

# 森林脑炎免疫机制的实验研究

## 免疫小白鼠脑组织悬液及血清中和抗体与 保护力的关系\*

黄永成 武文焕

(长春生物制品研究所)

实验证明,用灭活的森林脑炎鼠脑疫苗经不同的方法和条件所免疫的小白鼠行脑腔攻击病毒时保护力很低,甚至证明不出,而以腹腔或皮下部位攻击时,则保护力极为显著。这种现象与免疫用鼠种、小白鼠体重、疫苗的效价、攻击用毒种之株别、病毒稀释液之种类、疫苗免疫次数、免疫疫苗量、疫苗注射部位以及免疫间隔时期和免疫后攻击日期等等无关。屡次试验都获得同样的结果,详细情况已于另文报导<sup>[1]</sup>。

为进一步探求脑内攻击不能呈有保护现象的原因,并查明血清抗体和脑组织抗体在森林脑炎病毒自动免疫的作用机制的关系,故做了如下的试验。今仅将其初步的结果报告于下。

### 材 料 和 方 法

1. 病毒 使用之 COΦ 株系 1953 年 10 月由卫生部生物制品检定所发给之苏联干燥毒种。在试验前经 12—16 克小白鼠脑腔连续传代。解剖后之鼠脑冻存于  $-40^{\circ}\text{C}$ ,应用时不超解剖后的两周。每次用三个无菌鼠脑混同研磨,毒力滴定一般在  $10^{-4.5}$  以上。乳鼠变异株原种系 COΦ 株,后经 2—4 克乳鼠脑腔连续传代。在 40 代后对 12—16 克小鼠的腹腔和皮下感染毒力发生明显降低之变异株。回传株系为乳鼠变异株在 14—16 克小鼠脑腔又连续回传 40 代者。其腹腔及皮下毒力略有升高,但基本上仍接近于变异株<sup>[2]</sup>。

2. 疫苗 系本所脑炎疫苗室按苏联法规程序所制备的鼠脑疫苗原液;含 10% 的小鼠脑组织并加有 0.2% 福马林(加等量磷酸盐缓冲盐水稀释即为人用疫苗)。

3. 小白鼠 试验用小白鼠均系长春生物制品研究所动物室自行繁殖者,其原种系由印度哈佛金研究所获得之瑞士种。

4. 免疫程序 仿 Casals 法<sup>[3]</sup>。选取体重 20—22 克小白鼠若干,分为两群,一为试验组,另为对照组。试验组于第一日腹腔注射 10% 鼠脑疫苗,每只小鼠 0.25 毫升;第 3 日 0.25 毫升;第 12 日腹腔注射以缓冲磷酸盐水 (pH 7.8) 稀释成  $10^{-4}$  的鼠脑病毒悬液 0.5 毫升;第 16 日注射  $10^{-2}$  病毒悬液 0.5 毫升;第 20 日亦为  $10^{-2}$  病毒悬液 0.5 毫升。在首次免疫后第 35 日将免疫之小鼠分若干组,经脑腔或腹腔攻击病毒。同时取部分小鼠,从心脏采血;并用 20 毫升盐水通过心脏进行灌流,以洗去组织中残留的血液,然后取脑。

\* 1958 年 8 月 13 日收到。

**5. 小白鼠脑组织悬液的制备** 免疫组与对照组之小鼠,先以乙醚施轻度麻醉,用针固定其四肢,使其腹部朝上。消毒后用灭菌的剪刀剖开腹部,然后再剪开胸腔以露出心脏。用 20 毫升注射器和 1/2 号针头从左心室慢慢地注入无菌的生理盐水约 20 毫升,灌流后剪断心脏,放出液体。灌流后的小鼠经 5% 来苏水消毒外部后无菌手续解剖;将取出之脑再以生理盐水洗涤三次,同时做无菌试验,然后保存于 -40℃ 冰箱。临中和试验前,每三个脑合并为一组,每个鼠脑按 0.4 克计算加入林格氏液 (pH 7.8) 制成 20% 的悬液,经每分钟 2,000 回轉离心沉淀 10 分钟后吸取上清即为试验用脑组织悬液。健康鼠脑悬液和上法同样制备。

**6. 中和试验方法** 中和试验用的免疫血清和健康血清均先于 56℃ 水浴加温 30 分钟以除去非特异性物质,但脑组织不经加温处理。病毒用林格氏液稀释成  $10^{-1} \times 2$  至  $10^{-9} \times 2$  各个不同的稀释度。血清和脑组织不再稀释。在每个不同稀释度的病毒悬液中,加等量的血清或脑组织悬液。混合后轻微振荡摇匀,置 37℃ 水浴作用 1 小时,然后置入 2—4℃ 冰浴中。每个稀释度注射 5 只 10—12 克小鼠于脑腔内 0.04 毫升,或腹腔 0.1 毫升。接种后逐日观察,21 日后判定结果,按 Reed-Muench 氏法计算  $LD_{50}$ ,并由此求出中和指数。

試驗結果

1. 試驗毒株經不同途径注射小白鼠毒力滴定結果——森林脑炎病毒經乳鼠传代后对小白鼠的致病性发生了改变,对皮下和腹腔内注射病毒毒力降低已曾詳細报导<sup>[2]</sup>。我們这次試驗用的毒种計有三种:coφ 株、乳鼠变异株与变异回传株,三株对小白鼠不同途径感染毒力滴定的結果列于表 1。

表 1 攻击用病毒毒力滴定試驗

注射途径和 剂 量	株 别	病毒稀释度与小鼠死亡数									LD <sub>50</sub>
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	
脑腔内 (0.04 毫升)	coφ 株					6/6	6/6	6/6	6/6	1/6	8.60
	变异回传株					6/6	6/6	5/6	4/6	1/6	8.24
	乳鼠变异株				6/6	6/6	6/6	6/6	4/6		> 8.25
腹腔内 (0.3 毫升)	coφ 株				6/6	6/6	6/6	5/6	3/6		7.85
	变异回传株			2/6	3/6	1/6	2/6	0/6	1/6		4.00
	乳鼠变异株	5/6	2/6	3/6	2/6	0/6					2.42
皮 下 (0.3 毫升)	coφ 株				6/6	6/6	6/6	6/6	0/6		7.50
	变异回传株	3/6	1/6	0/6	1/6	0/6	0/6				1.29
	乳鼠变异株	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6					≤ 0.50

註 1. 表中 LD<sub>50</sub> 为 LD<sub>50</sub> 的負倒数,如 10<sup>-8.6</sup> 以 8.6 表示,以下表同。

2. 表中分母为接种小鼠之总数,分子为死亡鼠数,以下表同。

从表 1 可以看出,在小白鼠的致病性上 coφ 株和乳鼠变异株是不同的;变异回传株居于二者中間,偏近于乳鼠变异株。

2. 高度免疫小白鼠脑内攻击病毒試驗——从表 1 中結果說明三株在毒力不同,乳鼠变异株經皮下感染已不能引起发病和死亡,是否在免疫小白鼠用該病毒脑腔攻击时亦同

样发生了改变，而呈现保护现象，这对森林脑炎、脑腔攻击无保护现象的原因的解释是有很大的帮助的。为此，取同批免疫的小白鼠用不同株病毒同时攻击，试验结果列于表 2。

表 2 高度免疫小白鼠对 coφ 株、乳鼠变异株及变异回传株脑内攻击的保护力

注射途径和 剂量	攻击毒种	组 别	攻击病毒后小白鼠的生存和死亡数										保护指数
			10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	LD <sub>50</sub>				
腹腔内 (0.04 毫升)	coφ 株	免疫组			4/4	2/5	5/5	4/5	3/5	1/5		6.62	100
		对照组					5/5	5/5	5/5	1/5	8.62		
	乳鼠变异株	免疫组		5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	3/5			7.00	6.7
		对照组			5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5		7.83	
	回传变异株	免疫组			4/4	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		≥ 8.50	10?
		对照组				5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		≥ 9.50	
腹腔内 (0.3 毫升)	coφ 株	免疫组	0/4	0/4	0/4	0/4						≤ 0.50	11,480,000
		对照组				4/4	4/4	3/4	3/4	2/4		7.56	

由表 2 的结果看出，脑腔攻击病毒其保护指数是相当低的，虽然 coφ 株是略高。如以 coφ 株腹腔攻击时，保护指数高达 11,480,000。这次的结果和以往单用 coφ 株所得的试验结果上基本相同。

3. 中和试验——脑组织是否可产生中和病毒物质的问题，过去曾做过试验。但因小白鼠免疫用的为普通疫苗而结果不显著；从脑组织中虽证明不出中和物质，但血清的中和抗体效价亦低，因而不能确切肯定此问题。另外，中和试验的方法亦很重要。往往在中和物质低的时候用脑腔中和法不易查出。为克服如上的缺点，我们采用了活毒免疫法，同时应用腹内注射病毒和脑内注射病毒两种方法来比较血清和脑组织的中和物质。试验结果列于表 3。

表 3 高度免疫小白鼠的血清及脑组织对 coφ 株病毒的中和试验

注射部位和 剂 量	试验材料	不同稀释度接种后小白鼠的生存和死亡数									中和指数
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	LD <sub>50</sub>	
脑腔内 (0.04 毫升)	免疫血清	5/5	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5			4.50	7,586
	正常血清			5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	8.38	
	免疫鼠脑		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5		8.50	1
	正常鼠脑			5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	8.50	
腹腔内 (0.1 毫升)	免疫血清	0/4	0/4	1/4	0/5	0/5				< 1.62	239,900
	正常血清		4/4	4/4	4/4	4/4	2/4			7.00	
	免疫鼠脑	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4				6.33	7
	正常鼠脑		4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4		7.23	

从表 3 结果看出，无论脑腔或腹腔注射病毒法，免疫的小白鼠血清都可以证明有高效价的中和抗体，尤以腹腔法更为显著。至于免疫之脑组织用两种方法都证明不出。本试验主要缺点是免疫后的一个固定时期采血，是否血清中和抗体和脑组织抗体的升降成交叉的，两者呈现最高的时间不同，尚难定论。但两者悬殊如此明显，再结合保护力试验

的結果来判断,我們认为脑組織中即使于某一时期含有一些抗体,也是极微量的。

## 討 論

森林脑炎病毒所引起的中和抗体对病毒的作用,無論在試驗管內或在动物体内都很容易地得到証实。小白鼠在腹腔注射病毒之前或同时或以后投予免疫血清时,可保护部份小鼠免于死亡。如脑內注射病毒时,病毒直接侵入了脑組織,便看不出血清的保护作用。中和試驗时,血清和病毒的混合物同时注射脑腔或腹腔內时,結果亦有差別。在这点上,我們的試驗是和 Casal<sup>[3]</sup>、Olitsky 二氏<sup>[4]</sup>的結果相一致的。

Шубладзе 氏认为森林脑炎的体液抗体与动物机体的抵抗力是相平行的。Певкович 氏<sup>[5]</sup> 在研究体液因素在自动免疫机轉中的作用时,亦认为免疫动物的抵抗力和体液抗体是平行的。辛氏<sup>[6]</sup> 等証实疫苗免疫的小鼠能中和腹內注射而进入血流中的病毒,因而防止病毒侵入脑內。

森林脑炎所以不能抵抗脑內攻击病毒,脑神經組織缺乏免疫反应可能是主要因素之一。我們用各种的免疫方法都检查不出中和病毒的物质,特别是經生毒免疫后血清中的抗体中和指数相当高的时候,脑組織悬液的中和指数仍然不能发现。

Schlesinger 氏<sup>[7]</sup> 在研究西方馬脑炎病毒自动免疫的作用机轉时,曾証明免疫鼠对脑內攻击病毒时不能保护增殖速度快的变种,而能保护慢株。該著者并认为快株乃經多年于鼠脑传鼠脑毒力被提高,接种后小白鼠生存期間縮短病毒繁殖太快所致。我們过去常用之攻击毒种为 соф 株。据 Шубладзе 氏和 Анджапаридзе 氏<sup>[8]</sup> 的报告,соф 株在 1937 年所分离,并已通过小白鼠数百代。因此,我們考虑到毒种的性状亦不容忽視的。但是我們曾用过新由病屍脑組織或者由婢新分离到毒株进行脑內攻击时亦証明不出保护力<sup>[9]</sup>。本試驗又証明了 соф 株經乳鼠传代后发生毒力改变的变异株亦得同样結果。

## 摘 要

1. 超免疫的小白鼠用 соф 株、乳鼠变异株以及变异回传株病毒脑內攻击时保护指数均低,但用 соф 株腹腔攻击病毒时則呈現显著的保护現象。

2. 超免疫的小白鼠血清用脑內中和法和腹內中和法都可証明出中和抗体;以脑內法所表現的比腹內注射法为低。同样免疫鼠的脑組織用两种方法都証明不出有中和作用。

3. 对免疫小白鼠脑內攻击病毒保护現象低的原因曾加以討論,作者推論这种現象与实验动物的免疫程度有关。

## 参 考 文 献

- [1] 长春生物制品研究所:卫生部防疫資料彙編,第七輯,1956。
- [2] 朱既明、唐王书:生物制品通訊,2:1 26—32,1957。
- [3] Casals J., *J. Exp. Med.*, **79**: 347, 1944.
- [4] Casals J. & Olitsky, P. K. *J. Exp. Med.* **82**: 431—443, 1945.
- [5] Певкович, Е. Н. *Ж.М.Э.Н.*, 10—11. 1945.
- [6] 辛鈞、蔣学圣:生物制品通訊,2:1 32—39, 1957。
- [7] Schlesinger, R. W. *J. Exp. Med.* **89**: 491—505. 1949; *J. Exp. Med.* **89**: 507—527, 1949.
- [8] Шубладзе, А. К. и Анджапаридзе, О. Г. *Ж.М.Э.Н.*(9) 74—77, 1954.
- [9] 未发表資料。

## STUDIES ON THE IMMUNE MECHANISM OF SPRING AND SUMMER ENCEPHALITIS

HUANG, Y. C. AND WU, W. H.

Up to the present time, the failure of active immunization to protect animals against intracranial inoculation of the spring and summer encephalitis virus remained unexplained. The authors attempted to solve this problem by comparing the content of neutralizing antibody in the blood serum and in emulsion of brain tissues simultaneously. It was found that in hyperimmunized animals, neutralizing antibodies were found in both brain emulsion as well as in the blood serum, although the former was only a small fraction of the latter (index of 7 as against 239,900). Thus the nature of the discrepancy between resistance of immune animals by the intraperitoneal as against intracranial route remained still open to further investigation.