

脊髓灰质炎减毒活疫苗 III 型新毒种的研究

I. III 型新毒株中 III<sub>2</sub> 的选育

昆明医学生物研究所 III 型毒种协作组

我们在“独立自主、自力更生”的方针指引下,取材我国儿童中分离出的 III 型野毒株,采用快速传代方法减毒,在不同温度下 (30℃、32℃、34℃、36℃) 通过猴肾细胞传代 26 次,毒力有明显减低,又经 3 次蚀斑纯化,选育出 3 株减毒变异株,其中以 III<sub>2</sub> 株经各项检定证明符合毒种要求,特别是猴子的嗜神经毒力程度很低,为我国脊髓灰质炎 III 型活疫苗的生产提供了新的毒株。

应用减毒活疫苗预防脊髓灰质炎是控制和消灭本病流行的重要手段。我国大规模地服用这种活疫苗以来,已经取得了显著的成效。生产活疫苗所用毒株的生物学性质对于疫苗的质量有重大影响。在国际上,用于脊髓灰质炎减毒活疫苗生产的毒株有 3 系,以 Sabin 氏这一系疫苗应用最为广泛。我国生产脊髓灰质炎减毒活疫苗,原来也是使用 Sabin 株,其中 III 型毒株 Leon<sub>12 a<sub>1</sub>, b</sub> 因为毒力偏高等原因,自 1964 年以后即停止使用。伟大的无产阶级文化大革命,给了我们深刻的教育,批判了思想上的“洋奴哲学”、“爬行主义”等修正主义路线,破除迷信,解放思想,遵照伟大领袖毛主席关于“自力更生”的教导,通过四年的反复试验、实践,群策群力,终于选育出我国自己的 III 型活疫苗新毒种中 III<sub>2</sub> 株,并已投入生产和使用。

本文报告中 III<sub>2</sub> 株的选育经过。

III 型新毒株的选育

(一) 原始毒株

选用了从我国儿童的大便中分离出来的 4 株 III 型脊髓灰质炎野毒株作毒种选

育实验。这些儿童在分离毒株时 (1961 年或 1963 年) 均未服用过 Sabin III 型疫苗。原始毒株的编号及具体来源列于表 1。这些原始毒株经实验室检定属于中等强度神经毒力的 III 型野毒株。

表 1 III 型脊髓灰质炎活疫苗毒种  
研究所用原始株来源

原始株编号	分地 离点	分 离 间	儿 童 状 况
265	南 宁	1963 年	脊髓灰质炎接触者王 ××, 男, 1 岁 4 个月, 未服过疫苗。
131	昆 明	1961 年	第三幼儿园健康儿童骆 ×, 女, 4 岁, 未服过疫苗。
301	昆 明	1961 年	市委幼儿园健康儿童和 ×, 男, 2 岁, 未服过疫苗。
319	昆 明	1961 年	市委幼儿园健康儿童熊 ××, 女, 3 岁 9 个月, 未服过疫苗。

(二) 减毒方法及经过

主要采用低温快速传代的方法。应用原代猴肾细胞培养管, 每管种入 10<sup>6</sup> TCD<sub>50</sub> 剂量的亲代病毒液, 每株每次传代用 10 支细胞管, 在指定温度下培养, 病变达 ++++ 时收获病毒液, 冻融 1 次再继续传代。整个过程是在 30℃、32℃、34℃、36℃ 不同

温度下循环交替传代,在适当代数时,用体外特征(即温度特征和蚀斑抑制特征)检查毒力变动情况。先后共传 26 代,最后进行纯化筛选。其过程简图如下:

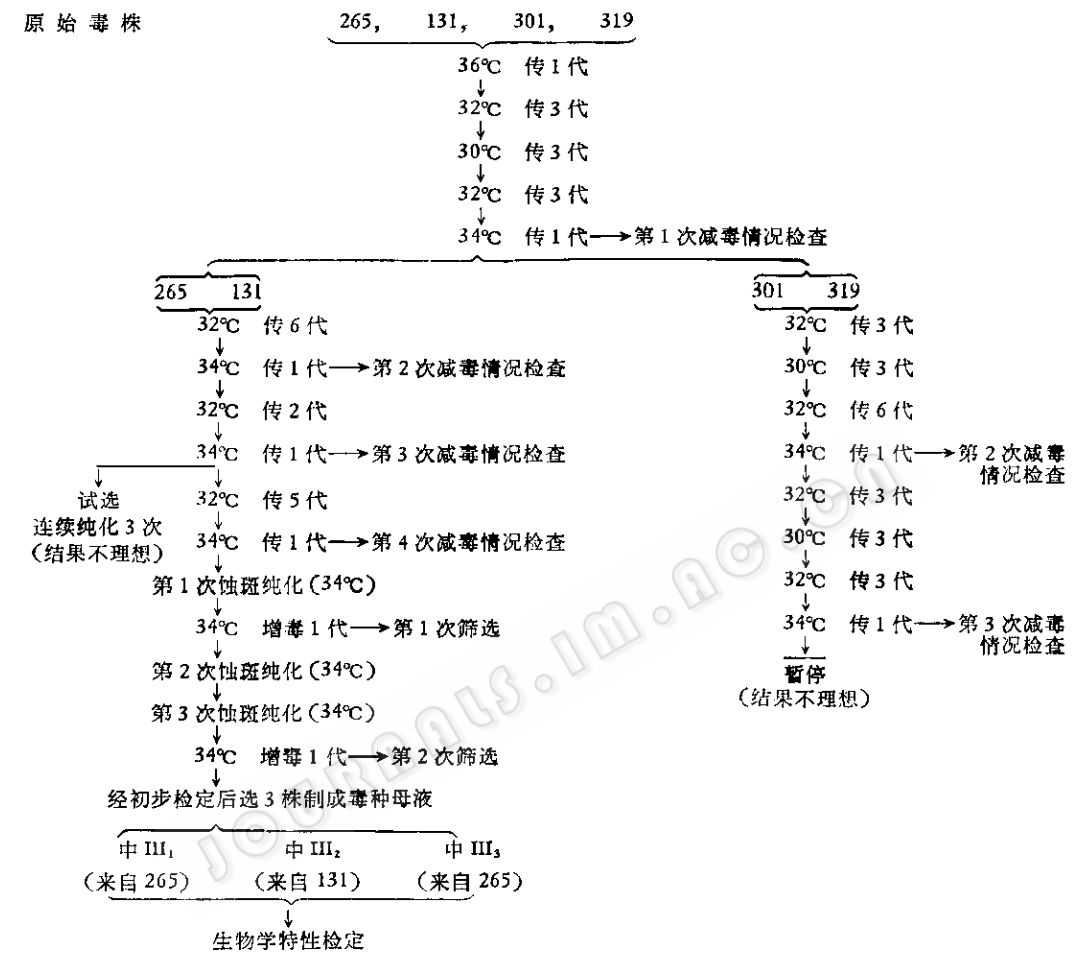


图 1 中 III<sub>2</sub> 株减毒及选育经过

**(三) 传代过程中各毒株的毒力变动**

为了了解各毒株在低温快速传代过程中的毒力变动情况,恰当掌握减毒程度,以便适时选育符合要求的毒种,采用了两种体外特征的方法来检查毒力变动情况。

1. 温度特征 (又称 T 或 *ret* 特征),是按常规病毒滴定的方法将被检病毒液作适当稀释,分别接种在猴肾细胞中,在常温 (37°C ± 0.5°C) 和高温 (40°C ± 0.5°C) 两种培养条件下观察病毒的繁殖能力,一般地说两种温度下病毒滴度的对数差越大越

好。

2. 蚀斑抑制特征 (又称 d 特征),是在不同碳酸氢钠浓度的琼脂覆盖层下作病毒的蚀斑滴定,一般地说在低 NaHCO<sub>3</sub> 浓度 (0.055 毫克 %) 时,弱毒株的病毒繁殖明显受到抑制。

目前测定脊髓灰质炎病毒毒力最常用的是体外试验方法,和猴体神经毒力试验的结果比较接近。为了节省猴子,故用来作初步观察毒力变动的指标。

3. 结果: 4 个原始毒株传代过程这两

项特征测定的结果及判定标准列于表 2 和表 3。所得结果表明,原始 131 号株和 265 号株经过减毒处理,随着传代次数增加,毒

力有明显降低,即温度特征从原来的  $t^+$  变成了  $t^-$  或接近  $t^-$  的性质,蚀斑抑制特征从原来的  $d^+$  变成了  $d^-$  性质;而 301 号和 319

表 2 减毒过程中温度特征检查结果

原始株代号	传代次数	37℃ 滴度 (logTCD <sub>50</sub> /毫升)	40℃ 滴度 (logTCD <sub>50</sub> /毫升)	滴度对数差	性质判定*
131	0	8.17	7.50	0.67	$t^+$
	10	8.38	>6.50	<1.88	$t^+$
	17	7.83	3.82	4.01	$t^\pm$
	20	7.50	3.50	4.00	$t^\pm$
	26	8.38	2.63	5.75	$t^-$
265	0	7.50	6.83	0.67	$t^+$
	10	7.38	4.32	3.06	$t^\pm$
	17	6.83	3.16	3.67	$t^\pm$
	20	7.38	2.68	4.70	$t^\pm$
301	0	8.00	7.83	0.17	$t^+$
	10	8.50	>6.50	<2.00	$t^+$
	23	6.50	5.38	1.12	$t^+$
319	0	8.50	7.38	1.12	$t^+$
	10	7.63	>6.50	<1.33	$t^+$
	23	6.63	5.50	1.33	$t^+$
Saukett 株	强毒对照	7.50	6.63	0.87	$t^+$
USOL-Dbac 株	弱毒对照	7.32	1.50	5.82	$t^-$

\* 性质判定标准: 滴度对数差小于 2 为  $t^+$  (表示强毒); 2—4.9 为  $t^\pm$  (表示中度毒力); 5 以上为  $t^-$  (表示弱毒)。

表 3 减毒过程中蚀斑抑制特征检查结果

原毒株代号	传代次数	高 NaHCO <sub>3</sub> 蚀斑滴度 (log <sub>10</sub> PFU/毫升)	低 NaHCO <sub>3</sub> 蚀斑滴度 (log <sub>10</sub> PFU/毫升)	滴度对数差	性质判定*
131	0	7.70	6.13	1.57	$d^\pm$
	10	7.29	<4.50	>2.79	$d^-$
	26	7.68	4.89	2.79	$d^-$
265	0	7.46	5.92	1.54	$d^\pm$
	10	5.81	<4.50	>1.31	$d^\pm \rightarrow d^-$
	26	7.07	4.60	2.37	$d^-$
301	0	8.00	6.96	1.04	$d^\pm$
	10	7.38	6.70	0.68	$d^+$
	23	6.39	4.68	1.71	$d^\pm$
319	0	7.80	6.00	1.80	$d^\pm$
	10	7.34	6.04	1.30	$d^\pm$
	23	6.50	5.17	1.33	$d^\pm$
Saukett 株	强毒对照	6.95	5.70	1.25	$d^\pm$
Leon 12a, b 株	Sabin 株对照	7.39	5.98	1.41	$d^\pm$

\* 所用判定标准: 滴度对数差小于 1 为  $d^+$  (表示强毒); 1—1.9 为  $d^\pm$  (表示中度毒力); 2 以上为  $d^-$  (表示弱毒)。

号株,经23次减毒传代后,其毒力性质虽有变化,但不理想,因此中断研究工作。

(四) 纯化选斑

通过较低温度下的传代,病毒毒力有所降低。为获其毒株纯系,保证毒株性质稳定,并筛选比较理想的弱毒株,应用蚀斑纯化的方法,挑选单个斑株重新繁殖出纯系的子代病毒,再检查其性质,加以选择。在第20次传代时,我们曾进行过试选,所得纯系的性质尚不够理想,于是就放弃未用。在第26次传代时,又分别将131号株和265号株各选3—5个斑,结果发现131号株的a斑和b斑及265号株的a、b、c、d 4个斑的温度特征性质较好,接近或完全达到弱毒要求。于是进行了第2次和第3次纯化选斑工作。在第3次纯化所得9个斑中,有3个斑(来自131的aca斑和来自265的cef和ceg斑)经3次重复试验,体外特征性质比较理想(表4)。因此将这3个斑作为继续研究的主要材料。

表 4 第三次纯化斑的体外特征及选育意见

亲代毒株	第3次纯化斑代号	温度特征		蚀斑抑制特征	选育意见
		实验次数	对数差>5(t <sup>-</sup> )次数		
131 RP <sub>26</sub>	aca	3	3	d <sup>-</sup>	弱毒,选用
	bec	3	2	d <sup>±</sup>	不理想,放弃
	bde	3	2	d <sup>±</sup>	不理想,放弃
	bdf	3	1	d <sup>-</sup>	不理想,放弃
265 RP <sub>26</sub>	acc	3	3	d <sup>±</sup>	稍差,待用
	add	3	1	d <sup>+</sup>	不理想,放弃
	ade	3	1	d <sup>+</sup>	不理想,放弃
	cef	3	3	d <sup>-</sup>	弱毒,选用
	ceg	3	3	d <sup>-</sup>	弱毒,选用

新毒株的生物学特性

根据减毒和纯化筛选的结果,将所得的3个减毒变异株按照生产条件制备出一批病毒液,并将这3个变异株暂命名为中III<sub>1</sub>株(选种时名为265 RP<sub>26</sub>ceg)、中III<sub>2</sub>

株(131 RP<sub>26</sub>aca)、中III<sub>3</sub>株(265 RP<sub>26</sub>cef)。对这3株病毒作了进一步生物学性质检查,以便最终选择出符合要求的毒株。

(一) 病毒效价滴定

在-20℃的保存条件下,先后一年半的时间里作了数次滴定,采用在原代猴肾细胞培养上观察病变和蚀斑两种方法,其结果为:中III<sub>1</sub>株滴度,病变法为7.38—7.68 log TCD<sub>50</sub>/毫升,蚀斑法为7.19 log PFU/毫升;中III<sub>2</sub>株,病变法为7.32—7.50,蚀斑法7.56;中III<sub>3</sub>株,病变法为7.17—7.32,蚀斑法7.23。从这个结果来比较,中III<sub>2</sub>株的滴度比较稳定并偏高些。

(二) 温度特征测定

选择37℃和39.5℃两种温度条件下进行测定,用捷克选育的III型疫苗株USOL-Dbac<sup>[1]</sup>和标准强毒株Saukett作对照,结果列于表5。一般以两种温度下滴度对数差大于5时判定为弱毒株,所选的三株对数差分别为6.38、5.50、5.67,均达到弱毒要求,USOL-Dbac株的毒力也比较低,唯在37℃的繁殖能力差些。

表 5 新选毒株的温度特征检查结果

样 品	37℃滴度 (log TCD <sub>50</sub> /毫升)	39.5℃滴度 (log TCD <sub>50</sub> /毫升)	对数差	结论
中 III <sub>1</sub>	7.38	1.00	6.38	弱毒
中 III <sub>2</sub>	7.50	2.00	5.50	弱毒
中 III <sub>3</sub>	7.17	1.50	5.67	弱毒
USOL-Dbac 对照	6.50	0.63	5.87	弱毒
Saukett 对照	7.17	6.83	0.34	强毒

(三) 低碳酸氢钠低渗压蚀斑抑制特征(od特征)测定

根据我们实验室的经验,单纯应用低碳酸氢钠的蚀斑抑制试验(d特征),所得结果有时不稳定,为便于更好地比较,我们参考了Balayan氏的方法<sup>[2]</sup>,应用了od特征,并以Sabin氏III型疫苗株(Leon 12 a<sub>1</sub> b)和捷克疫苗株(USOL-Dbac)及强毒

株 (Saukett) 作对照, 结果列于表 6。按照两种琼脂覆盖物下蚀斑滴度对数差大于 2 时为弱毒株的标准, 我们选育的 3 个变异株均符合弱毒株要求, 而 Leon 12a<sub>1</sub>b 株则不理想, USOL-Dbac 的滴度太低未测出具体结果。

表 6 新选毒株的 od 特征测定

样 品	普通条	酸性低	渗	对数差	结 论**
	件下蚀	压* 条件	斑滴度		
中 III <sub>1</sub>	6.87	<4.00		>2.87	弱毒
中 III <sub>2</sub>	7.69	<4.00		>3.69	弱毒
中 III <sub>3</sub>	6.60	<4.00		>2.60	弱毒
Leon 12a <sub>1</sub> b 株	7.50	>7.00		<0.50	阳性
Saukett 株	6.97	6.30		0.67	阳性
USOL-Dbac 株	<5.00	<4.00		—	滴度低未测出结果

\* 滴定均以 logPFU/毫升表示。

\*\* 判定标准同表 3。其中“阳性”即为强毒。Leon 12a<sub>1</sub>b 原为弱毒株, 但因其毒力偏高, od 特征达不到弱毒要求。

(四) 猴体神经毒力检查

为了了解脊髓灰质炎病毒疫苗株的毒力, 判定在人群免疫中的安全性, 在实验室的检查中以猴体残余致麻痹力试验最为敏感。为此, 我们选用了 73 支 3 公斤体重以下的恒河猴, 分别以脑内和脊髓内接种的方法, 进行猴体神经毒力检查。实验所得

表 7 新选毒株猴子脊髓内接种后的神经毒力检查

样品	接 种 剂 量	接 种 猴 数	临 床 观 察	病理组织学检查*			
				极轻度	轻度	中度	重度
中 III <sub>1</sub>	7.38	2	0/2	1	—	—	—
	6.38	2	0/2	1	—	—	—
	5.38	2	0/2	—	—	—	—
中 III <sub>2</sub>	7.50	2	0/2	2	—	—	—
	6.50	2	0/2	1	—	—	—
	5.50	2	0/2	—	—	—	—
中 III <sub>3</sub>	7.17	2	0/2	—	1	—	—
	6.17	2	0/2	—	—	—	—
	5.17	2	0/2	—	—	—	—

\* 病理组织学检查的病变分度是按我国脊髓灰质炎活疫苗检定规程标准划分。

结果(表 7、8)证明所选的新毒株减毒程度很高, 无论脑内或脊髓内接种均无临床致麻痹能力。脑内接种者, 在脑干和脊髓均无病理组织学特异性损伤; 脊髓内接种者, 仅在腰段出现轻度或极轻度脊髓灰质炎病理改变, 没有明显扩展现象。这反映着新选毒株对猴体的嗜神经毒力程度是非常低的, 和我们实验室掌握的材料相比, 中 III<sub>2</sub> 等新毒株比 Sabin 株 (Leon 12a<sub>1</sub>b) 的猴体神经毒力低, 和捷克的 USOL-Dbac 株相似。

表 8 新选毒株猴体脑内接种后神经毒力检查

样 品	接 种 剂 量	接 种 猴 数	临 床 观 察	病理组织学检查*			
				极轻度	轻度	中度	重度
中 III <sub>1</sub>	7.68	15	1/15**	—	—	—	—
	6.68	10	0/10	—	—	—	—
中 III <sub>2</sub>	7.32	15	2/15**	—	—	—	—
	6.32	10	0/10	—	—	—	—
中 III <sub>3</sub>	7.17	5	0/5	—	—	—	—

\* 同表 7。

\*\* 中 III<sub>1</sub> 株接种后因注射损伤有一只猴在注射后 24 小时内死亡。中 III<sub>2</sub> 株有一只猴与中 III<sub>1</sub> 情况一样; 另一只猴为注射后因患痢疾死亡。这 3 只猴均未见病理组织学特异损伤。

(五) 免疫原性的动物检查

新选出的毒株, 在进行人体服用观察之前, 在小动物身上先做了一次免疫反应的初步观察。将中 III<sub>2</sub>、中 III<sub>1</sub> 株和对照毒株进行家兔静脉注射, 每一毒株用 2 只家兔, 静脉注射 5 次, 每次 2 毫升, 第 28 天测血进行比较观察。中 III<sub>2</sub> 株及中 III<sub>1</sub> 株的中和抗体效价为 1024, 而 Sabin 株和捷克株为 256—1024。虽然动物试验和人体的免疫学效果并不完全平行, 但就这同一动物试验方法的结果比较, 中 III<sub>2</sub> 株和中 III<sub>1</sub> 株的免疫原性似不低于 Sabin 株和捷克株。

(六) 毒株潜在因子检查

为了证明新选毒株在传代减毒选育等

一系列过程中有无潜在病毒和细菌的混入,我们对中 III<sub>2</sub> 和中 III<sub>1</sub> 株进行了一般细菌和霉菌、结核菌检查和各种动物试验的病毒因子(包括一般猴病毒、B 病毒、Coxsackie 病毒、淋巴脉络丛脑膜炎病毒等)的检查,以及脊髓灰质炎病毒的型特异性检定。所有这些试验均表明所选的这二个新毒株无此类细菌和病毒污染。

## 讨 论

国外许多实验室提供的资料表明, Sabin III 型疫苗株 (Leon 12 a<sub>1</sub> b) 在免疫原性、各种特征、稳定性以及神经毒力等方面都比 I、II 型疫苗株差<sup>[3]</sup>。我们自己的生产实践和试验观察也有类似的想法,特别是神经毒力方面, Sabin III 型疫苗株常常超出了我国的检定标准,为了安全考虑,我们在疫苗生产中就不再使用这一毒株了。

为了解决 III 型疫苗株问题,国外的许多实验室进行了对原 III 型疫苗株的改良试验和新毒株的选育研究工作。1960 年 Sabin<sup>[4]</sup>曾应用 23—25℃ 条件下快速传代选新的毒株,但未将此工作进行下去。1964 年, Barnes 等<sup>[5]</sup>也采用和 Sabin 1960 年所用的同一自然弱毒野毒株作进一步减毒研究,选育出一株 III 型疫苗株 (Glenn),可在人肠道繁殖,有较好的抗体反应,初步证明其遗传稳定性比 Leon 12 a<sub>1</sub> b 株好,现在少数地区试用。同年, Stone 等应用提取感染性 RNA 的方法,将 Leon 12 a<sub>1</sub> b 株加以处理,获得一新的毒株,但经 Perkin 等的观察,遗传稳定性仍不理想,未予采用<sup>[6]</sup>。此外,日本的 Takahashi 等也应用猴肾和鸡胚细胞培养物交替传代的方法,从 III 型强毒株 (Saukett) 中选育出一株弱毒株 (Mc),仅做了一般实验室的特征检定,未做进一步研究<sup>[7]</sup>。1964 年以后,捷克的 Vonka 等<sup>[8]</sup>

采用了 33℃ 和 35℃ 交替传代的方法,成功地选育出一株 III 型疫苗株 (USOL-Dbac),现已被许多国家引用进行试验<sup>[9]</sup>。我们曾引入了这一毒株,进行过数年的观察,发现 USOL-Dbac 株的神经毒力比 Leon 12 a<sub>1</sub> b 株低,但毒株的繁殖滴度和热稳定性较差。

我们根据自己的生产实践,遵照伟大领袖毛主席关于“独立自主、自力更生”的教导,从我国儿童的大便中分离脊髓灰质炎野毒株,应用低温快速传代和蚀斑筛选的方法选育减毒疫苗株。获得了 3 个减毒株 (中 III<sub>1</sub>、中 III<sub>2</sub> 和中 III<sub>3</sub> 株),应用体外特征和猴体神经毒力检查,表明嗜神经毒力程度非常低,其他生物学性质也符合疫苗株要求。曾用中 III<sub>2</sub> 和中 III<sub>1</sub> 株做过少量人群服用观察,发现中 III<sub>2</sub> 株的免疫原性较好。从疫苗生产和人群免疫考虑,以后又对中 III<sub>2</sub> 株作了进一步研究。

## 参 考 资 料

- [1] Vonka, V. et al.: *Progr. Med. Virol.*, **9**: 204—255, 1967.
- [2] Balayan, M. S. et al.: *Virology*, **23**: 125—140, 1964.
- [3] Melnick, J. L.: *International Conference on the Application of Vaccines Against Viral, Rickettsial, and Bacterial Diseases of Man*. Washington, D. C. 14—18, Dec, 1970. (Pan American Health Organization. Scient. Publ. No. 226, 1971) p. 171—181, 1971.
- [4] Sabin, A. B.: *Perspective in Virology II*, p. 90—110, (Burgess Publ. Co. Minneapolis) 1960.
- [5] Barnes, Y. M. et al.: *Europ. Assoc. Poliomyelitis and Allied Diseases, IXth Symp.* Stockholm 1963, p. 283—289, (E. A. P., Brussels) 1964.
- [6] *Bull WHO*, **40**: 925—945, 1969.
- [7] Takahashi, M. et al.: *Biken J.*, **6**: 219—222, 1963.
- [8] Vonka, V. et al.: *Arch. ges. Virusforsch.*, **14**: 599—610, 1964.
- [9] *Bull WHO*, **40**: 295—300, 1969.

## STUDIES ON NEW ATTENUATED STRAINS OF TYPE III LIVE POLIOMYELITIS VACCINE

### I. THE DEVELOPMENT OF A NEW TYPE III ATTENUATED POLIOVIRUS

COOPERATIVE RESEARCH GROUP OF POLIO TYPE III VACCINE

KUNMING INSTITUTE OF MEDICAL BIOLOGY

(Kunming)

It is well known and confirmed by data of our own studies that the neurovirulence of the type III polio virus of Sabin's vaccine (Leon 12a, b) is higher than that allowed by the monkey safety test, and is thus not so satisfactory for the immunization of human beings. For this reason, numerous attempts have been made in the past to develop a new type III attenuated virus. Guided by the principles of "*independent and with the initiative in our own hands*", and by "*relying on our own efforts*", a series of experiments aiming to obtain a new type III vaccine virus superior to that of Leon12a,b virus in attenuation of neurovirulence has been carried out. We have chosen 4 wild strains of type III poliovirus isolated from stool specimens of healthy children in 1961 and 1963 before the mass vaccination campaign with Sabin's vaccine in Kunming and Nanning in South China. After 26 rapid passages

in monkey kidney cell cultures at four different temperatures (30°C, 32°C, 34°C, and 36°C), 2 strains, Nos, 131 and 265 showed significant difference in ret/39.5°C and d marker from the original wild virus as well as from those of the last passage. These two viruses were purified successively 3 times by means of plaque cloning, and 3 attenuated variants (中 III<sub>1</sub>, 中 III<sub>2</sub>, and 中 III<sub>3</sub>) were further characterized by means of genetic markers in vitro and monkey neurovirulence test *in vivo*. All the 3 attenuated variants selected showed very low degree of neurotropism even after intraspinal inoculation in monkeys. one of these, 中 III<sub>2</sub> strain, did not give significant lesions in the central nervous system on histological examination when the virus was given intracerebrally to 25 monkeys. It was thus concluded that this strain is more attenuated for monkey than the Leon12a,b vaccine virus.