

脊髓灰质炎减毒活疫苗 III 型新毒种的研究

II. 中 III₂ 株的现场服用观察

昆明医学生物研究所 III 型毒种协作组*

本文报告了中 III₂ 株四次现场服用的观察结果: 1. 共观察服苗儿童 245,262 人, 未见严重不良反应。2. 在三次现场观察中, 共选 287 名儿童进行了血清学检查, 中和抗体阳转率为 72.3—100.0%, 四倍增长率为 67.3—76.8%。3. 268 名服苗儿童的病毒学检查, 排毒率为 81.3%。4. 和 USOL-Dbac 株并行进行了遗传稳定性观察, 猴体神经毒力都有些回升, 两株结果非常接近。

在毛主席无产阶级革命路线指引下, 我们选育了一株脊髓灰质炎 III 型减毒株 (中 III₂), 经过实验室的生物学性质检查, 证明符合疫苗株要求^[1]。为了观察中 III₂ 株疫苗的安全性、免疫原性和遗传稳定性, 我们曾数次进行了人群服用的现场观察。本文简要报告这方面观察的结果。

材 料 和 方 法

疫苗与免疫 为了正确认识中 III₂ 株的安全性与免疫原性, 先后进行了四次人群服用观察。前二次服用的是中 III₂ 原毒种, 每个儿童服用 $10^{3.0}$ TCD₅₀ 病毒剂量, 后二次观察是服用中 III₂ 毒种制备的疫苗 (69-13 批) 糖丸, 每个儿童服用 1 颗, 约含 $10^{3.0}$ TCD₅₀ 病毒剂量。服苗儿童的年龄为 6 个月至 7 岁。

样品采集与处理 血液样品用指端法^[2]采集, 服苗儿童在服苗前和服苗后各采 0.3 毫升, 加入含有抗凝剂的生理盐水溶液中, 1:5 稀释放 4℃ 冰箱过夜, 然后吸取上清液存于 -20℃, 试验前经 56℃ 30 分钟灭活。粪便样品于服苗前采一次, 服苗后每周采一次, 连续四周, 部分儿童采集到八周。采集到的大便样品及时送到实验室, 按常规方法制成 20% 悬液, 保存于 -20℃。

血清中和抗体 将血清样品作连续四倍稀释, 分别加入等量同株病毒 (10^4 TCD₅₀/0.1 毫升), 于 37℃ 中和 1 小时, 接种原代猴肾细胞培

养, 用病变法于第 7 天判定结果。每次试验时, 服前和服后血样品同时进行。

病毒分离与检定 均在原代猴肾单层细胞培养管中进行。粪便样品一般经过两次传代后判定结果, 所得阳性样品应用脊髓灰质炎三个型的特异血清进行检定。服苗儿童的粪便样品, 凡检出 III 型脊髓灰质炎病毒者, 即算作排毒。

猴体神经毒力试验 为了研究中 III₂ 株在人肠道繁殖后的遗传稳定性, 应用了猴体神经毒力试验。从粪便中分离的含 III 型脊髓灰质炎病毒样品, 经脑内直接注入恒河猴的两侧丘脑。每一样品接种 2 只猴, 临床观察 28 天, 然后杀死猴子, 取中枢神经系统作病理组织学检查。

结 果

(一) 服用后的安全性观察

为了确保安全, 从事该项工作的同志及我所部分职工和家属共 17 人 (其中包括二名十岁左右儿童), 首先服用了加大 10 倍剂量的中 III₂ 株, 经过一个月的观察, 没有发现异常。其后, 于 1969 年 3 月至 7 月,

本文于 1976 年 1 月 28 日收到。

* 参加现场工作的还有: 河南省卫生防疫站, 郑州市、昆明市卫生防疫站, 新乡地区防疫站, 沁阳、孟县、温县、博爱、嵩明县防疫站, 以及有关工厂及农村的医护人员、保育人员等。

在昆明市三个工厂托儿所选了 100 多名儿童,在严格的医疗保护之下,进行了第一次儿童小量服用的安全性观察;1969 年 10 月、1970 年 5 月和 10 月,又分别在昆明市、云南省嵩明县、河南省郑州市及新乡地区进行了三次逐步扩大规模的人体服用的安全性观察。

在其中两次现场工作中,将流行病学

条件相似、年龄均为 6 个月至 7 岁的儿童分作两组,进行了服苗与不服苗的临床对照观察。按服苗组的时间,在服苗前与服苗后 15 天内,对两组儿童均逐个作了观察,观察结束后即让未服苗儿童全部补服。观察结果(表 1)表明临床反应中所见较多的是发热,但与对照组相比没有明显差别($P > 0.05$)。

表 1 中 III₂ 株服苗儿童与不服苗儿童临床对照观察*

分 组		观察儿童数	各 种 反 应 情 况							
			发 热		腹 泻		呕 吐		皮 疹	
			人数	%	人数	%	人数	%	人数	%
服苗组	昆明市	1,093	129	11.8	29	2.6	4	0.3	2	0.19
	郑州市	1,129	155	13.7	12	1.1	2	0.17	2	0.17
	小 计	2,222	284	12.8	41	1.8	6	0.27	4	0.18
对照组	昆明市	701	84	11.9	7	0.9	1	0.1	—	—
	郑州市	887	147	16.5	2	0.2	—	—	2	0.22
	小 计	1,588	231	14.5	9	0.5	1	0.06	2	0.12

* 1. 昆明市服用中 III₂ 株原株,郑州市服中 III₂ 株制备的疫苗。

2. 发热是以肛温 37.5℃ 以上者计算。

1970 年 9 至 11 月,在河南省郑州市中原区和新乡地区的沁阳、博爱、孟县、温县进行了大面积服用观察。观察了 6 个月至 7 岁的儿童共计 244,929 人,实际上服用中 III₂ 株疫苗的儿童为 235,160 人,占 96.01%。对 212,288 名服苗儿童获得了为期三天的近期临床观察结果。其中出现反应症状者有:发热者 1128 人(0.52%),腹泻 1018 人(0.45%),恶心呕吐 234 人(0.08%),皮疹 45 人(0.02%),其他如厌食,烦躁等共 196 人(0.09%)。这些症状一般不严重,发热一般为 37.5—39.0℃,腹泻每天 2—3 次持续 1—2 天,呕吐也仅 1—2 次,而且,在如此大量的观察中,很难说都是由疫苗引起的。

前后四次现场服用观察中,共观察服苗儿童数 245,262 人,未发现由于服用疫苗引起的脊髓灰质炎病例。因此,整个看起

来,服用中 III₂ 株疫苗的临床反应是很轻微的。

(二) 服苗后的血清学反应

在三次现场观察中共对 287 名服苗儿童采了血液样品进行血清学检查。第一次检查 100 名儿童,18 名儿童服苗前未查出脊髓灰质炎 III 型病毒的中和抗体,服苗后抗体全部阳转,阳转率 100%。中和抗体增长最高者为 1:320;另外 82 名儿童服前带有不同水平的抗体,服苗后抗体四倍增长者 59 名,增长率为 71.9%。第二次观察时,检查了 131 名儿童,抗体阳转率为 72.3%,服前带有同型抗体的儿童服苗后四倍增长率为 67.3%。第三次观察了 56 名儿童,抗体阳转率为 76.5%,四倍增长率为 76.8%。三次观察的结果汇于表 2 和表 3。总共 287 名服苗儿童中,抗体阳转率为

表2 服用中 III₂ 株疫苗后儿童的血清学反应*

观察次数	观察地区	观察儿童总数	服前测不出同型抗体儿童数	抗体阳转		服前具有不同水平抗体儿童数	抗体四倍增长		抗体平均滴度	
				阳转儿童数	%		抗体增长儿童数	%	服苗前	服苗后
1	昆明市区	100	18	18	100.0	82	59	71.9	14	150
2	嵩明县农村	131	76	55	72.3	55	37	67.3	4	29
3	郑州市区	56	17	13	76.5	39	30	76.8	13	68
计		287	111	86	77.5	176	126	71.6	8	70

* 前两次观察使用中 III₂ 原毒种,第3次观察使用中 III₂ 制备的疫苗(69-13批)。

表3 中 III₂ 株疫苗服用前后中和抗体变动情况

服苗前抗体水平	服苗后抗体水平						检查总份数	抗体阳转**	
	<5	5	20	80	320	≥1280		阳转及四倍以上增长份数	%
<5	25	42	33	9	2		111	86	77.5
5		6	8	8	15	8	45	39	86.7
20			14	22	14	12	62	48	77.4
80				17	18	15	50	33	66.0
320					9	6	15	5	33.3
1280						4*	4	1	25.0
计	25	48	55	56	58	45	287	212	73.8

* 有一份样品,服前为 1280,服后为 >5120,属于有四倍增长。

** 服前抗体 <1:5 的儿童,视为未测出抗体,服苗后如有 1:5 以上抗体者,称为阳转。

77.4%(72.3—100.0%),而服前带有同型抗体儿童的中和抗体,四倍增长率为 71.6%(67.3—76.8%)。从抗体水平的变动来看,服苗前中和抗体几何平均滴度为 8(4—14),服苗后为 70(29—150),抗体滴度的增长约为 5.2—10.7 倍。从中和抗体的变动情况看,服苗前具有低水平中和抗体(1:5—1:20)的儿童,服苗后抗体四倍增长率最高(77.4—86.7%);服苗前中和抗体为 1:80 水平者,仍有 66% 的儿童服苗后抗体有四倍以上的增长;即使服苗前已有 1:320—1:1280 这样相当高抗体滴度的儿童,服苗后也有 25—33.3% 的儿童增长了抗体。综合血清学检查的结果可以看出,中 III₂ 株具有一定的免疫原性,服用中 III₂ 株疫苗后可以使 77% 以上的敏感儿童和具有低水平脊髓灰质炎中和抗体水平的儿童引起血清学反应。

(三) 服苗儿童的病毒学检查

结合三次血清学研究观察,同时进行服苗儿童的病毒学检查。将服苗儿童的大便进行病毒分离和检定,在 268 名服苗不带 III 型脊髓灰质炎病毒的儿童中,有 218 名儿童服苗后排出了 III 型脊髓灰质炎病毒,排毒率为 81.3%。三次观察结果基本相似(表 4)。从排出病毒的量来检查,在第一次观察中选择了 25 份服苗后的排

表4 服用中 III₂ 株疫苗后肠道排毒情况

观察次数	观察地区	服苗儿童数	排毒人数*	排毒率(%)
1	昆明市工厂托儿所	95	78	82.1
2	嵩明县农村儿童	126	105	83.3
3	郑州市工厂托儿所	47	35	78.9
计		268	218	81.3

* 以排出 III 型脊髓灰质炎病毒者计算。

毒阳性大便悬液，在猴肾细胞培养管中作了病毒滴定。服苗后排出的最高病毒量为 $10^{6.39} \text{TCD}_{50}/\text{克}$ 粪便，各周次样品的平均排毒量示于图 1。前两周排毒量最高，然后渐渐下降。

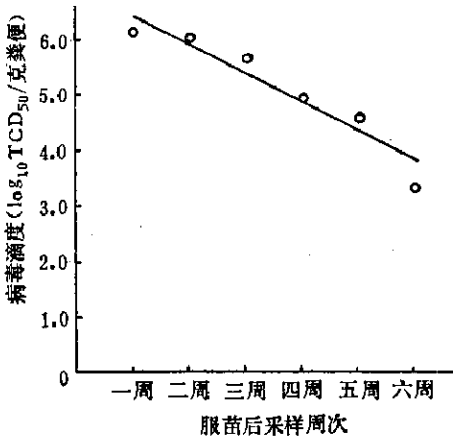


图 1 服用中 III₂ 疫苗后儿童肠道排毒量 (各周样品滴度平均计算)

在另一次观察中 (郑州市工厂托儿所)，我们将所观察的儿童分作二组，一组服用 III 型疫苗，为服苗组；另一组服空白糖丸，为接触组；再在接触组儿童家中的兄妹或近邻中选择儿童作为间接接触组。各组儿童在服苗组服苗前采集大便样品一次，服苗后 1、2、4、8 周再分别采集大便样品作病毒学检查 (样品采完后及时给接触组及间接接触组儿童补服疫苗)。各组儿童的排毒情况列于表 5。从这一表中可以看出，服苗组儿童的排毒率为 78.9%，接触组为 42.8%，间接接触组为 46.2%，这说明服用中 III₂ 株疫苗，病毒可在儿童肠道中较好地繁殖，而且有一定的扩散能力。再从各周次的排毒情况来看，到第 8 周时，服苗组的排毒率下降到 9.5%，接触组和间接接触组的排毒率也呈下降趋势，分别为 19.0% 和 11.9%。这表明该疫苗病毒在自

表 5 服用中 III₂ 株疫苗后肠道排毒及其自然扩散情况

分 组	检查人数	排毒人数	排 毒 率 (%)	服 苗 后 各 周 次 排 毒 情 况*			
				一 周	二 周	四 周	八 周
服 苗 组	47	35	78.9	23/39 (58.9)	21/43 (48.9)	11/38 (28.9)	2/21 (9.5)
接 触 组	49	21	42.8	14/42 (30.9)	12/42 (28.5)	12/39 (30.7)	4/21 (19.0)
间接接触组	45	21	46.2	15/45 (33.3)	15/44 (34.1)	6/42 (14.3)	5/42 (11.9)

* 斜线上数字为排出 III 型病毒数，斜线下为检查人数；括号内数字为排毒百分率。

然界的扩散能力又是有一定限度的。

(四) 遗传稳定性观察

主要是测定中 III₂ 毒株在人肠道传代后的遗传学稳定性。我们选了捷克疫苗株 (USOL-Dbac) 作平行的对照试验。

1969 年底，我们在云南省嵩明县进行了中 III₂ 株第二次现场服用观察，将两个相近生产队的 6 个月至 5 岁的儿童，分两组分别服用相同量的 ($10^{5.9} \text{TCD}_{50}$) 中 III₂ 株

疫苗和 USOL-Dbac 株疫苗，同时各选一些密切接触儿童不服疫苗，均按要求同时采集大便样品。经过分离定型，从两组服苗儿童排出的大便阳性样品各选 10 株；作为人肠道传代一次样品；从两组接触儿童排出大便阳性样品各选 5 株，作为人肠道传代二次样品。所选样品均经过原代猴肾细胞培养 3 代 (37°C 二代，34°C 一代)，型别检定证明为 III 型脊髓灰质炎病毒株后，用其原倍组织培养液 (含病毒量 $10^{6.17} - 10^{8.3}$

表 6 中 III₂ 株和 USOL-Dbac 株经人肠道繁殖后的猴脑内神经毒力检查

毒株名称	人肠道 传代次数	服苗后 取样时间	观 察 儿童数	样品株数	接种剂量 (log ₁₀ TCD ₅₀)	猴体麻痹率		组织学损伤率	
						株数比	猴数比	株数比	猴数比
中 III ₂	1	7—11天	5	5	7.38—7.68	2/5	1(1)/10*	3/5	4(1)/10**
		14—28天	5	5	6.83—7.83	3/5	1(2)/10	5/5	6(3)/10
	2	7—34天	5	5	6.17—7.83	2/5	2(0)/10	3/5	3(2)/10
	计		15	15		7/15	4(3)/30	11/15	13(6)/30
USOL-Dbac	1	5—9 天	5	5	7.63—8.38	0/5	0(0)/10	3/5	0(3)/10
		12—27天	4	5	7.63—8.38	2/5	2(0)/10	5/5	6(4)/10
	2	7—34天	5	5	7.50—8.17	4/5	2(2)/10	5/5	6(2)/10
	计		15	51		6/15	4(2)/30	13/15	12(9)/30

* 斜线上括号外数字为麻痹猴体数目,括号内数字为肌力减退猴数;斜线下为接种猴只数。

** 斜线上括号外数字为病理组织学检查重度脊髓灰质炎病变猴数,括号内数字为轻度、中度脊髓灰质炎病变猴数;斜线下为接种猴只数。

TCD₅₀) 直接注入恒河猴的两侧丘脑,进行猴体神经毒力试验。主要结果总结在表 6 中。从表 6 可以看出:

1. 服用中 III₂ 株和 USOL-Dbac 株疫苗,经过在人肠道内繁殖后,所排出的病毒株都可引起一定比例的猴子产生临床麻痹和病理组织学改变,表明它们的毒力有一定回升。

2. 两个疫苗株各用 30 只猴子进行试验,总的试验结果,不管是猴体的麻痹率,或病理组织改变比率都非常接近,两组没有明显差别。

3. 按疫苗在人体繁殖周期长短(1 周或 2—4 周)及传代次数(人肠道一代或二代)加以分析后,可以看出,USOL-Dbac 株在服苗后 1 周(5—9 天)分离的样品毒力回升不大,而第 2—4 周(12—27 天)的样品和经人肠道传代二次样品,在猴体麻痹率和病理改变方面都较明显地表现出毒力上升。而中 III₂ 株的毒力,则没有明显随人肠道繁殖时间延长和代数增多继续增长的趋势。这两个毒株的这种小差异,是否真实地反映了两毒株的差异抑或是实验误差,以及这种差异的意义如何,都有待今后

积累更多的实践资料才能说明。

讨 论

为了考核中 III₂ 株用于活疫苗生产的安全性,我们采取了从成人到儿童,从小量到大量,逐步扩大服用范围的方法进行观察。先后四次观察中,共观察 6 个月至 7 岁儿童 245,262 人,不管是重点的临床反应观察,还是大面积的使用观察,均证明中 III₂ 株的反应轻微,对人群是安全的。

关于中 III₂ 株的免疫原性,我们主要进行了人体服用疫苗后的血清学中和抗体测定和肠道中病毒繁殖状况的观察。三次现场观察所获得的结果基本相似。在嵩明县农村中所做的第二次观察略低,服苗儿童的肠道自然带毒率为 13.03—19.04%,主要为非脊髓灰质炎的其他肠道病毒。是否是由于这一因素的影响,值得进一步探讨。将中 III₂ 株的结果和国外的 III 型毒株(美国的 Leon12a₁ b 株^[3]与捷克的 USOL-Dbac 株^[4])在国内相似条件下进行服用观察的资料作一比较(表 7),可以看到三者的免疫原性是近似的。对于 Leon 12a₁ b 株,国内主要是早期(1961—1963 年)所做的

表 7 脊髓灰质炎活疫苗各毒株国内服用观察的资料比较*

疫苗株名	观察地点	观察时间	观察儿童数	年龄范围	血清中和抗体检查		排毒率 (%)
					阳转率 (%)	四倍增长率 (%)	
中 III ₂	昆明、郑州	1969—1971	287	6个月—5岁	72.3—100.0	70.2—76.0	78.9—83.3
Leon 12 a ₁ b	昆明、广州、上海	1961—1963	425	2个月—7岁	72.2—82.3	69.5—85.2	46.9—91.5
USOL-Dbac	昆明、长春	1965—1969	272	6个月—4岁半	78.3—85.7	58.0—76.5	66.1—85.3

* 此数据是由上海市防疫站、广州市防疫站、昆明医学生物研究所等单位在不同时期观察的资料。

观察, 四次观察的结果表明: 抗体阳转率分别为 72.2、75.0、76.5 和 82.3; 在国内, 进行过二次 USOL-Dbac 株现场服用观察, 抗体阳转率分别为 85.7 和 78.3; 而中 III₂ 株则分别为 100.0、72.3、76.5%。其他的指标也基本一致, 这表明我们自己所选育的中 III₂ 减毒疫苗株有一定的免疫原性, 不低于国外现用疫苗株的水平。

在遗传稳定性的研究方面, 因为缺乏国内对其他毒株的实验资料可供比较, 所以我们在现场观察时, 同时用 USOL-Dbac 株作对照进行了平行试验。我们的结果初步证明, 中 III₂ 株和 USOL-Dbac 株在人肠道繁殖后的遗传稳定性是一致的。国外应用 Leon12a₁ b 株和 USOL-Dbac 株所作的研究报告不少^[5-11], 除个别因试验设计所造成的差异外, 人肠道繁殖后的猴体麻痹率和病理组织损伤比率也大都在这一范围。不过我们认为这三个毒株在遗传稳定性上都不够理想, 因此, 在今后的工作中, 选

育出一株在这一生物学特性上显著地优于现有者的毒株, 乃是我们继续努力的方向。

参 考 资 料

- [1] 昆明医学生物研究所 III 型毒种研究协作组: 微生物学报, 16: 41—47, 1976.
- [2] 董德祥等: 中华卫生杂志, 9(4): 254—256, 1964.
- [3] Sabin, A. B.: *J. Amer. Med. Ass.*, 164: 1216—1223, 1957.
- [4] Vonka, V. et al.: *Arch. ges. Virusforsch.*, 14: 599—619, 1964.
- [5] Sabin, A. B.: *Brit. Med. J.*, 14: 663, 1959.
- [6] Sabin, A. B.: *Live Poliovirus Vaccines, The First International Conference on Live Poliovirus Vaccines*, p. 21—24, WHO, Washington, 1959.
- [7] Clarke, S. K. R. et al.: *Brit. Med. J.*, 2: 1188—1192, 1958.
- [8] Gendon, Y. Z. et al.: *Oral Live Poliovirus Vaccine*. p. 456—476, Moscow, 1961.
- [9] Elbert, L. B. et al.: *Acta Virol.*, 11: 89—99, 1967.
- [10] Vonka, V. et al.: *Arch. ges. Virusforsch.*, 15: 234—243, 1965.
- [11] Simon, J. et al.: *ibid.*, 15: 681—689, 1965.

STUDIES ON NEW ATTENUATED STRAINS OF TYPE III LIVE POLIOMYELITIS VACCINE

II. INVESTIGATION IN A SERIES OF FIELD TRIALS WITH "CHUNG" III. VIRUS

COOPERATIVE RESEARCH GROUP OF POLIO TYPE III VACCINE,
KUNMING INSTITUTE OF MEDICAL BIOLOGY
(Kunming)

The results of investigation in four field trials with "Chung" III. virus are reported in the present paper. 1. A total of 245, 262 children were fed the vaccine in programs by our organization. No serious complications were noted. 2. A total of 287 children from 6 months to 5 years of age were examined serologically in these trials. The neutralizing antibody conversion rates were approximately 72.3 to 100.0 per cent. 67.3 to 76.8% showed

an enhancement of antibody for four times or over. 3. 218 out of a total of 268 children excreted homotypic viruses (81.3%). 4. To investigate the genetic stability of the "chung" III. virus, we compared it with USOL-Dbac strain. The neurovirulence of both strains is more or less recovered in the monkey. There is no significant difference in genetic stability between the two viruses during their growth in human alimentary tract.