体外人外周血单个核细胞热原检测法用于ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的方法学研究

蔡彤,张媛,贺庆,刘倩,杜颖,陈晨,高华

中国食品药品检定研究院药理室,北京 100050

摘要 为考查体外人外周血单个核细胞热原检测法对ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的适用性,选取不同厂家共10批供试品,使用体外人外周血单个核细胞热原检测法,采用加样回收干扰实验考察供试品是否存在干扰。结果表明,大部分供试品在最大有效稀释倍数内,IL-6法干扰实验的回收率在50%~200%,且热原物质含量均低于标准限值,均为合格样品。研究表明,体外人外周血单个核细胞热原检测法可用于ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗热原检测。

关键词 体外人外周血单个核细胞;热原检测法;ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗

体外人外周血单个核细胞热原检测法是利用外源性热原物质(例如来源于革兰氏阴性菌的细菌内毒素、革兰氏阳性毒素、真菌和病毒等)能刺激人类外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)产生内源性发热因子(IL-6),来检测或量化热原污染物质的一种新方法[1]。与原有的热原物质检测方法(家兔检查法和细菌内毒素检查法)相比,体外人外周血单个核细胞热原检测法(PBMC-IL-6法)具有可定量检测所有类型热原物质、灵敏度高、无种属差异等优点[2]。经过30年的研究,此方法已得到欧洲替代方法论证中心(European Center for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)、英国国家生物制品检定所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)等机构的正式验证与推荐,欧洲药典、美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)均已采纳此方法[3-4]。中国对该方法的研究已开展多年,对其检测限、灵敏度和特异性等进行了全面考察,建立了较为完善的实验体系[5]。但中国目前对该方法还未进行较为系统的品种适用性方面的研究。本课题通过系统的方法适用性研究,以确立一个可使用该方法检测的品种,使该方法真正付之于应用。

ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗是由A、C、Y及W135群脑膜炎奈瑟氏菌培养液,经提纯获得的夹膜多糖抗原,纯化后加入乳糖作为稳定剂冻干制成,用于预防A、C、Y及W135群脑膜炎奈瑟氏球菌引起的流行性脑脊髓膜炎[6]。接种后可能发生的不良反应包括发热、接种局部红肿硬结、食欲不振、呕吐、腹痛、过敏等。其中发热反应为其最常见的不良反应[7]。引起发热的原因,一是由于接种疫苗自身特性引起的,这种发热的程度不是很高,一般不会引起其他不良后果;二是由于疫苗质量问题引起的发热,即疫苗中,的热原物质引起的热原反应,临床主要表现为发热、寒颤、呕吐等。目前,ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的质量标准中,热原主要通过细菌内毒素检查及家兔热原检查两种方式加以控制。但这两种方法都各自存在不足之处:二者除均存在种属差异外,前者仅能检测细菌内毒素一种热原物质;后者虽能检测多种类型发热物质,但灵敏度低,仅能定性,不能定量,且需使用大量动物。针对目前该品种热原物质检测存在的问题,本课题组分析了使用PBMC-IL-6法对ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗进行热原检测的方法适用性,以期为ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗建立一种新的热原检测途径。

1 材料与方法

1.1 试剂

细菌内毒素国家标准品由中国食品药品检定研究院提

收稿日期:2017-07-25;修回日期:2017-08-21

基金项目:国家"重大新药创制"科技重大专项(2012ZX09304010)

作者简介:蔡彤,硕士研究生,研究方向为药检药理,电子信箱:teddyct@163.com;高华(通信作者),教授,研究方向为药检药理,电子信箱:huag55@163.com

引用格式:蔡彤,张媛,贺庆,等. 体外人外周血单个核细胞热原检测法用于ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的方法学研究[J]. 科技导报, 2017, 35(17): 88-91; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.17.012

供,10000 EU/支;RPMI1640培养液和淋巴细胞分离液均购自SIGMA公司;人IL-6 ELISA试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;细菌内毒素检查用水由中国食品药品检定研究院提供,5 mL/支。

1.2 供试品

中国有6个生产厂家具有ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的生产批准文号。本次研究获得了其中5个厂家1~3批的样品作为考察供试品,共10批,规格均为0.5 mL/剂量,包含A、C、Y、W135群脑膜炎球菌多糖各50 μg,临床用量为1次一剂量(0.5 mL)(表1)。

表1 ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗来源及批次

Table 1 Manufactures and batches of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine

厂家	批号	批数
A	201202001,201301001	2
B	20111029,20140304-2	2
C	201210004,201210008	2
D	20131006-1	1
E	201206008,201207009,201207011	3

1.3 仪器

漩涡混合器,美国Scientific Industries Inc.,型号:GENIE-2;CO_2培养箱,美国THERMO,型号:3141;酶标仪,美国BioTeK,型号:synergyHT;洗板机,上海新波生物技术有限公司,型号EGEAE2310。

1.4 人外周血单个核细胞

参照机构间替代方法评价协调委员会(The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM)推荐的实验方法[8]进行实验。PBMC-IL-6法要求使用来源于4个不同献血者的PBMC进行试验,结果均小于限值,才能判断供试品符合规定。故静脉抽取4个健康人的新鲜外周血,使用15 U/mL的肝素钠溶液抗凝。在4 h内,使用淋巴细胞分离液,用密度梯度离心法将PBMC从血中提取出,然后使用RPMI1640培养液将每个献血者的PBMC稀释至浓度约为2.0×10^6/mL,并添加来自于每个献血者的血清,血清含量为1%~2%。

1.5 方法

PBMC-IL-6法是以细菌内毒素标准品为基准来评价药品中全部热原的污染情况及反映药品致热能力。从细菌内毒素标准量效曲线得出的内毒素浓度可等效于热原污染物浓度。因此,需使用细菌内毒素标准品制备标准曲线及回收。

1.5.1 细菌内毒素标准曲线

用1 mL细菌内毒素检查用水复溶1支细菌内毒素国家标准品,漩涡混合器混合15 min。使用RPMI1640培养液稀释至所需浓度,每稀释一步均应在漩涡混合器上混合30 s。细菌内毒素标准曲线所用内毒素标准品溶液浓度由低到高依次为0、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2、0.4 EU/mL(均平行4孔)。

1.5.2 计算供试品的热原物质限值及最大有效稀释倍数

按照公式$L=K/M$,确定供试品的热原物质限值(L)。其中,K为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量,以EU/(kg·h)表示,注射剂K=5 EU/(kg·h),放射性药品注射剂K=2.5 EU/(kg·h),鞘内用注射剂K=0.2 EU/(kg·h)。M为人用每千克体重的最大供试品剂量,以mL/(kg·h)、mg/(kg·h)或U/(kg·h)表示,中国人均体重按60 kg计算,人体表面积按1.62 m^2计算。注射时间若不足1 h,按1 h计算。按照$L=K/M$计算,K=5 EU/(kg·h),M为0.5 mL/(60kg·h),则L=600 EU/mL。

按照公式$MVD=C\cdot L/\lambda$,确定供试品最大有效稀释倍数(MVD)。其中,L为供试品的热原物质限值。C为供试品溶液浓度,当L以EU/mL表示时,则C等于1.0 mL/mL,当L以EU/mg或EU/U表示时,C的单位需为mg/mL或U/mL。λ为所制备的细菌内毒素标准曲线的最低点浓度,0.0125 EU/mL。MVD=600 EU/mL÷0.0125 EU/mL=48000倍,则ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗供试品的最大有效稀释倍数为48000倍,在实验中实际采用的稀释倍数为20000倍。

1.5.3 供试品及供试品回收溶液的制备

供试品使用RPMI1640培养液进行稀释,稀释倍数不得超过MVD。供试品回收溶液中添加的标准内毒素浓度为0.05 EU/mL。

1.5.4 PBMC-IL-6法

将每一个献血者的PBMC分别加入到一块底部为U型的96孔板中,然后将稀释的内毒素标准品溶液、供试品溶液和供试品回收溶液依次加入到对应的孔中(均平行4孔)。加样体积为:125 μL PBMC溶液/孔+125 μL标准品或供试品(回收)溶液/孔。混匀后,置于5% CO_2,37±1℃孵育18~24 h。孵育结束后,按照IL-6 ELISA试剂盒说明书进行测定。

2 结果

参考中国药典细菌内毒素检查法,供试品在最大有效稀释倍数内,回收率为50%~200%,则认为在此实验条件下供试品溶液不存在干扰作用。在本实验条件下,4个献血者对5个厂家生产的ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗在20000倍稀释倍数下的回收率均在50%~200%范围内,表明供试品无干扰(表2)。在干扰实验合格的前提下,4个献血者检测的10批供试品的热原物质含量均小于其限值600 EU/mL,结果为合格。由于本次实验的最低检测限均为0.0125 EU/mL,供试品稀释倍数为20000倍,当测定值低于最低检测限时,对应的供试品热原含量应为小于稀释倍数乘以检测限,即< 250 EU/mL(表3)。

表2 ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗PBMC-IL-6法干扰实验回收率

Table 2 The recovery of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine in the PBMC- IL-6 pyrogen test

厂家	批号	4人PBMC的回收率/%				
		1	2	3	4	平均值
A	201202001	54	106	104	74	84
	201301001	51	148	98	96	98
B	20111029	83	116	82	127	102
	20140304-2	81	136	100	66	96
C	201210004	72	200	78	67	113
	201210008	90	125	119	53	97
D	20131006-1	110	160	95	150	129
E	201206008	177	62	94	170	126
	201207009	142	67	93	100	101
	201207011	156	59	114	50	94

表3 ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗PBMC-IL-6法热原物质含量

Table 3 The pyrogen concentrations of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine in the PBMC- IL-6 pyrogen test

厂家	批号	4人检测的热原物质含量/(EU·mL^{-1})				
		1	2	3	4	结果
A	201202001	480	<250	<250	<250	均小于600
	201301001	<250	<250	<250	<250	均小于600
B	20111029	<250	<250	<250	<250	均小于600
	20140304-2	<250	<250	<250	<250	均小于600
C	201210004	<250	<250	<250	270	均小于600
	201210008	<250	<250	<250	<250	均小于600
D	20131006-1	<250	<250	<250	<250	均小于600
E	201206008	<250	<250	<250	<250	均小于600
	201207009	<250	<250	<250	<250	均小于600
	201207011	<250	<250	<250	<250	均小于600

3 讨论

采用PBMC-IL-6法对5个生产厂家的10批ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的进行了较为系统的方法适用性考察，10批ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗在稀释倍数为20000倍时，PBMC-IL-6法的回收率均在50%~200%，表明供试品对该方法无干扰作用。可使用PBMC-IL-6法检测ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的热原物质。

研究发现，ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的质量标准中，不同厂家的细菌内毒素限值不同，但大部分都高于临床安全标准限值(600 EU/mL)，一般为1250 EU/剂量(0.5 mL)或2500 EU/剂量(0.5 mL)。对此10批样品进行细菌内毒素检测表明，细菌内毒素含量均在500~1200 EU/mL。但实际上，在GMP条件下生产的药品，其内毒素污染不应超过临床安全剂量。ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的制定的细菌内毒素标准限值及检测结果普遍偏高的原因，可能是由于除致热性内毒素外，ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗中含有的多糖亦与鲎试剂发生反应造成的[9]。研究显示，PBMC-IL-6法热原物质检测结果较细菌内毒素检查法均显著偏低(均<480 EU/mL)，为上述假设提供了数据支持。由此可见，细菌内毒素法并不能真实检测出ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗中致热物质的含量，不适合监控该疫苗热原物质的污染。

4 结论

近年来，人外周血单个核细胞体外热原检测法基于使用人类细胞、无种属差异的优势而被广泛研究。虽因其存在人类取血等伦理学问题，目前难以大规模、标准化使用，暂时不能替代现有的热原物质检测方法，但该方法对于原检测方法存在问题的品种可进行进一步的检测和研究，可作为有益的补充方法。

体外人外周血单个核细胞热原检测法PBMC-IL-6法在中国的研究已开展多年，但还未进行过较为系统的品种适用性方面的研究，没有确立可以使用该方法检测的品种。本次

研究的样品来源覆盖了中国ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗80%的生产企业,较为全面,实验结果可以较好代表该品种的特性,由此可以确定该疫苗可使用PBMC-IL-6法检测其热原物质。研究的结果为PBMC-IL-6法确立了一个适用的品种,也建立了一个系统的方法适用性研究模型,可以作为其他品种方法适用性研究的参考,进一步扩展PBMC-IL-6法的应用。

由于细菌内毒素检查法不能真实检测出ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗中致热物质的含量,而较之家兔法而言PBMC法更为灵敏,因此建议ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗生产厂家将PBMC-IL-6方法作为热原物质检查方法的补充,可更真实地检测出该疫苗的热原污染情况,从而更好的保障临床用药安全。

参考文献(References)

[1] 何开勇, 高华, 季晖. 新的体外热原试验方法研究进展[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 777-781.
He Kaiyong, Gao Hua, Ji Hui. A progress of a new in vitro pyrogen test [J]. Chin J Pharm Anal, 2007, 27(5): 777-781.

[2] 贺庆, 谭德讲, 高华, 等. 新型体外热原检测法的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(4): 405-409.
He Qing, Tan Dejiang, Gao Hua, et al. Progress in research of novel in vitro pyrogen tests[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 26(4): 405-409.

[3] 秦媛媛, 吴彦霖, 刘倩, 等. 三类体外热原检测方法的研究进展[J],中国药事, 2012,26(5): 507-512.
Qin Yuanyuan, Wu Yanlin, Liu Qian, et al. Research progress of three types of *in vitro* pyrogen test methods[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2012, 26(5): 507-512.

[4] 杜颖, 蔡彤, 刘倩, 等. 热原检测的3种方法在非肠道用制品检测中的适用性比较研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11): 1971-1978.
Du Ying, Cai Tong, Liu Qian, et al. Comparative study of the applicability of three methods for pyrogen test on parenteral medical products[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(11): 1971-1978.

[5] 贺庆, 高华, 谭德讲, 等. 人外周血单个核细胞热原检测法的研究[J]. 药物分析杂志,2012, 32(10): 1711-1717.
He Qing, Gao Hua, Tan Dejiang, et al. The use of human peripheral blood monocytic cells: A novel method for pyrogen testing[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(10): 1711-1717.

[6] 李亚南, 乔瑞洁, 梁丽,等. 2~59岁健康人群接种ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗的免疫原性观察[J]. 微生物学免疫学进展,2012, 40(5): 15-19.
Li Yanan, Qiao Ruijie, Liang Li, et al. Immunogenicity of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine inoculated in healthy population of age 2- 59 years old[J]. Prog in Microbiol Immunol, 2012, 40(5): 15-19.

[7] 陈万庚, 马永法, 周爱庆. 国产ACYW135流脑多糖疫苗免疫安全性观察[J]. 现代预防医学, 2011, 38(24): 5131-5132.
Chen Wangeng, Ma Yongfa, Zhou Aiqing. Observation on the safety of domestic ACYW135 group of epidemic cerebrospinal meningitis polysaccharide vaccine[J]. Modern Preventive Medicine, 2011, 38(24): 5131-5132.

[8] NIH. ICCVAM test method evaluation report: Validation status of five in vitro test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products[EB/OL]. 2008. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/pyrogen/pyr_tmer.htm.

[9] 张媛, 蔡彤, 高华, 等. ACYW135群脑膜炎球菌多糖疫苗人新鲜全血体外热原检测方法适用性考察[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(11): 983-986.
Zhang Yuan, Cai Tong, Gao Hua, et al. The suitability of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine for human whole blood in vitro pyrogen test[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2015, 50(11): 983-986.

The suitability of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine for human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) *in vitro* pyrogen test

CAI Tong, ZHANG Yuan, HE Qing, LIU Qian, DU Ying, CHEN Chen, GAO Hua

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract To investigate the suitability of meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccines for human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in vitro pyrogen test (IL-6), 10 batches of vaccines from different manufacturers are collected. The recovery is determinated by human PBMC- IL-6 *in vitro* pyrogen test with spiking bacterial endotoxin. The recovery of 10 batches of vaccines is between 50%—200%, and the test solutions are at a dilution less than the maximum valid dilution (MVD). The results show that all the 10 batches of vaccines are qualified products in the pyrogen test. The meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine is suitable for the human PBMC- IL-6 *in vitro* pyrogen test to control the pyrogen.

Keywords human peripheral blood mononuclear cell; pyrogen test; meningococcal groups ACYW135 polysaccharide vaccine

(责任编辑 陈广仁)