

流行性乙型腦炎小鼠被動免疫試驗*

王用楫 王欽臣

(衛生部生物製品研究所)

就以前的報告,知道在流行性乙型腦炎流行區域內,一般成人的血清中^[1,2,3]和馬匹的血清中^[4,5,6,7,8],大都含有中和乙型腦炎病毒的抗體。1951年在北京腦炎流行的末期,鍾惠瀾等氏曾試用成人血漿治療腦炎病人,獲得有效的結果^[9]。據此,衛生部生物製品研究所在1951年底即開始腦炎免疫血清的研究。在研究過程中,我們做了一些動物實驗。現在把免疫馬血清對於小鼠實驗傳染的效果報告如下。

材 料 和 方 法

(一) 病毒

試驗中所用的病毒係1949年秋在北京分離的流行性乙型腦炎病毒京衛研2毒株^[10]。其新鮮受染病毒的鼠腦懸液,對小鼠50%致死量的滴定度在 10^{-9} 左右,病毒稀釋液為10%滅能健免血清生理鹽水,腦腔接種量為0.03毫升。

(二) 免疫血清

1951年底選擇健馬4匹。先用乙型腦炎鼠腦疫苗(福馬林滅毒的10%鼠腦懸液)免疫8次,用量由10毫升增至250毫升;然後改用活毒免疫12次,注射量由10%

表1 馬混合免疫血清抗體的測定(I)
(用小鼠、雞胎與鼠腦病毒、雞胎病毒作中和試驗)

宿主種類	接種途徑和分量	試驗病毒來源	試驗組 50% 致死量*	對照組 50% 致死量	中和指數
小 鼠 (7—9 克)	腦 腔 0.03 (毫升)	鼠 腦	2.2	8.2	1,000,000
		雞 胎	<1.5	6.5	>100,000
雞 胎 (8 日)	卵 黃 囊 0.1 (毫升)	鼠 腦	3.3	7.3	10,000
		雞 胎	3.0	8.3	200,000

* 50% 致死量是以病毒稀釋度的倒數的對數表示的,如病毒稀釋度為 $10^{-2.2}$,則以2.2表示之。

的受染鼠腦懸液 10 毫升增至 150 毫升，後者約相當 5×10^{11} 個小鼠 50% 致死量；一律採皮下法，每週注射 1 次。末次免疫後第 10 日採血，分離血清，把 4 匹馬的血清等量混合進行試驗。並用病毒稀釋法^[3]和血清稀釋法進行中和試驗，來測知血清的效力，結果見表 1、表 2。

表 2 馬混合免疫血清抗體的測定(II)

(血清，病毒同時以 10 倍遞級稀釋，小鼠腦腔注射中和試驗)

馬混合血清稀釋度	試驗組小鼠 50% 致死量*	對照組小鼠 50% 致死量	中和指數
未稀釋	2.2	8.2	1,000,000
1:10	2.8	8.2	250,000
1:100	3.3	8.2	80,000
1:1,000	5.6	8.2	400
1:10,000	5.5	8.2	500

* 同表 1 說明。

(三) 小鼠

當試驗開始時，小鼠體重在 7—9 克間，年齡約為出生後 2—3 週。試驗組與對照組小鼠係同時選定。

(四) 免疫方法

取未稀釋或用食鹽水連續 10 倍稀釋的上述混合免疫馬血清，用皮下注射法免疫試驗組小鼠，每隻每次用量為 0.1 毫升。被動免疫時間在注射試驗病毒以前或以後，注射為一次或多次，隨試驗的目的而異。對照組小鼠應接受正常馬血清注射，但因不含中和抗體的馬血清不易獲得，各對照組小鼠均未接受注射。

(五) 試驗注射

試驗注射時均係採用新鮮鼠腦病毒。每次都是選擇已顯典型症狀的病鼠 3 隻，心臟放血，以無菌術取腦，在玻璃組織研磨器內充分研細，加 10% 滅能健兔血清食鹽水按 10 倍稀釋，每稀釋一次換一吸管。

試驗組和對照組小鼠同時接受同樣病毒的試驗注射。一般採腹腔注射法，每隻小鼠接種量為 0.3 毫升；如採用腦腔注射，用量為 0.03 毫升。每個病毒稀釋度注射小鼠 5 隻。每個試驗中選擇適當的病毒稀釋度的試驗範圍。

(六) 觀察結果

試驗注射病毒後，逐日觀察並記錄小鼠的死亡，直至第 14 日為止。凡在注射後 48 小時內死亡的小鼠認為係非特異性死亡，棄而不算。依 Reed-Muench 氏法^[11]，分別計

算試驗組和對照組小鼠的 50% 致死量；以二者之比表示試驗血清的保護力。這個比叫做保護指數。保護指數在 50 以上者視為血清被動免疫的陽性結果，10 以下者視為陰性，10—50 之間者不加肯定。

試驗和結果

(一) 腦腔注射病毒試驗

本試驗中的小鼠分為 5 組。第 1—4 組為試驗組，分別注射未稀釋的和 1:10, 1:100, 1:1,000, 稀釋的免疫血清各 0.1 毫升；第 5 組不注射血清，作為對照。24 小時後，5 組小鼠以 10 倍稀釋的病毒，行腦腔病毒注射試驗。試驗結果如表 3。

表 3 免疫馬血清的被動免疫效果 (I)

(血清皮下免疫，24 小時後病毒腦腔注射小鼠實驗結果)

試驗組別	血清的稀釋度	每只注射血清的絕對量(毫升)	試驗組小鼠 50% 致死量*	對照組小鼠 50% 致死量	保護指數
第 1 組	未稀釋	0.1	5.6	8.0	250
第 2 組	1:10	0.01	6.5	8.0	32
第 3 組	1:100	0.001	6.7	8.0	20
第 4 組	1:1,000	0.0001	7.5	8.0	3

* 同表 1 說明。

由表 3 可以看出：未稀釋血清免疫的小鼠獲得相當高的被動免疫（保護指數為 250），而用 1:1,000 稀釋血清免疫的則否（保護指數為 3）。

由於用腦腔注射病毒法所測知的保護指數不夠高，在以後的試驗中，我們改用了腹腔注射病毒法。

(二) 被動免疫持續時間試驗

這個試驗係由兩次進行的。第一次用未稀釋及不同稀釋的血清，免疫了 4 組小鼠；於 24 小時及 7 日後分別以腹腔法注射試驗病毒。第二次只用未稀釋和 1:10 稀釋的血清免疫小鼠，於試驗開始後第 14、31、46 和 64 日，用腹腔注射病毒法試驗。結果列為表 4。

根據血清注射後 24 小時和 7 日試驗的結果，小鼠獲得的被動免疫在首 7 日內似無顯著的不同；每隻小鼠接受血清的絕對量雖僅 0.0001 毫升，仍有顯著的保護效力（保護指數為 790 和 400）。在免疫後第 14 日試驗時，保護指數仍然很高；注射 0.01 毫升血清的小鼠，保護指數為 100,000；但與免疫 24 小時和 7 日後試驗比較時，顯然是降低

表 4 免疫馬血清的被動免疫效果 (II)
(血清皮下免疫, 病毒腹腔注射小鼠實驗結果)

試 驗 數	血清免疫與試驗注射的間隔日數	血 清 的 稀 釋 度	注射血清的絕對量 (毫升)	試驗組小鼠 50% 致死量*	對照組小鼠 50% 致死量	保 護 指 數
I	1 (24 小時)	未 稀 釋	0.1	0.8	8.2	25,000,000
		1 : 10	0.01	2.2	8.2	1,000,000
		1 : 100	0.001	3.4	8.2	63,000
		1 : 1,000	0.0001	5.3	8.2	790
	7	未 稀 釋	0.1	0.8	9.0	160,000,000
		1 : 10	0.01	1.7	9.0	20,000,000
		1 : 100	0.001	4.5	9.0	32,000
		1 : 1,000	0.0001	6.4	9.0	400
II	14	未 稀 釋	0.1	1.0	7.0	1,000,000
		1 : 10	0.01	2.0	7.0	100,000
	31	未 稀 釋	0.1	1.8	3.5	50
		1 : 10	0.01	2.8	3.5	5
	46	未 稀 釋	0.1	3.2	3.3	1.3
		1 : 10	0.01	3.3	3.3	1.0
	64	未 稀 釋	0.1	2.4	2.7	2.0
		1 : 10	0.01	2.5	2.7	1.6

同表 1 說明。

了。第 31 日試驗時, 接受未稀釋血清免疫的小鼠, 仍顯有微弱的保護效力(保護指數為 50); 但第 46 和 64 日試驗時, 保護力已完全不能測知了。

附帶說明的, 在這個試驗中, 由於試驗注射病毒與血清免疫的間隔日數不同, 對照組小鼠 50% 致死量亦有顯著的差別(見表 4)。這是由於小鼠隨年齡的增加而降低它對乙型腦炎病毒的腹腔注射的敏感性的原故^[12]。

(三) 實驗感染後被動免疫的效果試驗

試驗小鼠分為 9 組, 先腹腔注射不同的 10 倍稀釋病毒, 24 小時後皮下注射不同稀釋的血清 1 次或多次, 當使用多次時係每日注射 1 次, 有些組的小鼠於皮下注射血清的同時並於腦腔內注射血清。各組注射血清的途徑、次數和分量與試驗結果合併列為表 5。

表 5 免疫馬血清的被动免疫效果 (III)

(病毒腹腔接種, 24 小時後血清一次或多次, 皮下或皮下合併腦腔注射實驗結果)

組別	血清的 稀釋度	血清注射方法						試驗組小鼠 50% 致死量 ²	對照組小鼠 50% 致死量	保 護 指 數
		皮 下			腦 腔					
		次數	分量 (毫升)	絕對量 (毫升)	次數	分量 (毫升)	絕對量 (毫升)			
第 1 組	未稀釋	1	0.1	0.1				5.6	8.3	500
第 2 組	1:10	1	0.1	0.01				6.8	8.3	32
第 3 組	1:100	1	0.1	0.001				7.5	8.3	6
第 4 組	1:1,000	1	0.1	0.0001				7.3	8.3	10
第 5 組	未稀釋	2	0.2	0.2	2	0.06	0.06	3.5	8.0	32,000
第 6 組	未稀釋	1	0.1	0.1	1	0.03	0.03	3.8	8.0	16,000
第 7 組	1:10	5	0.5	0.05				4.5	8.0	3,200
第 8 組	1:10	4	0.4	0.04				5.0	8.0	1,000
第 9 組	1:10	3	0.3	0.03	3	0.09	0.009	5.0	8.0	1,000

* 同表 1 說明。

從表 5 可以看出下列的事實: (1) 第 1 組保護指數為 500, 如與第 2、3 和 4 組 (分別為 32、6 和 10) 比較, 可資說明應用大量血清能獲得較好的結果。第 5、6 組與第 9 組比較, 也能看到同樣的現象^[2]。第 1 組一次注射血清的絕對量為 0.1 毫升, 保護指數為 500; 第 7 第 8 組注射血清絕對量僅 0.05 和 0.04 毫升, 但分作 5 次或 4 次注射, 保護指數為 3,200 和 1,000。後兩組的血清用量雖少於第 1 組, 但由於連續多次注射, 得到的結果反較第 1 組為佳。由此可以說明血清連續多次注射能獲得較好的保護。(3) 第 1 組皮下注射未經稀釋的血清 1 次, 第 6 組也是依同法注射同樣的血清, 但同時合併腦腔注射血清; 結果第 1 組保護指數為 500, 而第 6 組為 16,000, 後者顯著高於前者。這證明腦腔注射血清確有一定的效果。

討 論

流行性乙型腦炎免疫血清如在接種病毒之前應用, 即便採用人工腦腔內感染病毒, 對小鼠亦可顯出被動性免疫; 但遠不及用腹腔感染病毒法效果顯著。在馬腦脊髓炎免疫血清的保護試驗中, 也有類似的情況^[13]。

當用腹腔注射試驗病毒時, 於應用血清後 1 週內, 小鼠由被動免疫得到的保護指數大致沒有變化; 但於第 2 週末試驗時, 已顯著降低, 至 31 日後被動免疫的效力已全部消失了。被動免疫在小鼠存在的久暫與血清的用量有關。

乙型腦炎自然傳染的途徑一般認為係由蚊蟲的刺咬。這與腦腔注射試驗病毒完全不同，而與腹腔感染比較近似；實際上後者仍較蚊蟲刺咬為嚴重。又許多地區一般成人血清中大都含有中和乙型腦炎病毒的抗體^[1,2,3]。根據這樣的事實和前述試驗的結果，免疫血清或成人血清如用於預防腦炎，可能有相當效果。Hammon等氏^[14]近來用人血漿中丙種球蛋白被動免疫 1—11 歲的兒童數萬人，來預防嬰兒麻痺症（脊髓前灰白質炎）；據云，在應用後 2—5 週之間，顯有一定的保護作用。免疫或成人血清對預防腦炎也可能有類似的效果。又我們曾用預防麻疹的胎盤球蛋白液與乙型腦炎病毒做過中和試驗，顯出相當強大的中和效果。在腦炎流行期前或期間注射胎盤球蛋白液的兒童中，對腦炎發病率是否受到一些影響是值得觀察的問題。

在乙型腦炎實驗傳染的過程中，各家已證明有病毒血症（Viremia）的時期存在^[15,16,17,18]。根據此種事實，可以解釋免疫血清能夠預防腦炎試驗傳染，是由於動物從被動免疫獲得抗體的關係。西部馬腦脊髓炎的免疫血清具有類似的預防效果^[13,19,20,21]。

就我們的試驗結果，小鼠腹腔注射乙型腦炎病毒 24 小時後，開始使用免疫血清，能獲得被動免疫的保護。血清用量愈大，應用次數愈多，愈能得到滿意的結果。蘇聯工作者曾用免疫血清治療森林腦炎（春夏型腦炎）病例；如肌肉同時合併脊椎管內注射獲得的治療效果比單獨肌肉注射時更為滿意^[22]。如果認為脊椎管內注射與小鼠腦腔注射情形是相似的話，在這次動物試驗中，腦腔注射免疫血清確有其一定效果。據此，當用免疫血清治療乙型腦炎病例時，亦可考慮脊椎管內注射血清的問題。

結 論

1. 小鼠由注射免疫血清而獲得的保護與 (1) 免疫血清和試驗病毒注射的先後，(2) 病毒注射的途徑，(3) 應用血清的劑量和次數，都有直接的關係。

2. 以腹腔接種試驗病毒法，小鼠經皮下注射免疫血清後第 1 週內，由被動免疫得到的保護指數大致沒有變化。每隻小鼠血清用量為 0.1 毫升時，免疫後第 2 週末保護力仍極顯著（保護指數為 1,000,000），至第 31 日試驗時，仍顯微弱的被動免疫（保護指數為 50）。對免疫血清或成人血清用於預防腦炎的可能性曾作討論。

3. 據小鼠試驗，於腹腔感染病毒 24 小時後，開始皮下注射免疫血清，應用劑量愈大或連續應用次數愈多，得到的效果愈好。如皮下同時合併腦腔注射血清，可以得到更好的保護。

參 考 文 獻

- [1] Sabin, A. B. Schlesinger, R. W. and Ginger, D. R., *Proc. Soc., Exp. Bio. and Med.*, **65**: 183, 1947.
- [2] Mitamura, T. Jintendo Ijikenkyu Zasshi, No. 589, 1. 1943.
(日文, 由文獻[1]引證)
- [3] 王用楫, 戚迦陵, 戚景華, 李美容, 王欽臣, 微生物學報, **1**: 97, 1953.
- [4] Sabin, A. B. Ginger, D. R. and Matumoto, M. (松本), *Am. J. Hyg.*, **46**: 341, 1947.
- [5] Paterson, P. Y., Leý, H. L. Jr., Wisseman C. L. Jr., Pond, W. L., Smadel J. E., Diercks F. H., Hetherington H. D. G., Sneath P. A. A., Wintherington, D. H., and Lancaster, W. E., *Am. J. Hyg.*, **56**: 320, 1952.
- [6] Bawell, M. B., Deuel, R. E., Matomoto, M. and Sabin, A. B. *Am. J. Hyg.*, **51**: 1, 1950.
- [7] Deuel, R. E., Bawell, M. B., Matomoto, M. and Sabin, A. B., *Am. J. Hyg.*, **51**: 13, 1950.
- [8] 戚景華, 戚迦陵, 劉瀚湘, 微生物學報, **1**: 202, 1953.
- [9] 鍾惠瀾, 駱鏡清, 褚福棠, 中華醫學雜誌, **815**, 1953.
- [10] 黃韻祥, 王逸民, 中華醫學雜誌, **37**: 280, 1951.
- [11] Reed, L. J. and Muench, H., *Am. J. Hyg.*, **27**: 493, 1938.
- [12] Lennette, E. H., and Koprowski, H., *J. Immunol.*, **49**: 175, 1944.
- [13] Olitsky, P. K. and Harford, C. G., *J. Exp. Med.*, **6**: 761, 1938.
- [14] Hammon, W. McD., Coriell, L. L., Wehrle, P. F. and Stokes, J. Jr., *J. A. M. A.*, **151**: 1272, 1953.
- [15] Hammon, W. McD., Reeves, W. C. and Burroughs, R., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **61**: 304, 1947.
- [16] Meikejohn, G., Simpson, T. W. and Stacy, I. B., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **65**: 359, 1947.
- [17] Thomas, L. and Peck, J. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **61**: 5, 1946.
- [18] 王潛淵, 任廣宏, 黃韻祥, 中華醫學雜誌, **38**: 1050, 1952.
- [19] Howitt, B. F., *J. Infect. Dis.*, **51**: 593, 1932.
- [20] Traub, E., *Zentr. Bak., 1 Abt., Orig.*, **147**: 81, 1941.
- [21] Olitsky, P. K. and Saenz, A. C., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **68**: 200, 1948.
- [22] 伊瓦奧諾夫等, 1951, 流行性腦炎, 原載“急性傳染病教程”第七版, (見蘇聯醫學 1952, 第八年, 第六期, 第四頁).

EFFECT OF EPIDEMIC JAPANESE B ENCEPHALITIS IMMUNE SERUM ON EXPERIMENTAL INFECTION IN MICE

WANG YUNG-CHI and WANG CHIN-CHEN

National Vaccine and Serum Institute, Peking

(ABSTRACT)

1. Protection acquired by passive immunization in mice appeared to be dependent upon (1) the route of virus inoculation, (2) the dosage of serum and (3) the interval between serum and virus administrations.

2. Experiments on mice immunized subcutaneously with the immune serum and then challenged with mouse brain virus by the intraperitoneal route indicated that, there was no apparent change in protection index within the first week after passive immunization. In mice given one dose of 0.1 ml., the protection power was still evident (protection index 1,000,000) at the end of the second week, and remained detectable (protection index 50) on the 31th day, but disappeared on the 46th day and hereafter. The possibility of using immune serum in the prophylaxis of Japanese B encephalitis infection was discussed.

3. In mouse experiments, in which the immune serum was injected subcutaneously 24 hours after intraperitoneal inoculation of virus, the protective effect appeared to be better when serum was given in large dosage or by repeated injections on successive days. A more satisfactory result could be obtained when the immune serum was given by both subcutaneous and intracerebral route simultaneously as compared with serum given by subcutaneous alone. The problem of treatment of Japanese B encephalitis infection with immune serum was discussed.