

甲型肝炎灭活疫苗免疫原性的猴体实验

李成明^{*} 陈江婷^{*} 万宗举 崔俊生^{*} 练幼辉^{**} 尹红章 赵伟^{*} 黄小岑^{**} 王祥^{**} 陈统球^{**}
尹卫东^{*} (中国药品生物制品检定所,北京 100050)

摘要 甲型肝炎病毒 TZ84 毒株经 2BS 二倍体细胞培养制备成甲型肝炎灭活疫苗。采用普通猕猴和恒河猴进行疫苗的保护性研究。结果均有较好的抗体反应,而且对甲型肝炎病毒鲁兴株(强毒株)的攻击亦均有保护作用。表明该疫苗有较好的免疫效果。

关键词 甲型肝炎灭活疫苗 普通猕猴 恒河猴

Experimental Study on Immunogenicity of Inactivated Hepatitis A Vaccine in Monkeys

Li Chengming^{*}, Chen Jiangting, Wan Zongju et al (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050)

Abstract Inactivated hepatitis A (HA) vaccine was prepared by culturing the strain TZ84 of HA virus in 2BS cells, and the immunogenicity of it was studied in common marmosets and *Macaca mulatta*. The result showed that good antibody responses were induced in the 2 kinds of monkeys. The vaccine could also protect the monkeys from the challenge with strong virus strain (Luxing). It indicated that the inactivated HA vaccine had good immunological effect.

Key words Inactivated hepatitis A vaccine Common marmoset *Macaca mulatta*

甲型肝炎灭活疫苗的免疫效果在国际上已得到公认^[1-3]。日本森次保雄等用猕猴感染甲型肝炎病毒,建立了理想的甲型肝炎动物模型。Korzaya 等用猕猴属类(*Macaca*)建立起甲型肝炎动物模型。国内毛江森等用红面猴作为甲型肝炎病毒的敏感动物^[4,5]。练幼辉等用恒河猴(*Macaca Mulatta*)和普通猕猴(Common Marmoset)进行了甲型肝炎动物模型的对比研究,证实普通猕猴从肝脏病理反应、甲肝抗体和肝功能改变等方面比恒河猴明显。因此,选择普通猕猴和恒河猴作为实验动物进行甲型肝炎灭活疫苗的研究。现将结果报告如下。

材料与方法

1. 甲型肝炎灭活疫苗

甲型肝炎病毒 TZ84 毒株第 30 代,在人胚肺二倍体细胞 2BS 株上大量培养后,经过 PEG 处理、分

子筛和超滤提纯,用 1:4000 甲醛灭活,经定量测定,甲肝病毒抗原含量为 1000 U/ml,制成含 1.0 mg/ml 氢氧化铝吸附甲型肝炎灭活疫苗,分装量为 1.0 ml/支,4℃保存。

2. 甲型肝炎病毒野毒株

2.1 TZ84 毒株:用人胚肺二倍体细胞 2BS 株连续传 3 代后,冻融收获,20 000 r/min 超离心收集甲肝病毒,抗原定量为 1500 U/ml。

2.2 鲁兴株:中国医学科学院医学生物研究所,收集甲型肝炎病人急性期粪便制备,经生物学证实含有甲型肝炎病毒,可作为甲型肝炎病毒攻击用野毒株^[6]。

3. 实验动物

3.1 普通猕猴:由天津医科大学实验动物中心从澳大利亚引进种猴繁殖之子代,年龄 1~3 岁,体重 250~400 g,接种前测定抗-HAV 阴性,肝功能及

* 唐山怡安生物工程有限公司

** 中国医学科学院医学生物研究所

肝脏组织活检正常。

3.2 恒河猴:系中国医学科学院医学生物学研究所实验动物中心提供,年龄 1~2 岁,体重 1.5~2 kg,接种前抗-HAV 阴性,血清 ALT 和肝组织活检正常。

4. 接种方法及剂量

疫苗采用肌肉注射,每只 1.0 ml。接种后 28 d,用野毒株攻击,静脉注射,每只 1.0 ml。

5. 标本的采集

5.1 血清:接种前后和攻击后每周空腹时采血 1 次,第 8 W 后每两周采血 1 次,室温放置过夜,第 2 d 分离血清。

5.2 肝组织活检:接种前后每月肝穿活检 1 次。4 个月后将猴处死,取肝脏、心脏、肺脏、胃、十二指肠、肾脏和肠系膜淋巴结等进行肝组织病理检查。

5.3 粪便:攻击后第 2 d 起每天收集大便 1 次,连续收集 1 个月,以后每周收集 1 次,收集 1 个月,置 -20 保存,备检。

6. 检测方法

6.1 甲肝病毒抗原定量检测:用唐山怡安生物工程有限公司生产的 EIA 甲肝抗原定量检测试剂盒检测。根据甲肝抗原参比品作标准曲线,样品抗原含量用平行线定量法计算,以 U/ml 表示。

6.2 抗-HAV IgM:用唐山怡安生物工程有限公司生产的抗-HAV IgM EIA 试剂盒检测。

6.3 抗-HAV:用唐山怡安生物工程有限公司生产的抗-HAV EIA 试剂盒检测。根据 WHO 甲肝抗体标准品作标准曲线,样品抗体效价用平行线定量法计算,以 mIU/ml 表示。

6.4 ALT:采用 Encore 型自动生化分析仪。

6.5 ICD:采用生化分析法。

6.6 猴粪便甲肝病毒测定:用 PBS 将猴便制成 20% 的大便悬液,-70 冻融 3 次,10 000 r/min 离心 30 min。取上清 1:10 稀释,接种 2BS 细胞,盲传两代,冻融收获后,采用 EIA 方法进行甲肝抗原测定。

6.7 肝组织病理:参照 Krawczynski,1981 肝脏病变分度方法。

7. 实验分组

7.1 免疫组:2 只普通狢猴、4 只恒河猴分别接种甲型肝炎灭活疫苗 1 支。

7.2 加强免疫组:普通狢猴和恒河猴接种甲型肝炎灭活疫苗 1 支。4 W 时,其中 1 只普通狢猴和 1

只恒河猴分别加强接种 1 次。

7.3 保护实验组:普通狢猴和恒河猴接种甲型肝炎灭活疫苗 1 支。4 W 时,其中 1 只普通狢猴和 2 只恒河猴分别用鲁兴株(20%大便悬液 1.0 ml/只)进行攻击。

7.4 对照组:鲁兴株直接攻击 2 只普通狢猴和 2 只恒河猴。

7.5 病毒感染组:TZ84 毒株第 3 代感染 2 只普通狢猴和 3 只恒河猴。

结 果

1. 普通狢猴的免疫反应

甲型肝炎灭活疫苗接种 2 只普通狢猴后第 2 W 出现抗-HAV 阳转,至第 4 W 抗体滴度已达 625~2500 mIU/ml。抗-HAV IgM 于接种后 2~3 W 阳转,最高滴度 1:1000,抗-HAV IgM 持续 5~10 W 转阴。ALT 无异常升高现象。肝活检未见病理改变。

4 W 后,1 只狢猴再接种甲型肝炎灭活疫苗 1 支;另对 1 只狢猴用甲型肝炎病毒野毒鲁兴株攻击。结果 2 只普通狢猴均出现抗 HAV 峰值反应,攻击或加强免疫后第 2 W 抗-HAV 达到 10000 mIU/ml,持续 4 W,降至 2500 mIU/ml,ALT 无异常升高。攻击或加强免疫后肝活检未见病理改变。见图 1 和图 2。攻击后的普通狢猴大便未见甲肝病毒排出。

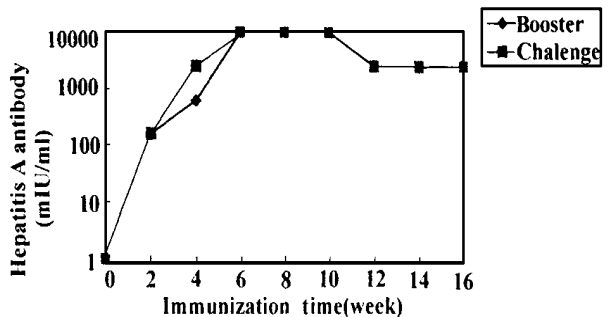


图 1 普通狢猴的甲型肝炎灭活疫苗免疫反应

Fig 1. Antibody response of common marmosets to inactivated hepatitis A vaccine

2. 恒河猴的免疫反应

甲型肝炎灭活疫苗接种 4 只恒河猴第 2 W 后出现抗-HAV 阳转,至第 4 W 抗体滴度已达 625~2500 mIU/ml,抗-HAV IgM 于接种后 2~3 W 阳转,最高滴度 1:1000,抗-HAV IgM 持续 1~3 W 后转阴。ALT 无异常升高现象。肝活检未见病理改变。

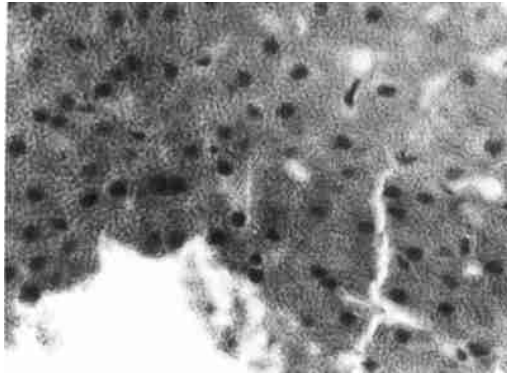


图 2 甲肝病毒野毒攻击甲肝灭活疫苗免疫狨猴肝组织切片

Fig 2. Section of liver tissue of immunized marmosets after being challenged with hepatitis A wild virus

4W 后,其中 1 只恒河猴加强免疫 1 次,结果出现抗-HAV 反应峰,加强后第 2W 抗-HAV 达到 40 000 mIU/ml,持续 4W 后降至 10 000 mIU/ml,ALT 无异常升高现象且未见肝脏病理改变。

4W 后,另 2 只用鲁兴株攻击,结果抗-HAV 增长 4 倍,攻击后第 2W 抗-HAV 效价达到 10 000 mIU/ml,2W 后开始下降,保持在 2 500 mIU/ml。见图 3。攻击后的恒河猴 ALT 无异常升高现象,肝活检未见病理改变,大便未见甲肝病毒排出。

3. 野毒感染普通狨猴和恒河猴的反应

甲型肝炎病毒鲁兴株大便悬液接种 2 只普通狨猴后,1 只第 3W 出现抗-HAV 阳转,至第 12W 抗体滴度已达 1 16 384,抗-HAV IgM 于接种后第 2W 出现阳性,滴度为 1 20 000。一直持续到第 10W,12W 时略有下降,为 1 10 000。ALT 未见异常反应。肝活检在第 6W 开始出现肝脏组织学病理改变。大便悬液检测 7 ~ 26 d 排毒。另 1 只狨猴第 4W 抗-HAV 阳转,第 12W 抗体滴度为 1 64。肝活检在第

10W 开始出现肝脏组织学病理改变。大便悬液检测 6 ~ 22 d 排出甲型肝炎病毒。

甲型肝炎病毒鲁兴株大便液接种恒河猴后,第 2W 出现抗-HAV 阳转,一直保持在较低水平。至第 8W 抗体效价达到 156 ~ 625 mIU/ml,抗-HAV IgM 一直未阳转。ALT 未见异常反应。肝活检未见肝脏组织学病理改变,9 ~ 15 d 大便排出甲型肝炎病毒。见表 1、图 4。

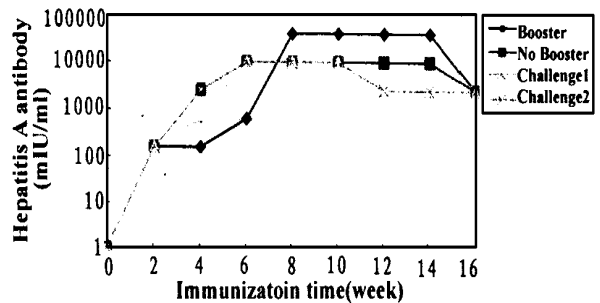


图 3 甲型肝炎灭活疫苗恒河猴的反应

Fig 3. Antibody response of macaca Mulatta to inactivated hepatitis A vaccine

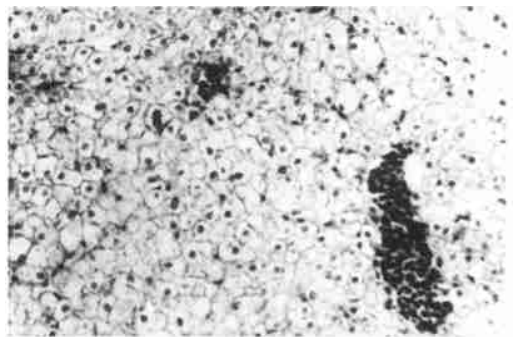


图 4 甲肝病野毒(鲁兴株)攻击狨猴的肝组织切片

Fig 4. Section of liver tissue of immunized marmosets after being challenged with strain Luxing of hepatitis A virus

表 1 甲型肝炎病毒鲁兴株感染普通狨猴和恒河猴的反应

Table 1. Reactions of common marmoset and macaca mulatta infected with strain Luxing of hepatitis A virus

No.	appear when Antibody	The highest antibody titer	Anti-HAV IgM	Liver pathology	HAV in feces
Cm1	3	1 16 384	> 1 20 000	++	+
Cm2	4	1 64	> 1 20 000	++	+
Mm1	2	625 mIU/ml	-	-	+
Mm2	2	156 mIU/ml	-	-	+

4. TZ84 毒株第 3 代感染普通狨猴的反应

甲型肝炎病毒 TZ84 株第 3 代接种 2 只普通狨猴后 2W 出现抗-HAV 阳转,至第 4W 抗体效价已达

2 500 mIU/ml,最高到 10 000 mIU/ml,持续 2W,然后保持在 2 500 mIU/ml 水平。抗-HAV IgM 于接种后第 2W 出现阳转,滴度为 1 1 000,第 4W 时最高为

1 5 000,第 6~8W 消失。1 只狨猴 ALT 在第 4~6W 时略有升高,以后趋于正常。肝穿活检未见病理改变。大便悬液检测 3~20 d 排出甲肝病毒。

5. TZ84 毒株第 3 代感染恒河猴的反应

甲型肝炎病毒 TZ84 毒株第 3 代接种 3 只恒河猴后第 2W 出现抗-HAV 阳转,至第 4W 抗体效价已达 625~2 500 mIU/ml,最高达到 2 500~10 000 mIU/ml,持续 6~8W。然后开始下降,保持在 2 500~10 000 mIU/ml 水平。抗-HAV IgM 于接种后第 2W 出现阳性,滴度为 1 1000,第 4W 时最高为 1 5000~25000,第 10W 时全部阴转,1 只恒河猴 ALT 在第 1~2W 时略有升高,以后趋于正常。肝穿活检未见病理改变。大便悬液检测 9~15 d 排出甲肝病毒。

讨 论

甲型肝炎病毒 TZ84 毒株在 2BS 细胞传代至第 3 代,在普通狨猴和恒河猴体内没有肝脏病理改变,只有一过性 ALT 和 ICD 变化。说明甲型肝炎病毒 TZ84 毒株第 3 代致病性已经略有减弱,用于灭活疫苗的生产更为安全可靠。

普通狨猴对甲型肝炎病毒鲁兴株攻击有明显的肝脏病理改变,2 只狨猴甲肝抗体滴度分别为 1 64 和 1 16348,ALT 和 ICD 均有升高,肝脏组织学病理

也有改变证实甲型肝炎病毒鲁兴株有致病性,可作为甲型肝炎病毒野毒攻击使用。

国内对普通狨猴的研究较少。该猴种体重轻,饲养条件严格,价格昂贵,其 ALT、ICD 的参考范围尚不能十分准确确定。恒河猴来源容易,饲养简单,价格便宜,与人类免疫反应类似。猴体实验研究结果表明:普通狨猴与恒河猴甲肝抗体水平基本一致,但肝脏病理反应比恒河猴敏感。因此,在进行甲肝灭活疫苗免疫原性实验时,选择普通狨猴和恒河猴同时进行,相互弥补较为适宜。

参 考 文 献

- 1 Wiedermann G, Ambrosch F, Andre FE, et al. Persistence of vaccine-induced antibody to hepatitis A virus. *Vaccine*, 1992,10(suppl1):129.
- 2 Van Damme P, Thoelen S, Cramm M, et al. Inactivated hepatitis A vaccine: Reactogenicity, immunogenicity and long-term antibody persistence. *J Med Virol*. 1994,44:446.
- 3 Tilzey AJ, plamer SJ, Barrow S, et al. Effect of hepatitis A vaccination schedules on immune responses. *Vaccine*, 1992,10(suppl):121.
- 4 Mao JS, Xie RY, Huang HY, et al. Studies in monkey of attenuated hepatitis A varinants. *Sci. Sin(B)*, 1998,31:338.
- 5 Mal JS, Dong DX, Zhang HY, et al. Primary study of attenuated live hepatitis A vaccine (H₂ strain) in humans. *J Infect Dis*, 1998,159:621.

(1998-09-28 收稿,1998-10-27 修回)

(上接 209 页)

专家片岗哲朗认为卡介菌纯核酸是免疫增强剂的有效成分并具有抗肿瘤的活性^[10],他将卡介菌纯核酸加上一定的佐剂后,其免疫增强剂及抗肿瘤活性明显增强,而 BCG-PSN 中多糖是否也起上述作用还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 湖南省死卡防治慢支协作组. 死卡防治慢性支气管炎、感冒和流感的临床和实验研究. *中华内科杂志*, 1976,15:286-289.
- 2 王慧,钟光明,梁英锐等. 卡介菌多糖核酸及其对感冒的防治作用. *中华结核和呼吸杂志*, 1989,12(1):20~23.
- 3 陈一飠,王慧,等. 卡介菌多糖核酸对小鼠巨噬细胞的激活作用. *湖南医学院学报*, 1988,13(2):117~120.
- 4 孙利军,王慧,谭礼智. 卡介菌多糖核酸对 ConA 诱导 IL-2 的实验研究. *湖南医科大学学报*, 1992,17(3):213-215.
- 5 赵伟强,王慧,谭礼智. 卡介菌多糖核酸对干扰素的诱生和促诱生活性. *湖南医科大学学报*, 1990,15(1):34~37.

- 6 谭礼智,陈清兰,熊德坤,等. 卡介菌多糖核酸对哮喘防治的实验和临床研究. *湖南医科大学学报*, 1991,16(1):77-80.
- 7 林恩尧. 卡介菌提取物调节慢性支气管炎免疫功能效果的观察. *中华结核和呼吸系疾病杂志*, 1987,10(1):41.
- 8 卡介菌多糖核酸治疗肺结核协作组. 卡介菌多糖核酸糖联用 6 月短程化疗治疗肺结核. *湖南医科大学学报*, 1992,17(3):255~258.
- 9 《中国生物制品规程》一部. (试行) 1995 版,16-18.
- 10 Tohru T, Hiroshi Y, Shizuo S, Yet al. Antitumor activity of DNA fraction from mycobacterium bovis BCG 1, Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity *JNCL*, 1984,72(4):1-8.
- 11 晏子厚,杨永芳,马明清,等. 治疗用卡介苗的研制. *微生物免疫学进展*, 1998,26(1):19-22.
- 12 Gurrie GA, Gurrie CA, Eccles SA. Serum lysozyme as a marker of host resistance. *BJ Cancer*, 1976,33:51-59.
- 13 Byron NA, Caballero F, Campell M, et al. T-Cell Depletion & in vitro thymosin inducibility in asthmatic children. *Clin Exp Immunol*, 1978,31:490-497.
- 14 Grang JM. Immunotherapy of tuberculosis. *Tubercle*, 1990,71:237-239.

(1998-09-23 收稿,1999-04-22 修回)

