

鼠脑組織引起的实验性变态 反应性脑脊髓炎*

王用楫 盧錦漢 李美容 張永福

(卫生部生物制品研究所)

众所周知,在注射含有脑組織的狂犬疫苗之后,偶尔可以发生麻痺^[1]。Gamalea 氏^[2]早就认为这个现象与狂犬病固定毒无关,而系由于注射的正常脑組織对中樞神經系統的毒性作用。几十年来,这个說法已为許多学者的工作所証实。Rivers 等氏^[3,4],在 1933—1935 年使用兔脑,长期多次注射猴子的結果,发生了变态反应性脑脊髓炎。这个試驗結果为 Ferraro 等氏^[5]所証实。1946—1947 年 Morgan^[6,7], Kabat 等氏^[8,9], Morrison^[10] 及 Freund 等氏^[11],引用 Freund 氏的佐剂^[12]与脑組織制成乳状悬液接种动物,能迅速而成功地引起变态反应性脑脊髓炎。此种脑脊髓炎已用猴子^[7,9,13,14]、家兔^[10,15]、豚鼠^[11,14,16,17,18]、大白鼠^[19,20]、小白鼠^[21,22,23]进行过許多研究。接种材料大都为豚鼠、家兔或猴子的脑組織;用小白鼠的脑組織进行变态反应性脑脊髓炎試驗的較少。

为了了解小白鼠的脑組織能否使常用的实验动物发生变态反应性脑脊髓炎,我們先后使用小白鼠、豚鼠、家兔、猴子及大白鼠接种鼠脑組織,进行試驗。为增加出现疾病的机会,縮短动物观察時間,制备鼠脑抗原时也加入 Freund 氏佐剂,即将抗原与抗酸性杆菌(加热杀死的卡介苗)混悬在液体石蜡中。同时还采取了家兔脊髓組織依同法制备抗原,接种小白鼠及豚鼠,作为阳性对照。实验結果表明:鼠脑組織能規則地使豚鼠、猴子和大白鼠发生变态反应性脑脊髓炎,而小白鼠或家兔仅个别的发生疾病。本文将豚鼠、猴子及大白鼠的实验結果报告于后。

一、鼠脑組織悬液的制备

先取干燥卡介苗在乳鉢內研細,徐徐加入液体石蜡,成为乳状悬液,使每毫升液体石蜡中含有卡介苗 5 毫克。悬液制成后以 10 磅蒸气消毒 10 分钟,置冰箱中备用。

选择正常 18—20 克体重的小白鼠,心脏放血杀死,即刻在无菌条件下解剖,取脑,在乳鉢內研磨。每脑按 0.4 克計算,加入上述无菌液体石蜡卡介苗液制成鼠脑組織悬液,成分比例如下:

新鮮鼠脑	30 克
干燥卡介苗(已加热杀死)	600 毫克
液体石蜡	120 毫升

家兔脊髓悬液依同法制备。制成的鼠脑組織及家兔脊髓悬液保存在 4°C 冰箱中备用。

本文 1962 年 9 月 27 日收到。

* 蒙中国医学科学院病理科及本所研究室病理組大力协助,进行实验动物的病理学检查,特此致謝。

二、豚鼠試驗

选择体重 400—600 克的健康豚鼠 80 只,依接种材料、部位及其数目、途径不同,分为 8 组,每组 10 只。每只豚鼠均先后注射試驗材料两次,間隔 8 日。各组豚鼠的接种材料、部位、途径及剂量列表如下:

表 1 豚鼠的接种材料、部位、途径及剂量

試驗組別	接种材料	接种部位	接种途径	每只豚鼠 (剂量×部位×次) (毫升)×数目	接种总量 (毫升)
1	鼠脑	脚掌	皮内	0.05×4×2	0.4
2	鼠脑	脚掌	皮内	0.05×2×2	0.2
3	鼠脑	腹壁	皮内	0.05×4×2	0.4
4	鼠脑	腹壁	皮下	0.05×4×2	0.4
5	兔脊髓	脚掌	皮内	0.05×4×2	0.4
6	兔脊髓	脚掌	皮内	0.05×2×2	0.2
7	兔脊髓	腹壁	皮内	0.05×4×2	0.4
8	兔脊髓	腹壁	皮下	0.05×4×2	0.4

豚鼠于注射鼠脑或兔脊髓之前二日,先称取体重,注射后第五日及第 12 日以后,每星期检查体重一次。动物观察期为三个月。在此期间每日观察动物,特别注意是否发生神經症状。第一次接种第 5 日以后,即发现动物体重逐渐減輕;第 8 日以后,个别豚鼠出现肢体不全麻痺或后肢瘫痪,大小便失禁,发病后一般经过 1—6 日死亡。由于后肢麻痺,腰部及后肢肌肉松弛,萎縮,因而显出后肢及腰部特別瘦削(见图 1)。在观察过程中,发见个别豚鼠有先麻痺而后緩解恢复者,亦有緩解后症状再恶化而致死者。

麻痺致死的豚鼠,均做尸体检查,取脑脊髓,以 10% 福尔馬林固定作病理組織切片。尸体检查时曾采取心血及脑組織标本,分別作細菌培养及病毒分离。所有培养及分离結果,均屬阴性。据脑脊髓的組織切片检查結果,发现主要病变为炎症变化,大脑、小脑及脊髓均可受到侵犯,而以白質为主。炎症变化多出现在白質的血管周围(见图 2),軟脑膜及脑室管膜下。細胞浸潤主要为淋巴細胞及大单球細胞;但亦有多形核白血球、浆細胞或組織球等。髓鞘亦可能有中等度的变化。一般言之,未发现典型的脫髓变化,但在炎症反应

表 2 豚鼠試驗結果

試驗組別	发病時間		发病比例	病死時間		病死比例
	范围(日)	平均(日)		范围(日)	平均(日)	
1	11—21	18.5	4/10	20—21	20.5	2/10
2	20—22	21.0	3/10	20	20	1/10
3	—	—	0/10	—	—	0/10
4	—	—	0/10	—	—	0/10
5	8—14	11.4	10/10	8—19	15.6	10/10
6	9—19	13.6	8/9	14—22	17.6	8/9
7	7—25	16.9	8/10	11—27	18.5	5/10
8	20—27	22.8	4/10	27—28	27.3	3/10

的部位,曾看到髓鞘稀薄甚至遭到破壞的情況。血管周圍可現出血。

表 2 中舉出各組豚鼠的發病、病死的时间和比例。

根據上述試驗結果,說明實驗性變態反應性腦脊髓炎的发生与接种途径、接种部位、接种总量、接种材料都有一定关系。

豚鼠經注射試驗材料后发生体重減輕是一个普遍現象。依注射材料、部位、途径不同,将豚鼠体重減輕情况列为表 3。

表 3 豚鼠發病过程体重的变化

試驗組別	接种前 2 日 平均体重 (克)	接种后 平均体重			
		第 5 日 克	增減幅度 (克)	第 12 日 克	增減幅度 (克)
1	483	466	-17	444	-39
2	463	468	+5	438	-25
3	558	535	-23	533	-25
4	523	508	-15	513	-10
5	471	450	-21	399	-72
6	542	520	-22	492	-50
7	527	500	-27	501	-26
8	557	545	-12	534	-23

由表 3 可知:(1)注射試驗材料后第 5 日,8 組中有 7 組豚鼠平均体重已有下降,至第 12 日下降更为明显。(2)从各組豚鼠体重下降情况比較,注射兔脊髓的豚鼠下降幅度显然比注射小鼠腦組織的更为广闊。同时下降的幅度也是随注射部位及途径的不同而有区别的。(3)試將表 2 与表 3 比較,可看到体重下降的幅度与發病及病死比例显然有一定的关系,即發病及病死早的,体重下降的幅度大,晚的下降的幅度小。

三、猴子試驗

在猴子試驗中,試驗材料分两程注射。第一程用上述加佐剂的鼠腦組織悬液,分別以皮內及皮下途径各接种 5 只猴子,前后二次,間隔 7 日。接种部位、剂量及發病比例,病死比例列为表 4。

表 4 猴子試驗結果

試驗組別	接种部位	接种途径	接种剂量 (毫升×次数)	發病比例	病死比例
1	前臂屈側	皮內	0.1×2	2/5	0/5
2	背 部	皮下	1.0×2	2/5	1/5

在第 1 組皮內接种的 5 只猴子中,有 2 只發病。1 只(第 1 号)于首次接种試驗鼠腦材料后第 7 日精神萎靡,不進飲食;接种前体重原为 $3\frac{1}{2}$ 公斤,接种后体重逐漸減輕,第 22 日降至最低(为 $2\frac{1}{4}$ 公斤)。以后症狀逐漸消失,体重亦随之增加。另 1 只猴子(第 20 号)于接种后第 16 日出現后肢无力,运动迟鈍,至第 21 日表現运动失調,后肢麻痺;又两星期后恢复正常。

皮下注射的 5 只猴子中,2 只发生典型肢体麻痺症狀。1 只(第 32 号)以截癱發病。

即注射后第 40 日两后肢软弱无力,以后麻痺日漸加剧,行走依靠前肢爬行,两周后,症状逐渐好转,最后运动能力完全恢复。另一只猴子(第 249 号)于开始注射后第 33—36 日体温上升至 39.5—40.0℃,至第 41 日上午发病右侧偏瘫,右侧知觉迟钝,针刺没有反应,精神萎靡,视力亦迟钝;第 42 日一般情况更为恶化,左后肢运动亦有障碍,小便失禁,不能起立,躺臥在身体右侧,当晚死亡。經解剖检查,右脑半球顶叶的切面上,現有出血坏死病灶,心血細菌培养及脑組織病毒分离試驗均为阴性結果。在脑組織切片上,发现有典型变态反应性病變,即白質血管周围的脫髓現象特別显著。

上述試驗猴子于第 1 程皮內皮下注射后,連續观察 5 个月。为进一步观察发病情况,曾以同样鼠脑材料,进行第 2 程接种。为提高发病机会,第 2 程接种途径改为肌肉,部位在大腿內側;每次接种剂量一律改为 1.0 毫升,連續 2 或 3 次,間隔均为 1 星期。結果見表 5,及图 3—6。

表 5 表明第 2 程接种次数及观察結果

猴号	接种次数	潜伏期(日)	主要症状	发病与死亡間隔(日)	病理检查	
					肉眼观察	鏡下检查
17	3	18	死亡甚快,未及观察症状	1	大脑、脑干小脑出血	脫髓
18	3	19	頸向左側弯曲,左眼險下垂左眼瞳孔散大,視力消失,吃逆,流涎,癱瘓	1	大脑有出血灶	脫髓
20	2	16	牙关紧閉,小便失禁,兩側瞳孔縮小,視力障碍,癱瘓	4	大脑有广泛性出血斑	脫髓
217	3	30	強直性癱瘓,右側肢体严重,昏迷	9	大脑、脑干小脑出血	脫髓
1	3	21	惊动后肢体痙攣,頸強直,視力減退,麻痺	5	大脑有出血灶	脫髓
19	3	28	运动失調,前肢震顫,癱瘓发病,七周后运动能力恢复遺留左前肢震顫	—	—	—
32	3	—	运动正常注射局部紅腫未破	—	—	—
215	2	13	初后肢癱瘓,后波及前肢,肢体疼痛消失,眼險下垂小便先瀉留,后失禁	2	大脑、脑干小脑出血	脫髓

所有 6 只病死的动物,全部經過尸体解剖。解剖尸体时会采心血培养細菌及采取脑組織接种小白鼠脑內,分离病毒,都沒有得到阳性結果。根据临床表现、尸体解剖病理检查所見及細菌培养、病毒分离的阴性結果,可以认为这 6 只猴子都是死于变态反应性脑脊髓炎的。

发病后唯一生存的动物为第 19 号猴,这只猴子的发病潜伏期較长,病程中症状曾两度恶化两度好转。观察 5 个月,症状消失,运动正常;惟左前肢留有震顫后遺症。病程經過如次:注射后第 28 日发病,最初发现食欲不佳,精神不安,运动稍为迟钝。第 30 日运动失調,左前爪抓物不穩,左后肢运动障碍明显。次日两前肢震顫,两后肢不能直立,常嚎啕,毛聳起。至 33 日运动障碍有好轉,能在籠壁栏杆上攀登;但行走仍不穩,前肢仍震顫,握物仍不牢。第 36 日症状加重,两后肢直立不穩;次日更为严重,不能起立,伏在地上,以后又逐渐好转。至第 49 日又发现头向左側弯曲,頸部轉动受到限制,随后又逐渐好转。至第 63 日頸部运动完全恢复,惟左前肢仍遺留震顫。

四、大白鼠試驗

选用体重为 100—150 克的大白鼠 39 只,接种上述混有佐剂的鼠脑組織,前后两次,間隔 1 周,依接种不同途径分为 2 組。接种途径、剂量及試驗結果見表 6。

表 6 大白鼠試驗結果

試驗組別	接種部位	接種途徑	每只接種情況 (劑量×部位×次數) (毫升)×數目	接種總量 (毫升)	發病比例
1	腳掌	皮內	0.05×2×2	0.4	17/20
2	腹壁	皮下	0.5×2×2	2.0	0/19

第 1 組系注射至腳掌皮內，計有大白鼠 20 只，接種後 13—22 日之間，先後發現 17 只後肢癱瘓，運動完全靠前肢爬行。一般都有小便先瀰留後失禁的現象。這些都是變態反應性腦脊髓炎的典型症狀。病程約 2—3 周，癱瘓即逐漸消失，運動完全恢復，無死亡發生。第 2 組中有動物 19 只，皮下注射鼠腦組織，未曾發現肢體癱瘓或其他神經症狀。

五、摘 要

1. 正常小白鼠腦組織，加入適當的佐劑，接種豚鼠、猴子及大白鼠都能夠規則地引起變態反應性腦脊髓炎，而以肢體麻痺為主要特徵。

2. 豚鼠發病後一般數日內麻痺致死。個別豚鼠在疾病過程中，有麻痺緩解而恢復者，亦有緩解後而又惡化者。

3. 正常家兔脊髓接種豚鼠，亦可發生變態反應性腦脊髓炎。所引起的臨床症狀及病理變化與鼠腦所引起者相同；惟前者引起的發病比例及病死比例較後者為高，前者引起的發病時間及病死時間較後者為早。

4. 注射的途徑能影響豚鼠發病的比例。足掌皮內注射是產生變態反應性腦脊髓炎最有效的途徑。

5. 豚鼠接種後體重降低，是一個比較明顯而普遍的現象。體重降低幅度的大小與發病及病死比例的高低之間，顯有一定的平行關係。

6. 以 0.2 毫升 20% 的鼠腦組織懸液分 2 次皮內接種猴子，5 隻中有 2 隻發病，顯麻痺症狀者僅 1 隻，越兩周後逐漸恢復。皮下接種同樣鼠腦懸液兩次，每次 1.0 毫升，5 隻猴子中亦有 2 隻發病，分別以截癱、偏癱開始。截癱者經過 2 星期逐漸恢復運動；偏癱者病程兩日，結果死亡。病理解剖，見腦有出血性病灶，切片檢查發現大腦白質中血管周圍有脫髓病變。

7. 在皮內或皮下接種後未發病的或發病而又恢復的猴子中，在首次接種後第 5 個月，再以鼠腦組織進行肌肉注射 2—3 次，每次 1.0 毫升。結果 8 隻猴子中 7 隻發生腦脊髓炎，6 隻麻痺致死。病理檢查，發現致死猴子的腦內均有出血性病灶及脫髓性病變。另一隻發病而未死亡的猴子，運動逐漸恢復，麻痺消失，但遺留肢體震顫。

8. 猴子症狀的表現，與豚鼠比較是複雜得多。除兩者共有的肢體麻痺之外，猴子還有眼瞼下垂，瞳孔散大或縮小，視力消失或減退，痙攣、震顫等神經症狀。

9. 在病理變化方面，豚鼠的病變主要為靜脈周圍的細胞性炎症反應，多出現在腦膜及腦室管膜下，典型脫髓現象罕見。而猴子的主要變化為血管周圍的細胞性浸潤及典型的脫髓性病變，發生在大腦、腦干或小腦的白質中。

10. 大白鼠足掌皮內注射鼠腦組織之後，經過 13—22 日的潛伏期，20 隻中 17 隻出現變態反應性腦脊髓炎；而腹壁皮下接種 19 隻大白鼠，全部未曾出現肢體癱瘓。

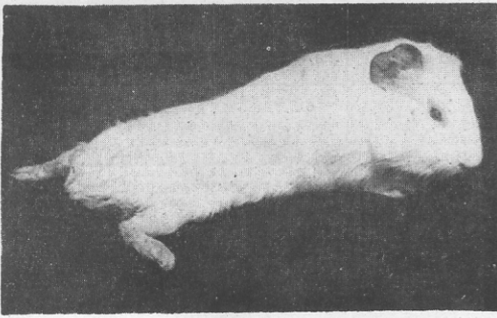


图1 鼠脑组织引起脑脊髓炎的豚鼠。
后肢麻痹、肌肉萎缩。

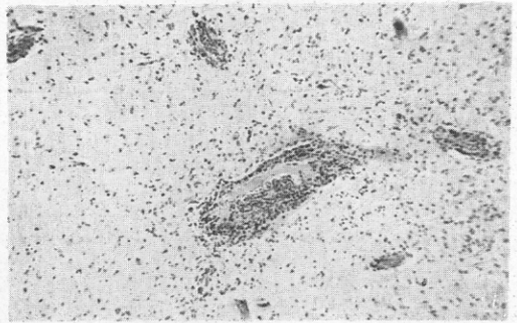


图2 豚鼠大脑切片80×(苏木精-伊红染色)。血管周围细胞浸润。



图3 鼠脑组织引起脑脊髓炎的猴子(215号)。前后肢瘫痪。



图4 鼠脑组织引起脑脊髓炎的猴子(18号)。颈向左侧弯曲、左眼瞳孔散大。

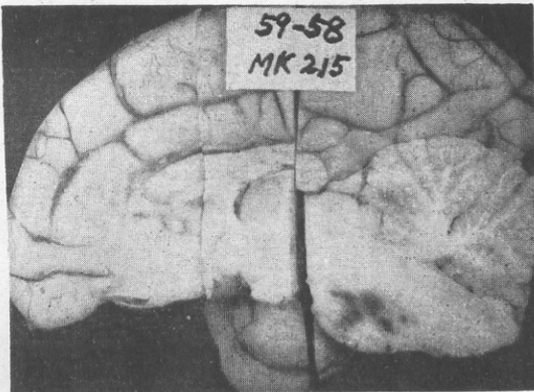


图5 215号猴脑纵切面。
桥脑及小脑出血灶。

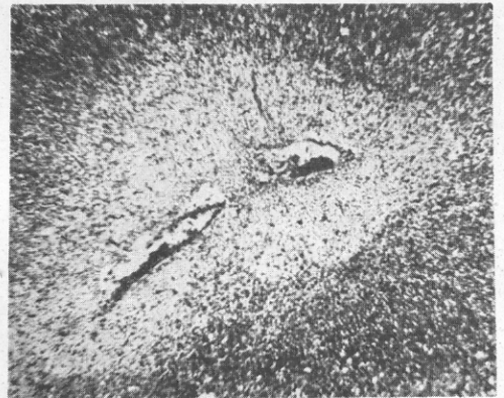


图6 病猴大脑切片,80×(镀银法染色)。
血管扩张,周围脱髓。

参 考 文 献

- [1] McKendrick, A. G., Bull. Health Org., League of Nations, 9:31—78, 1940.
- [2] Gamalia, N.: *Ann. Past.*, 1:63—83, 1887.
- [3] Rivers, T. M., Sprunt, D. H. and Berry, G. P.: *J. Exp. Med.*, 58:39—53, 1933.
- [4] Rivers, T. M. and Schwentker, F. F.: *J. Exp. Med.*, 61:689—702, 1935.
- [5] Ferraro, A. and Jervis, G. A.: *Arch. Neur. and Psych.*, 43:195—209, 1940.
- [6] Morgan, I. M.: *J. Bact.*, 51:614—615, 1946.
- [7] Morgan, I. M.: *J. Exp. Med.*, 85:131—140, 1947.
- [8] Kabat, E. A., Wolf, A. and Bezer, A. E.: *Science*, 104:362—363, 1946.
- [9] Kabat, E. A., Wolf, A. and Bezer, A. E.: *J. Exp. Med.*, 85:117—130, 1947.
- [10] Morrison, L. R.: *Arch. Neur. and Psych.*, 58:391—416, 1947.
- [11] Freund, J., Stern, E. R. and Pisini, T. M.: *J. Immunol.*, 57:179—194, 1947.
- [12] Freund, J. and McDermott, K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 49:548—553, 1942.
- [13] Kersting, G. and Pette, E.: *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 176:387—426, 1957.
- [14] Thomas, A. K.: *Ind. J. Med. Res.*, 40:121—129, 1952.
- [15] Сапер, Е. и Гаусманова, И.: *Жур. Невропат. и Психат.*, 57:172—178, 1957.
- [16] Alvord, E. C., Jr.: *J. Immunol.*, 61:355—367, 1947.
- [17] Wanko, T., *Wien Klin. Wschr.*, 64:288—289, 1952.
- [18] Свет-Молдавская, И. А. и Свет-Молдавский, Г. Я.: *Acta Virol.*, 3:1—8, 1959.
- [19] Lipton, M. M. and Freund, J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 81:260—261, 1952.
- [20] Lipton, M. M. and Freund, J.: *J. Immunol.*, 71:98—109, 1953.
- [21] Olitsky, P. K. and Yager, R. H.: *J. Exp. Med.*, 90:213—224, 1949.
- [22] Olitsky, P. K. and Lee, J. M.: *J. Immunol.*, 71:419—425, 1953.
- [23] Lee, J. M. and Olitsky, P. K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 89:263—266, 1955.

EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS INDUCED BY MOUSE BRAIN TISSUE

WANG YUNG-CHI, LU CHIN-HAN, LI MEI-YUNG AND CHANG YUNG-FU

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

Experimental allergic encephalomyelitis was regularly produced by injection of normal mouse brain tissue, or as controls with rabbit spinal cord tissue, emulsified with an adjuvant containing heat-killed BCG and liquid paraffin in guinea pigs, monkeys and albino rats; however, it was much less frequently induced in rabbits and white mice.

In the guinea pigs, the typical findings of the disease was a paralysis of the hind legs and death from ascending paralysis. In a few animals, however, following paralysis of one of the limbs, a gradual recovery was observed. In all cases, too, marked reduction in body weight was noticed.

Comparing with the results obtained when the rabbit nerve tissue was employed, it was found that in these animals, the use of rabbit cord tissue and the inoculation by intracutaneous route produced the most reliable results.

In the albino rats, with the mouse brain emulsion given intracutaneously, 17 out of 20 developed paralysis of both hind legs with an incubation period of 13—22 days. When the inoculation was made subcutaneously no symptoms of the disease was found.

In the monkeys, among a group of 5 animals given intracutaneously 2 doses of 0.1 ml seven days apart, 2 came down with a non-fatal form of the disease. One showed paralysis of both hind legs, while the other only paresis, loss of appetite and loss of body weight. Among the group of 5 animals receiving 2 doses of 1 ml at 7 days' interval subcutaneously, 2 also came down with the disease. One recovered after the exhibition of paralysis of the extremities and the other succumbed with ascending paralysis. Post mortem findings revealed hemorrhagic foci, perivascular demyelination and perivascular cellular infiltration in the brain.

After having recovered or remained healthy after the first series of injections, 8 monkeys were reinoculated with the same materials by the intramuscular route. Two or 3 doses of 1 ml each were given to each animal. As a result, 7 developed encephalomyelitis and 6 died of paralysis with hemorrhagic foci and perivascular demyelination in the brain. The only monkey remained alive showed tremor of fore limbs as a sequela.

It was noted that the clinical findings of the disease in monkeys were much more complex than those found in the guinea pigs. Besides paralysis of the limbs, ptosis, dilatation or contraction of the pupils, defective vision or even blindness, convulsion, tremor and other nervous symptoms were all encountered in the monkeys. Histologically, perivascular cellular infiltration in meninges and subependyma were the prominent changes in the guinea pigs whereas demyelination in the white matter was the principle lesion in the monkeys.