

43-49

20174(7)

Vero 细胞狂犬疫苗的研制*

曾蓉芳 宋家骊 顾 鸣 陈文兰 邵益斌 R512.990.3
R392-33

(卫生部上海生物制品研究所, 上海 200052)

A 摘要 利用自建的狂犬病毒 Vero 细胞适应株和细胞反应器微载体系统培养 Vero 细胞和狂犬病毒, 病毒滴度达到 $6.0 \sim 8.0 \log_{10} LD_{50}/mL$ 。病毒原液纯化后制出的纯化狂犬疫苗质量基本上均能达到 WHO 对此类型疫苗的主要质控要求, 表明疫苗小量试制工艺基本可行。

关键词 狂犬病毒适应株, 微载体培养系统, Vero 细胞, 狂犬疫苗质量 研制

现用的地鼠肾细胞狂犬病疫苗在国内已普遍使用十年之久, 对我国狂犬病的预防和控制起到一定的作用。但此型疫苗采用原代动物肾细胞为疫苗制备原料, 需提供大量动物, 且不能排除外源因子污染的可能性。因而疫苗生产工艺长期停留在落后的手工业生产模式, 疫苗的质和量受生产方式的制约, 较难取得明显的提高, 因此研制以先进的工业化生产工艺制备新一代的优质疫苗极其必要。

人二倍体狂犬病疫苗(HDCS 苗)^[1-2]在 80 年代以优质疫苗称著于全球, 但由于所用的细胞基质的生物学特性所限, 制备条件要求较高, 疫苗造价较贵, 难以广泛推广使用。WHO 近年来又推荐 Vero 细胞狂犬病疫苗^[3-7], 在欧洲等国已制成商品化疫苗(如法国的 PVRV、维尔博狂犬病疫苗等)此类型疫苗由于使用 Vero 传代细胞取代原代细胞为细胞基质制备疫苗, 工业化生产已有可能。此型纯化疫苗具有优质、能大规模生产的优点, 造价比 HDCS 疫苗低 $\frac{1}{2}$ 。

本课题旨在研制 Vero 细胞狂犬病疫苗, 根据国情, 拟研制造价比 Vero-RaB 苗更低的液体 Vero 细胞狂犬病佐剂疫苗, 或进而研制冻干剂型, 预计更容易被国人或发展中国家所接受。

材料和方法

1 材料

1.1 疫苗生产用细胞基质 Vero 传代细胞株 来源于美国 ATCC(Vero-81)。此株细胞经本所质控部门全面鉴定, 证明合乎疫苗生产用细胞基质要求, 该细胞株生长状态良好, 不含外源因子^[8], 致瘤性极低^[9](第 199 代细胞致瘤试验未发现肿瘤结节产生)。胞核学试验表明, 第 136 代到 204 代连续传代, 胞核学检查染色体频率分布高峰数目为 58 条, 即保持原细胞系核学特征^[9-10]。

1.2 疫苗生产用毒株(RFD 株)的来源和特性^[11] 将国内现用地鼠肾狂犬病疫苗生产毒株(aG 株)适应于 Vero 细胞而得。RFD 适应株和亲本株(aG 株)及国际狂犬病毒标准攻击毒株(CVS)之间具有良好的交叉抗原和免疫原性, 能诱导实验动物(小白鼠、家兔、狗等)产生中和抗体, 并能保护动物抗活毒攻击。因此, 本课题

收稿日期: 1996-05-10, 修回日期: 1996-07-08

• 本课题系国家科委“八五”攻关“动物细胞大规模培养技术研究”的分题
本所陈宇光、顾菁、程宇、吴书军、顾勤、马姬等同志参加了研究

选用 RFD 株为疫苗生产用毒株。

1.3 主要试剂 DMEM(GIBCO 公司产品), β -丙内脂(Sigma 公司产品), Sepharose CL-6B 和 DEAE 交换树脂(Pharmacia 公司产品), 抗狂犬病毒糖蛋白单抗(中国预防医科院病毒研究所提供), Dig-DNA 检测试剂(Beohringer 公司产品), Cytodex-1(Pharmacia 公司产品), GT₂ 微载体(华东理工大学提供), 牛血清检测试剂(中国药品生物制品检定所产品), 羊抗鼠 IgG 酶标抗体(Sigma 公司产品)。

2 试验方法

2.1 细胞和狂犬病毒培养 利用 5L 细胞反应器(NBS 公司产品)和微载体(4~5 g/L)培养 Vero 细胞, 当细胞浓度达 600 万/mL 以上时, 即可感染 RFD 病毒株, 经 37℃ 培养一定时间, 病毒滴度达 6.0 log LD₅₀/mL 以上时即可收病毒液。

2.2 疫苗后处理 合并所收病毒液, 去粗块, 以超滤法将病毒浓缩 50 倍左右, 再以分子筛分离病毒和杂蛋白。含病毒组份经离子交换柱处理, 使细胞 DNA 降低到 100 pg/mL 以下的水平, 经纯化病毒液以 β -丙内脂(β PL)灭活, 合并除菌过滤, 加保护剂和佐剂[Al(OH)₃]即为纯化 Vero 细胞狂犬病疫苗。

3 疫苗的质控检测法及质控主要指标

3.1 疫苗的无菌, 安全, 灭活和效价测定法, 按地鼠肾狂犬病疫苗规程进行^[12]。疫苗效价应 ≥ 2.5 IU/剂量。

3.2 残余牛血清含量测定 以中国药品生物制品检定所出品的试剂盒检测, 残余牛血清含量应 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 。

3.3 Vero 细胞 DNA 检测法^[13] 以本所自建 pUC₁₈/AGmr(Hind III)-1 重组质粒为探针。试剂为 Dig-DNA kit 点样→杂交→显色等步骤按 kit 要求进行。疫苗细胞 DNA 应 $\leq 100 \text{ pg/mL}$ 。

3.4 抗原量测定 按本组自建的 ELISA 法^[14]检测疫苗纯化过程的各项样品中狂犬病毒抗原量。

4 蚀斑法检测狂犬病毒滴度^[15]

基本同常规法。

5 中和抗体检测法

5.1 中和指数法(病毒变量, 血清定量法) 按常规进行, 中和指数 $\geq 1:100$ 时, 表示抗体阳转。

5.2 中和抗体效价滴定法(病毒定量, 血清变量法) 将疫苗免疫 4 只家兔(2.5 kg 左右), 每只肌肉注射 1 mL 疫苗, 第七天同法免疫一次, 第 14 天采血测定中和抗体(微量病变法或小鼠脑腔 ic 法)。凡能中和 31~316 个 LD₅₀ 攻击毒(CVS 株)的最高血清稀释度即为该血清的中和抗体滴度。本文暂定 1:10 滴度为阳转效价。

结 果

1 Vero 细胞生长动态

若按 $1-1.2 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞浓度接种入 5L 细胞反应器微载体系统内, 一般次日细胞的满球率即可达 80% 以上。随后细胞呈 0.4~0.8x/d 的速度增长。一般可参考培养液中氨和葡萄糖含量决定灌注培养的时间, 如细胞增殖速度较快($\geq 0.7x$), 且氨含量偏高时, 则应在培养的 48 h 左右开始灌注, 细胞到第四天可达种毒的浓度($7 \times 10^6/\text{mL}$ 左右)。反之, 细胞增殖速度较慢, 则可在第三天开始灌注培养(见图 1)。

2 RFD 毒株在 Vero 细胞上增殖状况

当 Vero 细胞浓度达 $7 \times 10^6/\text{mL}$ 左右时, 即可感染病毒(RFD 毒株), 种毒次日洗去未吸附的病毒和牛血清等杂蛋白, 加入维持液培养 5~6 d, 即可开始收病毒。病毒繁殖高峰在 5~11 d 之间, 随后逐渐下降。一般每隔 2~3 d 收毒一次, 直到细胞大量脱落为止, 病毒滴度在 $10^{-5.8} \sim 10^{-7.5}/\text{mL}$ 间(图 2), 合乎疫苗制备的要求。5L 细胞反应器一个培养周期可获病毒原液约 1.8 万 mL 左右。

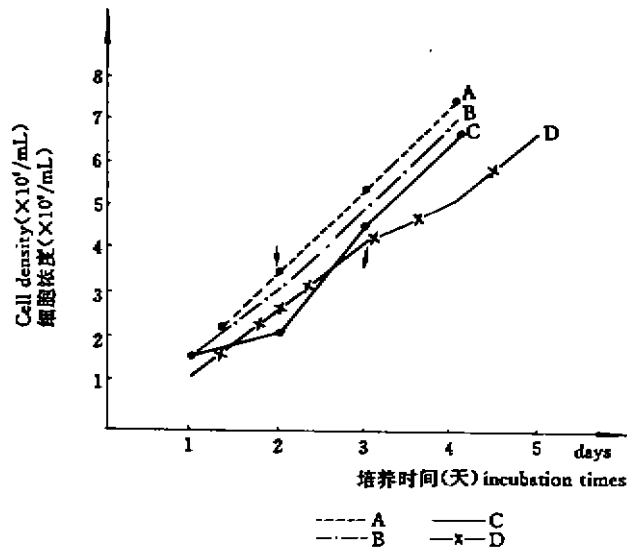


图 1 细胞增殖速度与灌注时间的关系

Fig. 1 Comparison of the cell growing velocity and perfusion time

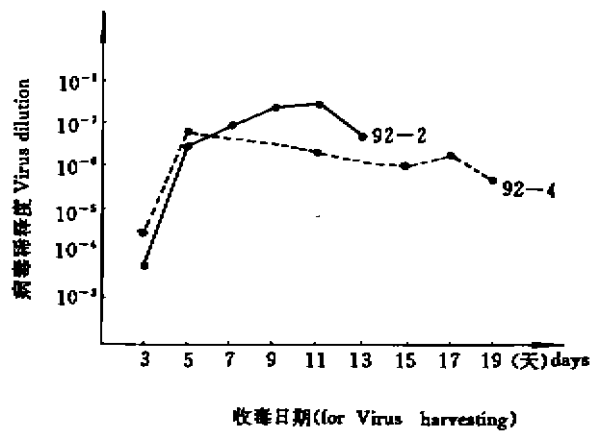


图 2 RFD 毒株在 Vero 细胞上的生长曲线

Fig. 2 The growing curve of RFD strain on Vero cell (in 5L cellgen)

3 病毒感染量的比较

在 Vero 细胞生长浓度相仿的情况下, 以两个不同的病毒量感染细胞 (0.12 和 0.06 MOI)。结果表明, 培养液病毒滴度差别不太明显, 均能达 $6.0 \log_{10} \text{LD}_{50}/\text{mL}$ 左右水平。因此制备病毒原液可用 0.06~0.12 MOI 的病毒感染量 (见表 1)。

表1 比较毒种感染浓度和培养液病毒滴度的关系

Table 1 Comparison of the infective dose of seed virus and the virus titers in cultural fluids

实验号 Exp. No.	细胞浓度 Cell conc. ($\times 10^6$ /mL)	毒种浓度 Seed virus conc. (MOI)	培养液病毒滴度(log LD ₅₀ /mL.) Virus titers of cultural fluids in different days					
			5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d
1	6.85	0.12	7.5	8.0	6.17	6.0	8.0	7.83
2	6.90	0.12	6.5	7.3	6.5	6.0	6.5	7.5
3	6.89	0.06	7.5	7.5	6.73	7.0	6.0	5.83
4	6.70	0.06	6.17	6.25	7.5	6.27	5.7	5.8

4 RFD 毒株在 Vero 细胞增殖过程中含毒的培养液残余牛血清含量测定

在以 5L 反应器微载体系统培养狂犬病毒期间, 培养液中牛血清含量在第 5~7 天较高(约 4.8 μ g/mL), 随后逐趋下降。表 2 的结果表明, 尽管细胞在感染病毒之后经多次洗涤处理, 病毒培养液中残余牛血清含量仍然较高(平均 3 μ g/mL)。

表2 RFD 毒株在培养过程(5L 反应器)的残余牛血清测定

Table 2 Detection of the residual bovine serum during cultural process of RV

批号 Lot No.	病毒培养时间(天)和病毒培养液中牛血清含量(μ g/mL.) Cultural times(days) for virus grown and bovine serum in cultural fluids						mean value
	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d	
T ₁₁	4.8	4.8	2.4	1.2	0.6	0.6	2.4
T ₁₂	4.8	2.4	nd.	nd.	2.4	nd.	3.2
T ₁₄	9.6	4.8	4.8	2.4	0.6	0.6	3.8

nd = non done

5 病毒原液的纯化或后处理

由于目前尚无条件使用优质高价的无血清培养基进行大规模或大量的细胞培养, 故所获病毒培养液中残余牛血清含量偏高。若采用国外常规使用的区带离心法纯化病毒, 很难使残余牛血清含量达“传代细胞疫苗的规程”要求($\leq 1 \mu$ g/mL)^[10], 故本研究采用分子筛分离收集大分子的病毒颗粒, 排除分子量较小的血清等杂蛋白, 达到疫苗纯化的质控指标。图 3 中第 1 峰为分子量较大的狂犬病毒颗粒成份。第 2 峰为病毒亚单位和牛血清等杂蛋白(毒力 $\leq 2.0 \log_{10}$ LD₅₀/mL)。图 4 提示采用 DEAE 交换柱进一步处理所收集的病毒颗粒成份, 能排除残余的细胞 DNA 等杂质, 使疫苗的细胞 DNA 含量达规程要求($\leq 100 \mu$ g/mL)^[10]。

纯化苗的总蛋白含量, 批间有差异, 但一般保持在 150 μ g/mL 左右者居多。纯化疫苗的回收率(或得率)由于疫苗抗原量检测法尚未标化。目前暂按病毒原液量和纯化后的疫苗量进行对比, 初估回收率为 20:1 左右。纯化苗内加入人白蛋白等为保护剂, Al(OH)₃ 为佐剂, 即为大用 Vero 细胞狂犬病佐剂疫苗(简称 PVCVRV 佐剂苗)。

6 PVCVRV 苗的质量分析

6.1 RFD 毒株纯度测定 以 1:10 马抗狂犬病免疫血清(武汉生研所产品)中和 RFD 毒株(#9205-8), 结果表明: RFD 毒株纯度合乎规程要求: 小鼠脑内法的中和指数为 10 000。兰斑法的中和指数为 $\geq 25 000$ 。

6.2 PVCVRV 苗对家兔诱生中和抗体试验 以效价为 3.03 IU/mL 的 PVCVRV 苗(#T₂₀₋₉)免疫家兔, 表 3 结果表明: 无论用中和指数法或中和抗体滴度测定(CPE 法)进行检测, 家兔中和

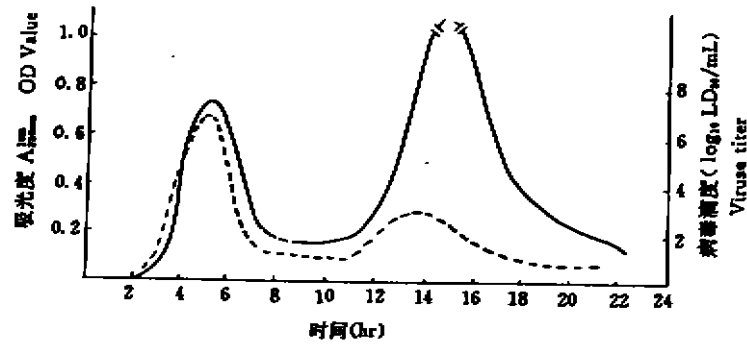


图 3 病毒分子筛凝胶柱分离图谱

Fig.3 Rabies virus components isolated by Sepharose column

— 蛋白质吸光度 — 病毒滴度
— O.D value — Virus titer

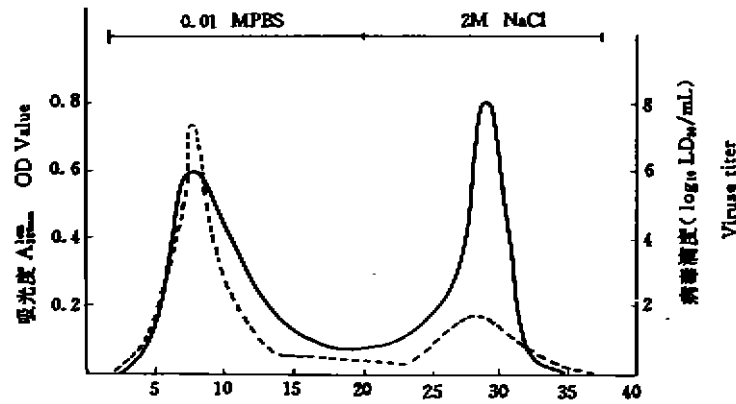


图 4 病毒离子交换柱分离图谱

Fig.4 Rabies virus components isolated by DEAE column

— 蛋白质吸光度 — 病毒滴度
— O.D value — Virus titer

抗体阳转均达 100%，抗体滴度也达一定水平。

6.3 纯化苗的质量 按 WHO 对传代细胞生产的人用狂犬疫苗(灭活)规程^[7]的要求,对近年来小量试制的数批疫苗质量进行分析,结果见表 4.纯化苗安全有效,不含活毒,效价能达合格标准(≥ 2.5 IU/mL)。残余牛血清含量 $\leq 1 \mu\text{g/mL}$,细胞 DNA 含量 $\leq 100 \text{ pg/mL}$ 。

表3 纯化狂犬疫苗诱导中和抗体

Table 3 Neutralizing antibodies induced by PVCrv

试验法 Testing method	免疫法 Immunized process (4 rabbits)	中和抗体 Neutralizing Ab(rabbits)				中和毒(CVS) Challenging virus
		# 1	# 2	# 3	# 4	
中和指数 NT index	2 doses in 0, 7 d 1 mL/dose(im)	56 234	1 000	3 162	3 162	6.25 log ₁₀ LD ₅₀ /0.03 mL
中和抗体滴度 Titers of neutralizing Ab	"	1:40	1:14	1:20	1:20	316 LD ₅₀

表4 6批纯化狂犬疫苗的质控检测结果

Table 4 The quality control tests in 6 lots of PVCrv

疫苗批次 Vac. No.	残余牛血清含量 Residual bovine serum	残余 DNA 含量 Residual DNA	疫苗效价(NIH法) Vaccine potency
T ₂₀₋₉	≤0.32 μg/mL	≤100 pg/mL	3.03 IU/mL
T ₂₈	≤0.32 μg/mL	≤100 pg/mL	2.52 IU/mL
T ₂₉₋₅	≤0.32 μg/mL	≤100 pg/mL	3.03 IU/mL
T ₂₉₋₉	≤0.32 μg/mL	≤100 pg/mL	2.83 IU/mL
T ₂₉₋₁₁	≤0.32 μg/mL	≤100 pg/mL	3.40 IU/mL
T ₃₃	≤0.32 μg/mL	≤100 pg/mL	4.70 IU/mL

讨 论

Vero 细胞狂犬病疫苗采用大规模工业化生产工艺在国外虽早获成功,但该工艺要求的设备和生产原料均较精密或昂贵,其疫苗造价对国人承受能力说来仍然偏高。为了探索适合国情的疫苗制备工艺路线,我们采用含牛血清培养液取代无血清培养液,在微载体系统中培养 Vero 细胞和狂犬病毒,所获病毒液(纯化前)的牛血清含量虽比转瓶培养工艺高 5 倍以上(平均 3 μg/mL),但采用层析法取代区带离心法做疫苗后处理,可解决病毒和牛血清等杂蛋白,取得较好分离的目的;同时又能使疫苗造价进一步降低。因此,我们认为本研究试用的疫苗小量试制工艺具有进一步扩大试用的可行性。当然,以层析法做疫苗后处理工艺的步骤较多,以及疫苗后处理得率的计算问题,仍有待进一步改进和探索。

参 考 文 献

- 1 Wiktor T J, Plotkin S A, Koprowski H, *et al*. Development and clinical trial of the new human rabies vaccine of tissue culture (Human diploid cell) origin. *Dev Biol Stand*. 1978, 40:3~9
- 2 Majer M, Annelies Herrmann, Mauler R. A Comparison of the pasteur and pitman moore strains of rabies virus for the production of rabies vaccine in human diploid cells. *J Biol Stand*, 1977, 5:249~256
- 3 Dureux B, Canton P H, Gerard A *et al*. Rabies vaccine for human use, cultivated on Vero cells. *Lancet* 1986 II (8498):98~99
- 4 Pravan Suntharasamai, Warrell M J, Warrell D A. New purified vero-cell Vaccine prevents rabies in patients bitten by rabid animals. *Lancet* 1986 II (8499):129~131
- 5 Vodopiza I, Sureau P, Lagon M *et al*. An evaluation of second generation tissue culture rabies vaccine for use in man: a four vaccines comparative immunogenicity study using a pre-exposure vaccination schedule and an abbreviated 2-1-1 postexposure schedule. *Vaccine*. 1986, 4(4):245~248

- 6 Klietmann B, Klietmann W, Cox J. Effectiveness and tolerance of pre- and postexposure treatment with purified inactivated rabies vaccine prepared on Vero cell line. *Vaccine*. 1988, 6:39~43
- 7 Requirement for Biological Substance No. 7 1986. WHO Requirement for inactivated rabies vaccine for human use produced in continuous cell lines(RBS 40m, TRS 760, 1986/1987)
- 8 宋家疆, 陈列胜, 王小敏等. Vero 细胞系生长特性, 致瘤性和胞核学检定. 卫生部上海生物制品研究所学术论文选编. 1988. 29~31
- 9 宋家疆, 王小敏, 李文勤等. Vero 细胞系外源因子检查. 卫生部上海生物制品研究所学术论文选编. 1991. 71~72
- 10 Montaynon B J. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines in reality for Vero cell line. *Dev Biol Stand*. 1989, 70: 27~47
- 11 曾蓉芳, 陈阿根, 黄海武等. 狂犬固定毒 Vero 细胞适应株的建立. *病毒学杂志*. 1990, 3(3):285~289
- 12 卫生部生物制品标准化委员会编. 人用浓缩狂犬病疫苗制造和检定规程. 中国生物制品规程一部. 1995 年版. 北京: 中国人口出版社, 1996. 121~125
- 13 陈宇光. AGMr(Hind III)-1 高度重复顺序的分子克隆及初步应用. 卫生部上海生物制品研究所学术论文选编. 1992~1993. 94~98
- 14 曾蓉芳, 陈焕玉, 陈阿根等. 狂犬病毒抗原和抗体快速检测法的应用. *中国人兽共患病杂志*. 1989, 5(6):2~6
- 15 邵益斌, 顾勤, 曾蓉芳. 应用快速 HEPES 蚀斑法检测狂犬病毒. *中国病毒学*. 1994, 9(1):70~73

Study on Vero Cell Rabies Vaccine

Zeng Rongfang Song Jiali Gu Mine *et al.*

(Shanghai Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Shanghai 200052)

The primary manufactory technique for Vero cell rabies vaccine was established. The quality of the experimental vaccine meet "the requirement for Vero cell rabies vaccine" introduced by WHO in 1986.

The Vero cell strain used for the vaccine production was from ATCC(U. S. A.). RFD virus strain used as seed virus for the vaccine was established by our laboratory in 1989.

The Vero cell was cultured in X-celligen(5 L) with microcarrier and then were infected with RFD fixed virus. The supernatant containing rabies virus was harvested at 2~3 days intervals. The virus titer of the supernatants was 6~8 log LD₅₀/mL. The virus pool was concentrated by ultrafiltration and the virus components were isolated by chromatograph. The final product contains human albumin as stabilizer and Al(OH)₃ as adjuvant. So, it is an adsorbed purified Vero cell rabies vaccine.

Six lots of the vaccine were detected by QC group. The results showed that the vaccine is safe and potent. The potency of every lot is ≥ 2.5 IU/dose, the residual bovine serum and cell DNA in all of the vaccine are $\leq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $\leq 100 \text{ pg}/\text{dose}$, respectively.

Key words Rabies adapted virus strain, Microcarrier cultural system, Purified Vero cell rabies vaccine (PVCRV)