

4种疫苗引起小鼠异常毒性检查中腹膜刺激症状的原因探讨

杨贇昀*, 胡宇驰, 周建平, 曹春然, 王志斌(北京市药品检验所, 北京 100035)

中图分类号 R965.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1169-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.06

摘要 目的:探讨4种疫苗引起小鼠异常毒性检查中腹膜刺激症状的原因。方法:按照2010年版《中国药典》(三部)“异常毒性检查法”项下规定,除阳性对照组(0.6%冰醋酸溶液)的给药剂量为每只0.2 ml外,其余组剂量均为每只0.5 ml,每组5只小鼠,给药方式为腹腔注射。分别进行甲型肝炎灭活疫苗(简称甲肝疫苗)、重组乙型肝炎疫苗(CHO细胞,简称乙肝疫苗)、流感病毒裂解疫苗(简称流感疫苗)、麻疹风疹联合减毒活疫苗(简称麻疹疫苗)、阴性对照(0.9%氯化钠注射液)、阳性对照的ICR小鼠异常毒性检查;甲肝疫苗、流感疫苗的ICR和昆明种小鼠异常毒性检查;甲肝疫苗、吸附前甲肝疫苗、吸附后甲肝疫苗、氢氧化铝佐剂、0.1%甲醛溶液、阳性对照、阴性对照的ICR小鼠异常毒性检查。观察出现腹膜刺激的动物数、出现时间、消失时间、其他异常表现以及7 d后体质量变化情况。结果:甲肝疫苗、乙肝疫苗和阳性对照均致3~5只小鼠出现腹膜刺激,出现时间在1~15 min,消失时间除阳性对照外均在30 min内,麻疹疫苗和阴性对照均未引起腹膜刺激;甲肝疫苗和流感疫苗均致所有ICR和昆明种小鼠出现腹膜刺激,出现时间在1~5 min,消失时间在8~10 min;甲肝疫苗、吸附后甲肝疫苗、氢氧化铝佐剂和阳性对照均致所有小鼠出现腹膜刺激,出现时间在1~5 min,消失时间除阳性对照外均在12 min内,全部小鼠均无其他异常表现且体质量正常。结论:疫苗中的氢氧化铝佐剂可能是导致小鼠腹膜刺激症状出现的原因。

关键词 甲型肝炎灭活疫苗;重组乙型肝炎疫苗;流感病毒裂解疫苗;麻疹风疹联合减毒活疫苗;异常毒性;腹膜刺激;ICR小鼠;昆明种小鼠

Investigation of the Reasons for Mice Peritoneal Stimulation Symptom in Abnormal Toxicity Test of 4 Kinds of Vaccines

YANG Yun-yun, HU Yu-chi, ZHOU Jian-ping, CAO Chun-ran, WANG Zhi-bin (Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the reasons for mice peritoneal stimulation symptom in abnormal toxicity test of 4 kinds of vaccines. METHODS: According to the requirements in volume III of *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition), mice were given intraperitoneal injection of 0.6% glacial acetic acid solution (positive control) 0.2 ml, and intraperitoneal injection of other drugs 0.5 ml with 5 mice in each group. Abnormal toxicity tests of ICR mice were conducted for inactivated hepatitis A vaccine (abbreviated as hepatitis A vaccine), recombinant hepatitis B vaccine (CHO cell, abbreviated as hepatitis B vaccine), influenza virus split vaccine (abbreviated as influenza vaccine), measles and rubella vaccine (abbreviated as measles vaccine), negative control (0.9% sodium chloride) and positive control. Abnormal toxicity tests of ICR mice and Kunming mice were conducted for hepatitis A vaccine and influenza vaccine. Abnormal toxicity tests of ICR mice were conducted for hepatitis A vaccine, pre-adsorbed hepatitis A vaccine, post-adsorbed hepatitis A vaccine, aluminum hydroxide adjuvants, 0.1% formaldehyde, positive control, negative control. The amount of mice suffering from peritoneal stimulation, onset time, disappearance time, other abnormal symptoms and change of body weight were observed. RESULTS: 3-5 mice suffered from peritoneal stimulation in hepatitis A vaccine group, hepatitis B vaccine group and positive control group, and the symptoms occurred in 1-15 min and lasted for 30 min except for positive control group; no peritoneal stimulation was found in measles vaccine group and negative control group. ICR mice and Kunming mice suffered from peritoneal stimulation in Aimmugen group and influenza vaccine group, and the symptoms occurred in 1-5 min and lasted for 8-10 min. All mice suffered from peritoneal stimulation in hepatitis A vaccine group, post-adsorbed hepatitis A vaccine group, aluminum hydroxide adjuvants group and positive control group, and the symptoms occurred in 1-5 min and lasted for 12 min except for positive control group. No other abnormal reaction was found in all mice and they were normal in body weight. CONCLUSIONS: Perhaps aluminum hydroxide adjuvant is the main reason of the mice peritoneal stimulation symptom.

KEYWORDS Inactivated hepatitis A vaccine; Recombinant hepatitis B vaccine; Influenza virus split vaccine; Measles and rubella vaccine; Abnormal toxicity; Peritoneal stimulation; ICR mice; Kunming mice

异常毒性是指药品在生产制造、制剂过程中外来引入的

异物或药物降解产生的不正常毒性反应,与生产工艺水平密切相关^[1]。疫苗结构复杂,为了更好地控制疫苗质量,保证其在临床使用中安全有效,在疫苗的质量标准中常设置异常毒

* 主管药师,硕士。研究方向:药理毒理学。电话:010-83224952。

E-mail:yun2y@126.com

性检查项。笔者在日常检验工作中发现,某些种类的疫苗在进行小鼠异常毒性检查时,腹腔注射给药一段时间后会现腹膜刺激症状。为此,本实验进行了几种常用的疫苗的小鼠异常毒性检查,以研究小鼠出现腹膜刺激症状的原因,辨别其是否属于小鼠异常毒性表现,与小鼠种类是否具有相关性,从而为疫苗的安全性研究提供实验数据。

1 材料

1.1 动物

ICR小鼠,SPF级,体质量18~22g;昆明种小鼠,SPF级,体质量18~22g,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号均为SCXK(京)2012-0001。

1.2 疫苗与试剂

成品:甲型肝炎灭活疫苗(简称甲肝疫苗,批号:201212035,规格:每支500u)、重组乙型肝炎疫苗(CHO细胞,简称乙肝疫苗,批号:201301XB01,规格:每支20μg)、流感病毒裂解疫苗(简称流感疫苗,批号:201212040,规格:每支7.5μg)、麻疹风疹联合减毒活疫苗(简称麻疹疫苗,批号:201212271,活性:活病毒<3.21gCCID₅₀),疫苗中间产物及辅料:经氢氧化铝吸附处理前的甲肝疫苗半成品、经氢氧化铝吸附处理后的甲肝疫苗半成品、氢氧化铝佐剂、0.1%甲醛溶液,成品、疫苗中间产物及辅料均由北京科兴生物制品有限公司提供;阴性对照:0.9%氯化钠注射液(北京双鹤药业有限公司,批号:1008061);阳性对照:0.6%冰醋酸溶液(北京现代东方精细化学品有限公司,批号:20090702)。

2 方法

2.1 不同种类疫苗的小鼠异常毒性检查

实验分为6组,分别为甲肝疫苗组、乙肝疫苗组、流感疫苗组、麻疹疫苗组、阴性对照(0.9%氯化钠注射液)组、阳性对照(0.6%冰醋酸溶液)组。按照2010年版《中国药典》(三部)附录XII F异常毒性检查法^[2]项下有关规定进行。每组供试品腹腔注射5只ICR小鼠,给药剂量为每只0.5ml(阳性对照组每只小鼠腹腔注射0.6%冰醋酸溶液0.2ml^[3]),注射后连续观察30min,记录注射后出现扭体、蜷缩等腹膜刺激症状的动物数、症状出现时间、消失时间、小鼠是否出现其他异常表现以及体质量变化情况。

2.2 不同品种小鼠对同种疫苗的异常毒性检查

实验分为4组,分别为甲肝疫苗组(ICR小鼠)、甲肝疫苗组(昆明种小鼠)、流感疫苗组(ICR小鼠)、流感疫苗组(昆明种小鼠)。取ICR小鼠和昆明种小鼠各10只,分别腹腔注射甲肝疫苗(各5只)、流感疫苗(各5只),给药剂量均为每只0.5ml。按“2.1”项下方法操作并观察、记录注射后出现扭体、蜷缩等腹膜刺激症状的动物数、症状出现时间、消失时间、小鼠是否出现其他异常表现以及体质量变化情况。

2.3 腹膜刺激症状的出现与甲型肝炎疫苗中不同组分的相关性实验

实验分为7组,分别为甲肝疫苗成品组、经氢氧化铝吸附处理前的甲肝疫苗半成品(简称为吸附前样品)组、经氢氧化铝吸附处理后的甲肝疫苗半成品(简称为吸附后样品)组、氢氧化铝佐剂组、0.1%甲醛溶液组、阴性对照(0.9%氯化钠注射液)组、阳性对照(0.6%冰醋酸溶液)组。每组供试品腹腔注射

5只ICR小鼠,给药剂量为每只0.5ml(阳性对照组每只小鼠腹腔注射0.6%冰醋酸溶液0.2ml)。按“2.1”项下方法操作并观察、记录注射后出现扭体、蜷缩等腹膜刺激症状的动物数、症状出现时间、消失时间、小鼠是否出现其他异常表现以及体质量变化情况^[4]。

3 结果

3.1 不同种类疫苗对小鼠腹膜刺激的影响

结果显示,在注射后1~15min期间,甲肝疫苗组、乙肝疫苗组、流感疫苗组中均有小鼠出现扭体、蜷缩等腹膜刺激症状,9~30min内均恢复正常。麻疹疫苗组小鼠腹腔注射后均未出现腹膜刺激症状及其他异常反应。7d到期时小鼠全部健存,且无异常反应,体质量增加正常。阴性对照组5只小鼠均未出现异常反应,阳性对照组5只小鼠均出现腹膜刺激症状。不同疫苗致小鼠腹膜刺激症状的实验结果见表1。

表1 不同种类疫苗致小鼠腹膜刺激症状的实验结果(n=5)
Tab 1 Results of mice peritoneal stimulation symptom test after injected with various vaccines (n=5)

组别	出现腹膜刺激症状只数	症状出现时间,min	症状消失时间,min	其他异常表现	7d体质量增加情况
甲肝疫苗组	5	1~5	10	无	正常
乙肝疫苗组	3	5~15	30	无	正常
流感疫苗组	5	2~4	9	无	正常
麻疹疫苗组	0	无	无	无	正常
阴性对照组	0	无	无	无	正常
阳性对照组	5	2~5	>30	无	正常

3.2 不同品种小鼠对同种疫苗的腹膜刺激性反应

结果显示,在注射后1~5min期间,ICR小鼠和昆明种小鼠均出现扭体、蜷缩等腹膜刺激症状,8~10min内均恢复正常,未见差异性表现。7d到期时小鼠全部健存,且无异常反应,体质量增加正常。同种疫苗致不同品种小鼠腹膜刺激症状的实验结果见表2。

表2 同种疫苗致不同品种小鼠腹膜刺激症状的实验结果(n=5)

Tab 2 Results of peritoneal stimulation symptom test of different varieties of mice after injected the same vaccines (n=5)

组别	出现腹膜刺激症状只数	症状出现时间,min	症状消失时间,min	其他异常表现	7d体质量增加情况
甲肝疫苗组(ICR)	5	1~5	10	无	正常
甲肝疫苗组(昆明种)	5	1~2	8	无	正常
流感疫苗组(ICR)	5	2~4	9	无	正常
流感疫苗组(昆明种)	5	2~5	10	无	正常

3.3 甲肝疫苗中不同组分致小鼠腹膜刺激症状的实验结果

结果显示,甲肝疫苗成品组、吸附后样品组、氢氧化铝佐剂组小鼠腹腔注射后1~5min期间均出现扭体、蜷缩等腹膜刺激症状,9~12min内均恢复正常;吸附前样品组、0.1%甲醛溶液组小鼠腹腔注射后均未出现腹膜刺激症状及其他异常反应;阴性对照组5只小鼠均未出现异常反应,阳性对照组5只小鼠均出现腹膜刺激症状。7d到期时小鼠全部健存,且无异常反应,体质量增加正常。甲肝疫苗中不同组分致小鼠腹膜刺激症状的实验结果见表3。

表3 甲肝疫苗中不同组分致小鼠腹膜刺激症状的实验结果 (n=5)

Tab 3 Results of peritoneal stimulation symptom caused by different components from hepatitis A vaccine in mice (n=5)

组别	出现腹膜刺激症状只数	症状出现时间,min	症状消失时间,min	其他异常表现	7 d 体质量增加情况
甲肝疫苗成品组	5	1~5	10	无	正常
吸附前样品组	0	无		无	正常
吸附后样品组	5	1~3	9	无	正常
氢氧化铝佐剂组	5	1~2	12	无	正常
0.1%甲醛溶液组	0	无		无	正常
阴性对照组	0	无		无	正常
阳性对照组	5	2~5	>30	无	正常

4 讨论

不同种类疫苗对小鼠腹膜刺激性实验结果表明,多种含有氢氧化铝佐剂的疫苗,如甲肝疫苗、乙肝疫苗、流感疫苗,都会引起小鼠腹膜刺激症状;其中甲肝疫苗、流感疫苗引起小鼠腹膜刺激症状出现较快,症状较明显,乙肝疫苗引起小鼠腹膜刺激症状出现较为缓慢。不含有氢氧化铝佐剂的疫苗,如麻疹疫苗,未见引发小鼠腹膜刺激症状。实验初步提示,小鼠的腹膜刺激症状的引发可能与疫苗中氢氧化铝佐剂相关。

由于甲肝疫苗、流感疫苗引起小鼠腹膜刺激症状较为明显,因此以这2种疫苗为实验对象,并分别采用ICR小鼠和昆明种小鼠分别对同种疫苗的进行实验。结果表明,ICR和昆明种小鼠注射某些种类的疫苗后均可发生腹膜刺激现象,提示疫苗引起小鼠腹膜刺激症状与小鼠的品种并无明显关系。

甲肝疫苗、乙肝疫苗、流感疫苗的生产工艺均是通过甲醛灭活、铝佐剂吸附,考虑可能是在生产中引入甲醛或铝佐剂导致小鼠腹腔刺激症状的产生。实验选用的这3种成品疫苗生产厂家不同,也排除了生产工艺水平不同引起的实验结果差异。

为进一步确认小鼠腹腔刺激症状的产生是与甲醛还是铝佐剂相关,选取同一厂家经氢氧化铝吸附处理前、后的甲肝疫苗半成品、成品及疫苗生产所用辅料(0.1%甲醛溶液、氢氧化

铝佐剂)分别进行实验。实验结果进一步表明,小鼠腹膜刺激症状的出现与铝佐剂吸附相关,确认疫苗中的铝佐剂是导致小鼠腹膜刺激症状出现的主要原因。

上述几种疫苗的小鼠异常毒性检查中,小鼠腹腔注射后出现腹膜刺激症状,可能是由疫苗中的铝佐剂引起的,并非是疫苗中其他外来引入的异物或药物降解而产生的不正常毒性反应,因此不能将其作为疫苗产生异常毒性的判断依据。目前2010年版《中国药典》(三部)附录XIF“异常毒性检查法”规定“无异常反应”,而在实际操作中,对于“无异常反应”这种确定性的描述还需要结合实际情况进行仔细分辨和判别。

有文献表明,铝佐剂可引起注射局部红斑、肿胀和硬结^[5],导致血管通透性增加^[6],此种特性可能是引起小鼠腹膜刺激症的原因之一。因此,研究、开发新型的免疫佐剂以增强疫苗的免疫力并减少疫苗的毒副作用和不良反应任重而道远。

参考文献

- [1] 张锐,李湛军.药品质量标准中的安全性检查进展[J].中国临床药理学与治疗学,2006,11(9):1078.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录98.
- [3] 陈奇.中药药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994:108.
- [4] 陈哲文,金于兰,马相虎,等.水痘减毒活疫苗豚鼠异常毒性检查方法的探讨[J].中国生物制品学杂志,2012,25(7):896.
- [5] 王晓娟,廖雪雁.疫苗佐剂的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2008,36(3):96.
- [6] Goto N, Kato H, Maeyama J, et al. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines[J]. Vaccine, 1993, 11(9):914.

(收稿日期:2013-07-23 修回日期:2013-09-05)

关于含羟乙基淀粉类药品的相关信息

本刊讯 2014年2月26日,国家食品药品监督管理总局发布第60期《药品不良反应信息通报》,提醒关注含羟乙基淀粉类药品对严重脓毒血症患者的肾损伤及死亡率增加风险,有关含羟乙基淀粉类药品的相关信息如下:

(1)羟乙基淀粉类药品适应证:含羟乙基淀粉类药品为血容量补充药,主要用于预防和治疗各种原因造成的低血容量,包括失血性、烧伤性及手术中休克等、血栓闭塞性疾患等。

(2)目前我国上市销售的羟乙基淀粉类药品包括:羟乙基淀粉20氯化钠注射液、羟乙基淀粉40氯化钠注射液、羟乙基淀粉130/0.4氯化钠注射液和羟乙基淀粉200/0.5氯化钠注射液等4个分子质量产品;还有羟乙基淀粉130/0.4电解质注射液。

(3)羟乙基淀粉类药品的常见不良反应包括:寒战、过敏

性休克、呼吸困难、胸闷、高热/发热、过敏样反应、皮疹、肾功能损害等。

(4)国外文献提到的风险我国的监测情况:国外多项研究和荟萃分析结果提示,严重脓毒血症患者使用羟乙基淀粉类药品与晶体液相比较,死亡率和/或需要肾脏替代疗法的肾损伤风险增加。但在我国收集到的羟乙基淀粉类药品不良反应报告中,用药原因主要为手术中或手术后补充血容量、失血性低血流量、脑梗塞、外伤、烧伤等;仅有1例(0.03%)用药原因为感染性休克,未发现有明显的使用风险。

如需了解详细信息,请登陆国家食品药品监督管理总局网站(<http://www.sfda.gov.cn>)或国家药品不良反应监测中心网站(<http://www.cdr.gov.cn>)。