

黏液素對於流行性乙型腦炎病毒 小白鼠試驗感染的作用

戚迦陵 戚景彝 劉雋湘

(中央生物製品研究所, 北京)

自從 Miller 氏^[1]發現胃黏液素能够加強淋病雙球菌對於試驗動物之致病力以後, 至今已經證明黏液素對於若干其他病菌亦有同樣的作用, 並且在作用的機轉方面也有許多學者曾加探討^[2-7]。關於黏液素對於病毒的作用, 雖然文獻中也有一些記載^[8-9], 但其對於流行性乙型腦炎病毒之作用則尚未見有所報道。本文作者在研究流行性乙型腦炎免疫血清的效力試驗時, 發現黏液素有增強腦炎病毒對於小白鼠之致病力的作用, 並且這一作用可以應用於保護力試驗。此點作者前已加以報道^[10], 茲再將黏液素對於小白鼠試驗感染之作用的有關試驗結果介紹於後, 以供同道們的參考。

材料與方法

(一) 黏液素(Mucin)

經驗證明不同規格或不同牌號及批號的黏液素作用往往相差甚遠, 故試驗用的黏液素必須經過選擇及標定然後固定一批使用, 切不可隨意更換。本試驗中所用的黏液素係 Armour 廠出品第 C 10809 批。

懸液的製備方法如下: 取黏液素放入乳鉢內, 先加少量蒸餾水研磨使勻, 然後一面研磨一面加蒸餾水, 最後使成 3% 均勻懸液, 經過 3 層紗布濾過後裝入玻璃管內, 用高壓蒸汽 10 磅 15 分鐘滅菌, 保存於 4°C 冰箱內待用。製成的懸液最多保存 2 週, 超過 2 週或滅菌 2 次以上者效能減退。臨用前每毫升加 1 N NaOH 0.015 毫升, 使 pH 約成為 7.5。

(二) 病毒懸液的製備

1. 毒種: 本試驗所用毒種均為流行性乙型腦炎病毒京衛研₂。
2. 病毒懸液: 用毒種注射小白鼠, 待發病後收取其腦用 10% 滅能健兔血清於玻

璃組織研磨器內研磨使成 10% 勻懸液,以每分鐘 2,000 轉的速度離心沉澱 10 分鐘,廢棄沉澱,取上清液用 10% 滅能兔血清作 10 倍遞續稀釋。黏液素的病毒懸液係將上述病毒稀釋液再用 3% 黏液素作 10 倍稀釋而成(例如黏液素 10^{-3} 的滴度係 10% 滅能健兔血清稀釋的 10^{-2} 病毒懸液 1 毫升加到 3% 黏液素 9 毫升內)。製成之病毒懸液立即用以注射。

(三) 病毒滴定

用不同稀釋液(10%滅能健兔血清或 3% 黏液素)稀釋的各種稀釋度的病毒懸液腹腔注射小白鼠各 5 隻,每隻注射 0.3 毫升,注射後觀察 14 日,逐日記錄死亡,按 Reed-Muench 二氏法計算 50% 致死量(LD_{50})。

(四) 腹腔注射病毒後腦內病毒之測定

用不同稀釋液稀釋之各種稀釋度的病毒懸液,各注射小白鼠 20 隻於腹腔內每隻 0.3 毫升。注射後每隔一定時間取小鼠 3 隻放血至死,取其腦研磨成為 10% 懸液,按腦腔病毒滴定法滴定。

試 驗 結 果

(一) 用黏液素懸液或滅能健兔血清作為病毒稀釋液,在不同體重的小白鼠腹腔內行病毒滴定:

屢次試驗證明用 3% 黏液素稀釋病毒較用 10% 滅能健兔血清稀釋者致病力為強。此種現象在體重 7—9 克的小白鼠內雖然已可判明,但不如在體重 16—18 克的小白鼠內明顯。試驗結果見表 1。

表 1 3%黏液素病毒懸液或 10% 健兔血清病毒懸液腹腔注射
對於不同體重的小白鼠之致病力的比較

病 毒 稀 釋 液	小 白 鼠 體 (克)	病 毒 稀 釋 度 *									LD_{50}
		10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	
3%黏液素	16—18	—	—	—	5/5	3/5	4/5	3/5	1/5	0/5	6.803
10%兔血清	16—18	5/5	5/5	2/5	2/5	1/5	0/5	—	—	—	3.444
3%黏液素	7—9	—	—	—	—	—	5/5	5/5	4/5	0/5	8.375
10%兔血清	7—9	—	—	5/5	4/5	5/5	5/5	4/5	0/5	—	7.25

* 表內數字的分母表示接種動物數,分子表示死亡動物數。

— 表示未作。

(二) 不同稀釋度的病毒懸液，腹腔注射小白鼠後，病毒侵入腦組織之時間及腦內病毒之測定：

用3%黏液素稀釋之不同稀釋度的病毒懸液，注射於體重7—9克的小白鼠腹腔內，每隻0.3毫升。注射後按時測定其腦內病毒量。結果表明病毒於腹腔接種後1小時即已侵入腦內，但似乎並不立即繁殖，直到十餘小時之後腦內病毒始見增加(表2)。

表2 不同稀釋度的黏液素病毒懸液腹腔感染後腦內病毒測定的結果

病 毒 注 射 後 小 時	3%黏液素稀釋病毒稀釋度				
	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6
1	(LD ₅₀) 2.834	(LD ₅₀) 1.625	(LD ₅₀) 0.625	(LD ₅₀) 0.6	(LD ₅₀) 0.625
5	1.834	2.375	0	0	0
9	1.375	0.75	0	0	0
13	2.167	0.635	1.375	0.635	0
17	1.682	1.167	1.5	1.375	1.625
21	2.834	2.5	2.375	1.5	1.167

0 係表示測定陰性結果。

(三) 3%黏液素與10%滅能兔血清稀釋病毒腹腔感染後，腦內病毒測定結果之比較：

試驗結果表明用黏液素或用兔血清稀釋病毒，如感染量大則結果無大區別，但如感染量小則黏液素稀釋者腦內發現病毒的時間較早。試驗結果見表3。

討 論 及 總 結

(一) 試驗證明3%黏液素有增強流行性乙型腦炎病毒對小白鼠的致病力的作用。此種作用，對於體重7—9克的小白鼠，不如對於體重16—18克的小白鼠明顯；對於前者感染力約可增加10倍，對於後者則可增加1,000至10,000倍。1949年張迺初氏^[11]及1950年王逸民等氏^[12]均曾論及用滅能兔血清稀釋流行性乙型腦炎病毒，腹腔注射小白鼠，其感受性與小白鼠的體重及年齡有關：其50%致死量對7—9克小白鼠有時可達 10^{-9} 以上，但對於16—18克小白鼠則僅在 10^{-3} 左右。在我們經驗中，如用滅能兔血清稀釋，則50%致死量對於體重16—18克小白鼠，亦僅能達到 10^{-3}

左右,但如用 3% 黏液素代替兔血清,則 50% 致死量可達到 10^{-6} 至 10^{-7} 上下。

表 3 黏液素或減能兔血清稀釋病毒腹腔感染體重 7—9 克小白鼠
後腦內病毒測定結果的比較

病 毒 稀 釋 液	病 毒 稀 釋 度	腹 腔 感 染 後 腦 內 病 毒 滴 定				
		24小時	48小時	72小時	96小時	120小時
3% 黏 液 素	10^{-3}	(LD ₅₀) 2.17	(LD ₅₀) 3.5	(LD ₅₀) 7.0	(LD ₅₀) 8.5	(LD ₅₀) 9.7
	10^{-4}	1.9	2.5	6.8	8.0	8.5
	10^{-5}	1.45	3.16	5.5	8.26	8.4
	10^{-6}	1.3	2.5	4.4	6.4	7.8
10% 減 能 兔 血 清	10^{-3}	2.66	3.5	6.1	8.5	7.4
	10^{-4}	2.2	2.5	6.1	8.2	7.84
	10^{-5}	2.0	2.682	4.84	7.5	7.5
	10^{-6}	0	0	0	4.834	5.626

0 表示陰性結果。

(二) 腹腔注射病毒後,腦內病毒滴定的結果證明,如感染量大,則無論用黏液素或兔血清稀釋,病毒均於 24 小時內侵入腦內,並開始繁殖。但如感染量小則用黏液素稀釋病毒,其侵入腦內之時間遠較用兔血清稀釋者為早。

(三) 用 3% 黏液素稀釋病毒腹腔注射,感染量在 10^{-3} 以上時則注射後 1 小時,病毒已在腦內發現,但似乎並不立即增多,在十餘小時之後腦內病毒量始見上升。

(四) 關於在作腦炎疫苗或血清的保護力試驗時,用黏液素稀釋病毒腹腔注射法代替兔血清稀釋病毒腦腔注射法的可能性與優點,作者前已論述^[10],而根據一年來在流行性乙型腦炎免疫血清保護力試驗上的經驗,作者認為用這一方法檢定血清所得結果,是比較明顯而易於判斷的。

誌謝 湯飛凡所長對本文諸多指正,特此誌謝。又參加這項工作的尙有何式媛、陳維玲、潘淑敏三位同志。

參 考 文 獻

- [1] Miller, C.P. *Science*, **78**: 340, 1933.
- [2] McLeod, Ch. *Am. J. Hyg., Sec. B.*, **34**: 41, 1941.
- [3] Anderson, C. G. and Oag, R. K. *Brit. J. Exptl. Path.*, **20**: 25, 1939.
- [4] Ercoli, N., Lewis, M. N. and Harker, E. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **59**: 273, 1945.
- [5] Nungester, W. J., Wolf, A. A. and Jourdonais, L. F. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **30**: 120, 1932.

1期 戚迦陵、戚景彝、劉雋湘:黏液素對於流行性乙型腦炎病毒小白鼠試驗感染的作用 81

- [6] Silverthorne, N. *Can. Pub. Health J.*, **29**: 233, 1938.
- [7] Fothergill, L. D., Dingle, J. H. and Chanderler, C. A. *J. Exptl. Med.*, **65**: 721, 1937.
- [8] Nungester, W. J., Jourdonais, L. F. and Wolf, A. A. *J. Infect. Dis.*, **59**: 11, 1936.
- [9] Olitzki, L. *Bact. Rev.*, **12**: 149, 1948.
- [10] 戚景彝、戚迦陵、劉雋湘:微生物學報**1**: 202, 1953.
- [11] 張迺初:中華新醫學報,**1**: 42, 1950.
- [12] 王逸民、柳元元、黃禎祥:中華醫學雜誌**38**: 1066, 1952.

THE EFFECT OF MUCIN ON EXPERIMENTAL INFECTION WITH EPIDEMIC TYPE B ENCEPHALITIS VIRUS IN WHITE MICE

CHIH, C.L., CHIH, C.E. AND LIU, C.H.

National Vaccine and Serum Institute, Peking.

1. It has been proved that mucin has an enhancing effect on experimental epidemic type B encephalitis infection in white mice. The effect is more marked in older mice than in younger ones. As previously reported by Chang [11] and Wong, Liu and Huang [12] and further confirmed by our experience, the LD_{50} for mice of 16 - 18gm. body weight lies usually around 10^{-3} when the virus was suspended in inactivated normal rabbit serum and inoculated intraperitoneally. But, as shown by our experiments, when the virus was suspended in 3 per cent mucin instead of rabbit serum a 1,000 to 10,000 fold increase in infectivity has been observed, viz, $LD_{50}=10^{-6}$ to 10^{-7} .

2. Groups of mice were inoculated intraperitoneally with virus suspensions of various concentrations, and titrations were made on their brain for virus content at different intervals. It was revealed that when the inoculum was heavy, virus could be found to have entered the brain tissue within 24 hours after inoculation no matter the virus suspension was made with rabbit serum or mucin emulsion. However, when the inoculum was small, the effect of mucin became evident. Mice were inoculated intraperitoneally with the same amount of virus suspension, namely, 0.3 ml. of 10^{-6} dilution, but using different diluents, i.e., 10 per cent inactivated normal rabbit serum or 3 per cent mucin respectively. No virus could be detected in the brain of mice receiving virus suspension in rabbit serum during the first 96 hours, while, definite propagation of virus was demonstrated in the brain of mice receiving virus suspension in mucin within 24 hours after inoculation. Furthermore, when mice of 7-9 gm. body weight were inoculated intraperitoneally with epidemic type B encephalitis virus suspension in 3 per cent mucin, virus could be detected in the brain as early as one hour after inoculation, provided the inoculum was heavy enough. (viz, 10^{-3}).

3. The practical application of mucin in the potency test of epidemic type B encephalitis immune serum and, possibly of vaccine as well, has been suggested.