

# 流行性乙型腦炎病毒的血凝試驗

## III. 苯浸血凝素性質的進一步研究

周培安 陳日光 周用直

作者<sup>[1,2]</sup>曾證實鼠腦內含有對流乙腦炎病毒血凝作用的非特異性抑制物、這種非特異性抑制物，以苯處理後可除去之。在過去的實驗中又發現苯有抑制血凝的作用，爲了獲得穩定的血凝素就必須以減壓蒸發除去有血凝抑制作用的苯。但在繼續研究中，却發現不同廠品的苯却不具有這種非特異性血凝抑制物。本文即是有關這種血凝素性質的進一步研究。

### 材 料 與 方 法

1. 高速沉澱：係用東德 Heinzjanetzki 高速沉澱器 (10,000 轉/分) 沉澱 10 分鐘。沉澱後沉澱管內液體之溫度爲 31—35°C (室溫 27—31°C)。
2. 血球：爲小雞 (3—4 週) 血球，血球懸液的製備同前<sup>[1]</sup>。
3. 補體結合試驗：採用微量法<sup>[3]</sup>。
4. 其他材料，方法，與符號未經特別說明者同前<sup>[1,2]</sup>。

### 實 驗 及 結 果

一、苯與血凝素的關係：在作者之一的第一篇報導<sup>[1]</sup>裏，提到新華化學製劑研究所出品的苯在 1:10,240 倍稀釋時仍能抑制 8 個單位的流乙腦炎血凝素，因之在製備流乙腦炎病毒血凝素時，必須減壓蒸發乾燥，才能獲得到穩定的血凝素。但在繼續研究中我們用了其他廠出品的苯 (Baker., E. Merck 與新中)，在 1:20 稀釋後，即無抑制作用，因之無須減壓蒸發乾燥亦可獲得高滴度的血凝素懸液。在用苯於 4°C 冰箱內處理 4 天後，血凝素懸液內的病毒已滅活了。這樣製出的血凝素懸液，不經減壓蒸發乾燥，亦可獲得了 1:2560 血凝滴度。在 4°C 冰箱內可保持這效價到 10 天；到一月時，尚有 1:160 的滴度。

二、稀釋液與血凝素滴度的關係：我們過去進行血凝試驗時<sup>[1]</sup>，係將乾燥血凝素以 pH 8.4 磷酸鹽緩衝鹽水稀釋後，再以 pH 6.3 的同樣鹽水按倍比稀釋，每管 0.5 毫升，然後加入 pH 6.3 的同樣鹽水的血球懸液。結果發現操作過程 (倍比稀釋後至加入血球懸液的時間) 延長時，血球凝集滴度會降低，以致影響結果的準確性。現在我們在倍比稀釋時，改用 pH 8.2 的磷酸鹽緩衝鹽水，而配製血球懸液時，則用磷酸二氫鈉鹽水 (M/7.5  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液 100 毫升 + 生理鹽水 900 毫升)。在二者混和後其酸鹼度仍爲 pH 6.3 左右，同時克服了血凝素稀釋後放置較久滴度降低的缺點。但血球以磷酸二氫鈉鹽水稀釋後，易於溶血，因

此於配製血球時，最好先以生理鹽水配成 2.5% 的原液，臨用前再以磷酸二氫鈉鹽水稀釋至 0.25%。用磷酸二氫鈉鹽水稀釋後之血球懸液，保存在冰箱內，不宜超過 8 小時，在室溫中不宜超過 4 小時。茲將兩種稀釋液滴定乾燥與未乾燥血凝素的結果總結於表 1 及表 2：

表 1 乾燥血凝素稀釋後滴度的變化(18—20°C)

滴 度 時 間	稀釋液 pH8.2+磷酸一氫鈉鹽水血球液									稀釋液 pH6.3+pH6.3 血球液						
	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	40	80	160	320	640	1280	2560
原始	4	4	4	4	4	4	4	2	—	4	4	4	4	4	2	—
10'	4	4	4	4	4	4	4	1	—	4	4	4	4	4	2	—
20'	4	4	4	4	4	4	3	1	—	4	4	4	4	4	1	—
60'	4	4	4	4	4	4	3	—	—	4	4	2	1	1	—	—
2小時	4	4	4	4	4	4	3	—	—	3	1	1	—	—	—	—
4小時	4	4	4	4	4	4	3	1	—	2	1	—	—	—	—	—
6小時	4	4	4	4	4	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8小時	4	4	4	4	4	4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表 2 未乾燥血凝素稀釋後滴度之變化(4—6°C)

滴度	稀釋液 pH8.2+磷酸二氫鈉鹽水血球液												稀釋液 pH6.3+pH6.3血球液									
	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	40960	81920	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	
原始	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	4	4	4	4	4	4	3	2	—	
10'	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	4	4	4	4	4	4	3	±	—	
20'	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	4	4	4	4	4	4	2	1	—	
60'	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	—	4	4	4	4	4	3	1	—	—	
2小時	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	—	4	4	3	2	1	—	—	—	—	
3小時	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	—	3	2	±	—	—	—	—	—	—	
4小時	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
6小時	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
8小時	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

從表 1.2 可以看出，同一血凝素，分別用 pH8.2 及 pH6.3 磷酸鹽緩衝鹽水稀釋時，血凝滴度的穩定性有很大的區別。表 1 內用 pH8.2 稀釋者，原始血凝滴度為 1:2560，用 pH6.3 稀釋者為 1:640；在 18—20°C 下用 pH8.2 稀釋者經 8 小時後，血凝滴度從 1:2560 降到 1:1280。而用 pH6.3 稀釋者，經 2 小時後只有 1:80；再經 2 小時即 < 1:40。表 2 的結果是在 4—6°C 下進行的。用 pH8.2 稀釋者，經 8 小時血凝滴度沒有改變；用 pH6.3 稀釋者，經 1 小時滴度降低 1 倍，2 小時降低 16 倍，3 小時後 < 1:40。這樣在實際應用血凝抑制試驗時，操作過程如在 8 小時內，無論在室溫或 4—6°C，使用 8 單位血凝素（含在 0.25 毫升內），所以獲得正確的結果。

三、血凝素作為補體結合抗元之試驗：Espana 及 Hammon 二氏<sup>[4]</sup> 的流乙腦炎病毒苯浸抗元，經張氏<sup>[5,6]</sup>、吳氏<sup>[7]</sup>等證明較醋酮-乙醚或醋酮-苯浸抗元之敏感性更高。我們的血凝素也是用苯處理而製備的，因之或能作為補體結合抗元。而且其製備方法簡單，一般實驗室均可採用，因此我們企圖初步證明其效價和特異性。實驗中採用 Espana 氏<sup>[4]</sup> 苯浸

抗元後吳氏<sup>[8,9]</sup>改良醋酮-乙醚浸漬抗元(未振盪20小時),作為對照。

(一)乾燥或未乾燥血凝素作為補體結合抗元之效價測定:方法按吳氏報告<sup>[7]</sup>進行,結果列於表3。

從表3所以看出 Espana 氏苯浸抗元效價最高,醋酮-乙醚抗元最低;血凝素抗元在二者之間。Espana 正常鼠腦抗元在1:4—1:16稀釋時與1:2—1:4陽性血清有不同程度的非特異性反應,而醋酮-乙醚抗元及血凝素抗元則沒有這種現象。這個結果指出我們的苯製血凝素可以代替補體結合抗元。

(二)血凝素作為補體結合抗元之特異性試驗:

用流乙腦炎,西方馬腦脊髓膜炎,聖路易型腦炎,鼠腦脊髓膜炎之免疫豚鼠血清與各種抗元(效價為1:32)作交叉補體結合試驗(用四單位抗元,以下實驗同)。其結果如表4:

表3 血凝素製劑作為補體結合抗元的效價

抗元種類 稀釋度	Espana's 苯浸抗元 (鼠腦20%)					醋酮-乙醚抗元 (鼠腦25%)*					未乾燥血凝素 (鼠腦10%)**					乾燥血凝素 (鼠腦10%)					血清對照
	1:4	8	16	32	64	4	8	16	32	64	4	8	16	32	64	4	8	16	32	64	
陽性血清																					
1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	—	—	—
1:4	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
1:8	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
1:16	+	+	+	+	+	+	+	2	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
1:32	+	+	+	+	+	3	3	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
1:64	+	+	+	+	3	2	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—
1:128	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—
抗元對照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
正常抗元1:2†	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
對 照1:4	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1:8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

\* 鼠腦1克加稀釋液3毫升。

\*\* 鼠腦1克加稀釋液9毫升。

† 陽性血清稀釋度。

表4 幾種嗜神經性病之交叉補體結合試驗

抗元 陽性血清	Espana's 苯浸抗元		醋酮-乙醚抗元		未乾燥血凝素		乾燥血凝素		聖路易	西馬	(血清對照)
	流 乙 1:8	正 常 1:8	流 乙 1:2	正 常 1:2	流 乙 1:4	正 常 1:4	流 乙 1:4	正 常 1:4	抗元 1:2	抗元 1:2	
流乙腦炎	1:1024	1:2	1:128	—	1:1024	—	1:512	—	1:4	—	—
西方馬腦炎	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1:32	—
聖路易腦炎	1:4	—	—	—	1:2	—	1:2	—	1:64	—	—
鼠腦脊髓膜炎*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
正常血清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

符號說明: — = <1:2

\* 西方馬腦脊髓膜炎,聖路易型腦炎,鼠腦脊髓膜炎(FA株)。病毒之抗元與血清係中國協和醫學院所贈,特此致謝。

表 4 指出, 應用血凝素作為補體結合抗元, 其特異性至少可以與 Espana 氏的苯浸補體結合抗元相比。對聖路易型腦炎免疫血清僅有輕度的交叉反應(1:2)。

## 摘 要

1. 作者曾發表流乙腦炎病毒感染鼠腦的懸液以苯處理減壓蒸發乾燥後, 可以獲得較穩定的血凝素。同時還報導了新華廠的苯有高度的血凝抑制作用, 不經減壓蒸發除淨, 即不能凝集血球。進一步研究發現有些廠家(新中等)出產的苯不抑制血凝, 因此不經減壓蒸發, 亦可獲得高效價的血凝素懸液。此種血凝素懸液在 4°C 冰箱內可保持其滴度 10 天到 1 月時, 其滴度由 1:2560 降至 1:160。

2. 流乙腦炎病毒血凝素用 pH6.3 的磷酸鹽緩衝鹽水稀釋時, 於試驗操作過程中, 其滴度亦會降低, 因之影響結果的準確性。我們改用了 pH8.2 的磷酸鹽緩衝鹽水稀釋血凝素及血清, 加入磷酸二氫鈉鹽水稀釋的血球, 克服了這種缺點。

3. 實驗又證明我們所製成的血凝素, 可以作為補體結合抗元。在特異性方面, 似乎比 Espana 氏苯浸抗元還要好一點; 其優點在於製備方法簡單, 無需真空抽氣設備。

註: 本文承張乃初教授改正, 特此致謝。

## 參 考 文 獻

- [1] 周培安: 微生物學報, 4: 67—76, 1956.
- [2] 周培安: 微生物學報, 4: 77—84, 1956.
- [3] 宋幹、周明先、沈中: 中華醫學雜誌, 37(4): 287, 1951.
- [4] Espana and Hamman, W. M.: *J. Imm.* 59: 31, 1948.
- [5] 張乃初、劉風亭、屈鴻鈞: 微生物學報, 2: 49, 1954.
- [6] 張乃初: 微生物學報, 5: 340, 1957.
- [7] 吳安然: 微生物學報, 4: 372, 1956.
- [8] 吳安然、朱錫華、劉風亭、馬連堤: 微生物學報, 1: 196, 1953.
- [9] 吳安然: 微生物學報, 4: 363, 1956.

## HEMAGGLUTINATION REACTION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS.

### III. FURTHER STUDY ON THE PROPERTY OF BENZENE-EXTRACTED HEMAGGLUTININ

CHOU PEI-AN, CHEN JIH-KWANG and CHOW YUNG-CHIH

It has been pointed out in our previous reports that a stable hemagglutinin could be obtained from Japanese B encephalitis virus infected mouse brains by the treatment of benzene and subsequently dried by evacuation. At the same time, it was also found that the benzene of Hsing-hua brand gave a high hemagglutination-inhibition action. In the present paper, benzene of other brands, such as Baker, E. Merck and Hsing-chung was tried and all showed no such inhibiting activity. Furthermore, a stable hemagglutinin could now be prepared without being dried. This benzene extracted hemagglutinin so prepared when preserved in the ice box maintained its titre for 15 days. The technic of the hemagglutination test was also improved by first applying phosphate buffered saline of pH 8.2 in the serial dilution of the hemagglutinin, and then add the cell suspension adjusted to pH 6.3. Finally, it was found that the benzene extracted hemagglutinin could also serve as the antigen for the complement fixation test. Its sensitivity was about the same as that of Espana with the advantage of being much simpler in its preparation.