

# 国产厌氧棒状杆菌菌苗小型生产工艺

李少兰\* 朱孝堃\*\* 杨凤文\*\*\*

(北京肿瘤免疫治疗协作组,北京)

本文报道一种小型、简易、廉价的方法,用以制备厌氧棒状杆菌菌苗。实验证明本方法生产的菌苗质量(包括菌团大小、脾指数及抑瘤效果等)达到了较好的水平。对动物没有可见的毒性作用,对人无严重的副反应。可供实验研究和临床试用。

厌氧棒状杆菌(以下简称棒菌)是一组革兰氏阳性、有异染颗粒的小杆菌,常寄生于动物及人的骨髓中。国外用棒菌制成灭活菌苗<sup>[1,2]</sup>,配合常规疗法治疗恶性肿瘤,发现它对某些动物与人类的恶性肿瘤有一定的生长抑制作用。1975年国内从人的骨髓中分离到此类细菌<sup>[3]</sup>,并在实验室内试制成菌苗,供肿瘤实验研究及临床试用。本文报道国产棒菌菌苗的小型生产工艺。

## 材料和方法

### (一) 菌种

北京肿瘤免疫治疗协作组分离的及河南医学院赠送的76-27及H-84两株菌种,均为革兰氏阳性小杆菌,奈瑟氏染色菌体呈黄褐色,异染颗粒为蓝黑色。细菌排列为栅栏状或菊花瓣状,亦有作“V”形排列或散在存在者,在厌氧条件下培养方能生长。

### (二) 培养基

#### (1) 碎肉半流体培养基(克)

蛋白胨	10
氯化钠	5
琼脂粉	1—6
碎肉	适量
牛肉浸汁	1,000 毫升

调pH至8.0±0.1;最终pH为7.0—7.2。

#### (2) 硫乙醇酸钠培养基(克)

蛋白胨	15.0
L-胱氨酸	0.5
氯化钠	2.5
葡萄糖	5.0
硫乙醇酸钠	0.5
琼脂粉	0.8
肝浸液	5,000.0 毫升
蒸馏水	500.0 毫升

调pH至7.6—7.8,最终pH为7.0—7.2。

#### (3) 肝汤培养基(克)

蛋白胨	10.0
氯化钠	5.0
葡萄糖	5.0
肝浸液	500.0 毫升
蒸馏水	500.0 毫升

调pH至7.6—7.8,最终pH为7.0—7.2。

### (三) 菌苗制备工艺

取经检验合格的菌种(76-27、H-84),按图1所示程序进行接种培养,作为种子液。将此种子液接种于装有4,000毫升肝汤培养液、容积为

本文于1979年9月24日收到。

\* 北京制药厂;

\*\* 中国医学科学院肿瘤研究所;

\*\*\* 卫生部药品生物制品检定所。

先后参加本协作组的单位有: 中国医学科学院肿瘤研究所、首都医院、卫生部药品生物制品检定所、医科院中国医学科学院药物研究所及北京制药厂等。

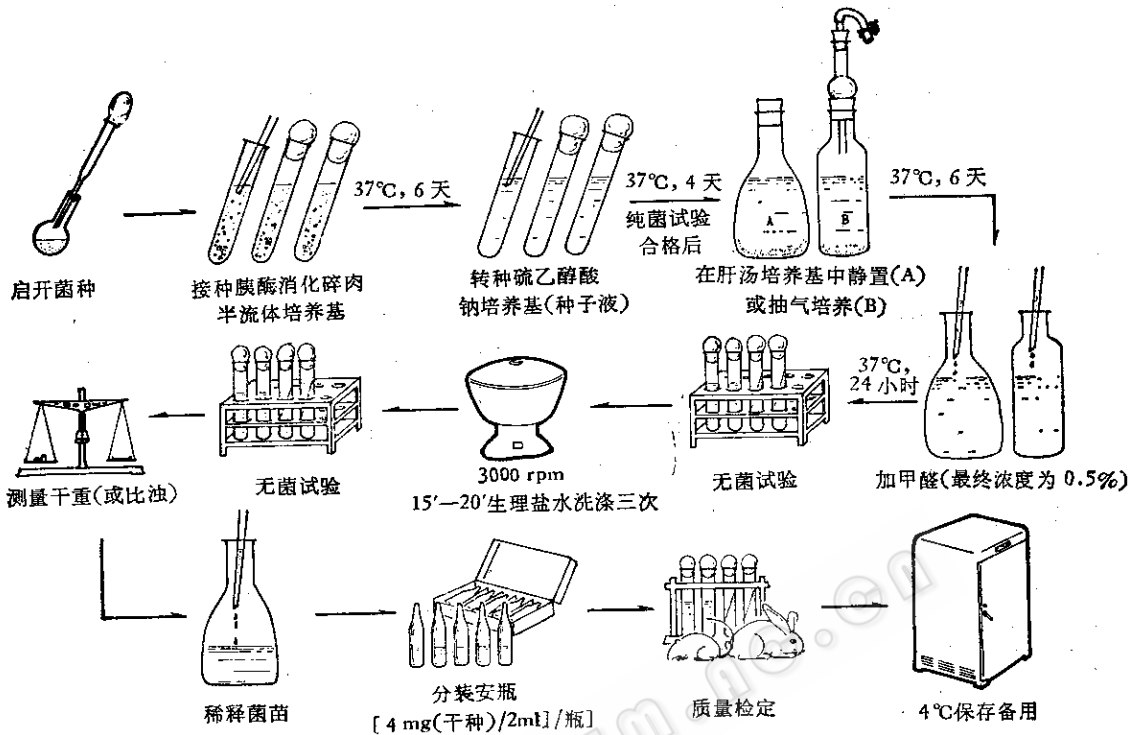
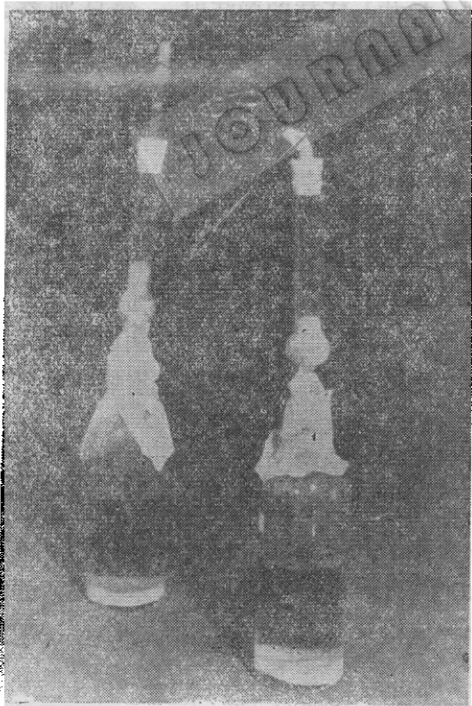


图1 国产厌氧棒状杆菌苗小型生产示意图

图2 厌氧棒状杆菌抽气培养  
瓶底部为繁殖的细菌

5,000 毫升的小口玻璃瓶中，做静置或抽气（-760 毫米汞柱）培养。（图 2），经 37°C 培养 6—7 日，细菌沿瓶壁自下向上生长，涂片检查为无杂菌生长的棒状杆菌纯培养。

上述细菌纯培养置 60°C 水浴中加温 1 小时，或加入甲醛溶液，使其最后浓度为 0.5%，再置 37°C 条件下保温 24 小时，然后以 3,000rpm 离心 15—20 分钟，弃去上清液加入 pH7.5 缓冲盐水或生理盐水混匀，再经离心，如此反复洗涤三次。尽量洗去培养液和游离甲醛，用生理盐水配制成细菌悬液，并将其浓度调整为 2 毫克（干重）/毫升。分装安瓶，每瓶 2 毫升（4 毫克），再置 60°C 水浴中加温 1 小时，冷却后放 4°C 冰箱保存备用。

## 结果与讨论

### （一）菌苗产量

5,000 毫升培养瓶，装 4,000 毫升培养液，每瓶培养一次的细菌产量为 5—6 克，可生产菌苗 1,500 支左右。以每个病人一

个疗程用 4 毫克  $\times$  10—12 支计算, 可供 100 多人使用一个疗程。

## (二) 菌苗质量

1. 在每 1,000 支成品菌苗中随机抽样 3—5 支, 混合后, 分别接种于需气培养基及厌氧培养基中, 进行杂菌污染及本细菌灭活是否彻底的检查。如结果怀疑有杂菌生长, 再加倍抽样重试, 如仍有怀疑, 则应废弃此批菌苗。本实验室按上述方法所生产的菌苗, 90% 以上均无杂菌生长。

2. 随机抽取菌苗样品, 按规定<sup>[4]</sup>称取干重或以标准比浊管比浊, 菌苗浓度分别为 2 毫克/毫升或 120 亿菌体/毫升, 误差不超过  $\pm 10\%$ 。

3. 将菌苗摇匀、稀释、取少量滴在载玻片上划好的 1 厘米<sup>2</sup>方格内, 涂匀, 自然干燥后, 染色。显微镜下检查未发现直径 10 微米以上的菌团证明菌苗含量准确, 无杂菌污染, 灭活彻底, 重量、酸碱度与致热原均在合理范围之内。静脉注射时不致因菌团过大, 造成血管栓塞。

## (三) 毒性反应

取同一性别的纯系小鼠 DBA 或 615 纯系小鼠 10 只, 体重为 18—22 克经腹腔注射本菌苗 0.5 毫克。一周后再称重体重, 结果不低于原体重, 亦无小鼠死亡。注射后 2 周处死动物, 取心、肝、脾、肺、副肾及淋巴结等进行病理学检查, 未发现有梗死性病灶, 证明本菌苗无严重的毒性反应。在动物试验的基础上进行了临床试用, 观察其对人的毒性作用。据初步报道<sup>[5]</sup>, 在 700 多人次的皮下注射中, 接受本菌苗注射者, 普遍出现发热, 温度在  $37.5^{\circ}$ — $40^{\circ}\text{C}$ , 24 小时左右退热, 一般无需作特殊处理。另有一例女性食管癌病人, 连续三次, 于注射菌苗后, 注射局部发生水疱而中止使用菌苗, 其余未见严重的局部或全身性反应。静脉注射应十分谨慎<sup>[6]</sup>。

## (四) 效果

1. 网状内皮系统激活试验: 用同一性别 DBA 纯系小鼠 20 只, 体重 18—22 克, 随机分成两组, 一组腹腔注射菌苗 0.5 毫克/只, 另一组腹腔注射生理盐水代替菌苗。10—14 天后, 处死动物, 称取体重及脾脏重量, 按下述公式计算脾脏指数 (Spleen index, SI)。

$$SI = \frac{[(\text{实验组动物脾重之和}) \div \text{实验组动物体重之和}]}{[(\text{对照组动物脾重之和}) \div (\text{对照组动物体重之和})]}$$

本菌苗的 SI 为 2.2—2.8, 与国外同类产品的 SI 相似。

2. 抑瘤试验: 取同一性别、体重 20—22 克杂种昆明种小鼠 20 只, 腹腔接种 Ehrlich 腹水癌细胞 100 万个。实验组小鼠 (10 只) 于接种瘤细胞前一日腹腔注射菌苗 0.5 毫克/只, 以后隔日注射一次, 共计 5—6 次。对照组小鼠 (10 只) 以生理盐水 (0.3 毫升) 代替菌苗注射。每日观察动物, 以对照组小鼠全部死亡之日的实验组小鼠存活数作为评价菌苗效果的标准——保护率。

$$\text{菌苗保护率} = \frac{\{\text{对照组小鼠全部死亡时的存活实验组小鼠数} \times 100\% \}}{\{\text{对照组小鼠总数}\}}$$

结果证明本菌苗的保护率为 80—90%。有报道临床上采用本菌苗辅以常规治疗手段用于治疗恶性黑色素瘤, 收到了一定的治疗效果<sup>[6]</sup>。

鉴于棒菌菌苗有一定程度的副反应, 其抑瘤效果, 特别是对人类恶性肿瘤的疗效有待深入研究。目前临床使用量尚不大, 且有一定的有效期, 故本文报道的是一种值得采用的简便、经济的小型试制工艺。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Halpern, B. N. et al.: *Nature*, **212**: 853—854, 1966.
- [ 2 ] Wooreuff, MFA. et al.: Immunopotiation,

(Ciba Foundation Symposium 18), Amsterdam, Associated Scientific Publishers, 1973, p. 285—303.

- [ 3 ] 中华人民共和国药典; 附录 44, 1977 年。
- [ 4 ] 朱孝堃等: *中华肿瘤杂志*, **1**(4):266, 1979。

## THE PROCEDURES FOR SMALL SCALE PRODUCTION OF ANAEROBIC *CORYNEBACTERIA* VACCINE

Li Shao-lan    Zhu Xiao-kun    Yang Feng-wen

(*Beijing Cancer Immunotherapy Cooperating Group. Beijing*)

This paper described a simple and inexpensive method for the production on a small scale of anaerobic *corynebacteria* vaccine. The quality of the vaccine, including its capacity to induce splenomegaly and to inhibit tumor growth in mice, was proved satisfactory. It was not toxic

to animal and no severe side effects were observed when given to man.

Since the clinical trial of anaerobic *Corynebacteria* vaccine is still in its early stage and its expiry is limited, the method for small-scaled production introduced in this paper may be practically useful.