

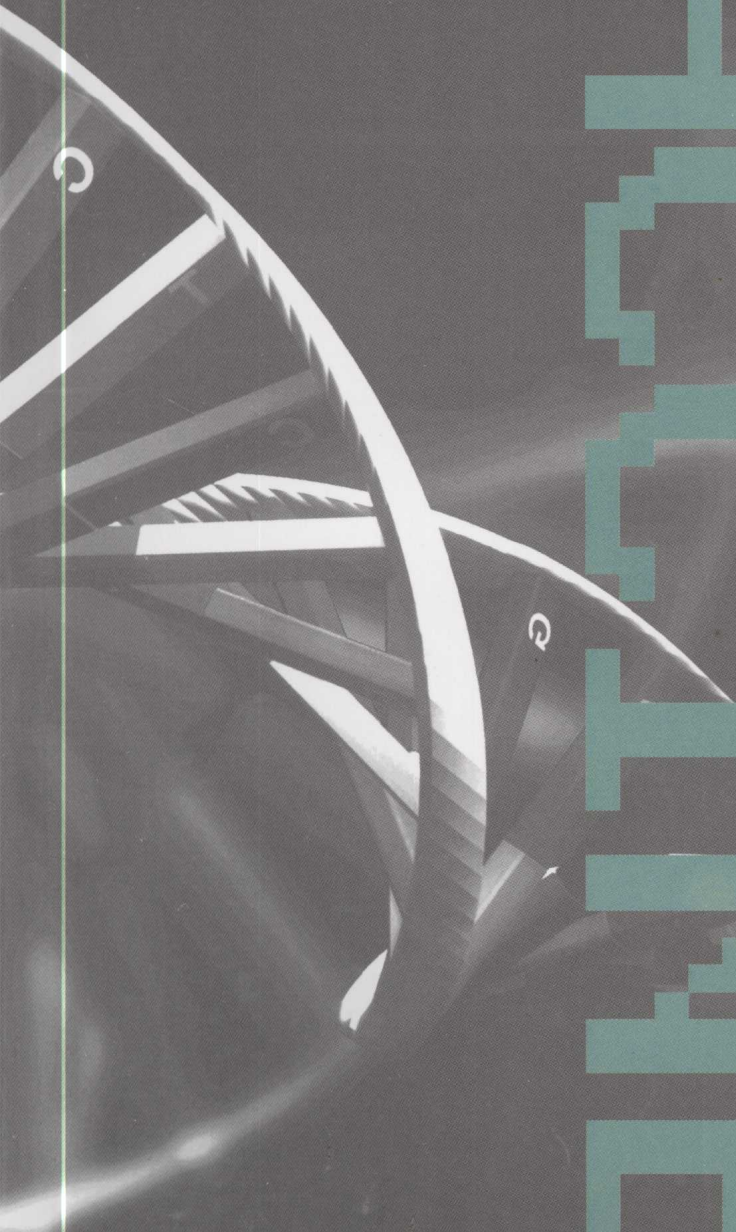
窦 骏◎主编

疫苗工程学

VACCINE
ENGINEERING

VACCINE ENGINEERING

东南大学出版社



全国高等学校教材
供基础、临床、预防、生工、药学、兽医、生医类专业用

疫苗工程学

主 编 窦 骏

副 主 编 王立新 赵 宇

编 者 (以姓氏笔画为序)

王 净(东南大学中大医院)

王长娴(东南大学基础医学院)

王世霞(南京医科大学江苏省人民医院中美疫苗研究中心;
美国马萨诸塞大学医学院)

王立新(东南大学基础医学院)

卢 山(南京医科大学江苏省人民医院中美疫苗研究中心;
美国马萨诸塞大学医学院)

沈传来(东南大学基础医学院)

张 莹(东南大学基础医学院)

杨瑞丽(东南大学基础医学院)

赵 宇(东南大学基础医学院)

赵枫姝(东南大学基础医学院)

唐 权(东南大学医学院)

高大庆(东南大学基础医学院)

陈国兵(中国药科大学生命科学与技术学院;
澳大利亚墨尔本大学医学院)

窦 骏(东南大学基础医学院)

廖继佩(东南大学基础医学院)

潘 宁(东南大学基础医学院)

编写秘书 唐 权(东南大学医学院)

东南大学出版社

· 南 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

疫苗工程学/窦骏主编. —南京:东南大学出版社,
2007. 10

ISBN 978 - 7 - 5641 - 0969 - 1

I. 疫… II. 窦… III. 疫苗—研究 IV. R979. 9

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 158512 号

东南大学出版社出版发行
(南京四牌楼 2 号 邮编 210096)

出版人:江 汉

江苏省新华书店经销 溧阳市晨明印刷有限公司印刷
开本:787mm×1092mm 1/16 印张:26.75 字数:685 千字

2007 年 10 月第 1 版 2007 年 10 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5641 - 0969 - 1/R · 92

印数:1~3000 定价:45.00 元

(东大版图书若有质量问题,请与读者服务部联系。电话:025—83792328)

前 言

疫苗工程学与基础医学和临床医学密切相关,是一门理论与实践高度结合、综合性、应用性很强的课程。为了满足我校生物工程专业教学的需要,特组织基础医学院病原生物学与免疫学系和相关学科(系)老师及国外本领域的专家编写了这本《疫苗工程学》。

全书共二十九章,第一~十章是总论部分,介绍了疫苗理论、技术、研制流程、应用、计划免疫、市场管理及疫苗相应法规,对传统疫苗、基因工程疫苗和核酸疫苗进行了详细的描述,并提供了新疫苗研究及开发的新技术和新信息。第十一章开始的各论部分,按细菌类疫苗、病毒类疫苗、真菌类疫苗、寄生虫类疫苗、肿瘤疫苗等分类,介绍了相应疫苗的研制与应用,并对预防艾滋病、肝炎、结核病、疟疾、SARS、禽流感等传染病的新疫苗研究进展进行了介绍。本书属首次编著,可作为生物工程专业、药学专业、医学专业、生物医学专业、分子生物学专业、兽医专业等大专院校教材,亦可作为从事生物高科技专业人员、科研人员和进修人员的参考读物。

我们从2005年12月开始本教材的准备,由于编者主要是病原生物学与免疫学系老师,教学和科研任务繁忙,且目前暂无适宜疫苗工程学教学所用的教材,编写人员以张延龄、张晖教授主编的《疫苗学》和李忠明教授主编的《现代疫苗学》为蓝本,参考相关教材和论著,并结合自身在疫苗研究工作中的经验,尝试着编写了本书。在此,对《疫苗学》和《现代疫苗学》主编张延龄、张晖、李忠明教授表示真挚的感谢。对本教材涉及以上两本书的相关内容,我们愿与三位教授保持交流与沟通。限于编者水平有限,加上时间紧迫,教材中难免有疏漏和错误之处,恳请读者与同行指正。

东南大学 赛骏

2007年6月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 疫苗学概述.....	(1)
第二节 疫苗学发展简史.....	(2)
第三节 疫苗对人类的贡献和疫苗研究面临的任务	(10)
第四节 疫苗工程学	(12)
第二章 免疫学与疫苗	(16)
第一节 免疫学概述	(16)
第二节 疫苗有效免疫反应的基本要素	(49)
第三章 传染病学与疫苗	(52)
第一节 传染病特征	(52)
第二节 传染病流行及疫苗应用	(53)
第三节 疫苗分类和使用要求	(57)
第四节 实施疫苗接种规范	(62)
第五节 计划免疫	(69)
第四章 免疫佐剂	(74)
第一节 免疫佐剂概述	(74)
第二节 免疫佐剂的简史、分类、作用机制及使用原则	(74)
第三节 疫苗中使用的免疫佐剂	(76)
第四节 临床试验疫苗中使用的免疫佐剂	(77)
第五节 传递系统	(82)
第六节 展望	(83)
第五章 疫苗的设计及效果评价	(85)
第一节 疫苗的设计	(85)
第二节 疫苗的体外检定	(90)
第三节 疫苗的效果评价	(92)
第六章 疫苗研制的程序	(96)
第一节 疫苗研制的一般过程	(96)
第二节 疫苗临床前研究	(96)
第三节 疫苗临床试验.....	(100)
第四节 疫苗的质量控制与管理.....	(107)
第五节 疫苗的注册管理及要求.....	(110)
第七章 实验动物的管理	(112)
第一节 实验动物管理的组织机构.....	(112)
第二节 动物房的分类.....	(113)

第三节	动物房的设备及原材料·····	(114)
第四节	动物房的卫生·····	(115)
第八章	疫苗的供给和 market 管理·····	(118)
第一节	疫苗经济·····	(118)
第二节	疫苗市场的特点·····	(120)
第三节	疫苗市场的管理·····	(120)
第九章	免疫预防在抵御生物战中的作用·····	(123)
第一节	生物战的历史与现状·····	(123)
第二节	微生物的遗传改造带来生物武器的无限发展空间·····	(124)
第三节	抵御生物战的武器·····	(124)
第四节	生物战剂的杀伤力评估·····	(127)
第五节	应重点防御的生物战剂·····	(128)
第十章	新型疫苗研制·····	(131)
第一节	核酸疫苗·····	(131)
第二节	植物转基因疫苗·····	(137)
第三节	T 细胞疫苗·····	(142)
第十一章	细菌类疫苗(一)消化道传播的细菌疫苗·····	(145)
第一节	霍乱疫苗·····	(145)
第二节	伤寒疫苗·····	(150)
第三节	痢疾疫苗·····	(153)
第四节	幽门螺杆菌疫苗·····	(157)
第五节	产肠毒素大肠杆菌疫苗·····	(161)
第六节	肉毒中毒及其生物制品·····	(165)
第十二章	细菌类疫苗(二)呼吸道传播的细菌疫苗·····	(169)
第一节	结核病疫苗·····	(169)
第二节	百日咳疫苗·····	(180)
第三节	白喉疫苗·····	(183)
第四节	脑膜炎球菌疫苗·····	(186)
第五节	肺炎链球菌疫苗·····	(188)
第六节	B 族链球菌疫苗·····	(191)
第七节	流感嗜血杆菌疫苗·····	(194)
第十三章	细菌类疫苗(三)经皮肤感染的细菌疫苗·····	(197)
第一节	破伤风类毒素疫苗·····	(197)
第二节	鼠疫疫苗·····	(200)
第三节	炭疽疫苗·····	(207)
第十四章	钩端螺旋体疫苗·····	(211)
第一节	概述·····	(211)
第二节	病原学与流行病学·····	(212)
第三节	钩端螺旋体免疫及疫苗研制·····	(213)

第十五章	病毒类疫苗(一)呼吸道传播的病毒疫苗	(216)
第一节	流行性感疫苗	(216)
第二节	麻疹疫苗	(223)
第三节	风疹疫苗	(227)
第四节	流行性腮腺炎疫苗	(229)
第五节	麻疹、腮腺炎、风疹三联活疫苗	(232)
第六节	呼吸道合胞病毒疫苗	(237)
第七节	水痘疫苗	(239)
第十六章	病毒类疫苗(二)消化道传播的病毒疫苗	(244)
第一节	脊髓灰质炎病毒疫苗	(244)
第二节	轮状病毒疫苗	(249)
第三节	甲型肝炎病毒疫苗	(252)
第四节	戊型肝炎病毒疫苗	(258)
第十七章	病毒类疫苗(三)血源及血制品传播的肝炎病毒疫苗	(262)
第一节	乙型肝炎病毒疫苗	(262)
第二节	丙型肝炎病毒疫苗	(271)
第十八章	病毒类疫苗(四)HIV 疫苗	(276)
第一节	概述	(276)
第二节	流行病学	(280)
第三节	HIV 感染的免疫反应	(282)
第四节	HIV 疫苗研究	(284)
第十九章	病毒类疫苗(五)经皮肤感染的病毒疫苗	(289)
第一节	汉坦病毒疫苗	(289)
第二节	狂犬病疫苗	(291)
第三节	流行性乙型脑炎疫苗	(294)
第二十章	人乳头瘤病毒疫苗	(297)
第一节	人乳头瘤病毒的生物学特征	(297)
第二节	人乳头瘤病毒与宫颈癌	(298)
第三节	宫颈癌的预防措施	(300)
第四节	HPV 疫苗	(301)
第二十一章	真菌类疫苗	(306)
第一节	念珠菌疫苗	(306)
第二节	球孢子菌疫苗	(307)
第三节	隐球菌疫苗	(309)
第二十二章	寄生虫类疫苗(一)疟疾疫苗	(311)
第一节	概述	(311)
第二节	疟原虫靶抗原	(313)
第三节	疟疾疫苗研究的主要进展	(314)
第四节	增进疟疾疫苗免疫效果的策略和方法	(319)
第五节	疟疾疫苗研究问题与展望	(320)

第二十三章 寄生虫类疫苗(二)血吸虫病疫苗	(323)
第一节 概述	(323)
第二节 血吸虫感染免疫	(325)
第三节 血吸虫病疫苗	(328)
第二十四章 寄生虫类疫苗(三)弓形虫病疫苗	(333)
第一节 概述	(333)
第二节 弓形虫抗原研究	(334)
第三节 弓形虫病疫苗研究现状	(337)
第四节 弓形虫病疫苗研究展望	(340)
第二十五章 肿瘤疫苗	(342)
第一节 概述	(342)
第二节 肿瘤与免疫系统	(343)
第三节 肿瘤疫苗制备	(349)
第二十六章 免疫避孕疫苗	(361)
第一节 概述	(361)
第二节 不孕、避孕与免疫避孕	(361)
第三节 免疫避孕疫苗的研制现状	(363)
第四节 免疫避孕疫苗的前景	(369)
第二十七章 自身免疫病疫苗	(371)
第一节 概述	(371)
第二节 自身免疫病疫苗	(372)
第三节 问题与展望	(378)
第二十八章 治疗性疫苗	(380)
第一节 概述	(380)
第二节 治疗性疫苗的种类	(381)
第三节 治疗性疫苗设计的基本策略	(384)
第四节 治疗性疫苗的应用	(385)
第五节 问题与展望	(390)
第二十九章 新发现传染病的疫苗研制	(391)
第一节 SARS 疫苗研制	(392)
第二节 禽流感疫苗研制	(393)
第三节 人用禽流感疫苗研制	(395)
第四节 猪链球菌疫苗研制	(396)
第五节 新疫苗研制展望	(397)
英文缩写名、全称及中文译名	(401)
参考文献	(408)

第一章 绪 论

第一节 疫苗学概述

自古以来,人类对瘟疫就怀有巨大恐惧,本能地想方设法来预防或阻止瘟疫的传播或流行。尽管古代社会对瘟疫缺乏科学的认识,但在长期实践中也积累了一些预防瘟疫的经验,并逐步形成“以毒攻毒”的观念。天花曾是人类历史上的烈性传染病,是威胁人类生命的主要杀手之一。17 世纪中叶,在欧洲,患天花死亡者达 30%。我国早在宋朝(11 世纪)已有吸入天花痂粉预防天花的传说。到明代,即公元 17 世纪 70 年代左右,则有接种“人痘”预防天花的正式记载。从经验观察,将蘸有疱浆的患者衣服给正常儿童穿戴,或将天花愈合后的局部痂皮磨碎成细粉,经鼻给正常儿童吸入,可预防天花。这些方法经陆上丝绸之路西传至欧亚各国,经海上丝绸之路,东传至朝鲜、日本及东南亚国家。英国于 1721 年流行天花期间,曾以少数犯人试种“人痘”预防天花成功,但因当时英国学者的保守,未予推广。由于种“人痘”预防天花具有一定的危险性,故这一方法未能得到广泛应用。

用“人痘”预防天花就是基于“以毒攻毒”的认识,对以后人类寻求预防天花的方法有重要影响。如在 18 世纪后叶,英国乡村医生 Edward Jenner(爱德华·琴纳,1749—1823)观察到牛患有牛痘,局部痘疹酷似人类天花,挤奶女工为患有牛痘的病牛挤奶,其手臂部亦易得“牛痘”,但却不得天花。于是他意识到接种“牛痘”可预防天花。为证实这一设想,他将牛痘接种于一位 8 岁男孩手臂,2 个月后,再接种从天花患者来源的痘液,只致局部手臂疱疹,未引起全身天花。他于 1798 年公布了他的论文,把接种牛痘称为“Vaccination”(拉丁语中,牛写为 Vacca),即接种牛痘,预防天花。在琴纳年代,人们全然不知天花是由天花病毒感染所致,而他在实践观察中,总结发现的种牛痘预防天花,既安全又有效,是一划时代的发明。接种牛痘在 19 世纪初至中叶在欧洲广泛推广。

由上述可见,疫苗(vaccine)一词与琴纳所用天花牛痘苗有关,即利用病原体(病毒、细菌、寄生虫等)经过严格复杂的技术工艺制造的生物制品。通过接种疫苗,使机体产生免疫力,从而达到预防或治疗相应传染病的目的。经过漫长的历史发展,当今已有多种疫苗,疫苗的研究、制造、检定、使用和管理已经成为一门具有特色的学科。疫苗学(vaccinology)是一门理论与实践高度结合,综合性、应用性很强的科学,它是集微生物学、传染病学、免疫学、病理学、化学、药学、生物化学、分子生物学、流行病学和统计学为一体的边缘学科,现已发展成一门独立学科。疫苗学一词已在近代的书刊中山现,疫苗学的内涵包括疫苗的研制、开发、使用和管理等,可见,疫苗学与人类的生存发展息息相关。

传统的疫苗学以预防传染病为主,包括人用疫苗学和兽用疫苗学,主要用于健康人和家畜。近年来,由于人类与疾病斗争和社会的需要,随着上述各学科发展,出现了治疗性疫苗,如抗肿瘤疫苗、抗感染疫苗和免疫避孕疫苗等。广义而言,治疗或短期用的抗血清免疫球蛋白也包括在疫苗学之中。此外,尚有“鱼疫苗”,早在 20 世纪 30 年代就已报道,鱼类有免疫反应。后来抗生素的应用成为预防疾病的主要措施,直至 20 世纪 70 年代由于化学治疗药的抗药性

及价格较贵,鱼疫苗又再度兴起,近年已成为疫苗学的一个分支。

本书以介绍人用疫苗为主,系统论述疫苗的研制、开发、使用、管理、市场和主要相关理论、技术及各种常用疫苗,特别是人用预防性主动免疫疫苗。

第二节 疫苗学发展简史

疫苗学对人类的贡献是任何其他学科都难以与之相比的,因为它使多种危害人类健康的疾病或瘟疫得到消灭或控制,拯救了数亿人的生命,是医学史上最为广泛和有效的保障健康的办法,但疫苗学的发展经历了漫长的历程。

一、疫苗学发展经验时期

在有历史记录的早期,人类就有了对疾病和免疫的记载,经过长期的实践,疫苗的研究逐步完善,才使得多种疫苗当今能在人类广泛使用。

(一) 人类对免疫的记载

公元前 5 世纪,古希腊发生科学史上的革命,自然规律取代超自然的观念控制。古希腊医药的先驱 Hippocrates 医生在其中起了很大作用。他认为疾病不是由于神秘和不可思议的影响造成的,而是气候和大气的干扰影响了体液的结果。他的结论用现代医学观念来分析是不正确的,但他的主要贡献是建立了根据观察和实验而作科学推论的原则。

公元前 2 世纪,古罗马著名医生 Galen 的医学和哲学著作进一步推动了流行病学的革命,他认为大气的变化、个体的易感性以及某种程度上接触感染原对流行病均起作用。这种模糊的观念直到 16 世纪法国巴斯德时代才被人们所接受。

公元前 1 世纪,人们曾认为喝亚致死量感染后的鸭血能防病。约 1 个世纪后,Elder 建议用疯狗的肝治疗狂犬病。非洲曾以同类的某些物质免疫预防蛇毒及其他毒物。而在中国则很早就有“以毒攻毒”的说法。人患天花病愈后可获得免疫,这是人类最早有关免疫的知识。最早的记载在公元前 590 年。在印度波斯曾用经皮肤接种的方式,即将粘有感染材料的棉花敷于划破的皮肤,并保持 1 年;在波斯也曾有吞食结痂的记载。当然这种原始的“免疫”措施未能有效控制当时的天花流行。

(二) 爱德华·琴纳的贡献

英国医生爱德华·琴纳经过长期观察,认为牛痘(cowpox)[他称之为牛的天花(cow smallpox)]可以保护人的天花(smallpox)。他给人接种牛痘,并在人体多次传代。正如前述,琴纳的实验证明,轻微的牛痘可以预防人的天花,所有这些被接种牛痘的人以后接种天花无严重反应。但琴纳的论文却被当时英国皇家学会拒绝,理由是证据不充分。1798 年,他自费出版的论文受到圣乔治医院著名医生 George Pearson 的重视并证实了琴纳的发现。尽管当时已进行广泛免疫接种,但天花仍然流行。直至 1840 年才终止用天花病人的结痂粉给人吸入的危险接种方法。

(三) 免疫接种在全世界展开

琴纳的论文发表 2 年后,美国哈佛大学医生 Benjamin Waterhouse 在推行免疫接种(vaccination)方面做出了积极贡献,曾被称为“新世界的琴纳”,他坚持免疫接种的改革事业,并保持着与从未相见的琴纳的友谊关系。后来,Jefferson 总统任命他为美国国家疫苗学研究所的联邦疫苗代理人。19 世纪初,法国、丹麦、瑞典、俄国和德国等国家开始免疫接种牛痘苗

预防天花。

二、疫苗学发展实验时期

(一) 巴斯德减毒活疫苗给免疫学带来了黄金时代

琴纳的工作全凭经验,但他并不知道种牛痘能预防天花的机制。当时法国的有机化学家巴斯德对疾病产生和恢复的机制很有兴趣,他的研究工作使他成为现代免疫学的创始者,也使后来的郭霍和德国学派有可能进一步发展观察技术,发现致病微生物。巴斯德在创建细菌发酵和疾病的理论以后,用减毒的微生物制成鸡霍乱菌疫苗。起初,刚从病鸡分离到的标本迅速接种到健康鸡,鸡很快死亡;当他休假2个星期以后,使用已存放2周的培养物给鸡接种时,发现并不产生典型的疾病,大量的鸡恢复了健康。一次偶然的机会巴斯德发现,强毒细菌给接种过减毒细菌存活下来的鸡再次接种,这些鸡只发生轻微的症状而全部存活。巴斯德将鸡霍乱病原培养物在室温长期放置而减毒,这种疫苗曾用于很多农场的动物。很快,鸡霍乱疫苗被广泛应用。

1880年,巴斯德借鉴了兽医学家加热或以碳酸处理炭疽感染动物的血制造羊用粗制疫苗方法,采用了减毒纯培养物,进行了温度、氧及其他物理因素对细菌影响的实验。并与医学界和兽医界合作,将炭疽杆菌培养于42~43℃,制成人工减毒活菌苗。巴斯德并未忘记伟大的先驱者琴纳,他将用于免疫的炭疽培养物称为“vaccine(疫苗)”,活的减毒炭疽疫苗在法国使用几年,羊的发病率从10%降至1%,牛的发病率从5%降至0.35%。

1885年,巴斯德研制了狂犬减毒活疫苗。巴斯德刚开始研究复杂的疫苗时不幸残疾,但他并未放弃对狂犬减毒活疫苗的研究。他首次将这种很小的在病犬的脑、脊髓生长的病原体命名为“病毒(virus)”,意思是简单的毒物。当时尚不知的病原体是狂犬病病毒。巴斯德将病原体经兔脑传代,亦能获减毒株,制成减毒活疫苗,进行预防接种。不仅预防了牲畜间的严重传染病,使畜牧业得到发展,且预防了人的多种传染病。用巴斯德方式处理过被疯狗咬伤的人的狂犬病发病率约为1%,而未处理人群的发病率高达15%~20%。为纪念他的成绩,1888年创立了巴斯德研究所。巴斯德死于1895年。

(二) 微生物学奠基人之一:郭霍

德国医生郭霍(Robert Koch,1843—1910)和巴斯德被公认为微生物学奠基人。郭霍在确认传染病的病原体方面做出了杰出贡献。他发明了将细菌固定于玻片并干燥和染色的方法,能更精确地在显微镜下对细菌进行观察。他还发明了培养基,可从病人排泄物或其他标本中分离出单个的菌落。经过一系列实验,他提出了确定病原菌的标准,即著名的郭霍法则(Koch' postulate),即特殊的病原菌应在同一疾病中查见而不存在于健康个体中;该特殊病原菌能被分离培养得到纯种;该纯培养物接种到易感动物,能产生同样病症;自人工感染的实验动物体内能重新分离得到该病原纯培养。郭霍法在当时对鉴定病原菌起到了重要的指导作用,奠定了微生物致病性研究基础。由郭霍和他带领的一大批学者相继发现了许多对动物和人体致病的病原菌,如结核杆菌、霍乱弧菌、脑膜炎奈瑟菌、痢疾志贺菌、白喉棒状杆菌、炭疽杆菌等。郭霍和他的助手们将结核杆菌及其代谢产物给动物注射,实验动物出现炎症,甚至溃疡,郭霍认为可能是机体清除细菌的防卫和免疫反应,而未感染过结核杆菌的动物无反应。郭霍等曾试图以此作为疫苗,虽然未获成功,但老结核菌素(old tuberculin)至今仍用于诊断结核病。当时他已注意到迟发性过敏现象,在基础免疫的研究上起了重要的作用。

(三) 死疫苗

对死疫苗的研究始于 1892 年,英国细菌学家 A. E. Wright 的主要兴趣集中在马耳他热和伤寒,在那个年代对疟疾、结核和伤寒等引起发热的疾病不易区别,更不可能区别伤寒和副伤寒。Wright 以活的和死的伤寒菌苗在猴和自己身上进行实验,导致他发热数周。后来他集中于死菌苗研究,53℃ 杀死伤寒菌培养物,再加 0.4% 来苏水。虽然这种疫苗局部和全身反应仍很重,但对机体表现出保护作用。

(四) 毒素和抗毒素免疫

法国著名临床医生 Pierre Bretonneau 于 1825 年成功地进行了第一个咽喉手术,他亲眼目睹了朋友的 4 个病儿中有 3 人死亡,在得到病人父母的允许后,他对幸存的第 4 个孩子进行了手术,被该手术救活的儿童一直活到 71 岁。19 世纪末,白喉是死亡率极高的疾病,美国首任总统华盛顿曾被误认为患白喉而死(实际上为葡萄球菌引起的咽炎和喉炎)。当时,郭霍的助手首次将白喉病人咽喉的白喉菌培养于含浓缩血清的固体培养基上,在动物实验的基础上,发现白喉细菌可产生剧毒的毒素,可使动物致病导致死亡。后来,巴斯德的学生证实用肉汤培养细菌几天后,这种无菌的滤液与白喉菌一样可杀死实验动物,这种可溶性的物质被称为毒素(toxin)。郭霍的一些助手进行了成功的实验,将白喉菌培养物的提取物注射给动物,他们发现一旦存活下来的动物对再次注射毒菌有耐受力。德国 Emile Behring 和日本人几乎同时发现,亚致死量的活的或杀死的白喉或破伤风培养物均能使动物产生抗数倍致死量的活菌或毒素的攻击。不久他们又发现,甚至极微量的白喉肉汤培养物滤液,也可使动物产生抗体。这些有抗体的动物血清转移给未免疫动物,可使后者有抗病能力。如动物已表现症状,则转移的抗血清可有治疗作用。20 世纪开始,抗毒素成为全球用来预防和治疗白喉的手段,开始用毒素免疫马,产生的抗毒素混合物来制造抗毒素。1904 年, Alexander Glenny 在伦敦用甲醛处理毒素得到白喉类毒素。E. Loewe 在维也纳用甲醛处理过的破伤风毒素免疫马和其他动物。用甲醛杀菌的瓶子装的毒素,其毒性大降,而免疫原性保留。偶然发现甲醛可解毒变成类毒素。1901 年获得诺贝尔生理学或医学奖的 Behring 用毒素与抗毒素(antitoxin)的混合剂(TA)给动物免疫。直到 1913 年, Behring 制造了近于中性的相对安全的混合物开始用于人的免疫。维也纳大学小儿科医生 Bela Schick 发现了一种皮内实验:在人皮内注射一定量的白喉毒素,局部反应取决于血清中抗毒素的水平,此即著名的锡克式实验。

人体使用马抗血清时发现有过敏现象,后来知道是机体对异种蛋白的免疫反应。1910 年,有学者在以硫酸铵或硫酸钠沉淀法部分纯化了马抗血清,大大减轻了过敏反应。1914—1918 年第一次世界大战期间,破伤风抗毒素的使用,使破伤风梭菌的发病率和死亡率大大降低。

(五) 早期细菌疫苗的研制

1. 伤寒、副伤寒、霍乱、痢疾 英国军队于 1904 年开始应用伤寒疫苗,使第一次世界大战期间伤寒病大大下降。1916 年开始使用伤寒副伤寒甲乙联合疫苗。

早期霍乱从症状上容易与痢疾等其他肠道感染混淆。1883 年,郭霍获得证据,霍乱病由像“逗点”样的霍乱弧菌引起。1884 年,西班牙细菌学家 Jaime Ferran 第一个制造了霍乱减毒活疫苗,但不良反应太大。以后, Waldemar Haffkine(1892)、Wilhelm Kolle(1896)先后进行了多年研究,制成了霍乱疫苗,但免疫效期只有 6 个月,但在第一次世界大战期间,霍乱死菌苗用于军队却起了作用,当时曾出现霍乱、伤寒、副伤寒甲乙四联疫苗。

1896 年,日本痢疾大流行,发生 90 000 病例,有 20 000 人死亡。Kiyoshi Shiga 从病人的

粪便中分离到了痢疾菌,并发现能与病人血清凝集。1900年,Shiga制造了抗血清,随后,美国人 Simon Flexner 分离出另外的痢疾菌。尽管痢疾疫苗自 1903 年开始应用,但至今痢疾疫苗对预防和治疗的价值仍无定论。

2. 鼠疫(Plague) 又称黑死病,由于鼠类为重要传染媒介,故中文称它为鼠疫。此病早年在欧洲流行猖獗,14 世纪欧洲有 330 万人死于此病,占总人口的 33%。1664—1665 年,伦敦发生历史上最大的鼠疫流行,死亡 80 000 人。中国民间曾有“东死鼠西死鼠,人见死鼠如见虎,鼠死不几日,人死如墙垛”的传说,可见中国鼠疫曾经流行之严重。Kitasato 和 Yersin 于 1893—1894 年在香港流行鼠疫时分离到鼠疫的病原体,即鼠疫杆菌,他们将鼠疫杆菌感染大白鼠,可使其致死。1895 年, Yersin 等首次研制出加热灭活全菌体死疫苗。1902 年, Weldemar 等研制的鼠疫疫苗在人群中接种,显示了较好的预防效果,未免疫人群的发病率为 7.7%,而免疫人群的发病率仅为 1.8%;死亡率从 60.1%降至 23.9%。

3. 结核杆菌 郭霍是结核杆菌疫苗研究的 3 位英雄之一。虽然他未获成功,但他的基础免疫研究为后来的卡介苗的成功研究奠定了基础。卡-介(Albert Calmette, 1863—1933; Camille Guérin, 1872—1961)二氏将有毒的牛型结核分枝杆菌在含胆汁、甘油和马铃薯的培养基上经过 13 年 230 次传代,获得毒力减弱但保留该菌免疫原性的变异株,即卡介苗(Bacillus of Calmette-Guérin, BCG),于 1921 年用于结核病的预防。

4. 布氏杆菌、流行性脑膜炎和嗜血流感杆菌 1887—1893 年先后分离出这些病的病原体,并进行了疫苗研制。

(六) 早期病毒疫苗的研制

人类与之斗争最早的疾病即天花,自使用牛痘苗以后,天花在全世界的流行逐渐减少。疫苗在防病方面的作用已受到充分肯定,直至 WHO 宣布天花已在全球消灭。除了这一典型范例外,人类早期病毒疫苗的研制还有:

1. 流感 第一次世界大战期间,流感在欧洲流行造成人员大量死亡。1932 年,英国流感再度流行, Laidlaw 等将病人鼻腔冲洗液经过除菌过滤再给白鼬鼻腔感染,引起发病,首次证明病原为非细菌,随后在美国、澳大利亚发现病人血中有中和抗体。1934 年,流感病毒经白鼬传代后再传给实验动物小白鼠,发现只有经鼻腔滴入病毒,才能引起白鼬、小白鼠和猪感染,而皮下、肌肉和静脉注射可引起抗体的产生,但不发病。1937 年美国 and 英国研制出首批活疫苗,但考虑安全原因没有正式使用。后来在流行中发现了不同型的病毒,即流感甲、乙型,而且互相不保护。1943 年和 1946 年美国使用流感疫苗,显示出很好的预防效果,但奇怪的是 1947 年的效果不好。后来发现,甲型流感在流行中已变异为甲 1 型。最后总结出流感病毒约每 10 年发生变异。1949 年在纽约发现丙型流感病毒,1957 年中国西南大流行时确定了甲 2 型或称亚洲型。

2. 黄热病 这是由特殊蚊子传播的疾病。最早的大流行 1900 年发生在美国驻古巴的军队当中。以 Walter Reed 少校为首的一组人员在古巴研究了黄热病。该研究组人员 Carlos 让咬过病人的黄热蚊(后来归类于埃及蚊)咬自己,结果发病,从而证明此蚊为该病的传播者。1901 年该组另一成员 Carroll 将一患者的血滤液给 3 个志愿者注射,其中 2 个人有典型的发病症状,从而确认黄热病的病原体为病毒。1927—1930 年先后有 5 位科学工作者因研究黄热病而被感染致死。英国的 Marshall Findlay 和 Edward Hindle 于 1929 年将病死的猴肝和脾以酚及甲醛处理后再感染猴,可以使猴子得到免疫,血清中有保护抗体。1930 年, Max Theiler 将黄热病病毒注射入小白鼠脑内,引起脑组织炎症,预先注射免疫血清,则可保护小

鼠。后来, Theiler 和其他科学家用经过多次小鼠传代后和组织培养传代的病毒制成减毒疫苗, 1935 年第一种减毒疫苗与抗血清在智利使用, 1937 年, 减毒株 17D 鸡组织培养制成的疫苗开始成功地使用。1939—1945 年战争时期, 17D 疫苗起了很大作用。1951 年, Theiler 因对黄热病研究的杰出贡献而获得诺贝尔生理学或医学奖。

3. 小儿麻痹 由脊髓灰质炎疾病引起病人麻痹, 肢体萎缩, 主要感染对象为儿童, 故称小儿麻痹(infantile paralysis)。1909 年奥地利报道将此病传染给猴子。同时美国纽约洛克菲勒研究所的 Simon Flexner 和 Paul Lewis 将病人鼻腔和咽喉的冲洗液过滤涂菌后接种猴引起感染, 从而证实病原为病毒。同时发现猴子病后的血清传给其他猴, 可以使猴抗病; 猴病后也获得对再感染的抵抗力。1916 年, 美国曾发生大流行, 引起 27 000 人患病, 6 000 人死亡, 后来成为美国总统的罗斯福也是受害者之一。1930—1941 年的报道表明, 注射抗血清有一定好处; 1951—1953 年曾用血清中丙型球蛋白来治疗小儿麻痹病人对某些病例有效, 但总的结果表明: 一旦确诊为脊髓灰质炎, 给予抗血清已为时过晚, 用免疫球蛋白来治疗小儿麻痹病也不是有效方法。

1949 年以前曾试图制造疫苗, 但都未成功。美国哈佛大学和波士顿儿童医院的 John Enders、Frederick Robbins 和 Thomas Weller 1949 年用人胚胎或成人的非神经组织细胞培养脊髓灰质炎病毒获得成功。他们还发现了这类细胞的一些细胞病理学变化, 以判断病毒是否生长的指标。以后用猴肾细胞培养该病毒又获成功。1954 年他们因此得到诺贝尔生理学或医学奖。1949 年, 另一重要成果是约翰霍普金斯大学的 David Bodian 及其同事发现脊髓灰质炎病毒有 3 个型, 各产生其对应的抗血清。1952 年约翰霍普金斯大学的 Howard Howe, 接种 3 个型的甲醛解毒的疫苗给猩猩和 6 个人, 均产生抗体并持续数月。

目前用于小儿麻痹的疫苗主要是索尔克(Salk)疫苗和口服减毒活疫苗。美国匹茨堡大学的细菌学教授 Jonas Salk 受 Enders 成功的影响, 开始研究并证实了 Bodian 脊髓灰质炎病毒有 3 个型的实验结果, 并以猴肾组织培养制成 3 个型的甲醛灭活疫苗。

美国 Albert B. Sabin 在 1953—1955 年成功地开展了口服减毒活疫苗的研究。至 1957 年, 共试用了 31 万只猴子, 160 个猩猩, 240 个人, 包括沙宾(Sabin)本人及其家人, 均表明安全。并发现口服减毒活疫苗以后有抗体产生, 减毒病毒可经过粪便排出而在人群中传播。减毒病毒在肠内繁殖可妨碍被感染的野生有毒病毒的繁殖。中国至今仍采用此类口服减毒活疫苗, 疫苗的效果很明显。

4. 麻疹 阿拉伯作家 Rhazes 于公元 10 世纪首次对该病记载。早年曾与天花和猩红热混淆, 到 17 世纪英国海波格拉底医生 Thomas Sydenham 临床上对这 3 种病加以区别。麻疹在没有疫苗之前, 是对人类健康产生严重威胁的疾病。如印度 1959 年 84 500 人死于麻疹。患麻疹后可以有很长时期的免疫, 因此较早有人使用被动免疫。1925—1927 年用血清预防的方法由 Copeman 引入英国。1939 年, 英国 Marshall Findlay 和 Frederic Mac Callum 首先提纯丙型球蛋白。1944 年, 美国哈佛大学的 Edwin J. Colin 改用酒精提纯球蛋白。免疫球蛋白曾在麻疹流行中发挥了预防作用, 但是这仅是短期临时预防措施。1954 年, 哈佛大学的 Enders 和 Thomas Peebles 首次以组织培养分离出麻疹病毒。Enders 曾分离小儿麻痹病毒, 他后来还分离了风疹、水痘和鸡痘病毒以及埃可病毒。他与他的同事将麻疹病毒用鸡胚来培养。经鸡胚传代的病毒对人已减毒, 并以 Edmonston 株减毒病毒首次制造了疫苗。另外, 还有先用甲醛杀死的死疫苗给予 1 次或 2 次免疫, 然后再注射活疫苗等不同免疫程序。我国当前主要用减毒活疫苗用于麻疹预防, 安全性已有保障。

5. 病毒性肝炎、腮腺炎和风疹 病毒性肝炎早年从临床症状上显示这种黄疸型肝炎很易与黄热病、钩端螺旋体病混淆,后来发现包括主要经口感染的甲型肝炎、戊型肝炎和主要经血感染的乙型肝炎、丙型肝炎及其他型肝炎。早在疫苗出现之前,预防措施主要是免疫球蛋白。1934年美国 Johnson 和 Good pasture 分离出腮腺炎病毒。1948年,Thomas Weller 和 John Enders 用鸡胚组织培养该病毒,经过重复传代,制成减毒疫苗。1950—1955年死疫苗和活疫苗已应用于不同国家,起到了一定的预防作用。

风疹是一种首次由德国人描写的症状相对较轻的由病毒引起的疾病,有人称之为德国麻疹。妊娠妇女患风疹后可能引起新生儿畸形。1947—1953年间,以免疫球蛋白为主要的预防手段。美国 Thomas Weller 于 1962 年分离出风疹病毒,经过一系列组织培养传代,研制了减毒活疫苗。

如上所述,人类在漫长的与疾病斗争的过程中,初步研制了许多疫苗来预防相应疾病。这类传统疫苗包括:①以杀死的细菌或病毒颗粒为抗原的死疫苗;②经减毒但仍然保持免疫原性的活疫苗;③解毒的细菌毒素即类毒素疫苗。这些疫苗在防病中起到了重要作用,目前还在使用。但在实践中发现有些疫苗不良反应较大,且效果不理想。

三、疫苗学发展现代时期

20 世纪 60 年代以来,为解决某些传统疫苗存在的问题,医学家们将化学、生物化学、分子遗传学、细胞与分子免疫学和药学发展的新理论及新技术应用到疫苗研制实践中,出现了一些新型疫苗。主要有以下几类:

(一) 蛋白质纯化疫苗的发展

1. 无细胞疫苗 20 世纪 70 年代,老的全细胞灭活百日咳菌苗效果不稳定,免疫后有明显的不良反应,包括局部红肿、发热、厌食等,尤其是一些并发的神经症状。尽管后来对这些神经性不良反应是否由百日咳菌苗引起有争议,但在当时这些不良反应致使一些国家如瑞典等停用全菌体百日咳菌苗。而停用菌苗以后,百日咳发病率明显提高了。这些都促进了对百日咳菌的生化成分、致病因子和抗原成分的研究,百日咳毒素(pertussis toxin, PT)随后被提纯。在日本首先被批准使用甲醛解毒的 PT 类毒素为主的无细胞疫苗,后来,美国以及欧洲用过氧化氢解毒的 PT 类毒素疫苗也逐步得到推广。目前,老的菌体菌苗与各种无细胞菌苗同时使用。不同厂家生产的无细胞菌苗包括不同的成分,这些纯化成分中 PT 类毒素被公认是主要抗原。PT 类毒素与白喉破伤风类毒素组成的新的百白破联合疫苗 DTaP 也已得到应用。

2. 改进的白喉类毒素、破伤风类毒素 20 世纪 20 年代出现的以培养液上清或仅以硫酸铵初步纯化的毒素用甲醛解毒后,加铝佐剂的疫苗使用了多年,也对降低白喉和破伤风的发病起了很大作用。但因产物不纯,批与批之间不稳定,效果也不恒定,还曾出现过严重的不良反应。20 世纪 60~80 年代,逐步改进了纯化的方法,得到越来越纯的毒素。Callicr 等报道了将白喉毒素制成结晶体,现已对毒素产生的基因及其调控、分子结构与功能有了清楚的认识。纯毒素相对分子量为 58 350,由亚单位 A(相对分子量为 21 150)和亚单位 B(相对分子量为 37 200)组成。亚单位 A 为主要的毒性部分,为腺苷-2-磷酸核糖化(ADP-ribosylation)类的细菌毒素之一。亚单位 B 的功能为吸附在宿主细胞。研究证明,白喉毒素的产生与棒状杆菌噬菌体(coryne bacterio phage)有关。

20 世纪 80 年代破伤风毒素也已进行提纯,相对分子量为 150 500,由 A、B、C 3 个亚单位组成。亚单位 A 为毒性部分,并已清楚产生毒素的相关基因。目前,白喉、破伤风类毒素的生

产在不同生产部门有所不同。有的仍采用传统的方法,产品纯度不高。未来的趋势是使用高纯度的毒素来制造疫苗。

3. 其他细菌类毒素疫苗 其他细菌类毒素疫苗如腊肠杆菌(*Clostridium botulinum*)毒素、类痢疾毒素(shigella-like toxin)、炭疽菌毒素、霍乱毒素(CT)、致病人肠杆菌不耐热毒素(HLT 或 LT)以及流脑菌外膜蛋白等近年来均已纯化,并对结构及基因调控进行了研究。其中,CT 和 LT 虽然单独使用不是理想的疫苗,但与其他抗原合用则为很好的免疫佐剂。

(二) 多糖及结合疫苗的兴起

1. 流行性脑膜炎 流脑双球菌的荚膜多糖(capsular polysaccharide, CP)为重要的抗原。根据 CP 将流脑菌分为 12 个血清群:A、B、C、29E、H、I、K、L、W135、X、Y 和 Z。流脑多糖为第一个从细菌纯化并建立了化学鉴定标准的多糖抗原,纯化的多糖产品规定不得含有一定水平以上的蛋白质、核酸和脂多糖(LPS),多糖相对分子量与免疫效果有关。1968 年,Walter Reed 军事医学研究所用新方法提纯了 A 群和 C 群流脑多糖,并证明有很好的免疫力。1974 年第一个多糖流脑疫苗被批准使用,随后,多糖疫苗已在很多国家被正式批准使用。为提高免疫效果,流脑多糖—蛋白质偶联疫苗近年也得到了较快发展。而 B 群流脑多糖,分子量小,免疫效果不理想,含有与成年人组织糖蛋白相类似的结构——聚唾液酸链,因此,B 群流脑多倾向于用其外膜蛋白,而非多糖和偶联疫苗。

2. 嗜血流感杆菌(Hib)疫苗 20 世纪 30 年代,Pittman 等在研究中发现,血清中抗 Hib 荚膜多糖抗体与抗感染免疫有关。1969 年,Robbins 实验室开始研究 Hib 荚膜多糖,同一时期,其他实验室也开始了 Hib 多糖的研究。1974 年,在芬兰,对 3 个月至 5 岁儿童进行了大规模的 Hib 多糖的现场试验,共观察 98 272 名儿童,其中大于 18 个月儿童的保护效果超过 90%。1985 年 Hib 多糖疫苗被批准上市。实践中发现,仅仅是多糖不足以引起 T 细胞免疫反应,因此免疫效果不好,在初生儿中免疫反应尤其不理想。Robbins 及其同事们又将 Hib 多糖与蛋白质结合制成偶联疫苗(conjugate)。1987 年,PRP-D 即嗜血流感杆菌多糖与白喉类毒素的偶联疫苗首次被批准,这是由 Schneerson 和 Robbins 研究并由 Connaught 公司改进和生产使用的。如今,由这些先驱们开创的多糖—蛋白质偶联疫苗已成为新类型疫苗,包括流脑、Hib、葡萄球菌和 B 群链球菌等疫苗。作为载体的蛋白质有破伤风、白喉类毒素、百日咳类毒素、白喉基因变种蛋白 CRM197 和流脑菌的外膜蛋白等。各种多糖—蛋白质偶联疫苗均由世界上的大公司如 Merieux 和 Merck 等生产。此外,肺炎球菌的某些型多糖疫苗也于 1977 年被正式批准使用。

四、新型疫苗的发展

James Watson 和 Francis Crick 于 1953 年在英国杂志《自然》上宣布发现了 DNA 双螺旋结构,为此他们与 Wilkins Manrice 共享了 1962 年的诺贝尔生理学或医学奖。这一生物学史上的里程碑对疫苗学也产生了重大影响。许多致病微生物的致病性和抗原性的基因结构逐渐被研究清楚。20 世纪 80 年代中后期以来,分子免疫学、细胞生物学、分子遗传学、分子生物学、微生物学、化学和生物化学、生物工程学等理论与技术的发展,使许多致病微生物的毒力、抗原物质的分子结构以及相关基因结构逐个被研究清楚,为疫苗的研制与发展迎来了春天。

(一) 亚单位疫苗

亚单位疫苗(subunit vaccine)是去除病原体中与激发保护性免疫无关的甚至有害的成

分,保留有效免疫原成分制作的疫苗。例如,从乙型肝炎病毒表面抗原阳性者血浆中提取表面抗原制成的乙型肝炎疫苗;无细胞百日咳疫苗则由提取百日咳杆菌的丝状血凝素等保护性抗原成分制成,其内毒素含量仅为全菌体疫苗的 1/2 000,副作用明显减少而保护效果相同;提取细菌的多糖成分制作成脑膜炎球菌、肺炎球菌、b 型流感杆菌的多糖疫苗。

(二) 合成肽疫苗

合成肽疫苗(synthetic peptide vaccine)又称抗原肽疫苗。是根据有效免疫原的氨基酸序列设计和合成的免疫原性多肽,以期用具有免疫原性的最小的肽来激发有效的特异性免疫应答。同一种蛋白质抗原的不同位置上有不同免疫细胞识别的表位,如果合成的多肽上既有 B 细胞识别的表位,又有辅助 T 细胞(Th)、细胞毒 T 细胞(CTL)识别的表位,它就能诱导特异性体液免疫和细胞免疫。目前,在了解人群 HLA 单元型表位的基础上,利用计算机演绎法可预测 T 细胞识别的表位,为合成肽疫苗的研制提供了重要手段。合成肽分子小,免疫原性弱,常需交联载体才能诱导免疫应答。常用的载体是脂质体,它可将合成肽分子运送至抗原提呈细胞(APC)的胞浆中,使其与 MHC-I 类分子结合,诱导特异性 CTL 应答。根据疟原虫子孢子表位制作的疟疾疫苗正在进行临床试验,细菌毒素、人类免疫缺陷病毒(HIV)和肿瘤等合成肽疫苗也在研制中。

(三) 重组抗原疫苗

重组抗原疫苗(recombinant antigen vaccine)是利用 DNA 重组技术制备的只含保护性抗原的纯化疫苗。首先需选定病原体编码有效免疫原的基因片段,将该基因片段引入细菌、酵母或能连续传代的哺乳动物细胞基因组内,通过大量繁殖这些细菌或细胞表达目的基因的产物。最后从细菌或细胞培养物中提取并纯化所需的抗原。重组抗原的表达除大肠杆菌外,还有酵母、体外培养细胞、转基因植物和转基因动物等,各有特点。重组抗原疫苗不含活的病原体和病毒核酸,安全有效,成本低廉。目前获准使用的有乙型肝炎疫苗(重组乙型肝炎病毒表面抗原)、口蹄疫疫苗和莱姆病疫苗。此外,改变有毒分子(如白喉毒素、百日咳毒素、霍乱毒素和大肠杆菌不耐热毒素等)的个别氨基酸使其从而成为基因重组类毒素疫苗等。

(四) 重组载体疫苗

重组载体疫苗(recombinant vector vaccine)是将编码病原体有效免疫原的基因插入载体(减毒的病毒或细菌疫苗株)基因组中,接种后,随疫苗株在体内的增殖,大量所需的抗原得以表达。如果将多种病原体的有关基因插入载体,则成为可表达多种保护性抗原的多价疫苗。目前使用最广的载体是痘苗病毒,用其表达的外源基因很多,已用于甲型和乙型肝炎、麻疹、单纯疱疹等疫苗的研究。利用脊髓灰质炎病毒、伤寒 Ty21a 疫苗株为载体的口服霍乱疫苗和痢疾疫苗也在研制中。

(五) 核酸疫苗

核酸疫苗(nuclear acid vaccine)是 20 世纪 90 年代从基因治疗研究中衍生而发展的一个全新生物科学研究领域。1990 年,Wolff 等于基因治疗的实验中意外地发现,含有外源基因的质粒 DNA 不经任何处理直接注入骨骼肌,也能在体内表达外源蛋白。同年,Nabel 等将重组 β 半乳糖苷酶外源基因直接转染动物的动脉管壁,在血管内皮细胞和平滑肌细胞也表达了外源基因产物。1992 年,Tang 等将人生长激素基因的质粒 DNA 导入小鼠表皮细胞,几周后小鼠产生了抗人生长激素抗体,并发现加强免疫后,抗体水平明显升高。1993 年,Wang、Ulmer 等多个研究小组先后报道,将含编码 HIV-I 型包膜蛋白基因和编码流感病毒核壳蛋白基因的质粒 DNA 分别注入不同动物体内,均可诱导特异性免疫应答,并在部分研究中证实,核酸