

## • 安全性评价 •

## 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗动物安全性评价

吴虓飞, 吕晶, 金鑫, 曹春然, 胡宇驰\*

北京市药品检验所 药物安全评价中心, 北京 100035

**摘要:**目的 对流感病毒 H7N9 型裂解疫苗进行动物局部安全性评价。方法 家兔肌肉刺激试验: 家兔后肢股四头肌 im 0.5 mL 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗, 每天给药 1 次, 连续给药 2 d, 末次给药后 48 h 和第 25 天对注射部位进行肉眼和病理组织学检查。豚鼠全身主动过敏试验: 豚鼠后肢隔日 im 0.5 mL 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗, 连续注射 3 次, 于末次致敏后第 14 天 iv 给予 1.0 mL 的流感病毒 H7N9 型裂解疫苗进行激发, 观察豚鼠 30 min 内是否出现过敏反应。急性毒性试验: 小鼠后肢 im 0.2 mL 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗, 给药 1 次后观察小鼠的不良反应情况。结果 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗可导致注射部位肌肉出现局灶性炎细胞浸润, 肌间质细胞增生, 条索状化脓灶, 停药 25 d 后, 上述病变消失。流感病毒 H7N9 型裂解疫苗豚鼠过敏反应发生率为 67%, 25 min 内恢复正常, 过敏反应评价为弱阳性到阳性; 小鼠急性毒性试验未见异常。结论 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗安全性良好, 不影响其临床使用。

**关键词:** 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗; 肌肉刺激; 过敏; 急性毒性; 安全性评价

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)06-0531-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.013

## Safety evaluation of H7N9 Influenza Split Vaccine in animals

WU Xiao-fei, LV Jing, JIN Xin, CAO Chun-ran, HU Yu-chi

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

**Abstract: Objective** To evaluate the local safety of H7N9 Influenza Split Vaccine in animals. **Methods** Rabbits were im injected with H7N9 Influenza Split Vaccine (0.5 mL, once daily continuously for 2 d), and macrography and pathological examination of injection site was conducted after 48 h and 25 d of the last administration. Guinea pigs were im injected with H7N9 Influenza Split Vaccine (0.5 mL) every other day for three times successively, and on day 14 after the last sensitization, H7N9 Influenza Split Vaccine (1.0 mL) was iv administered to observe whether the allergic reaction appeared within 30 min. Mice were im administered once with H7N9 Influenza Split Vaccine (0.2 mL) and observed continuously for 14 d for acute toxic symptoms. **Results** Pathological changes such as focal inflammatory cell infiltration, muscle interstitial cell hyperplasia and hemorrhage, and funicular suppurative focus were observed in the injection sites of rabbits, and disappeared on day 25 after stopping administration. The incidence of anaphylactic reactions of the vaccine in Guinea pigs was 67% and allergic reactions were evaluated as extremely mild or mild positive, and the animals with reactions were recovered to normal within 25 min. No abnormality was observed in acute toxicity test. **Conclusion** H7N9 Influenza Split Vaccine is safe and suitable for clinical application.

**Key words:** H7N9 Influenza Split Vaccine; muscular stimulation; anaphylaxis; acute toxicity; safety evaluation

流感病毒 H7N9 型裂解疫苗[H7N9 Influenza Vaccine (Split virion, Inactivated, Adjuvanted)]系采用世界卫生组织(WHO)推荐并提供的NIBRG-268[A/Anhui/1/2013(H7N9)]疫苗病毒株接种鸡胚, 经培养、收获病毒液、灭活病毒、裂解及纯化, 及氢氧化铝吸附后制成。该疫苗由北京科兴生物制品

有限公司研制, 可刺激机体产生针对 H7N9 型流感病毒的抗体, 临床上人拟定给药途径为上臂三角肌肌肉注射。为了用药安全, 本研究依据《化学药物刺激性、过敏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》《中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则》和《预防

收稿日期: 2014-07-03

作者简介: 吴虓飞, 研究方向为药理毒理。E-mail: xfwuchina@gmail.com

\*通信作者 胡宇驰 E-mail: huyuchi@bidc.org.cn

用生物制品临床前安全性评价技术审评一般原则》，采用肌肉刺激性试验、全身主动过敏性试验和急性毒性试验对流感病毒 H7N9 型裂解疫苗进行临床前安全性评价，为临床应用提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 疫苗与试剂

流感病毒 H7N9 型裂解疫苗（批号 201308002）和氢氧化铝佐剂（批号 20131025）均由北京科兴生物制品有限公司提供；氯化钠注射液（9 mg/mL，批号 12080542）由国药集团容生制药有限公司提供；水合氯醛（批号 20130314），乌来糖（批号 T20091109）和牛血清白蛋白（批号 20121101）均购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 实验动物

普通级大耳白家兔，体质量 2.0~2.5 kg，雌雄不限，实验动物质量合格证号为 11400700028398，生产许可证号为 SCXK（京）2010-0002。SPF 级 Hartley 豚鼠，体质量 300~350 g，雌性各半，实验动物质量合格证号为 11400700029000（雄）、11400700029003（雌），生产许可证号为 SCXK（京）2012-0001。SPF 级 ICR 小鼠，体质量 19~22 g，雌雄各半，实验动物质量合格证号为 11400700027847，生产许可证号为 SCXK（京）2012-0001。以上动物均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.3 家兔肌肉刺激实验<sup>[1-3]</sup>

取健康家兔 12 只，随机分为流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组和氢氧化铝佐剂组，6 只家兔右侧后肢股四头肌 im 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗，0.5 mL/只；另外 6 只家兔以相同的方式注射氢氧化铝佐剂，0.5 mL/只。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，作为阴性对照组。1 次/d，连续给药 2 d。末次给药后 48 h，流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组和氢氧化铝佐剂组各取 4 只家兔，以及末次给药后第 25 天取剩余家兔，20% 乌来糖溶液 5 mL/kg 静脉麻醉致死，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，在 0.5 cm×1.0 cm 以下	1
中度充血，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

### 1.4 豚鼠全身主动过敏实验<sup>[1-3]</sup>

取 24 只健康豚鼠，雌雄各半，按体质量随机分为阴性对照组（氯化钠注射液）、阳性对照组（10 mg/mL 牛血清白蛋白）、氢氧化铝佐剂组和流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组。另取 4 只豚鼠作为留用动物，留用组豚鼠不致敏，当氢氧化铝佐剂或流感病毒 H7N9 型裂解疫苗激发注射后，若发现有过敏反应等异常症状时，从留用组取雌雄各 1 只豚鼠，自外侧跖静脉注射激发剂量的受试物，观察是否由于药物作用引起的类似过敏反应症状，以供结果判断时参考。采用左右后肢两点肌肉注射的方式致敏，0.25 mL/侧，0.5 mL/只，各组豚鼠隔日 im 给予受试物，共致敏 3 次。所有动物于末次致敏后第 14 天经外侧跖静脉注射激发给药 1 次，1.0 mL/只，观察豚鼠在激发后 30 min 内有无过敏反应症状并评分，见表 2，3，最后计算各组过敏反应发生率。

过敏反应发生率 = 发生过过敏反应的动物数 / 组内动物数

表 2 过敏症状

Table 2 Allergy symptoms

序号	症状	序号	症状	序号	症状
0	正常	7	呼吸急促	14	步态不稳
1	躁动	8	排尿	15	跳跃
2	竖毛	9	排粪	16	喘息
3	颤抖	10	流泪	17	痉挛
4	搔鼻	11	呼吸困难	18	旋转
5	喷嚏	12	哮鸣音	19	潮式呼吸
6	咳嗽	13	紫癜	20	死亡

表 3 全身致敏性评价标准

Table 3 Evaluation criteria of systemic sensitization

症状	评价	结果判定
0	—	过敏反应阴性
症状 1~4	+	过敏反应弱阳性
症状 5~10	++	过敏反应阳性
症状 11~19	+++	过敏反应强阳性
症状 20	++++	过敏反应极强阳性

### 1.5 小鼠肌肉注射急性毒性实验<sup>[1-3]</sup>

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（氯化钠注射液）和流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组。采用左右后肢两点 im 给药的方式，0.1 mL/侧，0.2 mL/只（为 1 200 倍人用临床剂量），1 d 内给药 1 次。给药后连续观察 14 d 动物的临床症状，并测定小鼠体质量和摄食量，观察期结束后，对所有小鼠实施剖检，对心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、脑、胃、肠、气管、睾丸、附睾、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、右后肢注射部位肌肉进行大体病理学检查<sup>[4]</sup>。

### 1.6 数据统计

使用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析，体质量为单变量因素计量资料，先进行单因素方差分析，然后根据方差分析结果，进行统计分析，比较受试药物组与阴性对照组均数差异的显著性，摄食量以均值表示。

## 2 结果

### 2.1 家兔肌肉刺激实验结果

末次给药后 48 h，剖检肉眼观察，氢氧化铝佐剂和流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组各有 1/4 的家兔注射部位出现轻度充血，范围在 0.5 cm×1.0 cm 以下，平均反应级为 0.25。组织病理学检查结果显示，阴性对照组、氢氧化铝佐剂组和流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组分别有 2/4、4/4、3/4 的家兔注射部位出现局灶性的病理改变。阴性对照组病变为局灶性炎细胞浸润，肌间质细胞增生，病变面积较小。氢氧化铝佐剂组和流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组病变表现和病变程度明显重于阴性对照组，主要表现为局灶性炎细胞浸润，肌间质出血，间质细胞增生，条索状化脓灶，且 1/4 的家兔距注射部位约 2 cm 处肌肉组织也可见上述病理改变。末次给药后第 25 d，各组家兔注射部位和距注射部位约 2 cm 处肌肉组织均未见异常。

### 2.2 豚鼠全身主动过敏实验结果

致敏给药期间至激发给药前，各组豚鼠均未发现异常临床症状，体质量增长也未见异常，见表 4。激发给药后，阴性对照组和氢氧化铝佐剂组豚鼠均未见过敏反应症状，过敏反应发生率为 0；阳性对照组豚鼠全部出现过敏反应症状，其中 5/6 的豚鼠死亡，过敏反应发生率为 100%，过敏反应程度为极强阳性；流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组 4/6 的豚鼠

鼠在注射后 2~9 min 开始出现过敏反应症状，症状包括搔鼻、喷嚏、咳嗽，注射后 3~25 min 恢复正常，过敏反应发生率为 67%，过敏反应程度为弱阳性到阳性；取留用组豚鼠雌雄各 1 只静脉注射激发剂量的流感病毒 H7N9 型裂解疫苗，未见明显的类似过敏反应症状，过敏反应发生率为 0，见表 5。

表 4 全身主动过敏试验各组豚鼠的体质量变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	体质量/g		
	首次致敏	末次致敏	激发给药日
阴性	322.8±16.8	370.3±18.6	485.2±42.9
牛血清白蛋白	324.0±11.1	362.3±20.4	475.8±26.0
氢氧化铝佐剂	318.1±16.3	364.8±29.9	475.7±49.9
流感病毒 H7N9 型裂解疫苗	319.0±20.3	362.1±22.7	470.6±40.0

表 5 各组豚鼠的过敏反应症状评分及过敏反应发生率

组别	过敏反应症状评分					过敏反应发生率/%
	-	+	++	+++	++++	
阴性	6	0	0	0	0	0
牛血清白蛋白	0	0	0	1	5	100
氢氧化铝佐剂	6	0	0	0	0	0
流感病毒 H7N9 型裂解疫苗	2	2	2	0	0	67
留用	2	0	0	0	0	0

### 2.3 小鼠肌肉注射急性毒性实验结果

小鼠注射流感病毒 H7N9 型裂解疫苗后，在 14 d 观察期内全部存活，体质量增长和摄食正常，见表 6、7，未出现明显的与疫苗相关的异常临床症状。观察期结束，对各组小鼠主要脏器和左、右后肢注射部位肌肉进行大体病理学检查，均未见异常，表明 ICR 小鼠对流感病毒 H7N9 型裂解疫苗的最大耐受量为人用临床剂量的 1 200 倍。

## 3 讨论

本研究对流感病毒 H7N9 型裂解疫苗进行了家兔肌肉刺激、豚鼠全身主动过敏和小鼠急性毒性试验，为临床安全用药提供参考。刺激试验中流感病毒 H7N9 型裂解疫苗导致注射部位肌肉出现刺激反应，根据本中心对疫苗类药物安全性评价的经验，

表6 急性毒性试验各组小鼠的体质量变化 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
Table 6 Body weights of mice in each group in acute toxicity test ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	性别	给药后动物体质量/g					
		给药前	第1天	第4天	第7天	第11天	第14天
阴性	雄	21.5±0.8	22.2±0.6	25.6±0.8	26.7±0.8	28.5±1.0	30.2±1.2
	雌	20.4±0.7	20.5±0.7	22.0±0.9	22.4±0.9	23.4±1.1	23.8±1.7
流感病毒 H7N9 型裂解疫苗	雄	21.9±0.5	23.0±0.6	26.0±1.0	27.7±1.1	29.2±2.2	31.9±1.5
	雌	20.5±0.8	20.3±0.8	21.1±0.7	22.3±0.5	23.6±0.8	24.6±1.1

表7 流感病毒 H7N9 型疫苗小鼠肌肉注射急性毒性试验摄食量变化 ( $n=10$ )

Table 7 Food consumption of mice im injected with H7N9 Influenza Split Vaccine in acute toxicity test ( $n=10$ )

组别	性别	摄食量/(g·10 <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )		
		1 d	2~7 d	8~14 d
阴性	雄	2.0	1.8	1.7
	雌	1.7	2.1	2.0
流感病毒 H7N9 型裂解疫苗	雄	2.0	1.6	1.7
	雌	1.8	1.9	1.8

大多数疫苗注射后均会出现类似的慢性炎症反应<sup>[5]</sup>。局部刺激反应通常与疫苗的 pH 值、渗透压和辅料组分等有关, 氢氧化铝常作为疫苗的佐剂, 但易引起刺激性反应<sup>[5-6]</sup>, 在本试验中, 氢氧化铝佐剂也出现刺激反应, 因此推测疫苗引起刺激性的原因可能与氢氧化铝佐剂有关。另外, 流感病毒 H7N9 型裂解疫苗的给药方式为肌肉注射, 在临床应用中肌肉注射的给药方式对刺激的耐受性较强, 同时考虑到该疫苗的局部刺激性较轻微且该病变可恢复, 因此不影响本品的临床使用。

过敏试验中流感病毒 H7N9 型裂解疫苗引起豚鼠出现轻微的过敏反应, 并未有豚鼠出现死亡, 疫苗中蛋白类的存在和抗原量可能是影响豚鼠是否产生过敏反应的主要原因<sup>[7]</sup>, 本试验中的过敏反应可能由流感病毒 H7N9 型裂解疫苗组分中的异种动物蛋白(如卵清蛋白)导致, 通常异种动物蛋白极易在豚鼠上产生过敏性, 厂家可通过改善工艺进一步降低疫苗中异源蛋白的含量。另外, 通常流感病毒裂解疫苗在临床使用上(如甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗), 不针对鸡蛋或疫苗中任何其他成分(包括辅料、甲醛、裂解剂等), 特别是卵清蛋白过敏患者

使用。因此, 虽然流感病毒 H7N9 型裂解疫苗引起豚鼠出现轻微的过敏反应, 但在临床上不针对上述过敏者使用, 可将该疫苗在临床使用中产生过敏风险降至最低。小鼠急性毒性试验结果表明, ICR 小鼠对 1 200 倍人用临床剂量的耐受良好。

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, 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流感病毒 H7N9 型裂解疫苗进行临床前安全性评价, 仅为其临床前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] 范瑞泉, 魏青, 陈铁江, 等. 注射用呋异丙苷的安全性实验 [J]. 中国生物制品学杂志, 2004, 17(1): 47-48.
- [4] 王军志. 生物技术药物安全性评价 [M]. 第2版, 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [5] 吴虓飞, 周建平, 胡宇驰, 等. 甲型乙型肝炎联合疫苗的制剂安全性试验研究 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(4): 253-255.
- [6] 吴虓飞, 曹春然, 孙圆媛, 等. 治疗用皮卡乙型肝炎疫苗 (CHO 细胞) 及其组分的小鼠急性毒性实验研究 [J]. 中国药物警戒, 2013, 10(12): 709-711.
- [7] 单晓蕾, 张肃才, 孙云霞. 豚鼠给予疫苗的速发型全身主动过敏反应 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 518-519.