

流行性乙型腦炎病毒血凝試驗

II. 鼠腦內血凝抑制物的研究

周 培 安

(中國協和醫學院細菌科)

文獻中^[1,2,3,4,5,6,7]曾指出鼠腦內含有嗜神經性病毒的血凝抑制物,但此種抑制物究屬何種物質,尚未見有報導。作者于上文^[3]中曾提及這種物質,能被適當脂溶媒除去之,因而認為可能是脂類物質。本文的目的是在進一步報導有關這種抑制物其他的性質、鼠腦內抑制物的含量、與血凝滴度的關係、中和病毒能力等的一些研究結果。

實驗及結果

實驗一 沉淀速度,冰凍溶化對鼠腦內所含抑制物的影響:

用中山株病毒,同時感染乳鼠(日齡 10 天左右)及成鼠腦(體重 12—14 克)數批,發病後取腦用 0.01M 磷酸鹽緩衝鹽水(pH7.0),做成 10% 的腦懸液,放冰箱內 3—16 小時後,分別用低速(2,000 轉/分)沉淀 10 分鐘或高速(10,000 轉/分)沉淀 1 小時,以比較其上清液的血凝滴度及凝集現象規則與否。結果如表 1 所示,同一批乳鼠或成鼠的血凝滴度,高速沉淀比低速沉淀的高,而且可以看出,成鼠腦懸液的凝集現象,經高速沉淀後,較為規則^[3]。

高速沉淀的上清液比低速沉淀者滴度高、凝集規則的原因,可能是由於經高速沉淀後,懸液內的一部分抑制物被沉下去了,因而血凝滴度增高,凝集現象也較規則。由此我們可以推論抑制物的顆粒比血凝素顆粒大,這點與 Sabin 氏的報導相符合^[1]。

感染鼠腦懸液以高速遠心沉淀後,其上清液經冰凍溶化一次後,血凝性能由強陽性(滴度 1:81,920)變為陰性。再經高速沉淀一次後,雖又可出現血凝現象,但很不規則;如經苯處理乾燥後,則出現了很規律的凝集現象(滴度 1:20,480)。故冰凍溶化,使鼠腦懸液失去血凝作用的原因,並不是由於血凝素被破壞,而可能是由於釋放出了更多的抑制物,而這種抑制物可用高速沉淀或苯處理除去其一部分或大部分。

表 1 沉淀速度对鼠脑内所含抑制物的影响

鼠齡	血 凝 滴 度																				
	低 速 沉 淀 上 清 液										高 速 沉 淀 上 清 液										
	40*	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960
乳鼠	4	4	4	4	4	4	4	1	-	-	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	-
成鼠	-	-	±	4	4	±	2	-	-	-	-	4	4	1	4	4	4	1	-	-	-

注: (*)稀释倍数的倒数, (4, 3, 2, 1)凝集强度, (±)可疑, (-)不凝集。

实验二 感染鼠脑与健康鼠脑中血凝素及血凝抑制物的关系:

将中山株感染之成鼠脑, 分别用 pH 8.4 及 pH 6.5 的 0.01 M 磷酸盐缓冲盐水, 做成 10% 的悬液。经低速离心沉淀一次后, 取出上清, 留出一部分外, 其余的(的)分成两份, 一份高速沉淀两次, 分别收集其上清液及两次之沉淀物。另一份用苯处理(处理法同上文^[8]所述), 收集全部中间层乳酪样物质, 并将下层悬液制成干燥血凝素, 然后将以下各种悬液进行血凝及血凝-抑制试验。

1. 低速沉淀上清液。
2. 高速沉淀上清液。
3. 苯处理后干燥血凝素, 用磷酸盐缓冲盐水稀释至原液量。
4. 两次高速沉淀后之残渣, 在乳钵内磨碎, 以磷酸盐缓冲盐水, 稀释至原液量(不能获得很均匀的悬液)。
5. 苯提出之乳酪样物质, 在乳钵内磨碎, 以磷酸盐缓冲盐水, 稀释至原液量(譬如乳酪样物质, 是用 10 毫升的鼠脑悬液提出的, 即加缓冲液 10 毫升)。(所制成的悬液很不均匀。)
6. 健康成鼠脑低速沉淀上清液。
7. 健康成鼠脑用苯处理干燥后, 以磷酸盐缓冲盐水稀释至原液量。

将上列各悬液, 按前文所述的方法^[8], 进行血凝试验。测定其血凝滴度后, 加热 56°C 30 分钟, 以破坏其血凝素, 再重复作一次血凝试验, 测定其是否已完全被破坏, 然后再进行血凝抑制试验。

血凝抑制试验法: 将各种鼠脑悬液, 按倍比稀释, 每管 0.25 毫升, 加血凝素 0.25 毫升(含 8 单位)。混合后, 放于冰室(8°C)内 30 分钟, 然后取出加 0.25% 的鸡血球悬液 0.5 毫升, 继续放置在 8°C 2 小时, 观察结果。其最高稀释度完全不凝集者, 为抑制滴度(滴度只算被用做抑制试验悬液之稀释倍数)。

表2 感染与健康鼠腦懸液的血凝, 血凝-抑制滴度

菌 株	鼠腦懸液	pH	血 凝					滴 度					抑 制					滴 度					血凝素 對照					
			未 加		加 熱 后			未 加		加 熱 后			未 加		加 熱 后			未 加		加 熱 后								
			20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	81920	
中 山 株 感 染	低 速 上 清	8.4	±	1	2	4	4	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	2	4	4	4	4	4	4
		6.5	—	—	4	4	4	—	—	—	3	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	3	4	4
	高 速 上 清	8.4	1	4	4	4	4	—	—	—	—	4	—	1	0	—	—	—	—	—	1	3	4	4	4	4	4	4
		6.5	—	2	4	4	4	±	—	—	1	±	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	1	4	4	4	4
	未處理干燥 后之稀釋液	8.4	4	4	4	4	4	3	1	±	—	—	—	—	0	—	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		6.5	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	高 速 沉 淀 液	8.4	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	1	3	4	4	4	4	4	4	4	4
		6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	2	—	4	—	1	—	—
	未 提 出 物	8.4	4	4	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	2	1	1	—	4	—	4
		6.5	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	3	2	4	4	4	4	2	—	—	—	
健 康 鼠 腦	低 速 上 清	8.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	
		6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	1	1	2	3	4	4	4	4	4	4	4	
	高 速 上 清	8.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0±	±	1	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0±	±	1	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	未處理干燥 后之稀釋液	8.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		6.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
協 3 株 感 染	低 速 上 清	8.4	4	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	1	2	3	4	4	4	4	4	4	

(±)未加熱, (0)滴度<1:20, (—)沒有凝集。

結果如表 2 所列,可見:

1. 用 pH 8.4 的緩沖液所制成的低速、高速沉淀感染鼠腦懸液的上清液,在血凝滴度方面較用 pH 6.5 的緩沖液所制成的為高,但二者都有凝集不規則的現象,而在抑制滴度方面則相反,即 pH 6.5 的比 pH 8.4 的高。經苯處理後之干燥血凝素,其血凝與血凝抑制滴度,亦因原液之酸鹼度不同,而有很大區別。例如 pH 8.4 的懸液,血凝滴度為 1:320,凝集現象規則,而抑制滴度為 <1:20;但 pH 6.5 的原液,血凝滴度 <1:20,而抑制滴度為 1:160。

2. 低速沉淀上清液的血凝滴度較高速沉淀上清液的略低,而抑制滴度則略高。

3. 高速沉淀的沉渣與苯提出物,因不能做成均勻懸液,故抑制試驗呈不規則現象,但大致可看出 pH 6.5 的較 pH 8.4 的抑制滴度高。

4. 健康鼠腦懸液之低速沉淀(2000 轉/分)上清液,不論加熱與否,抑制作用都非常微弱;而經苯處理干燥後之健康鼠腦稀釋液,則毫無抑制作用。

由上面的結果,可以證明下列數點:

1. 鼠腦內存在的抑制物,被病毒感染過者較多,而健康鼠腦內中則很少。可能宿主細胞受病毒感染後而裂解,因之易于放出抑制物,或系宿主細胞受病毒感染後,改變其新陳代謝,因之產生較多的抑制物。

2. 鼠腦內的抑制物,用 pH 6.5 的磷酸鹽緩沖鹽水浸出者較 pH 8.4 的多,此點目前尚難解釋。

3. 用苯處理干燥後之感染或健康鼠腦懸液之稀釋液,在 1:20 稀釋時,已毫無抑制作用,故苯能除去抑制物,已無疑問。由此證明,這種抑制物,可能系脂類物質。同時在試驗中,我們曾推想血凝滴度低的菌株,可能由于抑制物多的緣故。

4. 用協 3 株病毒,進行了對照試驗,結果正與此相反(見表 2),其血凝滴度低(1:40),抑制滴度也低(1:160),關於為什麼不同菌株具有不同的血凝,血凝-抑制的性質目前尚難解釋;至於血凝性能,在我們的部分實驗中,似與感染滴度有關。

實驗三 振盪與抑制現象的關係:

在實驗中用感染成鼠腦懸液的低速或高速遠心沉淀後的上清液做血凝試驗時,在 4—8°C 下放置 2 小時後,經常發現凝集不規則,或完全不凝集,但將試管振盪,使沉于管底的血球重新成為均勻懸液時,再放于室溫下 90 分鐘,則見原來凝集不規則的,變為規則了;完全不凝集的出現了凝集現象(見表 3)。

這一實驗的一部分與蘇聯學者 А. К. Шубладзе 氏^[13],關於抑制物抑制血凝的機轉,可能是血凝素吸附在抑制物上的論點相吻合,我們想鼠腦懸液內的血凝素,吸附在

抑制物上时,則不能与血球作用,而不能使血球凝集;当振盪后,血凝素脱离了抑制物,可能它对血球的親和力比对抑制物的大,优先地同血球作用了,因此又出現了血凝現象;又因抑制物所吸附血凝素的量不同,在操作过程中,由于不同程度的振盪,使被吸附的血凝素,在不同程度上,从抑制物上游离出來,而使試管内游离的血凝素分配不規則,因此發生的凝素現象也就不規則了。

表 3 血凝反应中振盪与抑制現象的关系

菌 株	振盪	滴 度											
		40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	
中 山	{	前	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		后	±	4	4	4	4	1	—	—	—	—	—
中 山	{	前	—	1	±	—	—	4	—	—	—	—	—
		后	—	4	4	4	1	4	1	—	—	—	—
京 衛 研	{	前	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		后	4	4	4	4	4	1	—	—	—	—	—
协 10	{	前	—	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—
		后	4	4	2	—	—	—	—	—	—	—	—

实验四 鼠腦內抑制物中和病毒的試驗:

为了研究鼠腦血凝抑制物,能否中和病毒,借以达到治療的目的,我們進行了这个試驗。用下列各种鼠腦懸液,按 Olitsky & Casals 氏法^[9],与中山株病毒,進行中和試驗(小白鼠体重 12—14 克,腦內注射)。

1. 苯处理干燥后的 10% 的健康鼠腦磷酸鹽緩冲鹽水稀釋液,加热 56°C 30 分鐘, pH 8.4。

2. 10% 健康鼠腦磷酸鹽緩冲鹽水低速沉淀上清液: (1) 加热 56°C 30 分鐘; (2) 不加热。

表 4 血凝抑制物中和試驗的結果

	LD ₅₀	中和指数的对数
病毒+苯处理后之健康鼠腦稀釋液 pH 8.4 (加热)	10—5.5	
病毒+健康鼠腦低速沉淀上清液 pH 8.4 (加热)	10—5.33	0.17
病毒+健康鼠腦低速沉淀上清液 pH 6.5 (加热)	10—5.0	0.5
病毒+健康鼠腦低速沉淀上清液 pH 8.4 (不加热)	10—4.66	0.84
病毒+感染鼠腦低速沉淀上清液 pH 8.4 (加热)	10—5.5	0
病毒+感染鼠腦低速沉淀上清液 pH 6.5 (加热)	10—6.0	-0.5

結果如表 4 指出,各組中中和指数最高的为健康鼠腦低速沉淀上清液,但也只有 $10^{0.17}$ — $10^{0.84}$,而感染鼠腦低速沉淀上清液,不僅毫無中和作用,且 LD₅₀ 較病毒加苯处理

后之健康鼠腦稀釋液的一組高，故总的說來，此种血凝抑制物，似無中和病毒的作用，与文献上的報導大致相符，例如 Casals & Olitsky^[10] 用正常鼠腦的醋酮-乙醚或氯仿-甲醇所提出的物質，只能稍稍保护小白鼠对苏联春夏型腦炎病毒的感染（按鼠腦重：稀釋液 = 1:4 的稀釋度时，中和指数为 $10^{0.88}$ — $10^{1.8}$ ）；Lyle B. Fastier^[7] 用正常鼠腦懸液及其醋酮-乙醚提出液，对 GDVII 株病毒，沒有中和作用。

同时从此种抑制物能抑制病毒的血凝作用，但不能中和它的感染力的事实，也可以說明病毒的血凝素和它能引起感染的部分是不同的。大久保伊昭^[11] 保存感染鼠腦懸液的过程中，从血凝滴度与感染滴度 (LD_{50}) 下降的不平衡，及 Sabin 氏^[1,2] 与波多野基一氏^[12] 从用高速离心沉淀及超濾过法可以分开血凝素与感染部分的結果來說明血凝素与感染部分不是同一物質的論点，也是符合的。

总 結

1. 感染鼠腦的懸液經高速沉淀后的上清液比低速的血凝滴度高，凝集現象較規則；但当冰冻溶化一次后，都变为陰性。
2. 鼠腦內存在的抑制物，被病毒感染过的較多，而健康鼠腦內者極少，用 pH 6.5 的磷酸鹽緩冲鹽水浸出的較 pH 8.4 的同样溶液浸出者多。
3. 血凝滴度低的菌株，經實驗証明血凝抑制滴度也低，原因未明。
4. 用感染成鼠腦的懸液，做血凝試驗时，常發生不凝集或凝集不規則的現象，但將含懸液及血球混合液的試管重新振盪，使管內血球再成为均匀懸液后，繼續在室温下放置 90 分鐘时，又可出現血凝或凝集現象規則化了。
5. 感染鼠腦抑制物，無中和病毒的作用。

参 考 文 献

- [1] Sabin, A. B. & Buescher, E. L. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **74**: 222, 1950.
- [2] Sabin, A. B. *Federation Proc.* **10**: 573, 1951.
- [3] Casals, J. *J. Imm.* **70**: 271, 1953.
- [4] Chanock, R. M. & Sabin, A. B. *J. Imm.* **70**: 312, 1953.
- [5] Olitsky, P. K. & Yager, R. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **71**: 719, 1949.
- [6] 大久保伊昭: 十全医学雜誌 **55**(5): 607, 昭和 28 年。
- [7] Fastier, L. B. *J. Imm.* **66**: 87, 1951.
- [8] 周培安: 微生物學報 **4**(1): 67, 1956.
- [9] Olitsky, P. K. & Casals, J. *J. A. M. A.* **134**: 1224, 1947.
- [10] Casals, J. & Olitsky, P. K. *Science* **108**: 690, 1948.
- [11] 大久保伊昭: 十全医学雜誌 **55**(5): 597, 1953.
- [12] 波多野基一, 森亘敬: ウイルス, リケツチア線和雜誌 **4**(2): 104, 1954.
- [13] Шублянов А. К. *Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунологии* **10**: 62, 1954.

HEMAGGLUTINATION REACTION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS II. STUDY OF THE INHIBITOR IN THE MOUSE BRAIN

CHOU PEI-AN

Department of Bacteriology, Chinese Union Medical College, Peking

In preparing the antigen for hemagglutination reaction of the encephalitis virus, the inhibitor contained in the mouse brain has always proven of great inconvenience. In the present communication, special efforts to elucidate the nature of the inhibitor are reported the results of this experiment can be summarized as follows:

1. After high-speed centrifugation (10,000 RPM) the hemagglutination titre of the mouse brain suspension was higher, and the reaction more regular than the same suspension after low-speed centrifugation (2,000 RPM). Once frozen however, both showed negative hemagglutination reaction.

2. Mouse brains which were obtained from infected animals contained a larger amount of hemagglutination inhibitor than those obtained from normal animals. At the same time, the inhibitor could be removed to a greater extent by buffer of pH 6.5 than that of 8.4.

3. There seems to be a rough parallelism between hemagglutination titre and virulence, the nature of this relationship remaining unexplained.

4. The experience of A. K. Shubladze has been confirmed that after being shaken for some time and then placed at room temperature for 90 minutes the tubes containing the red cells and hemagglutinating antigen prepared from the brain of adult mice were exempt from the irregularity that had previously existed.

5. Inhibitor from infected mouse brain showed no neutralization activity for the virus.