第6卷第4期 1958年11月

微生物學報
ACTA MICROBIOLOGICA SINICA

Vol. 6, No. 4
November, 1958

幾種有機溶劑對流行性乙型腦炎病毒(京衛研₁株)感染力的作用

柳元元 張漢荆

(中國醫學科學院病毒系)

利用甲醇、乙醇並有機溶劑提純蛋白質在文獻上早有報告[1,2] 但是在應用這些化學藥劑提純病毒方面,除了流感病毒以外文獻上很少述及。Cox 氏等[3,4]曾報告用甲醇和乙醇處理受染的鷄胚尿囊液,獲得較純淨的病毒製品。 Schwerdt 氏和 Schaffer 氏[5]曾利用丁醇從組織培養液中初步提純脊髓灰白質炎病毒。 但是如果鼠腦組織感染病毒,由於鼠腦組織中含有大量的類脂質,要除去這些物質而不使病毒受到損失,在方法上是十分困難的。 Casals 氏[6] 曾利用丙酮和乙醚處理一些嗜神經病毒,除去類脂質而得到滴度較高的補體結合抗原。 但是其中病毒感染力的損失如何,還是不清楚的。 Sulkin 氏等[7] 研究了乙醚對於嗜神經病毒的作用,觀察到乙醚能使東方馬腦炎病毒、西方馬腦炎病毒和聖路易腦炎病毒滅活, 而脊髓灰白質炎與狂犬病病毒對乙醚則有抵抗。 Bachrach 氏和 Schwerdt 氏[8] 曾報告用正丁醇從受染的鼠腦組織提純脊髓灰白質炎病毒,並且指出,用乙醚處理時病毒的損失相當大。 關於乙醚和丙酮等對流行性乙型腦炎病毒的滅活作用,還沒有看到文獻報告。

爲了了解有機溶劑對流行性乙型腦炎病毒的作用以便進一步進行該病毒的提純試驗,同時提供一些有關病毒的化學性質的材料,我們選擇幾種實驗室常用的有機溶劑進行研究。

材料和方法

I. 材料:

1. 毒株: 流行性乙型腦炎病毒京衛研₁株。 均用受染的小白鼠腦組織。病毒的代數均在 19—28 代之間。在本試驗中病毒的平均 LD_{50} 滴度爲 8.0 (對數)。

2. 有機溶劑:

甲. 種類及規格: 甲醇、乙醇(無水)、正丁醇、正戊醇、丙酮、乙醚(無水)和氯仿等,均爲化學純。

乙. 溶液的配製: 將甲醇、乙醇、丁醇、戊醇等分別用無菌的蒸餾水配成各種不同濃度的溶液或混合液備用;丙酮、乙醚、氯仿則不加以稀釋。

3. 實驗動物: 三週齡同一來源的正常小白鼠。

1958年4月17日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

4. 滴定用的稀釋劑：含 10% 脫脂牛奶的生理鹽水。

II. 方法：

1. 醇類：用無菌操作取出受染鼠腦組織，稱其重量後用消毒的細玻璃砂研磨均勻，分裝於小試管中(每管約有鼠腦組織 0.3—0.4 克)。分別用已配製好的各種濃度的甲醇、乙醇、丁醇、戊醇等液加入試管中，製成 10% 的鼠腦組織懸液(懸液中最後分別含有 80%、70%、……10% 的化學藥劑)。將含懸液的試管放在 0°C 冰水中 1 小時或 4 小時，然後以 3000 轉/分沉澱 20 分鐘，用三週小白鼠腦內接種法滴定沉澱後的上清液(標明爲“原液”)中病毒的效價，按照 Reed 和 Muench 氏的方法計算其 LD_{50} 滴度。

將上清液吸淨後，在沉澱物中加入磷酸鹽水(pH 8.2)使沉澱物再懸浮，仍成爲10% 的懸液。充分攪勻後將試管在 0°C 冰水中放置 1 小時，再以同樣的方法將懸液以 3000 轉/分沉澱 20 分鐘。將重懸浮後的上清液滴定(標明爲“沉澱釋放液”或簡稱爲“沉澱”)病毒的效價。

2. 丙酮、乙醚、氯仿：方法與醇類相同，惟除用純溶劑直接製備 10% 的組織懸液外不加蒸餾水或其他液體。在作用一定時間並如上沉澱後，吸去化學藥劑，同樣用緩衝鹽水釋放沉澱物，再次沉澱後滴定沉澱釋放液中病毒的 LD_{50} 滴度。

實 驗 結 果

1. 有機溶劑對小白鼠的毒性：爲了了解試驗用的有機溶劑對小白鼠的毒性，先用各種藥劑製成10% 的正常鼠腦懸液(甲醇、乙醇、丁醇和戊醇最後的濃度爲 80%；丙酮、氯仿和乙醚則不加稀釋)沉澱後將上清液用 10% 脫脂牛奶生理鹽水稀釋到10^{-3}，每個稀釋度注射於五隻三週齡的小白鼠腦內，每鼠 0.03 毫升，觀察二星期，其結果如表 1 所示：

由於各種藥劑在高濃度時對小白鼠有毒性，但是在較低濃度時對動物則無毒性，同時由於動物在注射高濃度的藥劑時立刻死亡，在觀察時均易於作爲非特異性死亡計算。

表 1 各種有機溶劑對小白鼠的毒性試驗

藥劑 名稱	藥劑 濃度	稀釋度 1:10	稀釋度 1:100	稀釋度 1:1000	總死亡數
甲 醇	80%	4/5	0/5	0/5	4
乙 醇		5/5	0/5	0/5	5
丁 醇		5/5	4/5	0/5	9
戊 醇		5/5	5/5	0/5	10
乙 醚	100%	5/5	0/5	0/5	5
氯 仿		5/5	5/5	0/5	10
丙 酮		5/5	0/5	0/5	5

表內數字的分母表示接種的鼠數，分子表示死亡的鼠數，小鼠的死亡大部在接種後五分鐘內發生。

2. 醇類對病毒的影響：

爲了便於比較各項試驗所得到的結果，先求得全部試驗的對照組的平均 LD_{50} 滴度 (8.0 對數)，然後，在此基礎上計算各試驗組的 LD_{50} 滴度，均以其對數値表示之。

由表 2 可見：在高濃度(即80%、70%、60%) 的甲醇、乙醇、丁醇和戊醇的作用下，病毒的 LD_{50} 滴度一般都比對照降低了 5—6 對數單位，即只有原來的數十萬到數百萬分之一。在濃度爲 20%、10% 的甲醇、乙醇中，病毒的 LD_{50} 滴度與對照相差不大。可以看出病毒的滅活和醇類的濃度成正比例。

在濃度爲 10% 的甲醇中，病毒的 LD_{50} 滴度在四小時的試驗中反而較一小時的爲高。(原液中病毒的 LD_{50} 滴度由一小時的 8.4 對數增至四小時的 9.0 對數，沉澱由 7.2 增加到

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 2　四種醇類對腦炎病毒 LD_{50} 滴度的影響(試驗溫度 0°C)

作用時間	溶劑名稱	滴定的材料	最後的濃度 % 80	70	60	50	40	20	10
			LD_{50} 滴度(對數)*						
一小時	甲醇	原液	<3.3		4.5		5.2	8.0	8.4
		沉澱	<2.0		1.9		4.2	8.1	7.2
	乙醇	原液	<0.5	<0.5	<1.8	2.3	4.8	7.3	8.0
		沉澱	2.0	<1.4	<1.4	3.1	3.8	6.3	8.0
	丁醇	原液	<1.6	<1.6	<1.6	<1.8	4.5	5.2	
		沉澱	<2.5	<2.5	<2.5	<1.8	2.9	4.0	
	戊醇	原液	<1.8	<1.8	<2.4	1.8	1.8	5.4	
		沉澱	<1.8	<1.8	<2.4	<1.3	1.3	4.0	
四小時	甲醇	原液	<2.5		3.0		5.0	7.2	9.0
		沉澱	2.0		3.0		3.8	7.3	8.2
	乙醇	原液	<1.0	<2.5	<3.8	4.2	4.9	6.2	8.0
		沉澱	<3.8	<2.5	3.8	4.4	3.7	5.8	7.8
	丁醇	原液	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	2.7	3.8	
		沉澱	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5	2.7	3.7	
	戊醇	原液	<1.5	<1.5	<2.4	3.5	3.8	3.9	
		沉澱	<2.1	2.5	<2.4	2.5	2.3	2.4	

* 各次對照原液的 LD_{50} 滴度平均爲 8.0、沉澱的 LD_{50} 滴度約爲其 1/10。

8.2)。在 40% 和 20% 時，作用時間越長則滅活作用也增大。在 20% 的濃度時病毒滴度的降低明顯地隨着藥劑的不同而異(圖 1)。濃度在50%以上時一方面由於藥劑的滅活作用較强，另一方面由於藥劑具有毒性以致滴定的稀釋度不可能過低，同時各次試驗的對照其 LD_{50} 滴度也不十分一致，因此滴定所得的結果多數小於實際應有的效價，故不易作比較。

表 2 同時指出在 20% 的甲醇和乙醇中，病毒的 LD_{50} 滴度要較在相同濃度的丁醇和戊醇爲高。

3. 乙醚、氯仿、丙酮對腦炎病毒的作用：

由表 3 可見乙醚、氯仿和丙酮對腦炎病毒的滅活作用相當大，作用後，病毒的 LD_{50} 滴度一般均爲對照的數十萬至數百萬分之一。

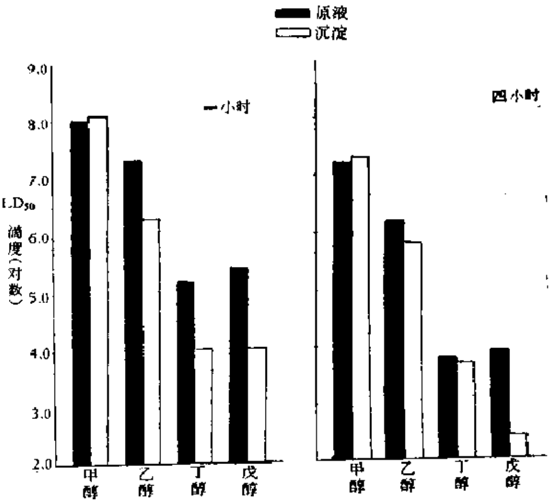

圖 1.　甲醇、乙醇、丁醇、戊醇在濃度爲 20% 時對腦炎病毒 LD_{50} 滴度的影響(試驗溫度 0°C)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表3　乙醚、氯仿和丙酮對腦炎病毒LD_{50}滴度的影響(試驗溫度0°C)

作用時間	滴定的材料	溶劑名稱		
		乙醚	氯仿	丙酮
		LD_{50} 滴度(對數)*		
1小時	沉澱	3.9	3.3	2.2
4小時	沉澱	2.8	4.6	2.6

* 各次對照原液的 LD_{50} 滴度平均爲 8.0、沉澱的 LD_{50} 滴度約爲其 1/10。

討　論

從試驗的結果看來,各種醇類對腦炎病毒(京衛研$_1$株)的滅活作用與其濃度有密切的關係。濃度愈高,則滅活作用愈强,反之則弱。實驗證明60%—80%濃度的乙醇對腦炎病毒(京衛研$_1$株)均有很强的滅活作用。因此,實驗室一般常用的酒精(濃度約70%左右)也可用作消毒腦炎病毒之用。至於在這種濃度的範圍內需要多少時間始能使病毒完全滅活,尙待進一步的試驗。

在高濃度的醇液中,短時間的差異(1小時與4小時)對溶劑的滅活能力無多大區別,這可能是因爲在高濃度的醇類溶液中,開始時病毒雖然迅速被滅活,但是以後可能由於在懸液中被凝固的鼠腦蛋白質對其中所含的極少量的病毒起了保護作用,因而使以後的滅活作用進行得很緩慢。濃度在40%和20%時,則可見溶劑對病毒的滅活作用與時間成正比,例如20%的乙醇溶液,在作用1小時後,原液中病毒的LD_{50}滴度爲7.3對數,4小時則爲6.2對數,沉澱中則由1小時的6.3降到4小時的5.8,在甲醇、丁醇及戊醇,也有類似情况。在10%濃度的甲醇作用4小時下,原液和沉澱中的病毒量一般比較作用1小時者爲高,雖然在10%的甲醇作用1小時或4小時,懸液中的病毒量均較對照爲高,但1小時約高4倍,而4小時則高10倍。這可能是由於:在10%濃度的甲醇溶液中,病毒比較容易從組織中釋放的原故。在10%的甲醇中病毒的LD_{50}滴度雖較高,但是這種懸液的混濁度比較用別的濃度製備的懸液的混濁度爲大。在試驗中未能看出醇類具有使病毒沉澱而不影響其感染力的作用。

在濃度爲20%時,甲醇、乙醇的滅活作用較丁醇、戊醇爲弱,而戊醇則似和丁醇相等或較弱,這個差異由圖1看來十分明顯。在濃度爲40%時亦有類似的情况。在更高的濃度中由於滅活程度很大,不易比較。Tillay 和 Schaffer 二氏[9] 1926年曾證明醇類分子中所含的炭原子的數目和它們對某些細菌的滅活作用有關。Klarmann 氏等[10] 1934年亦證明某些消毒劑的不同的烷基衍生物對一些細菌具有不同的消毒作用。醇類對腦炎病毒的滅活作用是否與其炭原子數目有關,尙待進一步研究,但是從試驗的結果看來,可能存在着正比的關係。

在實驗中,我們發現在某些高濃度的醇類溶液的作用下,"沉澱釋放液"中病毒的LD_{50}滴度較原液稍高,但是比對照則低得多,其原因可能是如上面所討論的由於懸液中的非病毒蛋白質在高濃度的醇溶液中凝固,因而對其中所含的病毒有保護。事實上當加入高濃度的醇類時,鼠腦組織立即凝結成塊狀,實驗時雖然盡量攪拌均勻,但也難免有較大的塊凝集在一起而容易沉澱。沉澱了的組織塊一方面減少與有機溶劑接觸的機會,另一方面保護了在組織塊中的病毒。在用磷酸鹽水緩衝液重新釋放時,被保護在組織塊中的病毒重新懸浮到懸液中,故表現了較原液稍高的滴度。

此外,我們在試驗時把試管中的病毒組織與溶液充分混勻後就靜置於冰水中(0°C),缺少不斷的振盪與攪拌,以致醇類溶液和病毒沒有更好的接觸,這也可能爲沉澱液中病毒

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

的滴度比原液稍高的原因之一。

在試驗醇類的作用時，未曾調整懸液的 pH，pH 能否影響醇類對病毒的作用，尚須進一步研究。

結　　論

一、濃度在 40% 以上的甲醇和 20% 以上的乙醇、丁醇、戊醇等溶液與乙醚、丙酮和氯仿等有機溶劑對腦炎病毒(京衛研₁株)均有一定程度的滅活作用，不宜直接用來進行腦炎病毒的提純，其滅活作用的强弱與溶劑的濃度及作用的時間成正比例。

二、初步實驗證明 10% 的甲醇有利於病毒的釋放，尤其在延長作用時間(1小時到4小時)時，病毒從組織中釋放出來的量比對照有明顯的增加。

三、醇類的分子中所含炭原子的數目與其對腦炎病毒的滅活作用似有一定的關係。

參 考 文 獻

[1] 劉思職及吳憲 中國生理學雜誌, **8**: 27, 1934.
[2] J. L. Oncley, M. Melin, D. A. Richert, J. W. Cameron & P. M. Cross, Jr. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**: 541, 1949.
[3] H. R. Cox, J. vander Scheer, S. Aiston and E. Bohnel. *Publ. Health. Rep.*, **61**: 1682, 1946.
[4] H. R. Cox, J. vander Scheer, S. Aiston and E. Bohnel. *J. Immunol.*, **56**: 149, 1947.
[5] C. E. Schwerdt and F. L. Schaffer. Virology, **2**: 665, 1956.
[6] J. Casals. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **70**: 339, 1949.
[7] S. E. Sulkin and C. J. Zarafonstis. *J. Exptl. Med.*, **85**: 559, 1947.
[8] H. L. Bachrach and C. E. Schwerat. *J. Immunol.*, **69**: 551, 1952.
[9] F. W. Tilley, and J. M. Schaffer. *J. Bact.*, **12**: 303, 1926.
[10] E. Klarmann, V. A. Shternov and L. W. Gates. *J. Lab. Clin. Med.*, **19**: 835, 1934.

THE ACTION OF CERTAIN ORGANIC SOLVENTS ON THE JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS (PEKING STRAIN)

Liu Yuan-yuan and Chang Han-king

(*Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

Methyl alcohol, ethyl alcohol, butyl alcohol and amyl alcohol in all concentrations above 40% and the undiluted ethyl ether, acetone and chloroform were found to have a certain degree of inactivating effect on the Japanese B encephalitis virus. The activity of these chemicals on the virus was found to be proportional to the concentration of the chemicals and to the time of action.

When the infected mouse brain was suspended in a 10% methyl alcohol solution, the elution of the virus was easier than that of control. The elution became more complete when the time of action is lengthened from one to four hours.

The results in this experiment suggest that some relationship might be present between the number of carbon atoms combined in the alcohol molecule and the inactivating activity of these chemicals on the Japanese virus.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn