

# 麻疹減毒活疫苗的研究

## III. 人羊膜細胞传代对麻疹病毒致病性与免疫性的影响\*

黃禎祥 郭可審 賈秉义\*\*

(中国医学科学院病毒学研究所,北京)

国内外許多麻疹疫苗的研究工作都肯定了病毒通过一些組織培养的連續传代可以降低其致病性,但是所有的疫苗都沒有彻底解决其发烧反应問題,因而影响了大規模的推广应用。在我們关于麻疹活疫苗研究的第一篇报导<sup>[1]</sup>中曾經指出,通过人羊膜細胞 37 代的苏联 L<sub>4</sub> 株比我們在人羊膜細胞传 5 代的 M<sub>60-5</sub> 株致病性为低,虽然病毒株不同,但能初步表明病毒通过人羊膜細胞传代可以減低其毒力。然而仅仅依靠人羊膜組織培养的連續传代是否能使病毒不断減毒,而最終达到基本消除其致病性,同时又具有較好的免疫性能的疫苗株要求呢? 这是我們所关心的問題。由于目前国内外还缺乏系統的、以一个病毒株在一种組織培养系統連續传代来观察其致病性与免疫性变化的資料,因而对上述問題难以作出結論。本文拟在前文<sup>[1]</sup>基础上將我們近两年来利用麻疹 L<sub>4</sub> 与 M<sub>60-5</sub> 株在原代人羊膜細胞上进一步传代所制备的各批疫苗,在小量易感儿接种后观察到的体温反应与抗体产生情况作一报导,作为麻疹疫苗研究的一些基础資料。

### 材料与方法

**麻疹病毒株** L<sub>4</sub> 株(苏联列宁格勒 4 株)在苏联曾于人胎腎細胞传 26 代,原代人羊膜細胞 30 代,在本实验室繼續于原代人羊膜細胞传代。M<sub>60-5</sub> 株系我們 1960 年所分离<sup>[2]</sup>,在人胎腎細胞传 6 代后轉入原代人羊膜細胞传代。

**組織培养** 原代人羊膜細胞系采取健康产妇的早产羊膜,以 0.25% 胰酶于 37°C 消化三个半小时,用含 10% 牛血清的水解乳蛋白(0.5%) Hanks 液培养。人胎腎細胞系將人胎腎組織块以 0.2% 左右的胰酶于 37°C 分次消化,用含 15% 牛血清水解乳蛋白 Hanks 液培养。两种細胞均在 4—7 天生长成片后应用。

**疫苗制备与检定** 除一批疫苗系在人胎腎細胞制备外,全部疫苗都用原代人羊膜細胞制备。疫苗液是不含血清的 199 綜合培养基。L<sub>4</sub> 株在人羊膜細胞(HAM)传了 37、56、67 代所制备的疫苗分別称为 L<sub>4</sub> HAM<sub>37</sub>、L<sub>4</sub> HAM<sub>56</sub> 及 L<sub>4</sub> HAM<sub>67</sub>; M<sub>60-5</sub> 株人羊膜 5 代及 26 代的疫苗則分別称为 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>5</sub> 与 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>26</sub>。以 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>27</sub> 毒株通过人腎細胞(HK)二代所制备之疫苗称 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>27</sub> HK<sub>2</sub>。各批疫苗均通过无菌試驗(包括类胸膜肺炎菌检查),动物安全試驗后才用于人体。疫苗滴定以传代人羊膜細胞或原代人胎腎細胞測定,注射时按其滴度稀释成 0.1 毫升含所需要的剂量(见表 1)。

**易感儿选择** 本文內各批疫苗免疫工作除一部分在天津进行外,多数在北京的几个托儿所进行。

\* 阮学珍、邓裕美同志参加部分技术工作。

\*\* 河北省医学科学院。

本文 1964 年 3 月 21 日收到。

易感兒年齡為 8 個月至 7 歲，身體健康，既往無麻疹史。文內全部易感兒均經血清學證實免疫前抗體為陰性。

**免疫方法及臨床反應的觀察** 所有兒童均採用皮下注射 0.1 毫升含一定病毒劑量的疫苗（多數為 10 或 100 TCID<sub>50</sub>）。注射後二周內觀察臨床反應，包括一般情況、卡他、費柯氏斑、皮疹及體溫等。體溫採自腋下，每天測 2—4 次，一天內若有一次或一次以上的發燒（>37℃）均按一天計算。文內各批疫苗平均最高體溫與熱程之計算，系僅按有發燒反應者作平均，但為了便於與有些作者的工作相比較，在平均體溫後面括號內附有按全體接種兒童計算之平均值。

**抗體檢查** 所有兒童在接種疫苗當天與免疫後一個月取血檢查抗體。除 L<sub>4</sub> HAM<sub>37</sub> 與 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>5</sub> 兩批疫苗以靜脈血作中和試驗外，其餘各批均自耳垂採血以微量血凝抑制法測定抗體。測定方法與曾毅等的報告<sup>[1]</sup>完全相同。

**統計學測定** 各批疫苗間體溫反應顯著性測定係以全體接種兒童之最高體溫分別作 t 測定，P 值 ≤ 0.05 即認為有顯著性差別。

### 實驗結果

**（一）麻疹病毒通過人羊膜細胞傳代後致病性的變化** 由於除 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>5</sub> 與 L<sub>4</sub> HAM<sub>37</sub> 疫苗有較明顯的皮疹、卡他外<sup>[1]</sup>，其他各批疫苗極少引起皮疹，卡他亦輕微，體溫反應即成為疫苗致病性的主要問題，因此本文僅以體溫反應作比較。M<sub>60-5</sub> HAM<sub>26</sub> 疫苗 10 及 100 TCID<sub>50</sub> 二種劑量在體溫反應與抗體水平上均無差別，故合併分析。從表 1 可以見到 L<sub>4</sub> 株通過人羊膜 37 代、56 代、67 代後，雖然發燒反應率無改變，但在平均最高體溫及熱程上有逐漸下降的現象。L<sub>4</sub> HAM<sub>37</sub> 的平均最高體溫為 39.2℃ (39.2℃)，而 L<sub>4</sub> HAM<sub>56</sub> 與 L<sub>4</sub> HAM<sub>67</sub> 則分別下降為 38.9℃ (38.5℃) 及 38.3℃ (38.3℃)；最高體溫 ≥ 38.5℃ 在發燒者中所佔的比例隨着傳代次數的增多由 7/7 下降為 5/8 與 3/7；平均熱程也由 4.7 天分別縮短到 4.0 天及 3.5 天。M<sub>60-5</sub> 株人羊膜 5 代與 26 代疫苗的比較中也顯示了同樣的變化。M<sub>60-5</sub> HAM<sub>5</sub> 平均最高體溫為 39.5℃ (39.5℃)，M<sub>60-5</sub> HAM<sub>26</sub> 則為 38.7℃ (38℃)；≥ 38.5℃ 的比例由 8/8 降至 11/16；平均熱程由 5.1 天縮短為 2.4 天。我們用統計學方法測定了有關疫苗體溫反應間差異的顯著性，L<sub>4</sub> HAM<sub>37</sub> 與 L<sub>4</sub> HAM<sub>56</sub>、L<sub>4</sub> HAM<sub>67</sub> 間 t 測定之 P 值分別為 ≤ 0.05 及 < 0.05 / > 0.02 (L<sub>4</sub> HAM<sub>56</sub> 與 L<sub>4</sub> HAM<sub>67</sub> 間 t 測定 P

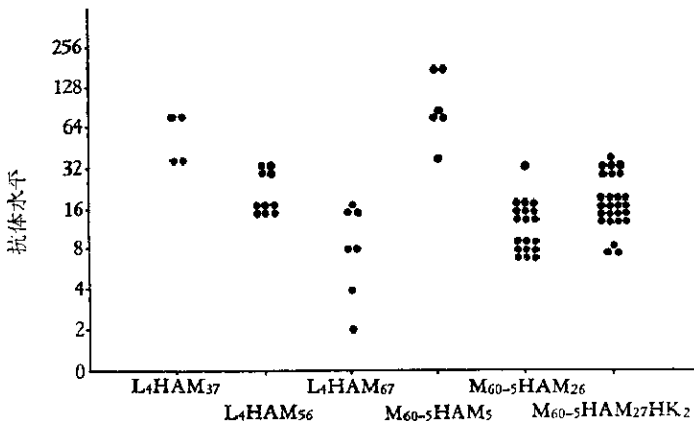


圖 1 麻疹 L<sub>4</sub> 與 M<sub>60-5</sub> 株病毒不同代數人羊膜疫苗免疫後抗體水平的分布。

表 1 麻疹病毒 L<sub>4</sub> 及 M<sub>40-5</sub> 株在人羊膜細胞傳代過程中致病性與免疫後抗體水平之變化

株 別	人羊膜代數	劑量 (1°CID <sub>50</sub> )	接種人數	發病人數	潛伏期(天)		最高體溫(°C)		發燒反應 t 測定	熱程(天)		免疫前		免疫後抗體 <sup>φ</sup>	
					範圍	平均	範圍	平均		範圍	平均	範圍	平均	範圍	平均
L <sub>4</sub>	37	6	7	7	6-9	7.7	38 <sup>5</sup> -39 <sup>8</sup>	39 <sup>5</sup> (39 <sup>5</sup> )*		2-7	4.7	<5 <sup>Δ</sup>	40-80 <sup>Δ</sup>	60 <sup>Δ</sup>	
	56	10	10	8	5-11	8.6	37 <sup>8</sup> -39 <sup>8</sup>	38 <sup>8</sup> (38 <sup>5</sup> )	P ≤ 0.05	2-9	4.0	<2	16-32	22.4	
	67	10	7	7	5-10	7.8	37 <sup>8</sup> -39 <sup>8</sup>	38 <sup>8</sup> (38 <sup>8</sup> )	P < 0.05 P > 0.02	1-6	3.5	<2	2-16	10.0	
M <sub>40-5</sub>	5	1-5	8	8	5-9	6.4	38 <sup>8</sup> -40 <sup>0</sup>	39 <sup>8</sup> (39 <sup>5</sup> )		2-6	5.1	<3-10 <sup>Δ</sup>	40-160 <sup>Δ</sup>	100 <sup>Δ</sup>	
	26	10	11	7	5-9	7.1	37 <sup>8</sup> -40 <sup>0</sup>	38 <sup>7</sup>		1-5	2.7	<2	8-16		
		100	12	9	5-7	6.7	37 <sup>8</sup> -39 <sup>8</sup>	38 <sup>7</sup>	P < 0.001	1-4	2.2	<2	8-32		
	合計		23	16	5-9	6.9	37 <sup>8</sup> -40 <sup>0</sup>	38 <sup>8</sup> (38 <sup>8</sup> )		1-5	2.4	<2	8-32	13.0	
		10	13	10	9-12	9.6	37 <sup>1</sup> -39 <sup>8</sup>	38 <sup>8</sup>		1-5	2.5	<2	8-32		
	27+HK <sub>8</sub>	100	16	15	7-11	8.6	37 <sup>1</sup> -39 <sup>8</sup>	38 <sup>4</sup>		1-6	3.1	<2	8-32		
	合計		29	25	7-12	9.0	37 <sup>1</sup> -39 <sup>8</sup>	38 <sup>8</sup> (38 <sup>1</sup> )		1-6	2.9	<2	8-32	19.3	

\* 括號內係以全體接種者計算之平均值。

Δ 用中和試驗法測定。

φ 血清稀釋度之倒數。

值則為  $\frac{<0.7>}{>0.6}$ 。在  $M_{60-5}$  HAM<sub>5</sub> 與  $M_{60-5}$  HAM<sub>26</sub> 二批疫苗間進行 t 測定  $p < 0.001$ ，表明不論  $L_4$  與  $M_{60-5}$  株，其各批疫苗體溫反應間的差異是具有顯著性的。

(二) 人羊膜細胞傳代對麻疹病毒免疫後抗体水平的影響 從表 1 與圖 1 中還可以看到，隨著病毒在人羊膜細胞傳代次數之增加，其免疫後抗体水平也有相當明顯的降低，而且  $L_4$  株與  $M_{60-5}$  株的表現也是一致的。如  $L_4$  HAM<sub>37</sub> 免疫後抗体水平在 1:40 與 1:80 之間，平均為 1:60；而  $L_4$  HAM<sub>56</sub> 免疫後抗体水平在 1:16 與 1:32 之間，平均 1:22.4； $L_4$  HAM<sub>67</sub> 免疫後抗体在 1:2 與 1:16 之間，平均僅 1:10。 $M_{60-5}$  HAM<sub>5</sub> 抗体在 1:40 與 1:160 之間，平均為 1:100； $M_{60-5}$  HAM<sub>26</sub> 抗体下降到 1:8 與 1:32 之間，平均 1:13。

(三) 麻疹減毒株通過人胎腎細胞傳代其致病性與免疫後抗体水平的變化 人胎腎細胞對麻疹病毒是比較敏感的，Enders<sup>[4]</sup> 氏以麻疹病毒在人胎腎細胞上傳了 23 代，證明不引起病毒對猴子的致病性的改變。鑑於病毒在人羊膜細胞繁殖的滴度較低以及免疫性隨著傳代而下降，我們試圖用已通過人羊膜細胞 27 代的  $M_{60-5}$  減毒株在人胎腎細胞上傳 2 代，以觀察是否會影響其原有之致病性與免疫性。從表 1 與圖 1 中可以看到，29 名易感兒接種  $M_{60-5}$  HAM<sub>27</sub> HK<sub>2</sub> 疫苗後，其發燒反應和抗体水平與  $M_{60-5}$  HAM<sub>26</sub> 相比沒有明顯地改變。 $M_{60-5}$  HAM<sub>27</sub> HK<sub>2</sub> 的平均最高體溫為 38.3°C (38.1°C)，抗体水平平均為 1:19.3，而  $M_{60-5}$  HAM<sub>26</sub> 則為 38.7°C (38°C)，抗体為 1:13。

## 討 論

從以上所報告的結果可以說明麻疹病毒不論是  $L_4$  株或  $M_{60-5}$  株在人羊膜細胞的連續傳代過程中，其致病性與免疫性看來都是有所改變的。隨著傳代次數的增加，疫苗的發燒反應逐漸降低，但是同時也伴隨著免疫後抗体水平的下降，這點是必須引起我們注意的。當  $L_4$  株通過人羊膜細胞 67 代後，雖然致病性較 37 代有明顯降低，但其免疫後平均抗体水平只有 1:10，有的兒童僅為 1:2。如果繼續傳代，估計體溫反應可能繼續下降，但免疫後抗体水平可能將更差，甚至可能部分兒童不產生免疫反應，而不適用於製備疫苗。此外，雖然平均體溫隨傳代而下降，但高燒反應仍然未能去除，這對疫苗的应用也是不利的。因此，單純以人羊膜細胞傳代使病毒減毒恐難獲得滿意的結果。在抗体測定方法上，我們早期採用中和試驗，以後因靜脈取血不易征得兒童家長的同意，改用耳垂取血，以微量血凝抑制法測定抗体。曾毅等比較了此法與中和試驗，認為二者可以有一個滴度之差<sup>[3]</sup>。我們曾同時測定  $L_4$  HAM<sub>56</sub> 之免疫後中和抗体與血凝抑制抗体，前者平均為 1:45.6，后者平均 1:22.4，兩種方法所得結果相差也為一個滴度。但從結果中看到  $L_4$  與  $M_{60-5}$  株晚代疫苗抗体水平與早代之差別大大超過一個滴度，因此我們認為方法之改變還不致影響到我們的結論，可以認為抗体水平的下降與病毒傳代是有關係的。國內外文獻資料中沒有系統的報告過同一毒株在同一細胞系統傳代後的變異情況，但是從幾個作者的不同報告中可以看到 Edmonston 株通過雞胚細胞連續傳代，其致病性與免疫性同樣有相應的改變。Goffe 等<sup>[5]</sup>、Collard 等<sup>[6]</sup>、Aldous 等<sup>[7]</sup> 的報告中觀察到 Edmonston 株雞胚細胞 19 代、31 代、53 代之疫苗臨床反應，認為未見到明顯差別，但 Schwarz<sup>[8]</sup> 以同一株病毒在雞胚細胞傳 90 代後發燒反應有了很明顯的降低（肛表平均為 101°F，相當於 38.3°C）。在抗体水平方面，Collard 等所報告的 Edmonston 株雞胚細胞 19 代疫苗免疫後中和抗体在

1:192—1:2048 之間, Schwarz 所报告的 90 代疫苗的抗体則在 1:6—1:320 之間(平均 1:74), 虽然他們的实验条件不一定完全一致, 但是病毒在組織培养連續传代过程中致病性有所減低, 而免疫后抗体水平也受到相应影响的这种趋势还是可能的。上海余鼎新等<sup>[9]</sup>也比較了 L<sub>4</sub> 株人羊膜 40 代与 56 代疫苗, 他們的結果二者在发烧反应方面无差別, 平均抗体水平前者为 1:52, 后者为 1:40, 差別也不甚肯定, 但从徐肇璵等<sup>[10]</sup>用上海制备的 L<sub>4</sub> HAM<sub>68</sub> 疫苗的結果看来, 当用 10.5 TCID<sub>50</sub> 时(此与本文剂量相似), 7 例发烧者中有 2 例超过 38.6°C, 但均未及 39.1°C, 其抗体平均为 1:16, 与 L<sub>4</sub> HAM<sub>37</sub> 相比差別仍然是明显的。当然, 由于我們在人体观察的例数比較少, 虽然观察到致病性与免疫性随传代次数增多而逐漸下降的情况, 但是若要对此作出結論还是需要比較大量的工作的。

从通过人腎細胞二代的 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>27</sub> HK<sub>2</sub> 疫苗的結果看来, 虽然尚不能說明病毒通过人胎腎細胞后其致病性和免疫性有明显改变, 但从图 1 中抗体分布及平均数来看略高于未經過人胎腎細胞的 M<sub>60-5</sub> HAM<sub>26</sub>。这些結果至少表明已經获得一定程度減毒的病毒通过少数几代人胎腎細胞并不会增加其致病性或降低其免疫性。由于麻疹病毒在人胎腎細胞內的繁殖滴度一般可达 10<sup>4-5</sup> TCID<sub>50</sub>/毫升, 这比人羊膜細胞制备的疫苗滴度为高。又因单纯通过人羊膜細胞传代会使病毒免疫性降低, 应该探求一些能減毒而又使之保持良好免疫性能的变异途径。对減毒株在人胎腎細胞繼續传代或与人羊膜細胞交替传代能否达到上述要求是可以进一步探討的。

## 小 結

(一) 不同代数的麻疹人羊膜疫苗在小量易感儿接种后, 观察到麻疹病毒 L<sub>4</sub> 与 M<sub>60-5</sub> 株通过原代人羊膜細胞連續传代后致病性逐漸降低。

(二) 病毒致病性降低的同时, 其免疫后抗体水平也有明显的下降。

(三) M<sub>60-5</sub> 株人羊膜 27 代病毒材料通过人胎腎細胞 2 代后毒力未見增高, 免疫后抗体水平也保持良好。

## 参 考 文 献

- [1] 黃禎祥、諸福棠、賈秉义、郭可馨、王慧瑛、吳宗麟、吳学鑫: 中华医学杂志, 47(6):341, 1961。
- [2] 黃禎祥、郭可馨、吳浴沂: 中华医学杂志, 47(6):352, 1961。
- [3] 曾毅、邓裕美: 中华医学杂志, 47(6):355, 1961。
- [4] Enders, J. F., Katz, S. L., & Medearis, D. N., Jr.: in "Perspective in Virology" Ed. by Pollard, M. 1: 103—120, 1959.
- [5] Goffe, A. P., Laurence, G. D.: *Brit. Med. J.*, 5626:1244, 1961.
- [6] Collard, P., Hendrickse, R. G., Montefiore, D., Sherman, P., Van der Wall, H. M., Morley, M. A., Goffe, A. P., Laurence, G. D., Pollock, T. M.: *Brit. Med. J.*, 5626:1246, 1961.
- [7] Aldous, I. R., Kirman, B. H., Butler, N., Goffe, A. P., Laurence, G. D., Pollock, T. M.: *Brit. Med. J.*, 5626:1250, 1961.
- [8] Schwarz, A. F.: *Am. J. Dis. Child.*, 103(3):386, 1961.
- [9] 余鼎新、余霞、张菁、陈宗舜、顧祖万、唐姚珍: 中华医学杂志, 48(4):293, 1962。
- [10] 徐肇璵、宋秀瑛、戚金陵、林传家、諸福棠: 中华儿科杂志, 12(1):12, 1963。

## STUDIES ON ATTENUATED MEASLES VACCINE

### III. PATHOGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF MEASLES VIRUS ATTENUATED IN HUMAN AMNION CELLS AT DIFFERENT PASSAGE LEVELS

HUANG, C. H., KUO, K. C. AND CHIA, P. Y.\*

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

Many authors have shown that measles virus passaged in certain tissue culture systems decreased in its pathogenicity when inoculated into susceptible children. But it is still uncertain whether or not by increasing the passages, the progressive decrease in virus pathogenicity is accompanied by similar reduction in immunogenicity. In this article, the pathogenicity and immunogenicity of 2 strains of measles virus passaged in human amnion cells (HAM) in the same laboratory at different levels were compared.

Vaccines of measles virus of L<sub>4</sub> strain in the 37th, 56th and 67th passage in HAM and of M<sub>50-5</sub> strain in the 5th and 26th passage of the same tissue culture system were prepared and tested in susceptible children. The mean highest temperatures following the use of L<sub>4</sub> strain at the 37th, 56th and 67th passaged vaccines were 39.2, 38.8 and 38.3°C respectively; and following that of M<sub>50-5</sub> strain at the 5th and 26th passaged vaccines were 39.5 and 38.7°C respectively. This results show that the pathogenicity was reduced as the number of passage in HAM was increased. The antibody titer of the vaccines prepared at different passage levels after vaccination manifested a corresponding decline. The mean antibody titers in L<sub>4</sub> vaccines at the 37th, 56th and 67th passage were 1:60, 1:22.4 and 1:10 respectively; and 1:100 and 1:13 in M<sub>50-5</sub> vaccines at the 5th and 26th passage respectively. It is noteworthy that although measles virus may be attenuated progressively in pathogenicity by increasing passages in HAM, the decrease in immunogenicity also follows. It remains to be seen whether or not a non-pathogenic strain and yet retaining sufficient immunogenicity could be obtained for mass immunization by repeated passages.

In addition, it is also interesting to note that 2 additional passages of M<sub>50-5</sub> of HAM<sub>27</sub> in human kidney cell cultures, an environment which has been considered not to modify viral virulence, gave neither increase in viral virulence nor decrease in antibody titer after immunization. This suggests that virus after attenuation to appropriate level might be maintained at this level by more passages in human kidney cells. Further studies to prove this point are, however, necessary.

\* Hopei Academy of Medical Sciences.