

315-319

第6卷第4期
1991年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 6 No. 4
Dec. 1991

EHF灭活疫苗扩大人体试用的效果观察

朱智勇¹ 曾蓉芳¹ 俞永新³

R 512.803

(1. 浙江省卫生防疫站, 杭州310009, 2. 上海生物制品研究所, 上海200052,
3. 中国药品生物制品检定所, 北京100050)

提 要

流行性出血热 (EHF) 沙鼠肾细胞灭活疫苗, 经75名自愿者扩大试用, 未发现不良反应。中和抗体阳转率达70.6~96.7%, 4℃保存14个月的疫苗, 仍有较高的中和抗体阳转率, 再一次证明此疫苗是安全有效的, 且有良好的稳定性。接种程序为0、7、28天内三次免疫与0、28、60天内三次免疫无明显差别。皮下接种佐剂苗产生的中和抗体滴度高于肌肉接种的佐剂苗和疫苗。

关键词: EHF灭活疫苗 人体试用 效果 流行性出血热

我们研制的EHF灭活疫苗, 1988年经10名人体试用, 初步结果表明, 此疫苗是安全有效的^[1]。为了解不同接种程序、不同接种部位、疫苗保存时间及加佐剂等对免疫效果的影响, 在本次扩大人体试用时^[2], 进行了不同的处理; 除进一步观察此疫苗的安全性和免疫活性外, 并了解接种此疫苗的最优条件。

材 料 与 方 法

一、疫苗: 由上海生物制品所生产, 以浙11为毒种, 沙鼠肾原代细胞为基质, 经β-丙内脂灭活制成^[1]。各批疫苗的基本情况如生产日期、剂型、接种途径等和免疫家兔后的抗体反应及分组接种等见表1。

表 1 各批疫苗概况和分组接种一览表
Table 1 Outline of EHF vaccines and immunization in groups

组别 Groups	疫苗批号 Batches	佐剂 Adjuvant	生产日期 Date of production	接种日期 Date of immunization	接种人数 No. of volunteer	免疫程序 Immunization procedure (day)	途径 Route	免疫家兔中和抗体 (倒数) Titres of neutralizing antibody in immunized rabbits (reciprocals)
A	8801	-	88.8.15	89.4.21	12	0, 7, 28	im	< 10, 20, 40, 80,
B	8801	-	88.8.15	89.4.21	12	0, 28, 60	im	< 10, 20, 40, 80,
C	8803	+	88.9.9	89.11.8	12	0, 7, 28	im	40, 40, 40, 80,
D	8803	+	88.9.9	89.11.8	10	0, 7, 28	im	20, 80, 80, 80,
E	8803	+	88.9.9	89.11.8	20	0, 7, 28	sc	20, 80, 80, 80,

本文于1990年12月10日到, 1991年3月15日修回
参加此项工作的还有: 唐汉英, 李岩金, 翁景清, 付桂明, 李敏红, 韩玉英, 舒浩麒, 陈松年, 董关六, 刘文雪, 安琪

二、接种对象：杭州市居民及学生76人，接种前经间接免疫荧光试验（IFA）和反向被动血凝抑制试验（RPHIA）测定血清中的EHF抗体，结果1人抗体阳性，余均为阴性，阳性者剔除，75人作为本次试用对象，年龄在16~36岁之间，男33人、女42人。

三、免疫程序和剂量：见表1，除B组外均为0、7、28天内免疫3次，在上臂三角肌处，每次1ml，B组作为延长接种间隔时间为0、28、60天内免疫三次。

四、接种途径：除E组为皮下注射外，其它组均为肌肉注射。

五、局部和全身反应观察：接种前经一般体检并测体温一次，接种后12小时，1、2和3天各测体温一次，并按表格记录局部和全身的反应情况。

六、采血时间：免疫后共采血二次，第一次采血在第二次接种后3周或2周静脉采血5ml（即接种程序为0、7、28天者于第28天采血；接种程序为0、28、60天者为首针后第42天采血），第二次在第三针后2周各采血一次，分离血清，用于抗体测定。

七、抗体测定：间接免疫荧光（IF）试验：按常规法进行，EHF抗原和羊抗人荧光血清由本室制备；反向被动血凝抑制（RPHI）试验：按文献〔3〕方法进行，试剂由本室制备；空斑减少中和试验（PRNT）：被检血清送中国药品和生物制品检定所，按文献〔4〕的方法进行空斑减少中和试验测定；

ELISA间接法：由上海医科大学李永良大夫协助测定。

结 果

一、局部和全身反应

经全程接种的75人，未发现体温超过38℃的发热及过敏反应和不适等其它全身不良反应，也未发现在注射局部有红肿、发炎及化脓等现象。即使加佐剂的疫苗也无硬结肿块发现。

二、不同接种程序对抗体产生的影响

用批号8801疫苗（不含佐剂），按原接种程序（0、7、28天）与延长接种间隔时间（0、28、60天）各接种12人，3针后2周采血测得的抗体见表2，经统计处理，二组无明显差别。

表 2 不同接种程序对抗体产生的影响

Table 2 The effects of different immunisation procedure on yield of EHF antibody

组别 Groups	免疫程序 Immunisation procedure (day)	抗 体 产 生 频 率 Frequency of occurrence of EHF antibody			
		RPHIA	IFA	ELISA	PRNT
A	0, 7, 28	12/12	12/12	12/12	11/12
B	0, 28, 60	10/12	12/12	12/12	12/12

No. of positive/No. of tested 阳性人数/观察人数

Positive; RPHIA ≥ 1:20 IFA ≥ 1:20 ELISA ≥ 1:100 PRNT ≥ 1:10

三、不同针次对抗体产生的影响

用批号8801疫苗接种2针和3针后的24名志愿者，抗体阳转情况如表3。

表3 不同接种次数对抗体产生的影响
Table 3 The effects of different immunization times on yield of EHF antibody

组别 Groups	免疫次数 Immunization times	抗体产生频率 Frequency of occurrence of EHF antibody			
		RPHIA	IFA	ELISA	PRNT
A+B	2	19/24	23/24	24/24	11/24
A+B	3	22/24	24/24	24/24	23/24

从表3可知, 接种2针和3针后RPHIA、IFA和ELISA抗体阳转无明显差别, 但PRNT测定的中和抗体3针明显优于2针, 差别高度显著($P < 0.001$)。

四、不同剂型和不同接种途径对抗体产生的影响

用批号8803批疫苗(无佐剂)经肌肉接种12人, 8803佐剂苗经肌肉和皮下分别接种19人和20人, 接种程序按原方法(0、9、28天)全程接种3针后, 经二周采血测定抗体, 结果如表4。

表4 不同剂型和不同途径对抗体产生的影响
Table 4 The effects of different preparations and routes on yield of EHF antibody

组别 Groups	接种途径 Route	抗体产生频率 Frequency of occurrence of EHF antibody			
		RPHIA	IFA	ELISA	PRNT
C	im	12/12	12/12	12/12	9/11
D	im	18/19	17/19	19/19	16/17
E	SC	19/20	18/20	20/20	13/15

从表4可知加佐剂的肌肉接种组, 中和抗体阳转率略低为94.1% (16/17), 而加佐剂苗和无佐剂苗的皮下接种组也均在80%以上, 经统计处理3组间均无显著差异($P > 0.05$)。

讨 论

本研究在扩大接种试验75人中, 未发现有明显的全身或局部的不良反应, 即使在注射部位也没有象注射狂犬等疫苗那种一时性的较剧烈疼痛感。在接种3针后用各种方法检查EHF病毒抗体, 均有较高的阳转率, 因此再次证明此疫苗是安全有效的, 且易被接种者接受。

比较接种程序, 0、7、28天和0、28、60天的免疫效果, 结果二者无明显差异。为了便于接种, 仍按原接种程序0、7、28天三次为妥。但本文未对佐剂观察进行比较。

2针接种后RPHIA、IFA和ELISA的阳转率均达90%以上, 但中和抗体阳转率仅为45.8% (11/24)。3针后中和抗体阳转率达96.7%, 此结果与上次10人试验相似, 因此为提高免疫效果以接种3针为宜。

佐剂疫苗免疫3针后其效果与无佐剂苗无明显差别,但佐剂苗经皮下接种组中和抗体阳转率略低于肌肉接种组,经统计处理虽无明显差异,这是否与例数少有关,需作进一步观察。

8803佐剂苗因需要增加做稳定性和动物试验,待试验完成,已过去较长的时间,接种时已距制造日期达14个月之久,出乎意料的是接种者各种抗体阳转仍较高,特别是中和抗体阳转率达71.0~86.7%,这表明我们研制的EHF灭活疫苗无论是无佐剂苗或佐剂苗都具有良好的稳定性。

据抗体的持久性观察,接种后3个月仍保持较高水平,但6个月后明显降低。抗体下降其保护力必定有所下降。但值得一提的是经疫苗01(1988年卫生部批准用于10人接种的疫苗)免疫的2只家兔,一年后血清中已测不出抗体,但经EHF浙:活毒攻击,仍能保护(未免疫的对照家兔抗原阳性),此结果提示经疫苗免疫后,血清中抗体虽已下降或转阴,但尚有保护力。这是否与细胞免疫等其它因素有关,值得进一步研究。

目前国外研制的EHF灭活疫苗均以IFA、ELISA或RPHIA等试验作为检查抗体的指标^[5,6],这恐不妥,俞永新等^[7]曾证明上述试验不能真正反映疫苗的免疫效果,它与中和抗体是不平衡的。故我国把中和抗体列为衡量EHF疫苗的指标,而测定抗体的其它方法仅作参考^[8]。

参 考 文 献

- [1] 朱智勇等,1990,病毒学杂志 1:7。
- [2] 中华人民共和国卫生部新生物制品人体观察申请件(89)特制申体第33号。
- [3] 李岩金等,1989,浙江医学,9(6):9。
- [4] 姚小剑等,1988,病毒学报,4(4):347。
- [5] Lee HW,1989 *JE & HFRS Bulletin* 3:55。
- [6] Kim RJ, et al., Antibody Formation and Preventive Effect after Vaccination with the Inactivated Vaccine against HFRS.
- [7] 俞永新等,1990,病毒学杂志,(1):63。
- [8] 中国预防医学科学院,临床观测用流行性出血热试验性灭活疫苗的基本要求, EHF疫苗研究协调会第二次修订,1989年8月9日北京。

Efficacy of Inactivated EHF Vaccine Used in Clinical Trial

Zhu Zhi-yong

(Zhejiang Health and Anti-epidemic Station, Hangzhou 310009)

Zeng Rong-fang

(Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai)

Yu Yong-xin

(National Institute for the Control of Pharmaceutical
and Biological Products, Beijing)

The inactivated EHF vaccine was used in clinical trial with 75 volunteers. There was not any side effects. It showed that about 90% seroconversion rate of neutralization antibody occurred. The vaccine stored for 14 months in 4°C

still had better immunogenicity. It was shown for the second time that the vaccine was safe, affective, and very stable. The immunization procedure of $3 \times 1\text{ml}$ during 28 days and of $3 \times 1\text{ml}$ during 60 days showed no significant difference.

Key words, Inactivated EHF vaccine Clinical trial

第四届国际抗病毒会议

The Fourth International Conference on Antiviral Research

第四届国际抗病毒会议于1991年4月21—26日在美国新奥尔良 Inter-Continental 宾馆举行, 参加代表有550人, 来自32个国家, 收到论文210篇。我国有陈鸣珊、吴章琦两人参加会议, 并介绍了中草药配方抑制HIV及用小剂量干扰素治疗乙型肝炎效果的研究。

会议于1991年4月21日正式开幕, 由国际抗病毒学会主席 Erik Declercq 致欢迎词, 并介绍国际抗病毒学会的简短历史。国际抗病毒学会1985年4月30日—5月3日在荷兰 Rotterdam 正式成立, 选举 Richard Whitley 为第一任主席, Earl Kern 为秘书长。1990年比利时布鲁塞尔国际会议改选 Erik Declercq 为第二任主席, 这次会议选举 George Galasso 为现任主席, 并出版抗病毒研究杂志由 Erik Declercq 任主编, 原国际抗病毒会议两年召开一次, 经布鲁塞尔国际会议后改为一年一次国际会议以增加更多的交流与发展。随后由著名学者 Herbert E. Kauffman 作抗病毒药物研究进展的报告。早期抗病毒药物研究以疫苗为主, 减少了麻疹、小儿麻痹症以及根除了天花, 但目前不少疾病尚缺少理想的疫苗, 如爱滋病、乙型肝炎、出血热等, 另有一些病毒抗原易变或含多种抗原, 如流感病毒, 鼻病毒等, 很难制备理想的疫苗。由于病毒在活体细胞内复制, 因此, 发展抗病毒药物除能阻断病毒复制外, 还要无害于宿主细胞的增殖, 但目前所筛选出的抗病毒药物, 对病毒有高度选择性及对宿主细胞无毒或低毒的制剂很少。多年来以核苷酸为主的抗病毒药物, 目前多在此基础上进行药物构形的改变, 使其对某种病毒具有高度的选择性。在抗病毒的药物中, 除干扰素外, 一般化学合成药物只能对一种核酸类型的病毒起作用, 而不能对DNA或RNA病毒都起作用。体外细胞培养的发展, 使抗病毒药物的筛选更为便利。分子病毒学的发展, 使抗病毒药物的研究更为深入, 但在人的抗体内由于免疫系统、酶系统、抗体器官损害程度, 发病轻重及早晚等因素的影响, 使得在体内进行抗病毒药物的研究比细胞培养、动物实验更为复杂。从体外筛选的药物只有少数有临床抗病毒疗效, 许多药物因毒性反应而无实用价值。实际上符合高效低毒的抗病毒药物是极少的, 因此选择不同阻断机制的药物联合应用是当前抗病毒研究的方向。

大会分8个方面报告: (1) 抗病毒药物的设计; (2) 体外合成的发展; (3) 抗病毒药物的靶; (4) 抗病毒药物的作用机制; (5) 分子生物学的靶; (6) 动物模型; (7) 药理学及临床研究; (8) HIV的感染。其中还有3次墙报, 隔日下午在三个大厅内进行, 其内容: (1) 体外合成的发展; (2) 联合用药的作用机制、靶及抗性; (3) 动物模型、药理学、毒性及临床研究。

诺贝尔奖金获得者 Gertruds Elion 教授参加了这次会议, 并获得国际抗病毒学会的优秀奖。她1944年就开始从事抗病毒的研究, 对无环鸟苷 (Acyclovir) 的发展起着重要的作用。并且筛选出许多抗HSV的药物, 她首次证明AZT治疗HIV感染的作用。

这次大会还展出了许多抗病毒的书刊和杂志, 《病毒学杂志》曾在会上展览。

来自世界各地的学者及代表相互交流, 互通信息, 欢聚一堂。会议决定1992年第5次国际抗病毒会议在加拿大温哥华召开, 1993年第6次国际抗病毒会议在意大利威尼斯召开。最后会议在热情洋溢的欢呼声中闭幕。

(中国科学院武汉病毒研究所 吴章琦)