

甲型乙型肝炎联合疫苗的制剂安全性试验研究

吴虓飞, 周建平, 胡宇驰, 孙圆媛

北京市药品检验所 药物安全评价中心, 北京 100035

摘要: **目的** 评价甲型乙型肝炎联合疫苗是否具有肌肉刺激性、急性毒性和过敏反应。**方法** 家兔后肢股四头肌 im 0.5 mL 甲型乙型肝炎联合疫苗, 每天给药 1 次, 连续给药 2 d, 停药 2 和 21 d 后对注射部位进行肉眼和病理组织学检查; 小鼠后肢 im 0.2 mL 甲型乙型肝炎联合疫苗, 给药 1 次后观察小鼠的不良反应情况; 豚鼠后肢隔日 im 0.5 mL 甲型乙型肝炎联合疫苗, 连续注射 3 次, 分别于末次致敏后第 14 和 21 d iv 给予 1.0 mL 甲型乙型肝炎联合疫苗进行激发, 观察豚鼠 30 min 内是否出现过敏反应。**结果** 甲型乙型肝炎联合疫苗可导致注射部位肌肉局灶性炎细胞浸润, 停药 21 d 后肌肉组织无异常; 在本实验条件中, 未见对小鼠有明显的毒性反应; 豚鼠全身主动过敏反应阴性。**结论** 甲型乙型肝炎联合疫苗无全身主动过敏反应且毒性较低, 对肌肉有轻度的刺激反应, 但其刺激作用可恢复。

关键词: 甲型乙型肝炎联合疫苗; 肌肉刺激; 急性毒性; 安全性实验

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)04-0253-03

Safety evaluation of hepatitis A and hepatitis B combined vaccine

WU Xiao-fei, ZHOU Jian-ping, HU Yu-chi, SUN Yuan-yuan

Department of Drug Safety Evaluation Center, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China

Abstract: Objective To evaluate whether hepatitis A and hepatitis B combined vaccine (HABV) has muscular stimulation, acute toxicity, and anaphylaxis. **Methods** Rabbits were im administrated with HABV (0.5 mL, once daily continuously for 2 d), and macrography and pathological examination of injection site were conducted on the days 2 and 21 d after the last administration. Mice were im administrated once with HABV (0.2 mL) and observed continuously for 14 d for acute toxic symptoms. Guinea pigs were im administrated with HABV (0.5 mL) every other day for three times successively, and on the Days 14 and 21 after the last sensitization, HABV (1.0 mL) was iv administrated to observe whether the allergic reaction appeared within 30 min. **Results** It showed that HABV could induce the focal inflammatory cell infiltration and histopathologic changes disappear at day 21 after stopping administration. No evidence of acute toxicity in mice and allergic reaction on guinea pig *in vivo* was observed. **Conclusion** There is gentle stimulation on quadriceps femoris in rabbits, no sensitization on guinea pig *in vivo*, the low toxicity treated with HABV. There is muscular stimulation, which is reversible.

Key words: hepatitis A and hepatitis B combined vaccine (HABV); muscular stimulation; acute toxicity; safety experiment

甲型乙型肝炎联合疫苗是北京科兴生物制品有限公司研制的一种含灭活甲型肝炎病毒抗原和重组酵母菌表达的乙肝表面抗原的联合疫苗, 该疫苗可刺激机体产生抗甲型肝炎病毒和抗乙型肝炎病毒的保护性抗体, 用于预防甲型肝炎病毒和乙型肝炎病毒的感染。临床上人拟用给药途径为上臂三角肌肌肉注射, 为了用药安全, 本研究根据国家食品药品监督管理局制定的《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》、《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则》、《化学药物急性

毒性研究技术指导原则》和《预防用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则》, 采用肌肉刺激性、急性毒性与过敏性试验对甲型乙型肝炎联合疫苗进行临床前安全性评价, 为临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 药品

甲型乙型肝炎联合疫苗(含氢氧化铝佐剂, 批号 2010062802, 北京科兴生物制品有限公司), 氢氧化铝佐剂(批号 A-R110328-002, 北京科兴生制

收稿日期: 2012-06-11

作者简介: 吴虓飞, 药理学博士, 主管药师, 主要从事药品检验、药理、毒理学研究工作和中药、西药、生物制品的安全性评价工作。
E-mail: xfwuchina@gmail.com

品有限公司), 0.9%氯化钠注射液(国药准字号 H13023200, 石家庄四药有限公司), 水合氯醛(批号 20090922, 国药集团化学试剂有限公司), 牛血清白蛋白(批号 20091010, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 动物

大耳白家兔, 体质量 2.0~2.5 kg, 雌雄各半, 合格证号 SCXK(京)2010-0002; Hartley 豚鼠, 体质量 300~350 g, 雌雄各半, 合格证号 SCXK(京)2006-0009; ICR 小鼠, 体质量 18~21 g, 雌雄各半, 合格证号 SCXK(京)2006-0009; 实验动物均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

2 实验方法^[1-3]

2.1 家兔肌肉刺激试验

取健康家兔 12 只, 按体质量随机分为甲型乙型肝炎联合疫苗组和氢氧化铝佐剂组, 6 只家兔(雌雄各半)右侧后肢股四头肌 im 0.5 mL 的甲型乙型肝炎联合疫苗, 6 只家兔以相同的方式注射氢氧化铝佐剂, 采用自身对照的方式, 所有家兔左侧后肢相同部位 im 等体积氯化钠注射液(9 mg/mL), 作为阴性对照组。1 次/d, 连续给药 2 d。停药 2 d 后, 甲型乙型肝炎联合疫苗组和氢氧化铝佐剂组各取 4 只家兔(雌雄各半), 以及停药 21 d 后取剩余家兔, 纵向切开股四头肌, 肉眼观察注射部位周围的刺激反应, 按“肌肉刺激反应分级标准”(表 1) 计算各组平均反应级, 然后用 4% 中性甲醛溶液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切 5 μm 薄片, HE 染色, 光镜下做局部肌肉病理组织学检查, 另一侧阴性对照组肌肉也同法处理。

平均反应级 = 剖检动物反应分级总和 / 剖检动物数

表 1 肌肉刺激反应分级标准

Table 1 Grading standards of muscular stimulation

刺激反应	反应级
无明显变化	0
轻度充血, 范围在 0.5 cm×1.0 cm 以下	1
中度充血, 范围在 0.5 cm×1.0 cm 以上	2
重度充血, 伴有肌肉变性	3
出现坏死, 有褐色变性	4
出现广泛性坏死	5

2.2 小鼠肌肉注射急性毒性试验

取 40 只健康 ICR 小鼠, 雌雄各半, 按体质量随机分为阴性对照组(9 mg/mL 氯化钠注射液)和

甲型乙型肝炎联合疫苗组。采用左右后肢两点 im 给药的方式, 0.1 mL/侧, 0.2 mL/只, 1 d 内给药 1 次。小鼠在给药前观察一次, 给药后 4 h 内观察小鼠的行为活动、外观体征、腺体分泌、呼吸、粪便, 以及中毒反应和死亡情况等, 随后连续 14 d 观察其一般状态。一般状态观察期间测定小鼠体质量和摄食量, 观察期结束后, 将各组存活的小鼠处死进行解剖, 对心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、胃、肠、气管、睾丸、子宫、卵巢、胸腺、头颈部淋巴结、肠系膜淋巴结、回肠 Peyer 氏淋巴集结和左、右后肢注射部位组织大体病理变化进行肉眼观察^[4]。

2.3 豚鼠全身主动过敏试验

取 48 只健康豚鼠, 雌雄各半, 按体质量随机分为 4 组: 阴性对照组(9 mg/mL 氯化钠注射液)、阳性对照组(10 mg/mL 牛血清白蛋白)、甲型乙型肝炎联合疫苗组和氢氧化铝佐剂组。采用左右后肢两点 im 的方式致敏, 0.25 mL/侧, 采用外侧跖静脉注射的方式激发。致敏和激发剂量分别为 0.5、1.0 mL/只, 末次致敏后 14 和 21 d 各组动物数量均为雌雄各 3 只。各组豚鼠隔日 im 给予受试物, 共致敏 3 次。然后每组豚鼠分成两批, 分别于末次给药后 14 和 21 d iv 给予受试物进行激发, 观察豚鼠在激发后 30 min 内有无以下级数过敏反应: 0、正常; 1、躁动; 2、竖毛; 3、颤抖; 4、搔鼻; 5、喷嚏; 6、咳嗽; 7、呼吸急促; 8、排尿; 9、排粪; 10、流泪; 11、呼吸困难; 12、哮喘音; 13、紫癜; 14、步态不稳; 15、跳跃; 16、喘息; 17、痉挛; 18、旋转; 19、潮式呼吸; 20、死亡。

3 结果

3.1 家兔肌肉刺激试验

停药 2 d 后, 阴性对照组、疫苗组、佐剂组分别有 2/8、2/4、2/4 的家兔注射部位见轻度充血, 范围均在 0.5 cm×1.0 cm 以下, 肌肉刺激平均反应级分别为 0.25、0.5、0.5。病理组织学检查结果显示, 阴性对照组、疫苗组、佐剂组分别有 3/8、3/4、3/4 的家兔注射部位有局灶性的病理改变, 距进针部位约 2 cm 处肌肉组织均未见异常。阴性对照组病变为局灶性的肌纤维变性、间质细胞增生; 疫苗组和佐剂组病变均为局灶性的炎细胞浸润、肌纤维变性和间质细胞增生。停药 21 d 后, 各组家兔注射部位和距进针部位约 2 cm 处肌肉组织均未见异常。

3.2 小鼠肌肉注射急性毒性试验

疫苗组小鼠给药后在 14 d 观察期内动物全部存

活,小鼠体质量增长和摄食正常,未出现明显的与疫苗相关的动物异常症状,小鼠外观体征、行为活动、腺体分泌、呼吸、粪便等均未见异常。观察期结束,对各组小鼠主要脏器和左、右后肢注射部位组织进行肉眼观察,均未见异常。

3.3 豚鼠全身主动过敏试验

豚鼠隔日3次im注射疫苗或佐剂致敏后,于末次致敏后14和21d iv激发,注射后豚鼠活动正常,均未出现1~20级过敏反应症状,过敏反应呈阴性。阳性对照组豚鼠出现搔鼻、喷嚏、紫癜、痉挛、呼吸急促、步态不稳、休克死亡等过敏症状,过敏反应呈极强阳性。

4 讨论

本研究对甲型乙型肝炎联合疫苗进行了家兔肌肉刺激、小鼠急性毒性和豚鼠全身主动过敏试验,为临床安全用药提供参考。在本试验条件下,家兔股四头肌im 0.5 mL的疫苗或佐剂2次,停药2 d后,阴性对照组、疫苗组和佐剂组部分家兔均可见注射部位出现局灶性病变。阴性对照组病变为注射时机械性损伤所引起的。与阴性对照组比较,疫苗组和佐剂组病变面积较大,且发生的炎细胞浸润在阴性对照组未见。因此,甲型乙型肝炎联合疫苗和氢氧化铝佐剂对肌肉具有轻度刺激反应,其刺激作用可能是由氢氧化铝造成的,停药21 d后,疫苗和佐剂引起的刺激性病变可恢复。甲型乙型肝炎联合

疫苗临床用于儿童,每次使用剂量为0.5 mL。小鼠im 0.2 mL疫苗1次后,未见毒性反应,此剂量相当于临床20 kg儿童每千克体质量用量的400倍。另外,甲型乙型肝炎联合疫苗对豚鼠无全身主动过敏反应。

预防用疫苗免疫机体后诱导产生特异性免疫应答而达到预防某种疾病的目的,它能保护机体免受感染源及感染源引起的抗原性物质的损伤。由于疫苗的结构特点和作用机制在理论上存在不安全因素,不同种系的动物与人体免疫系统之间具有相关性,因此疫苗的毒理试验具有特殊性,不同于一般的化学药品。本研究选用相关动物对甲型乙型肝炎联合疫苗进行临床前安全性评价,仅为其临床使用提供参考和依据。

参考文献

- [1] 王治乔,袁伯俊. 新药临床前安全性评价与实践 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 药物研究技术指导原则 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [3] 刘朝阳,杜庆成,张俊英,等. 阿替洛尔注射液对血管刺激、溶血和过敏的实验研究 [J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(3): 133-135.
- [4] 王军志. 生物技术药物安全性评价[M]. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 107.