

黃熱病毒的血球凝集反應*

盧寶蘭 黃元桐 湯飛凡

(衛生部生物製品研究所)

近年來很多種嗜神經性病毒的血球凝集現象已被發現^[1-15]，同時也已證實了在實驗診斷上的應用價值。Casals 與 Browns 氏^[10,11]曾研究了黃熱病毒的血凝反應，證明黃熱病毒具有特異性的血球凝集素。1954年 Porterfield 氏^[12]應用感染黃熱的猴血清製成抗原，也證明黃熱病毒具有特異性的血凝反應。但是，到目前為止，關於黃熱血凝素性質的研究報導還不太多。爲了進一步瞭解黃熱病毒的血凝反應，一年來我們在這方面進行了比較系統的研究。現將我們的試驗結果報告如下。

抗原製備

用黃熱 17D 與 Dakar 病毒株分別感染 3—6 天的乳鼠，小鼠發病後，將胸部剖開，放去心血，將剖出的腦子，立即放入藏在 -30°C 以下的二氧化碳冰浴中之小瓶內，然後保存在 -40°C 冰箱內 3—4 天後取出，按 Casals 氏^[11]之方法，在 10°C 以下的冷室中將鼠腦放在小型電動研磨機內先加入少量丙酮研磨兩分鐘，然後按每克腦重加足丙酮至 20 毫升，在冰浴內充分振盪 20 分鐘，用 1500 轉/分沉澱 1 分半鐘後，倒去上清，再加入同量丙酮提煉一次，等量混合 (1:1) 的丙酮乙醚一次，乙醚兩次，然後放在真空抽氣罐內抽乾，按每克腦重加入生理鹽水 2 毫升做成懸液，放置 4°C 過一夜，用 11500 轉/分高速沉澱 1 小時，此時上清液即是我們的抗原，保存在 -40°C 冰箱內。與上述各步驟的同時用同齡的正常小鼠作抗原對照。

按上述方法做成的抗原，其 pH 值爲 6.5—6.8 之間，對照相同。

血凝試驗進行方法

將出生後 24 小時內的雛雞放血，收集在 Alsever 氏^[17]溶液內，保存在 4°C 可用至 7

* 1956年10月13日收到。

天。用前將血球洗滌 3 次，然後用 pH 6.5 的 0.05 M 磷酸鹽緩衝液，按照電比結果，稀釋成 0.2% 之血球懸液。

用上述磷酸鹽緩衝液在冰浴內將抗原作連續 2 倍稀釋，每管盛不同稀釋度的抗原 0.25 毫升，加入 0.2% 之血球 0.25 毫升，振盪後放在 37°C 水浴內 10 分鐘，然後擱在 4°C 的冰箱內 1¼ 小時，記錄結果。

試驗結果

按照上述的方法，曾進行 6 次的抗原製造，茲將各批抗原的血凝試驗結果總結於表 1。

表 1 17 D, Dakar 及正常鼠腦抗原的血凝效價

試驗號	Dakar 抗原		17 D 抗原		正常鼠腦抗原 血凝效價
	病毒含量 LD ₅₀	血凝效價	病毒含量 LD ₅₀	血凝效價	
1			0	—	—
2	0	1:1024	0	—	—
3	0	1:256	4.50	—	—
4	4.87	1:512	4.75	—	—
5*	4.60	±	3.54	—	—
6	5.00	1:512			

註：0 = 沒有做。— = 陰性。* = 抗原在室溫 (20°C) 製備。

由表 1 可以看出：正常鼠腦抗原對雞血球不發生凝集；Dakar 抗原肯定地具有血球凝集現象，凝集效價最低的為 1:256，最高的達 1:1024；17 D 抗原在 5 次的試驗中均屬陰性。我們曾推想到是否因 Dakar 和 17 D 株間病毒含量不同而有此差異，因此作了幾次的病毒滴定，但如上表所載，滴定結果並無懸殊距離。因此兩株間的血凝差異原因尚未確定。第 5 次抗原製造係在 20°C 的室溫中進行的，結果很明顯地指出溫度對血凝效價之影響。

爲了更好地說明這一點，我們曾做了一系列的不同溫度的比較試驗說明在低溫 (-40°C) 情況下，抗原可保持其活動性至 9 個月之久；在 4°C，可以保持 2 天；在 26—28°C 的室溫中保存 2 小時，抗原效價即下降一倍；在 37°C，10 分鐘即全部消失。

關於凍化對抗原的影響，我們也做了一些試驗。將 Dakar 抗原放在 -50°C 低溫冰箱中的酒精浴內凍結半小時後，取出，立刻使其融化，如此反復凍化 5 次後，檢查效價並無下降情形。

Dakar 抗原對各種動物紅血球的作用：爲了瞭解 Dakar 抗原廣泛性的作用，除雞

雞外，我們研究了 13 種其他動物的紅血球的血凝反應，結果見表 2。

表 2 Dakar 抗原對各種動物血球之血凝試驗

動物種類	成雞	鴿子	家兔	豚鼠	地鼠	小白鼠	大白鼠	山羊	綿羊	馬	牛	猴	人 [0] 型	雞血球對照
Dakar 抗原血凝效價	±	1:640	1:80	±	±	-	-	-	1:160	±	-	±	±	1:640
正常鼠腦血凝效價		-							-					-

表 2 說明 Dakar 抗原對鴿子的紅血球的作用與雞相同，效價均為 1:640，其次為綿羊 (1:160)，再次為家兔 (1:80)，其他幾無作用。關於綿羊血球的凝集作用王潘淵氏^[16]曾述及，但對於鴿子的血球的凝集作用，文獻中從無記載。正常鼠腦對雞、鴿子、綿羊紅血球均無反應。

Dakar 抗原對各種血球的血凝現象出現後，放置室溫 3—4 天，未見離散。

血凝反應的最適宜 pH 值：用 6.0—8.0 的各種 pH 值的 0.05 M 磷酸鹽緩衝液稀釋抗原及血球，作抗原滴定，結果見表 3。

表 3 在不同的 pH 值下 Dakar 抗原的血凝效價

pH	血 凝 效 價	
	試 驗 1	試 驗 2
6.0	1:80	
6.5	1:160	1:320
7.0	1:160	1:320
7.5	—	1:160
8.0	—	

由表 3 可以看出 Dakar 抗原之最適宜 pH 值為 6.5—7.0。

不同溫度對血凝反應的影響：將 Dakar 抗原按上述方法稀釋後，放在各種不同的溫度下，觀察其血凝反應，結果見表 4。

表 4 在不同溫度下 Dakar 抗原的血凝反應

試驗號	溫度及時間	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	血球對照	血凝效價
I	22°C × 1½ 小時	-	±	±	±	±	-	-	-	-	<1:10
	28°C (室溫) × 1½ 小時		+	+	+	+	+	+	-	-	1:320

試驗號	溫度及時間	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	血球對照	血凝效價
II	37°C × 5 分鐘 → 4°C × 1½ 小時	++	++	++	++	++	++	+	-	-	1:640
	37°C × 20 分鐘 → 4°C × 1½ 小時	++	++	++	++	++	++	+	-	-	1:640
	37°C × 5 分鐘 → 28°C × 1½ 小時	++	++	++	++	++	++	±	-	-	1:480
	37°C × 20 分鐘 → 28°C × 1½ 小時	++	++	++	++	++	++	+	-	-	1:640
	37°C × 1½ 小時	-	±	++	++	++	+	-	-	-	1:320
	28°C × 1½ 小時	++	++	++	+	+	+	-	-	-	1:320
	4°C × 1½ 小時	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	37°C × 10 分鐘 → 4°C × 1½ 小時	++	++	++	++	±	-	-	-	-	1:120
	37°C × 50 分鐘	++	++	++	++	+	-	-	-	-	1:160
	37°C × 24 小時	++	++	++	++	+	-	-	-	-	1:160

由表 4 可以看出：血凝反應在 37°C 下為最強，其次為 28°C，再次為 22°C，在 4°C 下則不發生凝集。

血凝抑制試驗

血凝抑制試驗，為應用血凝作為診斷的關鍵問題。為了除去黃熱免疫血清內的非特異抑制素，我們應用了 Porterfield 氏^[12]等的處理方法：將試驗血清先加溫 56°C，30 分鐘滅能後，取 0.1 毫升加入 0.9 毫升生理鹽水，然後加入 10 毫升丙酮，猛搖 5 分鐘後，用 2000 轉/分沉澱 3 分鐘，倒去上清液，同樣再處理 1 次，放在真空抽氣罐內，抽氣半小時，將得到的白色粉末，再溶化於 0.92 毫升的 0.05 M 磷酸鹽緩衝液內 (pH 6.5)，搖盪，放冰箱內至次日，再次低速沉澱，以上清液作抑制試驗。

將處理過的血清作連續 2 倍稀釋，於每管盛各種稀釋度的血清 0.25 毫升，加入 0.25 毫升 Dakar 抗原 (每 0.25 毫升含 8 個血凝單位)，搖勻，放 4°C 內 20 分鐘，然後加入

表 5 聚子免疫前後血清的抑制效價

凝 號	抑 制 效 價	
	免 疫 前	免 疫 後
215	< 1:10	1:80
216	< 1:10	1:160
223	< 1:10	1:80
224	< 1:10	1:120
225	< 1:10	1:640
236	< 1:10	1:80

0.25 毫升 0.2% 的雞血球，放 37°C 內 30 分鐘，記錄結果。

我們曾用 17D 疫苗免疫 6 只猴子，在免疫前及免疫後一個月的時候，採血，按照上述的方法，測定其血清的血凝抑制效價，結果見表 5。

由表 5 可以看出：6 只猴子免疫前的抑制效價均為陰性 (<1:10)，免疫後的血清則具有肯定的抑制效價，最低的為 1:80，最高達 1:640。

在正常及免疫人血清的試驗裏也證明了這一點。

此外，在我們的試驗裏還注意到，在人及猴子的血清內，含有相當高滴度的 (1:40 以上) 非特異血球凝集素，用丙酮處理可以除去 (用 Chloroform 不能除去)。

討 論

Dakar 及 17D 病毒株如衆所週知，同為黃熱病毒，但在我們的試驗中，Dakar 株有特異性的血凝反應，而 17D 則沒有。我們除曾對二株間之病毒含量進行研究，確定無顯著差異外，在溫度 (4°、22°、37°C) 和 pH 值 (6.5—7.0) 的探究中，亦從未發現 17D 的血凝反應。是否因為 17D 毒株如西型馬腦脊髓炎病毒等，在小鼠腦內傳代日久後，即失去其血凝特性一樣^[13,14] 在雞胚內傳代較久，而失去產生血凝反應的作用；或者 17D 株的血凝素被另一物質所抑制，現尙未能確定。

在 Porterfield 氏的文獻裏談到，用丙酮方法處理血清內非特異抑制素時，在兩次丙酮提煉後，用乙醚處理一次，可使被凝固的血清容易溶解，但在我們的結果裏看出，經乙醚處理後，在血清內可能仍留下小量的乙醚，在溶解以後會引起溶血至相當高的滴度 (血清稀釋度 1:80 管仍有部分溶血)，而使結果不清楚，若將乙醚的揮發時間延長 (原來是在 50°C 水浴內 5 分鐘) 至 30 分鐘，仍不能避免溶血，同時抑制效價往往降低一倍；另一方面，若經丙酮處理後，直接抽乾，然後溶解，雖然，乾燥的時間需要較長，溶解也較慢，但是不引起溶血，同時效價也比較穩定。

黃熱血凝對本病毒免疫血清能發生特異性的抑制反應，但對其他嗜神經病毒，如流行性乙型腦炎，聖路易腦炎等病也具有交互抑制作用，故在實驗診斷上，不能被認為是唯一有效的方法，但由於血凝抑制試驗簡便經濟，應用於流行病學調查的初步試驗仍有其一定的價值。

總 結

1. 黃熱病毒 Dakar 株抗原能凝集雞和鴿子的紅血球，17D 株不能。
2. 血凝反應的最適 pH 為 6.5—7.0。

3. 血凝反應在 37°C 下最強,不離散,在 22°C 較差,在 4°C 不起反應。
4. 黃熱免疫猴子血清對 Dakar 抗原血凝具有特異的抑制效價。

參 考 文 獻

- [1] LaHelle, O. and Horsfall, F. L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**: 713, 1949.
- [2] —————, *ibid.*, **71**: 719, 1949.
- [3] Sabin, A. B., and Bucshes, E. L., *ibid.*, **74**: 222, 1950.
- [4] Sabin, A. B., *Fed. Proc.*, **10**: 573, 1951.
- [5] MacDonald, F., *Brit. J. Exp. Path.*, **33**: 537, 1952.
- [6] Fastier, L. B., *J. Immunol.*, **66**: 365, 1951.
- [7] Chanock, R. M. and Sabin, A. B., *J. Immunol.*, **70**: 271, 1953.
- [8] —————, *ibid.*, **70**: 286, 1953.
- [9] —————, *ibid.*, **70**: 302, 1953.
- [10] Casals, J., and Brown, L. V. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**: 170, 1953.
- [11] —————, *J. Exp. Med.*, **99**: 429, 1954.
- [12] Porterfield, J. S., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **48**: 261, 1954.
- [13] Chanock, R. M. and Sabin, A. B., *J. Immunol.*, **73**: 337, 1954.
- [14] —————, *ibid.*, **73**: 352, 1954.
- [15] —————, *ibid.*, **73**: 363, 1954.
- [16] 王喬淵,實用病毒學 134 頁, 1955.

STUDIES ON HEMAGGLUTINATION OF YELLOW FEVER VIRUS

LU PAO-LAN, HWANG YUAN-TUNG and T'ANG FEI-FAN
National Vaccine and Serum Institute, Peking

(SUMMARY)

A specific hemagglutinin for newly hatched chick and pigeon erythrocytes was recovered from the acetone-ether treated brains of suckling mice infected with the Dakar strain of the Yellow Fever virus, but could not be demonstrated for the 17D strain.

The hemagglutinin was stable under the temperature of -40°C, but the hemagglutination titre dropped rapidly at the temperature of 4°C or higher.

The reaction between the Dakar hemagglutinin and the erythrocytes of the newly hatched chicks was maximal at 37°C, weak at 22°C and negative at 4°C. No elution could be demonstrated under any temperature.

The optimal pH of the reaction was 6.5—7.0.

Hemagglutination-inhibition tests with the acetone treated immuned monkey sera yield specific inhibition titre.