

# 流行性乙型腦炎病毒血凝性質的研究\*

王用楫

(衛生部生物製品研究所)

近數年來對一些嗜神經性病毒，在一定的條件下已證明能產生血凝現象。主要的條件為：血凝素的製備方法，稀釋液的種類及其氫游子濃度 (pH)，使用血球的種類，血凝進行時的溫度。

Hallaur 氏<sup>[1]</sup> 1947年曾報告在 4°C 綿羊血球能為腦心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis, Col. SK 及 Col. MM 毒株) 所凝集，這個事實為 Olitsky 及 Yager 氏<sup>[2]</sup> 所證實。以後 Labelle 及 Horsfall 氏又發現小鼠腦脊髓炎病毒 (Mouse encephalomyelitis GD VII 毒株)<sup>[3]</sup> 的鼠腦懸液在 4°C 能凝集人的 O 型血球。

1950年 Sabin 和 Buescher 氏曾發現流行性乙型腦炎病毒及聖路易腦炎、西尼羅病病毒及森林腦炎病毒對一日雞及綿羊血球亦有凝集現象<sup>[4,5]</sup>。1953年 Casals 和 Brown 氏用一些嗜神經性病毒的丙酮乙醚抗原<sup>[6]</sup>，其中除乙型腦炎病毒外，還有東方西方及委內瑞拉馬腦脊髓炎、聖路易腦炎以及西尼羅、黃熱病、登革熱等病毒同樣也發現對雞血球的凝集性質<sup>[7,8]</sup>。1954年朱錫華氏曾證實乙型腦炎抗原的血凝性質，並認為可用成雞血球代替雞血球做血球凝集及血凝抑制試驗<sup>[9,10]</sup>。1954年 Шубладзе 及 Вардосанидзе 氏在研究森林腦炎、乙型腦炎及腦心肌炎時曾採用了 15 種哺乳動物和鳥類的紅血球，放置在 4°，23° 和 37°C 的情況下，觀察血球凝集現象。據試驗結果只有雞血球及綿羊血球能為乙型腦炎病毒所凝集<sup>[11]</sup>。

1953年春作者曾以 Sabin 及 Buescher 氏所述的條件<sup>[4]</sup> 發現乙型腦炎病毒確有血凝現象。並證明如用普通鹽水所得的血凝素，滴度下降很快，一星期後即不能測知，如用 pH 8.0 的緩衝生理鹽水代替普通鹽水，則得到的血凝素較為穩定。為了瞭解 pH 對血凝素安定性之間的關係，1955年春作者以不同 pH 的緩衝鹽水，製備血凝素，並稀釋血凝素及血球，以不同溫度保存血凝素及進行血凝試驗，在進行乙型腦炎血清學工作中

\* 1956年10月3日收到。

也曾對血凝抑制試驗與中和試驗、補體結合試驗進行一些比較。現在把這些試驗結果彙報於後，以供同道者參考和指教。

## 材 料 和 方 法

### (一) 病毒

試驗中所用的流行性乙型腦炎病毒毒株係“47”。該毒株係 1945 年從在於乙型腦炎患者的腦髓中分離的，於 1953 年由蘇聯得到。使用時係收到後又傳遞十餘代了。

### (二) 小白鼠

病毒的傳遞及血凝的製備均係採用體重 12—16 克的小白鼠，腦腔接種 1:400 的鼠腦病毒懸液 0.04 毫升，待小白鼠發病後，取腦製成 10% 的懸液。

### (三) 血凝素的製備

在無菌條件下，採取發病小白鼠的腦組織，放到玻璃圓底球瓶內，以玻璃珠充分搗碎，至成糊狀為止。然後每腦按 4 毫升的分量加添稀釋液。這樣製成的腦懸液經 3,000 轉/分鐘的速度遠心沉澱 5 分鐘，取上清液保存，稱為 1:10 的血凝素。

### (四) 血球的準備

雞紅血球即雞於出殼以後 24 小時內採取的紅血球，綿羊紅血球係由綿羊頸靜脈採取。這兩種血球都是先採集至 Alsever 氏溶液內，經緩衝生理鹽水洗滌 3 次。最後按紅血球的體積加緩衝鹽水使成 10% 的懸液，保存冰箱中，使用時間不超過一週。用前再稀釋成所需用的濃度—0.25%。

### (五) 稀釋液

製備血凝素，稀釋血凝素，洗滌紅血球及配製紅血球懸液均係採用磷酸鹽系統不同 pH 值的緩衝生理鹽水。配製處方如下：

氯化鈉 (NaCl)	6.8 克
磷酸氫二鈉 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	(見下表)
磷酸二氫鉀 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	(見下表)
蒸餾水 (H <sub>2</sub> O) 加至	1,000 毫升

表 1 不同 pH 值緩衝生理鹽水磷酸鹽使用量

pH	6.0	6.4	6.8	7.2	7.6	8.0
磷酸氫二鈉 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.30	0.60	1.05	1.48	1.69	1.85
磷酸二氫鉀 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.53	1.24	0.81	0.43	0.20	0.10

緩衝生理鹽水以高壓蒸氣滅菌。

### (六) 血球凝集試驗方法

試驗在室溫中進行。選用管底均稱的小試管,依 Salk 氏法進行試驗<sup>[12]</sup>,每管盛稀釋液 0.5 毫升,然後第一管內加入適當稀釋度的血凝素,依次按 2 倍稀釋法稀釋下去,使每管不同稀釋度血凝素的含量都是 0.5 毫升。最後一管只加稀釋液沒有血凝素,作為對照管。每管加 0.25% 紅血球懸液 0.5 毫升,充分搖蕩後,安放於 37°C 溫箱中。至對照管出現血球沉澱時,記錄血凝試驗結果。

依血球凝集的程度把血球凝集結果區別為:“++++”,“+++”,“++”,“+”及“-”,取“++”作為血凝素滴度的終點。

### (七) 血凝抑制試驗方法

血清先以 4 倍量的氯仿處理<sup>[4]</sup>,以除去血清中非特異性的血凝抑制作用。試驗時從 1:10 開始依兩倍遞次稀釋,每管血清稀釋液為 0.25 毫升。然後加入血凝素 0.25 毫升,其中含有血凝單位 8 個。最後加 0.25% 血球,放於 37°C 溫箱。記錄結果同血凝試驗。

## 實 驗 結 果

### (一) 關於血凝滴度的試驗

據以往的報告<sup>[4,11]</sup>,知道乙型腦炎病毒懸液能凝集雛雞血球及綿羊血球,在這個試驗中,就採用這兩種血球來比較不同溫度對血凝滴度的影響。

用 pH 8.0 的緩衝鹽水製備 10% 的鼠腦病毒懸液——血凝素。然後依兩倍稀釋由 1:40 到 1:2560 共作 6 列試管,3 列加 0.25% 雛雞血球,另 3 列加 0.25% 綿羊血球,充分混合後分別放置於 37° (孵育箱)、18° (室溫) 及 4°C (冰箱) 中,各列血凝素的試驗結果如表 2。

表 2 血凝素在不同溫度的情況下滴度的比較

血凝過程中的溫度	使用血球種類	血凝素在下列稀釋度中的血凝現象							對照	血凝素的滴度
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560		
37°C (孵育箱)	雛雞	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	640
	綿羊	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	640
18°C (室溫)	雛雞	++++	+++	++	-	-	-	-	-	160
	綿羊	++++	++	++	-	-	-	-	-	160
4°C (冰箱)	雛雞	++++	++	-	-	-	-	-	-	80
	綿羊	+++	++	-	-	-	-	-	-	80

從表 2 可以看出,同樣的血凝素由於放置溫度的不同,所表現的滴度是有區別的。

在 37°C 血凝素的滴度為 1:640, 在 18° 和 4°C 時滴度則為 1:160 和 1:80; 但在同樣溫度的情況下同樣的血凝素, 用兩種血球所得到血凝滴度却是相同的, 如在 37°C 均為 1:640, 18°C 為 1:160, 4°C 為 1:80。附帶說明的, 用雞血球時, 血凝現象出現較早, 同時在試管所現的血凝現象也較清晰。

放置在 18° 和 4°C 的 4 列試管 (加雞血球及綿羊血球的各兩列) 於血凝現象出現後, 再次充分振蕩, 使已凝集或沉下的血球重新懸浮, 然後放置在 37°C 孵育箱內, 各管內的血球, 重新凝集, 四列試管中, 血凝素的滴度都達到 1:640。這個事實可以說明, 放置在 18° 和 4°C 的血凝滴度雖然較低, 並不是由於血凝素遭到了破壞, 而是由於沒有達到血凝所需的適宜溫度。一旦溫度轉為 37°C 仍可達到原來的滴度 (1:640)。

據這個試驗結果, 可以認為 37°C 是發生血凝現象的合適溫度。

## (二) 關於血凝素製備液及稀釋液不同 pH 值的試驗

1953 年作者曾多次依 Sabin 氏法<sup>[4]</sup>用普通生理鹽水製備乙型腦炎病毒的血凝素, 發現這樣製得的血凝素不很安定, 在 4°C 冰箱保存一週即不能測知滴度。當時在作者的實驗室內正在製造乙型腦炎疫苗的原液 (即用 pH 8.0 緩衝生理鹽水製造的 10% 受染鼠腦懸液), 用這種原液進行血凝試驗時, 不但有血凝現象發生而且血凝滴度保持的時間還可以延長; 從而就考慮到血凝素製備液的氫游子濃度可能是影響血凝性質主要因素之一。據各家的報告<sup>[4, 7, 10, 11]</sup>, 稀釋液的氫游子濃度是乙型腦炎病毒血凝素發生血凝重要條件之一。因而決定採用不同 pH 值的緩衝生理鹽水作為血凝素的製備液和稀釋液, 來進行血凝試驗。

在這個試驗中首先配製 pH 6.0, 6.4, 6.8, 7.2, 7.6, 8.0 的 6 種緩衝生理鹽水。然後以這 6 種液體作為血凝素製備液, 製成了 6 種血凝素, 保存在 4°C 冰箱內, 至 24 及 48 小時分別進行血凝試驗。當試驗時又以這 6 種緩衝生理鹽水作為血凝素稀釋液, 分別稀釋每一種血凝素至 1:40 的稀釋各一管, 然後加入雞血球進行血凝試驗。為保證試管內容的 pH 不受血球懸液的影響起見, 採用了與血凝素稀釋液 pH 相同的緩衝生理鹽水來洗滌和稀釋雞血球, 換句話說, 即用 6 種稀釋液分別洗滌及稀釋雞血球, 使同一試管內血凝素稀釋液與血球稀釋液的 pH 是相同的。

表 3 就是這個試驗的結果。據血凝素在冰箱保存至 24 小時的試驗結果, 可以看出, 6 種血凝素用 pH 範圍合適的液體稀釋時, 都能出現完全的 (++++) 血凝現象。前兩種血凝素係用 pH 6.0—6.4 的緩衝生理鹽水製備的, 稀釋液 pH 的合適範圍為 6.4—7.2; 後 4 種血凝素製備時, 所使用的緩衝生理鹽水的 pH 為 6.8—8.0, 稀釋液 pH 的合適範圍為 6.0—6.8。只有 pH 6.4 和 6.8 兩種稀釋液能使 6 種血凝素都出現完全的

表 3 不同稀釋液血凝試驗結果 I

(不同稀釋液製備血凝素對不同稀釋液稀釋血凝素及血球的交互血凝試驗結果)

血凝素製備與試驗的間隔時間	血凝素稀釋液的 pH	血球稀釋液的 pH	用下列 pH 的稀釋液製備血凝素 (稀釋度均為 1:40) 的血凝現象						對 照
			6.0	6.4	6.8	7.2	7.6	8.0	
24 小時	6.0	6.0	-	++	++++	++++	++++	++++	-
	6.4	6.4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	6.8	6.8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-
	7.2	7.2	++++	++++	-	-	-	-	-
	7.6	7.6	++	++	-	-	-	-	-
	8.0	8.0	+	+	-	-	-	-	-
48 小時	6.0	6.0	-	-	++	++++	++++	++++	-
	6.4	6.4	-	-	++++	++++	++++	++++	-
	6.8	6.8	-	-	-	++++	++++	++++	-
	7.2	7.2	-	-	-	-	-	-	-
	7.6	7.6	-	-	-	-	-	-	-
	8.0	8.0	-	-	-	-	-	-	-

(++++) 血凝。這就初步說明 pH 6.4—6.8 是血凝素稀釋液的合適 pH 值濃度。

又據血凝素保存至 48 小時的試驗結果 (表 3) 表明, 前兩種血凝素製備後保存在 4°C 冰箱內至 48 小時, 試驗時無論使用稀釋液的 pH 如何, 均不能測出滴度, 再看用 pH 6.8 稀釋液所製備的血凝素, 至 48 小時所表現的血凝性質已較 24 小時為差, 而後 3 種血凝素 (用 pH 7.2, 7.6, 8.0 所製備者) 在 24 及 48 小時兩次試驗的結果都是一致的。即用 pH 6.0, 6.4, 6.8 三種稀釋液稀釋時在 24 小時及 48 小時都得到了完全 (++++) 的血凝現象。這就初步表明用 pH 7.2, 7.6, 8.0 的緩衝鹽水所製備的血凝素較為安定。

為了進一步瞭解稀釋液的 pH 值對血凝滴度安定性的關係, 用 pH 7.2, 7.6, 8.0 緩衝生理鹽水製備的血凝素, 分別用上述 6 種稀釋液稀釋血凝素及血球來進行血凝滴度試驗。

表 4 不同稀釋液血凝滴度試驗結果 II

(不同稀釋液稀釋血凝素及血球對血凝素的滴度試驗結果)

血凝素及血球稀釋液的 pH	用下列 pH 的稀釋液所製備的血凝素的滴度		
	7.2	7.6	8.0
6.0	40	80	80
6.4	2,560	2,560	2,560
6.8	1,280	1,280	1,280
7.2	0	0	0
7.6	0	0	0
8.0	0	0	0

就表 4 中的結果,用 pH 6.0—6.8 緩衝生理鹽水稀釋時,三種血凝素均有滴度出現,不過以 pH 6.4 及 6.8 稀釋時,得到的滴度較高 (1:2,560, 1:1,280), 而用 pH 6.0 稀釋液時,滴度較低 (1:40—1:80)。反之,用 pH 7.2, 7.6, 8.0 緩衝生理鹽水稀釋時,則不能測出血凝素的滴度。

附帶說明的用 pH 7.2—8.0 稀釋液製備血凝素,有所謂的“界前現象 (Prezone phenomenon)”, 即在低稀釋度 (1:10—1:20) 的試管中,不發生血凝現象。另外又曾以 pH 8.4 緩衝鹽水製得血凝素,其滴度和安全性與上述三種血凝素無何區別。

依上述兩個試驗,不難看出,血凝素製備液和稀釋液所需的氫游子濃度範圍是不同的。前者為 pH 7.2—8.0, 後者為 pH 6.4—6.8。

### (三) 關於血凝素穩定性的試驗

上述試驗說明乙型腦炎病毒的血凝作用與試驗進行的溫度及稀釋液的 pH 具有直接的關係,同時也觀察到這種病毒的血凝素是高度不安定的。為了測定保存的溫度和時間對血凝素滴度下降的關係。用 pH 7.2, 7.6 及 8.0 稀釋液各製備血凝素若干管,每管裝有血凝素 1.0 毫升,分為 3 組,分別保存在 4°, 10—14° 及 -50°C。在不同相隔時間,用 pH 6.4 的緩衝生理鹽水作為血凝素及血球的稀釋液,進行滴度測定試驗。這三種血凝素的滴度變化與保存時間的久暫是一致的。現以 pH 8.0 稀釋液所製成的血凝素為例,把保存溫度和時間對血凝素滴度變化的試驗結果列入表 5。

表 5 血凝素保存的溫度和時間對滴度的影響

血凝素製備與 試驗間隔日期	血凝素在下列溫度保存時的滴度		
	4°C	10—14°C	-50°C
1 日	1,280	1,280	20
3 日	1,280	1,280	20
6 日	1,280	640	0
12 日	640	640	0
22 日	640	0	—
24 日	160	0	—
33 日	0	—	—

由表 5 說明,血凝素保存在 4°C 時滴度下降較為緩慢,同時滴度保持時間亦較為長久。血凝素在製備後 6 日內滴度 (1:1,280) 無何變化,第 12 日降至 1:640,第 24 日為 1:160,至第 33 日試驗時滴度不能測知。在 10—14°C 保存時,滴度下降較 4°C 時為快,保存時間亦較短。在 -50°C 保存第 1 日及第 3 日檢查時,滴度已降至 1:20,且凝集現象亦非典型,到第 6 日已不能測知滴度。

此外血凝素滴度的下降與使用的血球的種類亦有關係。現以雞血球與綿羊血球比較試驗的例子,說明兩者間的差別。據表 6 的結果,可知同樣的血凝素第一日用雞血球與綿羊血球得到的血凝滴度相同(1:2,560),以後用綿羊血球得到滴度顯著地低於雞血球。

表 6 血凝素滴度的下降與使用血球種類的比較

血凝素製備與試驗間隔日期	血凝素用雞血球試驗的滴度	血凝素用綿羊血球試驗的滴度
2	2,560	2,560
3	2,560	320
5	1,280	320
6	1,280	80
8	640	40
12	640	0

#### (四) 關於病毒發育與血凝素出現的關係試驗

病毒的毒力滴定法是測定流行性乙型腦炎病毒含量最常用的一種方法。乙型腦炎病毒懸液既有血凝性質,是否可以利用血凝素滴定法來測定病毒的含量呢?為解答這個問題,首先就應該瞭解病毒的傳染滴度與血凝滴度之間有無相互的對應關係,因而佈置了這個試驗。

以 1:1600 稀釋的腦炎病毒懸液,腦腔接種小鼠,於接種後 12, 24, 48, 72, 96 及 120 小時各解剖 5 隻,以無菌操作法採取腦組織,用 pH 8.0 緩衝生理鹽水製備血凝素,同時用小白鼠腦腔接種法進行病毒的毒力滴定。

應該說明,各組小鼠非在同一時間內接種,具體接種時間係事前根據接種與解剖的不同間隔而安排的,使各組小鼠在同一時間解剖取腦,進行血凝試驗和毒力測定。

血凝試驗及毒力測定結果列為表 7。

表 7 病毒發育時間對血凝素出現的關係試驗

接種與解剖的間隔時間(小時)	用雞血球的血凝滴度	用綿羊血球的血凝滴度	毒力測定結果(LD <sub>50</sub> )
12	0	0	10 <sup>-3.3</sup>
24	0	0	10 <sup>-5.3</sup>
48	0	0	10 <sup>-6.4</sup>
72	320	320	10 <sup>-6.5</sup>
96	1,280	640	10 <sup>-8.3</sup>
120	640	320	10 <sup>-8.7</sup>
對照(正常鼠腦)	0	0	—

從表 7 中可以看出,在接種後 12, 24 及 48 小時(小鼠尚未出現症狀)所解剖的鼠腦中,均不能測知血凝素的滴度,但傳染滴度不但可以測出,而且是隨時間的增加而逐步上昇,接種後 12, 24, 48 小時的  $LD_{50}$  分別為  $10^{-3.3}$ ,  $10^{-5.3}$  及  $10^{-6.4}$ 。在 72, 96 或 120 小時,小鼠均已發病,所解剖的鼠腦懸液中,無論用雞血球或者用綿羊血球均能測出血凝素的滴度。表 5 中列出的血凝滴度曾反覆進行數次,得到了相同的結果。就中以在 96 小時所解剖的鼠腦懸液中血凝滴度較高(用雞血球為 1:1,280,用綿羊血球為 1:640),在 120 小時的滴度如與 96 小時的比較反有降低的傾向。但在接種病毒 72, 96 和 120 小時的鼠腦中,病毒含量或傳染滴度( $LD_{50}$  分為  $10^{-8.5}$ ,  $10^{-8.3}$  及  $10^{-8.7}$ )却不相上下。

根據這個試驗,知道在乙型腦炎鼠腦病毒的傳染滴度與血凝滴度之間並沒有發現有相互對應的關係。

#### (五) 血凝抑制試驗與中和、補體結合試驗的比較

在乙型腦炎病毒的血清試驗方法中,中和試驗和補體結合試驗是最常用的;近年來有許多利用血凝抑制試驗測知血清中抗體的報告<sup>[4,11]</sup>。為比較目的,作者曾用血凝抑制同時又用中和或補體結合試驗方法進行人體腦炎疫苗免疫前後的血清檢查及豚鼠免疫血清的抗體測定。現在把這兩個試驗的結果報告於後。

參加腦炎疫苗免疫前後血清檢查的志願者計 9 人,每人每次皮下接種鼠腦疫苗 2.0 毫升,前後兩次,間隔 3 天;分別在接種前及末次接種後第 11 日取血。表 8 中列出免疫前後血清學檢查的結果。血凝抑制試驗同份血清曾先後進行兩次,間隔 2 個半月;但兩次所得到的血凝抑制滴度無大差別(見表 8)。免疫前的抑制滴度在 1:10 與 1:80 之間,而免疫後的滴度在 1:40—1:640 之間;比較免疫前後血清的抑制滴度,各例都有增加;就第一次結果來說,滴度增至 2 倍者 1 例(第 6 例),增至 4 倍者 2 例(第 2, 4 例),增至 8 倍者 2 例(第 1, 8 例),增至 16 倍者 1 例(第 5 例),增至 32 倍者 3 例(第 3, 7, 9 例)。

由表 8 內中和試驗的結果可以看出,除第 1 及第 2 例免疫前後的中和指數增加不明顯外,其餘 7 例免疫後血清的中和指數顯然比免疫前增加了。免疫後血清的血凝抑制滴度及中和指數雖比免疫前的血清都有所增高,但在兩者提高的程度之間,却難找到相應的關係。

另外,當用豚鼠製備乙型腦炎免疫血清時,曾用血凝抑制試驗同時又作中和試驗及補體結合試驗的方法測定血清中的抗體。每隻豚鼠每次腦腔接種 1:10 的鼠腦病毒懸液 0.15 毫升,共計 5 次,間隔時間均為一週,免疫開始後每週由心臟取血 1 次,每次取



表 8 血凝抑制試驗與中和試驗檢查腦炎疫苗免疫前後人血清中抗體變化的比較

血清號數	性別	年齡	取血時間	中和指數 (用小白鼠)	血凝抑制滴度	
					第 1 次結果	第 2 次結果
1	男	20	免疫前	6,000	40	20
			免疫後	13,000	320	320
2	女	18	免疫前	1	10	10
			免疫後	2	40	40
3	女	19	免疫前	130	10	20
			免疫後	10,000	320	320
4	女	18	免疫前	1,000	20	10
			免疫後	20,000	80	160
5	男	21	免疫前	320	20	80
			免疫後	4,000	320	160
6	女	19	免疫前	800	80	80
			免疫後	25,000	160	320
7	女	16	免疫前	250	10	40
			免疫後	5,000	320	640
8	女	26	免疫前	2	40	—
			免疫後	130	320	—
9	女	20	免疫前	32	10	40
			免疫後	5,000	320	320

血時間都在腦腔接種病毒之前。免疫前的對照血清及免疫開始後間隔不同時間的免疫血清，係由 5 隻豚鼠採取混合而後試驗的。上述三種血清學方法測定的抗體結果列為表 9。據中和試驗結果，不難看出，中和指數隨病毒免疫的次數而逐漸上升的，至第 4 週

表 9 血凝抑制試驗與中和試驗補體結合試驗檢查腦炎病毒免疫豚鼠血清中抗體變化的比較

(腦腔接種 1:10 鼠腦病毒懸液每次 0.15 毫升共計 5 次間隔一週)

取血清時間	中和指數	補體結合滴度	血凝抑制滴度
免疫前血清 (對照)	1	0	10
免疫開始後			
1 週	8	10	80
2 週	25	320	640
3 週	37	640	1,280
4 週	530	640	1,280
5 週	1,700	320	1,280
6 週	2,500	80	160

時,中和抗體顯著增加(中和指數增加至 530),第 6 週(中和指數為 2,500)仍有上昇傾向。就補體結合試驗結果來看,免疫開始後第 1 週,補體結合滴度為 1:10,第 2 週為 1:320,至第 3,4 週滴度已達頂點(1:640),第 5 週反有下降傾向,第 6 週落至 1:80。

血凝抑制滴度如與補體結合滴度比較,則前者的變化與補體結合滴度的昇降之間似有平行的關係,血凝抑制滴度也是免疫開始後第 1 週滴度較低(1:80),第 2 週顯著上昇,第 3 週已達最高滴度(1:1,280),至第 6 週陡然下降(1:160)。

由這個試驗結果,可以看出,中和抗體出現較遲但持續較久,至免疫開始後第 6 週仍有增加傾向,反之血凝抑制抗體及補體結合抗體出現較早,第 3 週滴度即達頂點,持續至第 5 週。第 6 週以後兩者的滴度均顯著下降。血凝抑制抗體與中和抗體之間也看不到相互對應的關係。

## 討 論

流行性乙型腦炎病毒是一種嗜神經性病毒,它的血凝性質與流行性感冒或腮腺炎不同,必須在一定的條件下才能發生血凝作用。這些條件包括使用血球的種類、血凝素的製備方法、稀釋液的氫游子濃度,以及進行血凝的溫度。

關於血球的種類,在 Шубладзе 及 Вадосандзе 兩氏曾試驗過的 15 種動物血球中,其中包括鴿子和成鷄血球,證明乙型腦炎病毒懸液只能凝集雛鷄及綿羊血球<sup>[11]</sup>;而在其他試驗室內鴿子血球<sup>[13,14]</sup>和成鷄血球<sup>[9]</sup>也均能為乙型腦炎病毒的血凝素所凝集。這樣的差別可能是由於製造血凝素的方法不同所致。在這次的試驗中,僅採用了雛鷄和綿羊血球,再次證明這兩種血球均可為腦炎病毒懸液所凝集;同時還有這樣的體會:即當用綿羊血球進行血凝試驗時,發覺對照管血球下沉較慢,往往需時 2—3 小時之久,如用雛鷄血球,90 分鐘即可,此外雛鷄血球所現的血凝現象比較清晰易辨,有時用綿羊血球所得到的血凝滴度較用雛鷄血球為低。

在乙型腦炎病毒的血凝試驗中,陽性試驗的血凝盤狀形式出現較早,而在對照管中血球下降需時最久。據這樣的事實可以推想:血凝的機轉可能與 Dawson 及 Elford 氏用電子顯微鏡術所示出的流感血凝情況一樣<sup>[15]</sup>,也是血凝素(或者就是病毒顆粒)吸附在血球表面上,作為血球間的橋樑。大片的凝塊先沉至管底,而對照管中只有單個懸浮的血球自然下降較晚。

就已讀到的文獻,製備乙型腦炎病毒血凝素的方法可分為兩種:一種是 Casals 氏製造補體結合抗原法<sup>[7,8]</sup>即丙酮乙醚處理法;另一種方法是用受染鼠腦懸液經遠心沉澱取上清液而製得的<sup>[4,11]</sup>。本報告中所用的血凝素屬於後者。由於製法不同,兩種血凝

素的性質不盡相同，如前一種血凝素能保存至低溫（ $-20^{\circ}\text{C}$ ）或乾燥後保存在  $20^{\circ}$  或  $4^{\circ}\text{C}$ ，在 9 個月內滴度無下降情況；後一種血凝素，據上述試驗結果，如在冰凍低溫情況下保存時，則滴度很低甚至不能測知。由於性質不盡相同，某些發生血凝的條件亦各異，如前一種血凝素必須在冰浴內操作，血凝進行的合適溫度為  $4^{\circ}$  或  $22^{\circ}\text{C}$ ，稀釋液的合適 pH 值為 7.0<sup>[7,8]</sup>；而後一種血凝素可在室溫中操作，血凝的合適溫度為  $37^{\circ}\text{C}$ ，在  $18^{\circ}$  及  $4^{\circ}\text{C}$  血凝滴度出現較低。合適稀釋液的 pH 值為 6.4—6.8。

用 pH 7.2—8.0 緩衝生理鹽水所製備的血凝素，具有界前現象，即過濃的血凝素稀釋度（1:10 1:20）不現血凝現象。發生這一現象的原因，可能是在低稀釋度的試管內，經血凝素、稀釋液及血球懸液混合後，試管內容的氫游子濃度不宜於發生血凝的原故；另外據表 3 中所列舉的試驗結果，似乎亦能說明此點，即高 pH 液體所製得的血凝素用低 pH 的稀釋液能現出血凝，而低 pH 稀釋液製得的血凝素，發生血凝時需要稀釋液的 pH 都較高。

乙型腦炎病毒在小鼠腦內繁殖的階段中，傳染滴度與血凝滴度有不相同的發展。在新城疫病毒生長的過程中，有同樣的現象<sup>[16]</sup>。這樣的區別可以解釋為病毒顆粒成熟以後，才能成為血凝單位，在生長期間病毒尚未成熟，不能凝集血球。

Sabin 氏謂：流行性乙型腦炎病毒經小鼠傳代過多時即失去血凝現象。1953 年在我們的實驗室內曾以 8 株乙型腦炎病毒進行血凝試驗，7 株都顯相當高的血凝滴度，其中之一為分離歷史較久的中山株（Nakayama Strain），另一株係新近在北京分離者，經小鼠腦髓僅傳遞數代，却無血凝現象。據此，乙型腦炎病毒血凝性質的有無與傳遞代數的多寡，未必有一定的關係。另一方面 1953 年血凝試驗呈陽性的 7 株中，有 1 株傳代至 1955 年轉為陰性，而中山株仍現陽性結果。

又登革熱病毒因毒株不同，血凝所需稀釋液的 pH 各異<sup>[17]</sup>，乙型腦炎毒株之間是否也有同樣的現象尚不明瞭；對不發生血凝現象的乙型腦炎毒株，作者曾以不同 pH 稀釋液分別製備及稀釋血凝素，初步未得到血凝陽性的結果。

Шубладзе 和 Вардосандзе 氏指出<sup>[11]</sup>，正常血清含有非特異性血凝抑制因子的動物中，發現豚鼠的含量最少。這次試驗中，也有同樣的觀察，在表 9 內血凝抑制試驗中，正常豚鼠血清未經氯仿處理時，血凝抑制滴度並不高（1:10），實在沒有用氯仿處理的必要。

血凝抑制試驗已多次應用於乙型腦炎血清學工作中<sup>[4,10,11]</sup>在上述試驗中曾與中和試驗及補體結合試驗對應進行；據豚鼠免疫血清的初步試驗結果（表 9），認為血凝抗體與補體結合抗體相似，出現時間比中和抗體較早，免疫後第 2 週即可發現；第 3 週滴

度已達頂點；但最高滴度維持時間較中和抗體為短，至免疫後第 6 週血凝抑制滴度即衰頹下降，此時中和抗體仍在增長中。如與補體結合試驗結果比較時，隨時間的變化，血凝抑制與補體結合兩種抗體滴度的昇降似有并行的傾向；因而推想血凝抑制試驗，像用補體結合試驗法一樣，可能在疾病早期用於乙型腦炎病例的血清學診斷。

## 結 論

1. 流行性乙型腦炎病毒的血凝素能凝集雞血球及綿羊血球。在凝集過程中最適宜的溫度為 37°C。

2. 用 pH 7.2—8.0 的磷酸系統的緩衝鹽水所製備的乙型腦炎病毒血凝素較為穩定；稀釋血凝素及血球的適當稀釋液為 pH 6.4—6.8 的緩衝鹽水；血凝素的保存溫度應為 4°C。

3. 乙型腦炎病毒在小鼠腦內繁殖的階段中，傳染滴度和血凝滴度有不相同的發展。在腦腔接種後 72 小時內症狀未出現前，傳染滴度逐漸上昇，此時血凝滴度却不能測知；至症狀出現後才有血凝滴度出現。

4. 利用腦炎免疫血清對腦炎病毒的血凝抑制現象，可以測知血清中特異性抗體——血凝抑制抗體的含量；并與中和抗體及補體結合抗體進行比較。

## 參 考 文 獻

- [1] Hallaur, C., *Proc. 4th Internat. Cong. Microbiol.*, 1947, p. 257.
- [2] Olitsky, P. K., and Yager, R. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **71**: 719, 1949.
- [3] Lahelle, O., and Horsfall, F. L., Jr., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **71**: 713, 1949.
- [4] Sabin, A. B. and Buescher, E. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **74**: 222, 1950.
- [5] Sabin, A. B., *Fed. Proc.*, **10**: 573, 1951.
- [6] Casals, J., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **70**: 339, 1949.
- [7] Casals, J., & Brown, L. V., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **83**: 170, 1953.
- [8] Casals, J., & Brown, L. V., *J. Exp. Med.*, **99**: 429, 1954.
- [9] 朱錫華：中華醫學雜誌，第六號 444 頁，1954。
- [10] 朱錫華：微生物學報，**3**：63, 1955。
- [11] Шубладзе, А. К. и Вардосанцдзе, Э. Ш., *ЖМЭИ*, **10**: 62, 1954.
- [12] Salk, J. E., *J. Immunol.*, **49**: 87, 1944.
- [13] MacDonald, F., *Brit. J. Exp. Path.*, **33**: 537, 1952.
- [14] Austin, F. J., *Austral. J. Exp. Biol.*, **32**: 885, 1954.
- [15] Dawson, I. M., & Elford, W. J., *J. Gen. Microbiol.*, **3**: 298, 1949.
- [16] Gordon, L. E., Birkeland, J. M. and Iodd, M. C., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **80**: 205, 1952.
- [17] Sweet, B. H. and Sabin, A. B., *J. Immunol.*, **73**: 363, 1954.

# STUDIES ON HAEMAGGLUTINATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

WANG YUNG-CHI

*National Vaccine and Serum Institute, Peking*

(ABSTRACT)

1. A method for preparing Japanese B encephalitis haemagglutinin by light centrifugation of infected mouse brain suspension is described.
2. Physiologic salt solution, buffered at pH 7.2—8.0 with phosphate was found to be an excellent fluid for the extraction and preservation of haemagglutinin from infected mouse brains.
3. Newly hatched chick and sheep red blood cells have been found to be agglutinable by Japanese B encephalitis virus haemagglutinin with an optimal incubation temperature of 37°C; while the saline suitable for dilution of haemagglutinin and erythrocytes has to be buffered at pH 6.4—6.8.
4. The existence of an unequal development of infective and haemagglutinating titer during the growth of Japanese B encephalitis virus is described.
5. Evidence is presented that specific antibodies in immune sera might be detected by haemagglutination-inhibition technic. The haemagglutination-inhibition titer has been compared with that obtained by complement fixation and neutralization test.