

用肉渣猪胃消化培养基試制破 伤風毒素及类毒素之报告*

李 茂 陶 吉 昌

(昆明生物制品所)

破伤風毒素及类毒素制造,往往由于菌种和培养条件不同,所得之結果也有异。我們赞同 1951 年陈立予等倡議,利用肉渣廢料作破伤風产毒培养基^[1],其优点是成份簡便易得,又均是国产原料。經我們將处方的成份略加修改和补充后(如原处方采用肉膏,我們則改以等量肉浸液代之,并加入适当葡萄糖等),經六批产毒試驗观察的結果,其产毒力均較氏等获得之結果約高一倍。經制成类毒素后,其結合力單位最低能达 60 个,最高者可至 105 个。以豚鼠作免疫力測定,有 50% 以上能抵抗攻击毒素 5,000 个最小致死量 (M. L. D.)。茲將改进后的制造方法及試驗結果分別叙述于后:

一. 肉渣猪胃消化培养基制造

此培养基主要的改良成份,是以等量肉浸液与肉渣猪胃消化液所組成,其色澤为澄清透明的棕黄色液体, pH 7.4 左右,总氮量 (Kjeldahl 方法) 为 4.06—5.65 毫克/毫升,氨基氮 (Sørensen 氏方法) 为 0.35—0.7 毫克/毫升,蛋白胍含量 (莫斯科莫契尼可夫研究所方法) 为 2—4%。整个培养基制造分:(1) 肉浸液制备;(2) 肉渣猪胃消化液制备;(3) 产毒培养基配合等三个程序。詳細制法如下:

(1) 肉浸液:

碎牛肉	5,000 克
蒸餾水	5,000 毫升

选用中等以上健康牛之瘦肉,剔去脂肪筋腱,切成小块絞碎。称取碎肉 5,000 克于搪瓷桶內,加入蒸餾水 5,000 毫升,混合。置 2—10°C 冷室浸泡 16—18 小时后,取出倒入鋁質蒸汽煮鍋內,預加蒸餾水为总量的 $\frac{1}{10}$ 作蒸發量,用蒸汽煮沸 20 分鐘,以絨布濾清,再以蒸餾水补足至原量(至 5,000 毫升)。用 20% 氫氧化鈉溶液矯正 pH 7.0,盛于 10

* 1956 年 5 月 11 日收到。

升玻璃瓶中, 高压灭菌 10 磅 30 分鐘, 保存于冷室备用。濾出之肉渣留与猪胃作消化用。

(2) 肉渣猪胃消化液:

肉渣(利用以上制肉浸液留下者)	2,000 克
猪胃(絞碎机絞碎)	500 克
蒸餾水(48—50°C)	8,000 毫升
濃鹽酸(比重 1.19)	80 毫升

取新鮮健康猪胃, 剔去脂肪, 用冷开水輕輕洗淨, 切成小块絞碎, 称取肉渣 2,000 克及碎猪胃 500 克, 混合裝于玻璃瓶中, 加入 48—50°C 蒸餾水 8,000 毫升(于蒸餾水內預先加入 80 毫升鹽酸), 充分混合, 放于 43—50°C 水浴中消化, 在消化过程中, 前 7 小时內, 每 30 分鐘攪拌混合一次, 消化至 16—18 小时, 取出放于水浴中加热 80°C 5 分鐘。靜置 18—24 小时, 用虹吸法吸取清液濾清, 用 20% 氫氧化鈉溶液矯正 pH 至 7.0, 加热 80°C 5 分鐘, 濾清裝于玻璃瓶內, 經 100—115°C 灭菌 30 分鐘, 保存冷室备用。

(3) 产毒培养基配合:

肉浸液	2,000 毫升
肉渣猪胃消化液	2,000 毫升
20% 氯化鈣水溶液	22 毫升
30% 醋酸鈉水溶液	40 毫升
20% 葡萄糖水溶液	适量

取濾清之肉浸液及肉渣猪胃消化液各 2,000 毫升, 混合后預加蒸餾水 400 毫升为蒸發量, 加入 20% 氯化鈣溶液 22 毫升混合, 用 20% 氫氧化鈉矯正 pH 至 8.1—8.2, 加入 30% 醋酸鈉溶液 40 毫升, 混合, 裝于搪瓷桶內, 加热 5 磅 20 分鐘, 稍冷濾清, 用 25% 冰醋酸矯正 pH 至 7.4, 分盛于两个 3 升球瓶中, 灭菌 10 磅 30 分鐘后, 趁热时以無菌手續加入 20% 葡萄糖溶液(先經 10 磅 30 分鐘灭菌) 50 毫升于一瓶之培养基中, 然后将另一瓶的培养基并入, 以滿至 3 升球瓶頸部約 10 厘米处, 此时培养基总量約为 3,300 毫升, 然后将此培养基放置冷水中冷却至 45—50°C 后作接种用, 为保証質量, 以上每个制造过程所用的器皿, 均以 15 磅 30 分鐘灭菌。

二. 产毒試驗結果

采用上述的处方, 共制出 6 批培养基。所用的菌种系破伤風梭状芽孢杆菌, 京字 47 号菌株; 該菌种系保存于碎肉培养基內, 应用时将菌种仍移植于碎肉培养基內培育 18—24 小时。每 3 升球瓶的产毒培养基內接种菌液 1 毫升, 放置 36—37°C 温室培育 60—63 小时后, 用 Seitz 氏除菌器過濾。將濾出之毒素液以 17—19 克体重之小白鼠作最小致死量 (M. L. D.) 測定, 其 6 批产毒結果, 最低者为 450,000 M. L. D./毫升, 最高者可达 700,000

M. L. D./毫升, (見表 1)。

表 1 肉渣猪胃消化培养基產毒情况

批 号	培 养 基 質 量				培育時間 (小时)	产 毒 結 果
	总 氮 量	氨基氮量	蛋白陳量	pH		
32	5.46mg/ml	0.56mg/ml	4%	7.4强	63	600,000 M. L. D.
33	4.34mg/ml	0.35mg/ml	2%	7.4强	60	700,000 M. L. D.
34	5.46mg/ml	0.42mg/ml	2%	7.4	63	500,000 M. L. D.
35	4.06mg/ml	0.70mg/ml	4%	7.4强	62	600,000 M. L. D.
36	4.85mg/ml	0.70mg/ml	3%	7.4	60	600,000 M. L. D.
37	5.65mg/ml	0.68mg/ml	2%	7.4强	61	450,000 M. L. D.

三. 类毒素抗原性与免疫力試驗

取用以上制成的 6 批毒素, 分別的加入福馬林 0.37—0.4%, 置于 36—37°C 温室解毒 20—25 天, 可以完全脫毒。于此項类毒素內加入 0.4% 酚为防腐劑, 經除菌过滤后, 按照苏联生物制品法規方法, 进行抗原性与免疫力測定。

(1) 抗原性測定: 根据苏联法規檢定方法^[2], 所用标准破伤風抗毒素是中央生物制品檢定所于 1955 年發出的 0010 及 0011 批, 标准破伤風干燥毒素是中央生物制品檢定所 1955 年發出的“破毒 5 批”, 測定結果見表 2。

表 2 抗原性(結合力)試驗結果

批 号	32	33	34	35	36	37
結合單位/毫升	95	105	60	85	100	70

(2) 免疫力試驗: 取以上制出的 6 批类毒素, 分別注射于体重 300—400 克之豚鼠, 于每只豚鼠后腿皮下注射类毒素 5 毫升。免疫 30 天后, 將所免疫的豚鼠分为 5 組, 每組采用不同强度标准毒素(中檢所“破毒 5 批”标准破伤風干燥毒素)攻击, 第 1 組注射 100

表 3 6 批类毒素免疫力試驗結果統計

試驗 組別	类 毒 素 免 疫				标 准 毒 素 攻 击				死亡数	
	动物	只数	每只 剂量	途徑 免疫 天数	每只豚鼠剂量	观察 天数	健康 只数	豚鼠中 發病情况		
1	豚鼠	36	5毫升	皮下	30	100 M. L. D.	6—10	35	1 只發病可疑, 不能作中毒結論	
2	豚鼠	10	5毫升	皮下	30	1,000 M. L. D.	6—10	10		
3	豚鼠	2	5毫升	皮下	30	2,000 M. L. D.	6—10	2		
4	豚鼠	15	5毫升	皮下	30	3,000 M. L. D.	6—10	13	1 只局部發病, 1 只全身發病	
5	豚鼠	17	5毫升	皮下	30	5,000 M. L. D.	6—10	12	4 只局部發病, 1 只全身發病	
对照	豚鼠	22				1 M. L. D.	3—4			22

M. L. D. (法定規定量)^[2]; 第2組注射1,000 M. L. D.; 第3組注射2,000 M. L. D.; 第4組注射3,000 M. L. D.; 第5組注射5,000 M. L. D.; 對照組取健康豚鼠注射1 M. L. D.。為節省篇幅起見,不擬分別贅述,茲將6批各組試驗結果,作一綜合說明,見表3。

四. 結 論

1. 用京字47號菌株接種于此培養基中,經60—63小時的短時間培養,能獲得450,000—700,000最小致死量。

2. 將取得的毒素加入福馬林0.37—0.4%,放置36—37°C,在20—25天內,可以完全脫毒,將此類毒素作抗原性測定,每毫升有60—105個結合單位。以豚鼠作免疫力試驗,有50%以上免疫豚鼠能耐過5,000個毒素最小致死量。

王齊海所長與孫伯齡同志對本工作給予諸多鼓勵和指正,繆瑛英同志對培養基製造盡力殊多,特此一并致謝。

參 考 文 獻

- [1] 陳立予、劉士敏:大連衛生研究所彙刊第一卷,第三期,80—83頁(1951)。
 [2] 0057,蘇聯生物制品法規釋叢,破傷風類毒素與血清的製造及檢定法規,3—4頁(1955中央檢定所譯)。

THE USE OF STOMACH DIGEST OF MEAT RESIDUE FOR THE PREPARATION OF TETANUS TOXIN AND TOXIDS

LI MOU AND TAO CHIH-CHANG
Vaccine and Serum Institute, Kunming

Following the proposal made by Chen in the utilization of meat residue as an economical and satisfactory base in the medium for the preparation of tetanus toxin, we have now modified it and found it very satisfactory in routine production of this biological product as well as of its toxoid. The medium as now constituted consists of in addition to a stomach digest of meat residue, an equal amount of meat infusion (without peptone). Finally, glucose was added to a suitable proportion. The average yield in tetanus toxin by means of the above medium was 500,000 MLD for white mice and average yield of toxoid was 80 combination unit, which gave satisfactory immunizing potency in guinea pigs.