

流行性乙型脑炎猪肾组织培养疫苗的研究

I. 病毒的培养和疫苗的制备

陈立德 周明先 许兆祥*

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

为了改进流行性乙型脑炎疫苗的质量, 在国内曾进行了乙醚提纯脑炎疫苗, 白陶土和硫酸铵提纯病毒及疫苗^[1]以及鸡胚组织培养疫苗的研究^[2]。

我系曾证明以流行性乙型脑炎病毒感染猪后能引起毒血症, 其病毒滴度可达 $10^{-3.5}$ ^[3]。因此, 在1958年我们开始用猪肾单层细胞来培养流行性乙型脑炎病毒, 并进行了猪肾组织培养疫苗的研究。应用这种方法有可能制备出一种安全、有效的组织培养疫苗。由于猪肾来源丰富, 容易获得, 这对利用猪肾组织开展实验室的研究工作或生产疫苗提供了有利的条件。现将研究结果报告如下。

一、实验材料

1. **猪肾** 所用的猪肾均取自屠宰场, 选择8—10月龄的猪肾, 在猪被屠后尽快取下, 携回实验室进行细胞制备。

2. **培养液** 所用的培养液是0.5%乳白蛋白水解物 Hanks 液, 根据不同的实验加入不同量的动物血清(猪、马、羊血清 20%, 牛血清 15%)。培养液中含青霉素 100 单位/毫升, 链霉素 100 微克/毫升, 用 2.8% NaHCO_3 调 pH 至 7.4—7.6 间。

3. **维持液** 主要是用 199 维持液, 但为了观察不同维持液对病毒繁殖的影响, 曾用下列几种维持液作为比较:

(1) 7 种氨基酸维持液^[4]。

(2) 半胱氨酸、异亮氨酸、核酮维持液^[4]。

(3) 胱氨酸维持液^[5]; 胱氨酸 50 毫克, 溶于 1 升 Hanks 液中。

维持液均加抗菌素(量同前), 以 2.8% NaHCO_3 将 pH 调至 8.0—8.2 间。

4. **小白鼠** 正常健康的 3—4 周龄小白鼠。

5. **病毒株** 以 P₃ 株为主, 部分用京卫研₁株。在比较不同毒株的繁殖滴度时, 还用中山、M₄₇、西、等株以及从猪分离的脑炎病毒株: 六郎₁、六郎₁₇、六郎₂₃、厂₁₈、厂₂₂、彭₄₆、彭₅₂等^[6]。

二、实验方法

1. **猪肾细胞的消化与培养** 基本按 Youngner^[7] 的猴肾细胞组织培养方法。将猪肾组织剪成 2—3 毫米大小的组织块, 用磷酸缓冲液洗涤后倒入密闭装置的消化瓶内, 以 pH

* 本文部分疫苗承卫生部生物制品研究所、卫生部生物制品检定所代为检定; 猪肾组织的细菌分离及病理检查蒙北京中苏友谊医院协助, 特此致谢。

本文 1962 年 12 月 18 日收到。

7.8 无钙磷酸缓冲液配制的 0.25% 胰酶 (Difco 或 N.B.C.) 进行消化, 每次 5—7 分钟, 消化后的细胞悬液经 4 层纱布过滤, 然后以 1,000 转/分离心沉淀 15—20 分钟。沉淀后的细胞用培养液稀释, 按 30 万细胞/毫升接种, 接种后置 37℃ 静止培养, 3—4 天后换液(培养液成分同前)。一般在培养 6—8 天内便可以长成一片致密的上皮细胞。

2. 病毒接种 选择长成致密单层细胞的培养瓶接种病毒, 接种前用 Hanks 液将细胞洗涤两次。以 10^{-3} 的新鲜鼠脑病毒悬液按维持液量的 1/100 接种。此外, 曾用 10^{-1} 及 10^{-5} 稀释度的病毒接种, 以比较不同接种量对病毒繁殖的影响。

3. 组织培养病毒的滴定 用 10% 脱脂牛奶生理盐水为稀释剂, 以原病毒液的稀释度为 10^0 , 按 10 倍稀释之。每滴度接种小白鼠 4—5 只, 每鼠 0.03 毫升脑内注射, 观察 14 天。

4. 组织培养疫苗的制备 猪肾细胞接种病毒后置 37℃ 培养, 第 4 天收获病毒液。病毒液经 2,000 转/分离心沉淀 20 分钟后, 吸上清做细菌培养及病毒滴定, 其余加入福尔马林灭活, 使含 0.1% 浓度的福尔马林。为了比较不同天数的病毒滴度及疫苗效价, 于第 3、4、5 天各收获一部分病毒液作病毒滴定及制备成疫苗。疫苗放 4℃ 冰箱灭活及保存。2—3 周后开始做安全试验及效力试验。

5. 安全试验 以灭活后的疫苗脑内注射小白鼠 8 只, 第 7 天杀死两只, 取鼠脑传代 5 只小白鼠, 如此进行盲目传代三代。盲目传代过程中以无特异性死亡为合格。

6. 效力试验

1) Sabin 变法^[8]: 疫苗效价是以鼠脑疫苗的 50% 最小免疫量为 0.01 毫升作为标准。

2) 定量免疫法^[2]: 疫苗用磷酸缓冲盐水 10 倍稀释, 0.5 毫升腹腔注射 3 周龄小白鼠, 3 天后同量注射 1 次, 第 1 次注射后 7 天用不同稀释度的新鲜鼠脑病毒 0.3 毫升腹腔攻击, 同时以肉汤进行脑内刺激。疫苗的效价是以保护指数的大小来表示。

三、实验及结果

(一) 流行性乙型脑炎病毒在猪肾组织培养的繁殖动态

在本实验中, 当以 P_3 株鼠脑病毒 10^{-3} 悬液感染细胞后, 在第 24 小时病毒开始有增加, 于第 3、4 天达到较高的滴度, 第 5 天下降, 第 6 天已降至很低的水平 (见图 1)。实验证明, 流行性乙型脑炎病毒能在猪肾细胞大量繁殖, 并达到相当高的滴度。

除 P_3 株外, 还比较了另外 11 株从人或猪分离的病毒在猪肾细胞的繁殖情况, 试验结果证明, 不同毒株都能繁殖至较高的滴度, 但未见各毒株间的滴度有明显的差别。

在实验中观察到病毒在猪肾组织培养繁殖的高峰往往波动在第 3、4 天之间。为了着重观察第 3、4 天病毒滴度的波动情况, 在同样条件下进行了多次实验, 结果表明, 病毒在第 4 天的滴度最高, 其次是第 3 天 (表 1)。因此, 在以后制备疫苗的实验中都选择在第 4 天

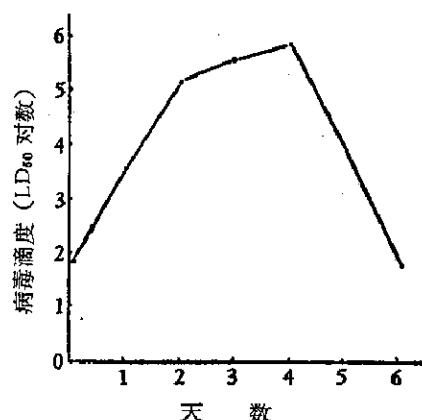


图 1 流行性乙型脑炎病毒在猪肾组织培养的繁殖动态

表 1 流行性乙型脑炎病毒在猪肾
組織培养不同天数的繁殖滴度

	病 毒 滴 度		
	3 天	4 天	5 天
实验次数	12	12	8
平 均	4.84*	5.42	4.60

* LD₅₀ 对数。以下各表的病毒滴度均以 LD₅₀ 对数表示。

这表明病毒接种量的大小对組織培养液內病毒滴度高低的影響較小，但与病毒滴度高峯出現的时间有关。

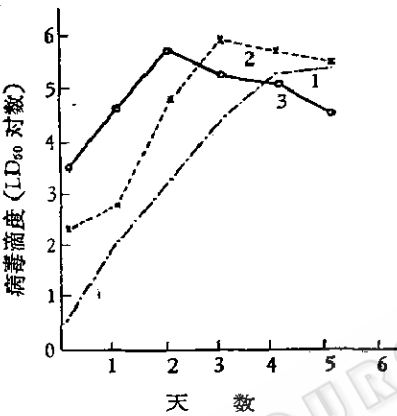


图 2 不同接种剂量的流行性乙型
脑炎病毒在猪肾組織培养內的繁殖

- 1. 接种 10⁻⁵ 鼠脑病毒悬液
- 2. 接种 10⁻³ 鼠脑病毒悬液
- 3. 接种 10⁻¹ 鼠脑病毒悬液

收获病毒。

(二) 接种量与病毒繁殖的关系

以 10⁻¹、10⁻³、10⁻⁵ 不同稀释度的鼠脑病毒接种到猪肾細胞后，病毒的繁殖曲綫因病毒接种量的大小而稍有不同(图 2):接种量为 10⁻¹ 时，高峯出現在第 2 天(10^{-5.83});用 10⁻³ 接种时病毒滴度的高峯出現在第 3、4 天(10^{-6.50}，10^{-5.83});而接种 10⁻⁵ 病毒时，病毒的繁殖滴度呈直綫上升，高峯出現在第 4、5 天(10^{-5.37}，10^{-5.50})。

(三) 不同維持液对病毒繁殖的影响

同时比較了 199、7 种氨基酸、半胱氨酸-异亮氨酸-核糖及胱氨酸 4 种維持液对病毒繁殖的影响，实验共进行了两次。从表 2 的結果看出，在这四种維持液中病毒繁殖的滴度差別不大。

表 2 不同維持液对流行性乙型脑炎病毒繁殖的影响

实验	維 持 液	病 毒 滴 度			
		1 天	2 天	3 天	4 天
1	199	2.20	5.32	4.83	6.16
	7 种氨基酸	1.50	5.32	6.50	5.16
	半胱氨酸-异亮氨酸-核糖	2.20	4.32	5.32	5.63
	胱氨酸	1.83	4.75	5.63	5.32
2	199	—	—	5.83	5.40
	7 种氨基酸	—	—	6.13	5.00
	半胱氨酸-异亮氨酸-核糖	—	—	6.13	5.40
	胱氨酸	—	—	5.50	5.40

“—”表示未作試驗。

(四) 不同动物血清培养的猪肾細胞对病毒滴度的影响

本实验采用 0.5% 乳白蛋白水解物 Hanks 液与不同动物及不同浓度血清(猪、馬、羊血清——20%;牛血清——15%)的培养液培养猪肾細胞，在接种病毒后第 4 天滴定其感染滴度，結果 15% 牛血清培养液在 7 次实验的平均病毒滴度稍高(5.874)，20% 猪、馬血清的病毒滴度相接近(5.377、5.328，分别为 17 次、13 次实验的平均值)，而 20% 羊血清的病毒滴度稍低(4.317)。由于羊血清的实验次数較少(仅 4 次)，因此不能认为这是羊血清培养猪肾細胞所能达到的最高病毒滴度。

(五) 猪肾組織培养疫苗的效价

共检定了 22 批疫苗的效价，結果見表 4。这些疫苗都是以 199 作为維持液，在接种病毒后第 4 天收获病毒制备成疫苗。所用的病毒株，除了 2 批为京卫研₁株外，其余都是 P₃ 株。这 22 批疫苗都是在冰箱保存 3 个月內进行检定。若以 Sabin 变法的 50% 最小

免疫量是 0.01 毫升作为检定合格标准, 则这 22 批疫苗中有 13 批在 0.01 毫升以下, 占 59.1%。但疫苗的效价尚不够稳定, 每批疫苗间效价的波动也较大。一部分疫苗用定量免疫法测定其效价, 结果证明猪肾组织培养疫苗能达到很高的保护指数——从 51,920 至 3,613,000, 大部分可达 100,000 以上。50% 最小免疫量在 0.01 毫升以下的, 其保护指数也较高。其中有二批疫苗(11-4, 43)的 50% 最小免疫量大于 0.01 毫升, 但保护指数分别也可达到 295,000 和 177,800。疫苗的效价一般与病毒滴度有平行关系, 但在表 3 中观察到有些疫苗的病毒滴度较高而疫苗效价反不够理想, 也有些疫苗的病毒滴度较低而有很好的效价。

表 3 流行性乙型脑炎猪肾组织培养疫苗的效价

疫苗批号	病毒滴度	灭活天数	效 价	
			Sabin 变法(毫升)	定量免疫法(指数)
*3-1	6.33	23	0.0100	—
**3-2	6.33	23	0.00865	—
5-1	5.40	46	0.0100	—
5-2	5.40	46	0.00630	—
9-1	5.62	62	0.0112	—
9-2	5.38	62	0.00187	—
9-3	4.82	62	0.00477	—
11-1	5.50	35	0.00870	3,613,000
11-2	5.75	35	0.00599	>382,000
11-3	5.25	35	0.0157	2,138,000
11-4	6.25	35	0.035	295,000
15	6.00	34	>0.500	—
17-1	>4.50	81	0.184	—
17-2	>4.50	81	0.00367	—
20	5.00	51	0.00544	—
21	5.17	48	0.00352	—
22	4.69	75	0.00304	—
42	5.50	25	0.0128	104,700
43	5.50	24	0.0280	177,800
44	6.24	24	0.0295	51,920
45	6.17	14	0.00400	3,311,000
46	5.62	14	0.0114	1,479,000

* 京卫研株以 0.2% 福尔马林灭活。

** 京卫研株以 0.1% 福尔马林灭活。

此外, 对猪肾组织培养疫苗效价的影响因素尚进行了下面两部分的研究:

1. 不同维持液的猪肾组织培养疫苗的效价

比较了 4 种维持液制备的疫苗的效价, 结果见表 4。在 7 次的实验中都证明无论是 7 种氨基酸, 半胱氨酸-异亮氨酸-核糖或胱氨酸维持液所制备的疫苗也能达到相当高的效价。但与 199 维持液一样, 效价不够稳定, 波动范围也较大。

2. 不同天数收获病毒所制备的疫苗的效价

以接种病毒后第 3、4、5 天收获的猪肾组织培养病毒液所制备的疫苗(199 维持液),

在保存 74、75、76 天后进行效价测定,观察其变动情况。结果第 3、4、5 天的病毒滴度分别为 4.22、4.69 及 3.66,而其相应的疫苗效价为 0.0119、0.00302 及 0.0410 毫升。第 4 天的疫苗效价比第 3 天或第 5 天的高,这些差异似与病毒滴度有一定的关系。

表 4 不同维持液的猪肾组织培养疫苗的效价

实 验	维 持 液	病 毒 滴 度	灭 活 天 数	效价 (Sabin 变法) (毫 升)
* 1	半胱氨酸-异亮氨酸-核糖 胱氨酸	5.40	52	0.00660
		5.40	52	0.00165
2	199	5.40	164	0.0756
	7 种氨基酸	5.40	164	0.00341
	半胱氨酸-异亮氨酸-核糖	5.40	164	0.00271
	胱氨酸	5.40	164	0.00714
3	199	5.00	51	0.00544
	胱氨酸	3.31	51	0.0826
4	199	4.69	75	0.00304
	胱氨酸	3.83	75	0.0234
5	199	5.75	95	0.0363
	7 种氨基酸	5.80	95	>0.500
	胱氨酸	5.17	95	0.0717
6	199	5.38	136	0.202
	7 种氨基酸	4.50	136	0.142
	胱氨酸	5.00	136	0.0701
7	199	4.52	108	0.149
	7 种氨基酸	6.48	108	0.0640
	胱氨酸	4.80	108	0.142

* 京卫研株。

表 5 流行性乙型脑炎猪肾组织培养疫苗的保存试验

批 号	病 毒 滴 度	自灭活至测定 效价的天数	疫 苗 效 价	
			Sabin 变法(毫升)	定量免疫法(指数)
5	5.40	46	0.0100	—
		164	0.0756	—
11—1	5.50	35	0.0087	3,613,000
		139	0.00869	5,245
11—2	5.75	35	0.00599	>380,200
		139	0.00770	239
11—3	5.25	35	0.0157	2,138,000
		139	0.130	363
20	5.00	51	0.00544	—
		256	0.199	—
21	5.17	48	0.00352	—
		253	0.167	—
22	4.69	75	0.00304	—
		246	0.241	—

(六) 流行性乙型脑炎猪肾组织培养疫苗的保存试验

流行性乙型脑炎猪肾组织培养疫苗用 1:1,000 浓度的福尔马林灭活,在 4℃ 冰箱保存較长的时间(4 个月以上)后,测定其效价,结果如表 5 所示。在第 1 次(3 个月以内)检定的 7 批疫苗中,有 6 批疫苗的 50% 最小免疫量在 0.01 毫升以下,但保存 4 个月以后,只有 2 批疫苗的效价维持在 0.01 毫升以下。另外有 9 批疫苗第 1 次来检定,而在冰箱保存了 95—140 天才测定其效价,结果所有疫苗的最小免疫量都大于 0.01 毫升($0.027- > 0.5$ 毫升),其保护指数亦下降到 $< 100-28,200$ 。

四、討 論

流行性乙型脑炎病毒能在 He La Detroit-6、Hep-2 等肿瘤细胞或 Cou 传代细胞上繁殖^[9-12],但这些细胞可能有致癌作用,不宜应用于制备疫苗。尚有一些动物组织如田鼠肾细胞^[13]、猴肾细胞^[11]也能繁殖本病毒,但这些组织来源较少或者比较昂贵,这对大量生产疫苗有很大的限制。此外,鸡胚纤维母细胞也能培养流行性乙型脑炎及蜱脑炎病毒^[14],并且已应用于制备疫苗。在我们进行实验研究的同时, Lee^[15] 等提出了流行性乙型脑炎病毒能在猪肾细胞繁殖的报告。

一种较理想的组织培养灭活疫苗必须含有较高的病毒量及具有较强的抗原性。从流行性乙型脑炎病毒在猪肾组织培养的繁殖情况中观察到,在接种病毒后第 4 天的病毒滴度能达 $10^{-5.5}-10^{-6.5}$,这样高的病毒滴度是符合于制备疫苗的基本条件。

培养猪肾细胞的培养液成分能影响病毒的滴度,实验证明虽然猪、马、羊、牛血清都能培养猪肾细胞,但以 15% 牛血清培养的猪肾细胞能得到较稳定和较高的病毒滴度。甚至使用 5% 的牛血清也能使猪肾细胞生长成单层。Young 等^[16]在研究猪肾细胞的组织培养时也认为牛血清可使猪肾细胞生长得比较好。

199 维持液的成分比较复杂,为了简化制备疫苗的维持液,我们同时比较了 199、7 种氨基酸、半胱氨酸-异亮氨酸-核糖及胱氨酸等四种维持液对病毒繁殖及疫苗效价的影响,结果表明,这些维持液都能使病毒有明显的繁殖,而利用这些维持液培养病毒所制备的疫苗也能达到一定高度的效价。

根据在猪肾组织培养疫苗效价检定的结果,约有 59.1% 疫苗的 50% 最小免疫量达到 0.01 毫升以下,保护指数能达到 51,920—3,613,000。但每批疫苗之间的效价尚不够稳定,差异也较大。这种现象在脊髓灰白质炎灭活疫苗中也有出现^[17]。每批疫苗之间的效价差异较大的原因可能与所用的猪肾组织来自不同的猪有关,也可能受维持液 pH 的影响。此外,疫苗检定的方法也还不够理想。

所有制备出的疫苗经安全试验检查,结果均未证实有活病毒存在。因此,在以 1:1,000 浓度的福尔马林作用下,病毒的灭活应当是可靠的。

由于考虑到猪肾可能存在有其他病原体,曾从实验用的猪肾分离结核杆菌、炭疽杆菌及布鲁氏杆菌,结果都是阴性。将部分猪肾做病理切片检查,也未发现有明显的病理变化,但在某些标本中发现有旧的病灶征象。显然,这些检查还是很不够的,在利用猪肾制备疫苗的过程中,必须对猪肾组织进行更详细的检查。

五、总 结

1. 流行性乙型脑炎病毒能在猪肾细胞组织培养繁殖, 病毒滴度可达 $10^{-5.5}$ — $10^{-6.5}$ 之間。不同毒株在猪肾组织培养上繁殖的滴度差别不大。
2. 用不同动物血清培养猪肾细胞, 証明以牛血清培养的猪肾细胞較好, 經病毒感染后, 其病毒滴度也較高。
3. 流行性乙型脑炎病毒能在 199、7 种氨基酸、半胱氨酸-异亮氨酸-核糖及胱氨酸等四种維持液培养, 并能得到相近的最高病毒滴度。
4. 用 Sabin 变法檢定猪肾組織培养疫苗, 結果有 59.1% 合格, 或能达到 51,920—3,613,000 的保护指数。疫苗在冰箱保存 4 个月以后, 其效价有較明显的下降。

参 考 文 献

- [1] 柳元元、张汉荆、张礼璧、张吉祥、关学勤: 微生物学报, 7:167—174, 1959。
- [2] 王用輯、顾佩韦、孙 勉、馬文信: 北京生物制品研究所, 論文选集, 1959。
- [3] 王逸民、任广宏、郑云凯、刘志勋: 中华卫生杂志, 6:197—201, 1958。
- [4] Rappaport, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91:464—470, 1956.
- [5] Dubes, C. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93:129—132, 1956.
- [6] 黃禎祥、戴 瑩: 微生物学报, 6:42—132, 1956。
- [7] Youngner, J. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 85:1954.
- [8] 长春生物制品研究所: 生物制品通訊, 2:154, 1958。
- [9] Scherer, W. F., Syverton, J. T.: *Amer. J. Path.*, 30:1075—1083, 1954.
- [10] Фан Цзе-мин, Левкович, Е. Н., Фокина, К. В.: *Вопр. Вирус.*, (1): 39—44, 1960.
- [11] McCollum, R. W., Foley, J. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94:556—60, 1957.
- [12] Фан Цзе-мин: *Вопр. Вирус.*, (2): 208, 1959.
- [13] Kissling, R. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 96:290, 1957.
- [14] Левкович, Е. Н., Засухина, Г. Д., Чумаков, М. П., Лашкевич, В. А., Гагарина, А. В.: *Вопр. Вирус.*, (2): 233—236, 1960.
- [15] Lee, H. W., Hinz, R. W., Scherer, W. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 99:579, 1958.
- [16] Young, G. A., Underhahl, N. R., Sabina, L. R.: *Am. J. Vet. Research.*, 18:466—472, 1957.
- [17] Kelly, S., Dalldorf, G.: *Am. J. Hyg.*, 64:243—358, 1956.

STUDIES ON THE SWINE KIDNEY TISSUE CULTURE VACCINE OF JAPANESE B ENCEPHALITIS

I. MULTIPLICATION OF VIRUS AND PREPARATION OF VACCINE

CHEN LI-TEH, CHOW MING-SIEN, HSÜ CHOA-HSIANG

(Department of Virology, Academy of Medical Sciences of China, Peking)

Because of the presence of nervous tissue in the mouse brain vaccine which might give rise to unfavourable reaction, swine kidney monolayer cell tissue culture for the preparation of virus and preparation of vaccine was investigated.

The Japanese B encephalitis virus multiplies intensively in the swine kidney cells, reaching a titer of $10^{-5.50}$ to $10^{-6.50}$ (LD_{50} in mice per 0.03 ml intracerebrally) at the 3rd or 4th day after inoculation, and the 4th day was the time chosen for the harvest of virus and preparation of vaccine.

The virus multiplies not only in the 199 synthetic medium, but also in Rappaport's medium, cysteine-isoleucine-ribose medium or cystine medium alone. The virus titer attained from $10^{-5.0}$ to $10^{-6.50}$.

Inoculation of different concentrations of mouse brain virus suspension (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) into swine kidney tissue culture, the maximal virus titer attained almost the same level, but the peak of the virus titer reached at the 2nd, 4th, and 5th day respectively.

The 50% minimal immunogenic dose in the 22 tested vaccines showed that 59.1% of the vaccine had passed the criterion of 0.01 ml (according to the modification of Sabin's mouse brain vaccine method). The immunogenic indices after immunization of the total intraperitoneal dose of 0.1 ml of the tissue culture vaccine to mice, vary from 51,920 to 3,613,000 in different lots of vaccine.

Effective vaccine can also be prepared with Rappaport's medium, cysteine-isoleucine-ribose medium or cysteine medium alone.

Using a concentration of 1:1000 formalin for the inactivation of virus, the potency of most lots of vaccines decreased obviously after storage in the refrigerator for about 4 months.