兔、狗、猴几乎都不发生狂犬病。脑内感染狗和兔, 致病力也有不同程度地降低, 从病理检查方面也证实了这个结论。此毒株制成的疫苗, 在狗、猴血清中和抗体反应方面, 以及抵抗狂犬街毒攻击方面 (豚鼠、狗、猴), 都和现行的羊脑疫苗具有相仿的水平。

参 考 文 献

- [1] Levaditi, M, C.: C, R, Soc, Biol, (Pan's), 75:505, 1913
- [2] Webster, L, T, & Clow, A, D.: J, Exp, Med, 66:125, 1937
- [3] Kanagawa, K.: J apanese J, Exp, Med, 14:519, 1938
- [4] Schultz, E, W. & Williams, G, F.: PSEBM 37:372, 1937
- [5] Kissling, R, E, PSEBM. 98:223, 1958
- [6] Kissling, R, E, et al. J, Immunol 91:362, 1963
- [7] Love, R, & Koprowski, H.: PSEBM, 116:560, 1964
- [8] Hayflick, L.: Exp, Cell Res, 25:585, 1961
- [9] Fenje, P.: Canad, J, Microbiol, 6:479, 1960

- [10] Fenje, P.,: Canad, J, Microbiol, 6:605, 1960
- [11] Abelsett, M, K.,: Canad, Vet, J, 5:84, 1964
- [12] Abelsett, M, K.,: Canad, Vet, J, 5:279, 1964
- [13] Otte, C, & Hoyke, B.,: Vet, Med, 57:158, 1962
- [14] Wiktor, T, J, & Fernandes, M.,: J, Immunol, 93:353, 1964
- [15] Wiktor T, J, & Koprowski, H.: PSEBM, 118:1069, 1965
- [16] Hronovsky, V.: Acta Virol, 12:233, 1968
- [17] Kondo, A.,: Virology 27:199, 1965
- [18] Selimov, M, A, et al. Prob, Vivol, 1:88, 1967 (in Russian)
- [19] Selimov, M, A, et al, Prob, Vivol, 1:36, 1967 (in, Russian)
- [20] Sikes, R, K, & Koprowski, H.: Bull, WHO.45:1, 1971
- [21] Plotkin, S, A. et al: Amer, J, Epid, 103:75, 1976
- [22] Karger, S, Basel, Development Biological Standardization, Vol, 40, 1978
- [23] Habel, K.: Puhl, Health Rep, 72:667, 1957
- [24] Peck, F, B, et al: JAMA, 162:1373, 1956

二、组织培养人用狂犬病疫苗的试制

(一) 材 料 和 方 法

1. 毒种^[30]

应用“aG”株，此毒株为北京株固定毒适应于地鼠肾组织培养的病毒株，经过各项生物学检定，符合用于制造疫苗的要求。制造疫苗的毒种为120—140克豚鼠脑腔5代以内传代者。豚鼠脑毒种用60%甘油缓冲盐水或纯甘油于-10℃以下保存。毒种毒力小鼠脑内注射在 10^6 LD₅₀以上。

2. 疫苗制造

应用2—3周龄地鼠肾，以0.25%胰蛋白酶消化，培养瓶为2000毫升Rou×瓶，营养液为含有0.25%水解乳白蛋白的SM₁液，其中含10%牛血清、适量抗菌素，待细胞长成单层后，种入毒种。其毒种量使其最后浓度成1:500—1:2500。种毒后3天换入不含牛血清的0.1—0.25%人血白蛋白新鲜维持液及适量卡那霉素。种毒后7—9天收获培养液，加入1/2000，或1/4000—1/5000福尔马林，放37℃灭活，1/2000福尔马林37℃10—24小时，1/4000—1/5000福尔马林为24—48小时，成为原制疫苗。疫苗内如加入Al(OH)₃(0.5毫克/毫升)为佐剂疫苗。原制疫苗加以超滤膜过滤浓缩，为浓缩疫苗。如再加入Al(OH)₃为佐剂浓缩疫苗。佐剂浓缩疫苗、原制疫苗、浓缩疫苗可以进行冷冻干燥，佐剂疫苗不必冻干。

3. 检定

效力、安全、无菌试验等各项检定完全按照我国现行羊脑狂犬病疫苗操作规程进行^[35]，效力试验应用Habel氏法，效力以效力保护指数LD₅₀数字表示之，10,000为合格。血清中和抗体测定按Kaplan方法^[36]，此外对原制疫苗与浓缩疫苗作了一些理化检查，利用酚灭活

疫苗以狗、猴作免疫原性测定。

(二) 实 验 结 果

1. 福尔马林灭活剂的灭活效果

连续17批次应用1/2000, 1/4000或1/5000福尔马林于37℃灭活10—72小时, 其效力与安全试验结果如1—9表:

表1—9 福尔马林灭活疫苗安全与效力试验结果表

批 号	灭活前滴定 Log LD ₅₀	福尔马林 浓 度	疫苗装量 (毫升/瓶)	37℃灭活时间 (小时)	安全试验 (小鼠发病数 /小鼠数)	效力保护指数
78—23	4.33	1:2000	1,000	16 + 8 = 24	0/2	37,150
78—24	4.50	1:2000	1,000	16 + 8 = 24	0/2	257,000
78—26	3.67	1:2000	2,400	24	0/2	1,000,000
78—27	4.00	1:2000	1,600	24	0/2	251,200
78—32	5.00	1:2000	5,000	11½	0/2	117,500
78—35	5.00	1:2000	1,000	10	0/2	83,180
78—36	4.77	1:2000	1,000	10	0/2	758,600
78—37	5.00	1:2000	1,000	10	0/2	10,960
78—38	5.00	1:2000	1,000	10	0/2	389,000
78—39	≥5.00	1:2000	1,000	10	0/2	72,440
78—26	3.67	1:4000	1,000	48	0/2	128,800
78—27	4.00	1:4000	1,000	48	0/2	346,700
78—28	4.00	1:4000	1,000	48	0/2	331,100
78—28	4.00	1:5000	3,200	72	0/2	13,800
78—29	4.33	1:5000	4,000	48	0/2	501,200
79—3	5.33	1:5000	1,000	20	0/2	28,840
79—4	4.33	1:5000	1,000	20	0/2	724,400

由表1—9中17批疫苗不论1/2000或1/4000、1/5000福尔马林, 均可于较短时间内 (一般在48小时内) 灭活, 其灭活后疫苗效力均在合格标准 (即保护指数为10,000) 以上, 且≥10万以上的高效力批号占多数 (11批, 占65%)。又以表中结果看, 滴度与效力似无一定关系, 两批滴度对数为3.67的疫苗效力, 并不比另外6批滴度≥5.00的效力为低。又为了比较福尔马林与酚对病毒的灭活效果, 将同一批病毒培养液分为两份, 一份用福尔马林灭活, 另一份用酚灭活, 进行6批次实验, 比较其效力, 结果如表1—10。

表1—10中福尔马林与酚灭活对比结果, 除78—23福尔马林灭活疫苗可能因该批进行了重灭活影响效力外, 其余各批福尔马林灭活疫苗效力均高于酚灭活疫苗3—40倍。

2. 硫柳汞作为组织培养狂犬病疫苗防腐剂的效果

以同批1/5000福尔马林灭活疫苗, 灭活后等分为两份, 一份加0.2%酚作为防腐剂, 另一份加入1/10,000硫柳汞为防腐剂, 于2—8℃放置六个月, 检定效力, 比较三次实验, 其结果如表1—11。

表1—10 福尔马林与酚灭活
疫苗效力比较

批 号	保 护 指 数		提高倍数
	酚灭活	福尔马林灭活	
78—23	218,800	37,150*	—
78—24	77,630	257,000*	3
78—26	12,880	128,800	10
78—27	39,810	251,200	6
78—28	7,244	331,100	40+
78—32	46,770	117,500	3—

* 曾重灭活一次

表1—11 硫柳汞、酚作疫苗防腐剂
对效力稳定性影响比较

批 号	防腐剂	2—8℃ 保存时间	保护指数
78—39	① 硫柳汞	6个月	467,700
	② 酚	6个月	18,200
79—1	① 硫柳汞	6个月	213,800
	② 酚	6个月	2,754
79—2	① 硫柳汞	6个月	223,900
	② 酚	6个月	2,089

表1-11中结果,硫柳汞作为防腐保存剂者比酚为防腐保存剂者效力指数高25—100倍,可见酚对效力稳定性有严重不良影响。也初步说明福尔马林灭活疫苗的的稳定程度。

3. 精氨酸的增效应用^[37]

按SM₁维持液中的原精氨酸含量14毫克/1000毫升增加至10倍量即140毫克/1000毫升作疫苗,其效力结果如表1-12。

表1—12 不同量精氨酸对效力影响

批 号	14毫克保护指数	140毫克保护指数	批 号	14毫克保护指数	140毫克保护指数
78—18	15,850	109,600	79—4	446,700	724,400
79—3	512,900	245,500	79—5	37,150	512,900

表1-12中结果,140毫克精氨酸含量者有2批效力较高,另2批近似,初步说明精氨酸的增效作用。适当再增加精氨酸含量可能进一步提高疫苗效力的效果。

4. 氢氧化铝作为疫苗佐剂的作用

氢氧化铝作为组织培养灭活疫苗佐剂,1972年即开始试用,兹列举20批,同批疫苗分为原制疫苗,与另一份加入Al(OH)₃0.5毫克/毫升后成佐剂疫苗进行效力比较,其结果如表1-13。

从表1-13中20批原制与佐剂疫苗效力比较结果看,佐剂疫苗批号大多数比原制效力增加5—60倍不等。

关于佐剂疫苗的稳定性,用6批佐剂疫苗放在温度2—8℃处一年,部分批号放37℃1个月,室温6个月,测其效力稳定性,证明是相当稳定的。其结果如表1-14。

表1-14结果表明,佐剂疫苗放置2—8℃12个月效力无下降趋势,个别批号放置37℃一个月,室温6个月,效力仍在合格标准以上,说明佐剂疫苗是相当稳定的。

5. 超滤浓缩疫苗试验

采用国产管型醋酸纤维素超滤膜,管长100厘米,内径1.4厘米,有效过滤面积为440厘米²,滞留阈为MW=3000,1.0—1.5公斤压力每小时滤速约500—800毫升,滤管采用2—5%福尔马林浸泡消毒,滤前先以10,000毫升蒸馏水先预洗滤。经超滤浓缩共12批次,浓缩倍

表1—13 原制与 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂疫苗效力比较

批 号	保 护 指 数		效 力 增加倍数 (近似值)	批 号	保 护 指 数		效 力 增加倍数 (近似值)
	原 制	佐 剂			原 制	佐 剂	
72—6	26,920	128,800	5	75—16	87,100	107,200	—
73—2	131,800	$\geq 1,000,000$	8	77—8	42,660	234,400	5
73—21	114,800	676,100	6	78—9	14,130	407,400	28
73—22	6,607	398,100	60	78—10	5,627	316,200	56
73—23	1,995	38,900	20	78—14	17,780	691,800	38
74—3	354,800	512,900	—	78—19	38,020	1,023,000	27
74—6	7,586	467,700	60	78—23	218,800	199,500	—
74—8	12,880	776,300	60	78—27	39,810	275,400	7
74—9	371,500	724,400	2	79—3	28,840	512,900	18
75—15	69,180	323,600	5	79—4	724,400	501,200	—

表1—14 佐剂疫苗效力稳定性

批 号	原 效 价	37℃	室 温	2—8℃ 效 价	
		1 个月	6 个月	6 个月	12 个月
73—2 铝*	$\geq 1,000,000$			812,800	302,000
73—3 铝	512,900				616,600
78—9 铝	407,400				537,000
78—10 铝	75,860				234,400
78—14 铝	436,500	166,000	32,360		$\geq 1,259,000$
78—19 铝	$\geq 1,023,000$		213,800	46,770	

* 铝就是 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂，下同。

数5—25倍不等，浓缩后疫苗再经2000—3000rpm/分钟沉淀20—30分钟，即为浓缩疫苗。取其半量加入氢氧化铝佐剂，成为浓缩佐剂疫苗。其效力结果如表1—15。

表1—15 超滤浓缩疫苗试验结果

批 号	浓 缩 前 效 力	浓缩倍数	浓缩疫苗效力	浓缩佐剂疫苗效力
混78—1	7,244; 14,130	7	$\geq 1,023,000$	$\geq 1,072,000$
混78—2	11,480; 131,800	25	$\geq 758,600$	$\geq 1,288,000$
78—13	123,000	15		$\geq 1,380,000$
混78—23	37,150; 257,000	15	$\geq 1,480,000$	$\geq 1,480,000$
78—29	501,200	5	$\geq 467,700$	—
混78—31	37,810; 218,800	7	309,000	$\geq 537,000$
78—32	117,500	8	干741,300	$\geq 128,800$
78—35	83,180	9	干 $\geq 1,096,000$	$\geq 1,480,000$
78—36	758,600	11	干 $\geq 1,288,000$	$\geq 1,288,000$
78—37	—	13	干 $\geq 1,072,000$	$\geq 1,072,000$
78—38	—	17	干 $\geq 1,230,000$	$\geq 1,230,000$
78—39	—	11	干 $\geq 794,300$	$\geq 1,230,000$

从表 1—15 可见，浓缩后疫苗效力大为提高，其中 78—13，78—32，78—35 三批提高的倍数基本与浓缩倍数相符。

浓缩疫苗与浓缩佐剂疫苗的效力稳定性，可用 6 批次疫苗放置 37℃ 试其稳定与否，其结果如表 1—16。

表 1—16 浓缩疫苗效力稳定性

批 号	原 效 价	37℃ 效 价		
		1 个 月	2 个 月	4 个 月
干浓 78—32	≥741,300	251,200	257,200	23,990
干浓 78—35	≥1,096,000	871,000	1,259,000	616,600
干浓 78—36	≥1,288,000	380,200	≥1,480,000	≥2,344,000
浓 78—32 铝	≥1,288,000	588,800	1,738,000	≥2,344,000
浓 78—35 铝	≥1,480,000	575,400	≥1,738,000	≥1,203,000
浓 78—36 铝	≥1,288,000	676,100	≥1,995,000	≥3,162,000

从表 1—16 看，放置 37℃ 1、2 个月的浓缩疫苗的效力基本不变，放置 4 个月的效力结果，除 78—32 批冻干浓缩疫苗效力有下降外，其余 5 批效力均看不出有所下降。

从以上各项试验，发现了多种对疫苗效力与效力稳定性的有利因素：

(1) 用福尔马林灭活的疫苗 ≥10 万以上的高效力批号占多数，而酚灭活疫苗以 5 万以下的偏低效力及不合格的占多数。二种灭活剂并行比较时，发现福尔马林疫苗效力比酚疫苗高许多倍。

(2) 从硫柳汞与酚作为防腐剂比较，二者效力稳定性差别更大，即以硫柳汞为防腐剂疫苗效力，比以酚为防腐剂疫苗高 25—100 倍，进一步说明酚对效力稳定性的不利作用。

(3) 疫苗加入较大量 (10 倍于原量) 精氨酸，似显出对效力的有利影响。

(4) 疫苗加入氢氧化铝佐剂，从数年来的疫苗批号结果看，证明可以增加效力 5—60 倍。

(5) 我们应用国产管型醋酸纤维素超滤膜，对原制疫苗进行超滤浓缩 5—10 倍，证明效力可以相应提高。如果浓缩疫苗加入佐剂，其效力更为提高与稳定。总之，采用以上 5 种有利因素，疫苗的效力与效力稳定性都获得了改进。

6. 各项检定结果

(1) 理化检查：

组织培养灭活疫苗为淡红色透明液体，如加入 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂时，则微呈浑浊，Al 久放则形成沉淀。其 pH、总氮与总蛋白含量测定结果如表 1—17。

表 1—17 组织培养原制疫苗生化测定结果

疫苗种类	批 号	pH	总氮%	总蛋白%	备 注
组 织 培 养	73—7	7.3	0.024	0.12	疫苗内包括加入的 7 种氨基酸量与白蛋白量 0.1%
	73—10	6.9	0.024		
羊 脑 对 照	73—50	6.24	0.077	0.41	
	73—52	6.25	0.074		