

# 流行性乙型脑炎免疫机制中 若干问题的研究\*

顧方舟

(中国医学科学院病毒系)

流行性乙型脑炎免疫机制的问题研究较少,我们在1952—1954年研究了下列几个问题:(1)病毒感染后及疫苗接种后免疫力的产生以及和血内中和抗体的关系;(2)不同途径注射病毒及灭活疫苗后免疫力的产生情况;(3)病毒在免疫机体内的散播动态。现报告如下。

## 一、材料和方法

**动物** 小白鼠。中和试验用3—4周鼠,体重8—10克。免疫用大部分为4—5周鼠,体重10—12克。

**病毒** M-47株。该毒株是苏联 Дробышевская 氏在1945年于我国沈阳分得的,其生物学及血清学性质经过详细研究证明与流行性乙型脑炎中山株无异<sup>[1]</sup>。此毒株于小白鼠(10—12克)脑内感染后有很高毒力,LD<sub>50</sub>滴度达 $10^{-8.0}$ ;腹腔注射时毒力较弱,LD<sub>50</sub>滴度为 $10^{-2.0}$ 左右;皮下注射时毒力更弱,注射1:10病毒液后绝大部分小白鼠不发病<sup>[2]</sup>。

将15—20只病鼠鼠脑用50%豚鼠血清(56℃灭活30分钟)制成20%悬液,按2毫升分装于安瓶中,于-15°至-20℃保存,如此可保持原有滴度2—3个月不变。

**疫苗制备方法** 取体重10—12克小白鼠50—100只,每只脑内注射1:10稀释的病毒0.03毫升,待发生典型症状时(4—5天)无菌取脑,制成10%的鼠脑佛马林灭活疫苗,并作安全试验及免疫效价测定。后两项按苏联的规程进行。

**血清处理及保存** 血液采集于试管内,37℃放10分钟,凝后剥离血块,4℃过夜,次日取血清,分装于安瓶中,普通冰箱保存。用前不灭活。

**脑组织浸液中抗体的测定** 取脑之前用15—20毫升生理盐水由左心室作灌注。将脑内血液洗净,然后将脑制成1:3悬液,离心沉淀后,取0.2毫升脑浸液与0.2毫升不同稀释度病毒混合,混合液放30℃中两小时,对照组用未免疫鼠脑同法处理。然后将此混合液注入小白鼠脑内,每只0.03毫升,观察18—21天,中和指数按 Reed-Muench 法计算。

**血清中和试验** 用常规方法进行,但每次用新鲜的病毒,病毒用10%豚鼠血清稀释。

## 二、试验结果

**试验1. 皮下注射病毒或灭活疫苗后小白鼠对脑腔攻击的抵抗力与血液内中和抗体的关系**

本文1962年3月27日收到。

\* 本工作是在 E. H. Левковин 教授指导下完成,特此表示感谢。本工作的技术操作是 K. B. Фокина 协助完成的,一併致谢。

取体重 10—12 克小白鼠 400 只,分为两组,第 1 组 250 只,每只皮下注射 0.5 毫升 1:1000 活病毒(約 100,000 LD<sub>50</sub>) 1 次,第 2 组 150 只作为对照。經 3、14、30、60、90 天由第 1 组取 24 只小白鼠作脑腔攻击:将病毒稀释 10<sup>-4</sup>—10<sup>-8</sup>,每稀释度注射 4—6 只,再取 7—10 只采集血液及取脑测定中和抗体,对照组以同法进行試驗。

另取两组同样体重的小白鼠。每组 200 只,每只作 3 次皮下灭活疫苗接种,每次 0.5 毫升。每次間隔 5 天,末次接种后第 15、30、63 及 93 天测定脑内抵抗力,并取血及脑测定中和抗体。另 150 只为对照,亦按上法测定脑内抵抗力以及血及脑内中和抗体,結果見表 1。

表 1 活病毒及灭活疫苗皮下接种后对脑腔攻击的抵抗力以及血内及脑浸液中中和抗体的水平

接种材料	免疫后攻击或采血时间(天)	脑内攻击抵抗指数(log LD <sub>50</sub> )	血清中和指数(log LD <sub>50</sub> )	脑浸液中中和指数(log LD <sub>50</sub> )
活病毒	3	0.9	0.8	—
	14	3.0	2.2	0
	30	3.5	1.7	0
	60	1.7	2.7	0.3
	90	1.8	3.5	-0.2
灭活疫苗	15	0.8	>3.0	0
	30	0.4	>4.0	0.2
	63	-0.5	3.2	0
	93	0	3.0	-0.5
	135	—	2.2	—

表 1 指出,病毒接种后 3 天,小白鼠对脑内攻击的抵抗力不明显,抵抗指数为 0.9; 14 天后指数上升为 3.0; 30 天最高,抵抗指数为 3.5; 60 天时降为 1.7; 90 天时为 1.8。

中和抗体开始与抵抗力平行上升,但 30 天时抵抗指数达 3.5,而中和指数只 1.7; 60 天时抵抗力已下降,但中和指数却上升到 2.7; 90 天时中和指数最高(3.5),但抵抗力已下降。可見小白鼠感染后,所获得对脑内攻击的抵抗力与血内中和抗体水平并无正相关。

这个結論亦可从灭活疫苗 3 次免疫的試驗結果得到証实。灭活疫苗免疫后动物对脑内攻击沒有抵抗力,但血内抗体水平却很高,中和指数最高达 4.0 以上,到 135 天时仍維持在 2.2。由此看来,血内中和抗体并不能使动物对病毒的脑内直接攻击获得抵抗力。

我們的試驗指出,不論活病毒或灭活疫苗接种后,脑組織浸液不存有中和乙型脑炎病毒的物質。因此,感染后脑組織的免疫力很难用中和抗体的存在来解释。

## 試驗 2. 不同途径注射活病毒及灭活疫苗后免疫力的产生

取 12 组 7—8 克小白鼠,每组 120 只,其中各取 70 只,按下述方法免疫,每组留 50 只作为对照。

病毒接种: 脑内——10<sup>-10</sup>, 每只 0.03 毫升; 鼻腔——10<sup>-4</sup>, 每只 0.05 毫升; 腹腔, 肌肉, 靜脉皆用 10<sup>-4</sup>, 各 0.25 毫升, 皮下用 10<sup>-3</sup>, 各 0.25 毫升。所用病毒之 LD<sub>50</sub> 滴度为 10<sup>-8.5</sup>, 接种 1 次, 15 天后用不同稀释度病毒作脑内攻击, 测定抵抗指数。

疫苗免疫时除靜脉外(10 倍稀释)皆用原倍疫苗, 脑内注射 0.03 毫升; 鼻腔 0.05 毫升; 其他皆 0.25 毫升。免疫 3 次, 每次間隔 1 天。脑内免疫组另設一对照组, 用含 0.2% 佛馬林正常鼠脑的空白疫苗免疫小白鼠, 动物于末次免疫后 7 天作脑内攻击, 于攻击时由每

組中取 7—10 只小白鼠采血測定中和抗体,結果見表 2。

表 2 不同途徑注射乙型腦炎病毒 (M-47 株) 及滅活疫苗後小白鼠對腦腔攻擊的抵抗力及血內中和抗体

注射途徑	病毒感染後		滅活疫苗免疫後	
	抵抗指數 (log LD <sub>50</sub> )	中和指數 (log LD <sub>50</sub> )	抵抗指數 (log LD <sub>50</sub> )	中和指數 (log LD <sub>50</sub> )
腦內	0.5	0	2.2	3.6
鼻腔	2.3	2.6	0	1.0
腹腔	2.2	1.5	-0.3	3.5
肌肉	2.3	1.5	0	3.2
靜脈	4.2	1.6	-0.8	2.5
皮下	3.2	1.7	0.3	3.4

由表 2 可見,向腦內注射  $10^{-10}$  病毒後 15 天,小白鼠對腦腔攻擊沒有抵抗力,血內亦未發現中和抗体。這可能由於  $10^{-10}$  稀釋度中病毒過少或不含有病毒之故,所以不能引起機體產生免疫反應。經鼻腔感染後,小白鼠獲得了相當強的抵抗力,抵抗指數為 2.3,血內中和抗体為 2.6,腹腔、肌肉、靜脈及皮下感染後抵抗指數分別為 2.2、2.3、4.2 及 3.2,血內中和抗體的指數分別為 1.5、1.5、1.6 及 1.7。

但滅活疫苗接種後情況與病毒感染後不同,除鼻腔接種中和指數為 1.0 外,其他途徑注射疫苗後皆產生了中和抗体,但對腦腔攻擊,除腦內直接注射疫苗抵抗指數為 2.2 外,其他均未表現出抵抗力。

在這個試驗中我們發現一個出乎意料的結果:即滅活疫苗直接注入小白鼠腦內後可以抵抗一定量病毒的腦內攻擊,為了証實這個結果的可靠性,我們重復了一次,結果証明小白鼠可以抵抗病毒的腦腔攻擊。

為了進一步了解此種抵抗力的性質,我們作了如下試驗:取 3 組小白鼠(10—12 克),每組 60 只,向右側腦半球注射滅活疫苗 3 次,間隔時間為 48 小時,7 天後用 M-47 株及森林腦炎 Coφ 株作腦腔攻擊;另取小白鼠 20 只,與上幾組同時向右腦內注入 0.03 毫升的 10% 正常鼠腦懸液(內含 0.2% 佛馬林)3 次,每 48 小時 1 次,7 天後用 M-47 株作腦腔攻擊,同時由各組 7—10 只小白鼠取血及腦。結果見表 3。

表 3 小白鼠腦內注射滅活疫苗後對乙型腦炎及森林腦炎病毒腦腔攻擊的抵抗力

組別	免疫材料	攻擊用病毒	攻擊部位	抵抗指數 (log LD <sub>50</sub> )
免疫組	滅活疫苗注入 右腦半球	乙型腦炎 M-47 株	右側腦半球 左側腦半球	2.0 2.7
		森林腦炎 Coφ 株	右側腦半球	0
對照組	10% 含 0.2% 佛馬 林正常鼠腦懸液	乙型腦炎 M-47 株	右側腦半球	0.7

結果指出,腦內注射滅活疫苗後,小白鼠可以抵抗乙型腦炎病毒的攻擊,而對森林腦炎沒有抵抗力。

血內中和抗体指數為 1.8,腦組織中未發現有中和 M-47 株的物質,中和指數為 0.8。

我們考虑到乙型脑炎佛馬林灭活疫苗有可能在增加注射次数及剂量后使动物获得对脑腔攻击的抵抗力。

取兩組 3 周鼠, 每組 40 只, 一組用灭活疫苗作 6 次腹腔接种, 每天注射 0.25 毫升, 末次免疫后 14 天作脑腔攻击, 另一組为对照。結果发现免疫組小白鼠可以抵抗脑腔攻击, 但抵抗指数較低, 为 2.2。

### 試驗 3. 病毒注入免疫机体后在体内的分布

取 10—12 克小白鼠兩組, 每組 70 只, 兩組都用 0.5 毫升活病毒 (M-47 株) 作一次皮下注射約 1,600,000 LD<sub>50</sub> 病毒。14 天后由脑內注入 100 LD<sub>50</sub> 或由靜脉注入 1,000,000 LD<sub>50</sub> 病毒, 然后隔 10 分钟, 1、3、5 天由脑組織、血液及內脏分离病毒, 在取材之前用 20 毫升生理盐水由左心注入洗滌內脏及脑內的血液。此外, 与試驗組同时取小白鼠 10 只, 14 天后由靜脉注入 1,000,000 LD<sub>50</sub> 病毒, 观察是否发病。結果見表 4。

表 4 脑內及靜脉內注入病毒后, 病毒在免疫小白鼠体内的分布

注射途径	病毒分离材料	病毒滴度 (log LD <sub>50</sub> )				
		10 分钟	24 小时	72 小时	5 天	7 天
脑內 (100 LD <sub>50</sub> )	脑	○	○	+	+	
	脊髓	-	-	○	○	
	血液	○	○	○	○	
	肝	-	-	-	○	
	脾	-	-	-	○	
靜脉 (1,600,000 LD <sub>50</sub> )	脑	○	○	○	○	○
	血液	1.2	○	○	○	○
	肝	1.5	○	+	+	○
	脾	2+	○	+	+	○

注: “○” 病毒未分出, “-” 試驗未作, “+” 小于 1 log LD<sub>50</sub>。

表 4 結果表明, 病毒注入脑內后只 72 小时及 5 天发现微量病毒, 血液、肝、脾及脊髓內皆未分出病毒, 所有剩余的脑內感染的免疫鼠皆未发病。而正常小白鼠脑內接种 100 LD<sub>50</sub> 病毒后, 在脑內可以大量繁殖, 引起动物发病。

由靜脉注入病毒后, 在 10 分钟时病毒可由血液、肝、脾中分出, 10 分钟以后病毒由血液內消失; 肝、脾內在 72 小时及 5 天可分出微量病毒, 其余時間皆未发现病毒存在; 而脑內一直未分出病毒。而注入等量病毒的正常小白鼠在 5—7 天皆发病。

## 三、討 論

从以上几个試驗可以看到小白鼠受乙型脑炎病毒皮下感染后, 不仅在血液中产生中和抗体, 并且可以抵抗一定量病毒的脑內攻击。这种抵抗力和血內中和抗体水平不成正比。当中和抗体水平上升时, 抵抗力反而減弱。灭活疫苗三次皮下接种后, 小白鼠血內中和抗体水平虽比活毒感染后高, 但对脑腔攻击的抵抗力表現很弱。活病毒不仅可以由皮下的途径引起对脑內攻击的抵抗力, 鼻腔、腹腔、肌肉、靜脉注射后同样也可获得相似的结果。但灭活疫苗由周緣途径接种后只引起中和抗体。

中和抗体在某些病毒疾病的免疫机制中无疑是一个重要的因素, 但在另一些病毒疾

病中，它就不一定是起主導作用的免疫因素，例如牛痘和狂犬病。

Webster 在 1938 年<sup>[3]</sup>就指出，聖路易腦炎的免疫力與血內中和抗體沒有平行關係。Casals (1943)<sup>[4]</sup>及 Левкович (1945)<sup>[5]</sup>証實了 Webster 的結果。但 Шубладзе (1943)<sup>[6]</sup>却發現二者有平行關係。

我們認為病毒疾病的免疫機制雖有其一般規律，但不同疾病由於其病原性質、發病機制不同而有其本身的特殊性。

在我們的材料發表的同年(1955)<sup>[2]</sup>，Morris<sup>[7]</sup>等人也發表了森林腦炎和乙型腦炎的感染與免疫的研究資料，他們證明給 *M. rhesus* 或 *M. cynomolgus* 猴皮內注射乙型腦炎或森林腦炎病毒後兩個月，再向腦內注入同樣病毒 (100—10 LD<sub>50</sub>)，部分動物可免予發病。著者指出這種抵抗力和血內中和抗體水平有關，但遺憾的是，他們未觀察此種免疫力產生的過程，也未用滅活疫苗作對照觀察。Casals<sup>[8]</sup>氏用森林腦炎佛馬林滅活疫苗免疫小白鼠，發現血內雖有高水平的中和抗體，但動物不能抵抗病毒直接注入腦內。

Levaditi 及 Nicoulau 氏早於 1922 年即指出病毒疾病有組織免疫的存在<sup>[9]</sup>。也有資料表明在 X-光照射後或丙種球蛋白缺乏症患者或動物感染病毒後，血中不產生中和抗體，但能抵抗病毒的再感染。

這種組織免疫的機制至今尚不明了，有人認為是由於腦組織中有中和抗體存在之故。日本林博<sup>[10]</sup>氏指出，乙型腦炎活病毒及滅活疫苗直接注入豚鼠腦內後，可以在腦內發現中和抗體。原因有二：(1)血液內的抗體由於血腦屏障滲透性增加而進入腦組織；(2)腦組織本身可以產生抗體。1955 年林博<sup>[11,12]</sup>用豚鼠及小白鼠所作的試驗證明，這兩種可能都有。

神經組織能否產生抗體問題也有人注意過，Morgan<sup>[13]</sup>證明患過脊髓灰質炎猴子的脊髓前角細胞有中和抗體，但是白質及腦內沒有發現抗體。此時血內中和抗體的滴度為 1:60—1:2000，但脊液中及腦組織中並未找到中和抗體。不過 Sabin 等人<sup>[14]</sup>却未能証實 Morgan 等人的結果。

我們的結果指出，不論是滅活疫苗或活病毒接種小白鼠後，腦內均未找到抑制乙型腦炎病毒的物質，而所用方法與 Morgan 及林博氏所用方法並無大的差別。

應該着重指出，小白鼠腦內直接注入乙型腦炎滅活疫苗後也可以產生對腦腔攻擊的抵抗力，在血中可以產生抗體，但腦內卻未找到中和病毒的物質。我們見到有腦內直接注射活病毒而產生對同種病毒的抵抗力的報告，例如 Fox (1943)<sup>[17]</sup>用 17 D 黃熱病無毒株注入小白鼠腦內，可以產生對嗜神經性毒株的攻擊。著者認為是局部產生抗體的緣故。Theiler (1940)<sup>[15]</sup>及 Cook (1938)<sup>[16]</sup>研究鼠腦脊髓炎及聖路易腦炎時也有同樣的發現。

看來，乙型腦炎的免疫機制是一個複雜的問題，只用病毒學方法是不能圓滿解決的。今後應用近代生物學、生物化學、生物物理學來研究，尤應注意組織免疫的機制問題。

#### 四、小 結

乙型腦炎病毒 (M-47 株) 由皮下、鼻腔、腹腔、肌肉、靜脈感染小白鼠後，不僅在血內產生中和抗體，並可使腦組織產生免疫力；可以抵抗活毒腦內攻擊。這種抵抗力與血內中和抗體水平沒有正比關係。

乙型腦炎滅活疫苗由皮下、腹腔、靜脈、肌肉三次接種後，能使小白鼠血內產生中和抗

体,但小白鼠不能抵抗病毒的脑腔攻击。

不論灭活疫苗或活病毒接种后,在小白鼠脑内均未发现中和乙型脑炎病毒的物质。脑内直接注射灭活疫苗可使动物抵抗一定量同种病毒的脑腔攻击。

病毒由脑内或静脉注入感染后,获得免疫力的小白鼠体内,病毒不能在脑组织内繁殖。

### 参 考 文 献

- [1] Дробышевская, А. И.: Докторская диссертация, Автореферат, 1953.
- [2] Гу Фан-чжоу: Кандидатская диссертация, Автореферат, 1955.
- [3] Hodes, H. L. and Webster, L. T.: *J. Exp. Med.*, 68:263, 1938.
- [4] Casals, J.: *J. Exp. Med.*, 78:447, 1943.
- [5] Левкович, Е. Н.: *ЖМЭИ*, № 10—11, 1945.
- [6] Шубладзе, А. К.: *ЖМЭИ*, № 4—5, 1943.
- [7] Morris, J. A., O'connor, J. R., and Smadle, J. E.: *Am. J. Hyg.*, 62:327, 1955.
- [8] Casals, J. & Olitsky, O. K.: *J. Exp. Med.*, 82:431, 1954.
- [9] Leraditi, C. & Nicolau, S.: *Camp. Rend. Soc. Biol.*, 86:233, 1922.
- [10] Hayashi, H.: *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 26:231, 1953.
- [11] 林 博: *Virus*, 5:7, 1955.
- [12] 林 博: *Virus*, 5:83, 1955.
- [13] Morgan, I. M.: *Am. J. Hyg.*, 45:390, 1947.
- [14] Sabin, A. B. and Steigman, A. L.: *J. Immunol.*, 63:211, 1949.
- [15] Theiler, M. and Gard, S.: *J. Exp. Med.*, 72:49, 1940.
- [16] Cook, E., Hudson, N. P.: *J. Inf. Dis.*, 65:206, 1938.
- [17] Fox, J. P.: *J. Exp. Med.*, 77:487, 1943.

## EXPERIMENTAL STUDY ON THE MECHANISM OF IMMUNITY IN JAPANESE B ENCEPHALITIS

KU FANG-CHOU

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences)

After the white mice were immunized by means of subcutaneous, intraperitoneal, intravenous or intramuscular inoculation with inactivated Japanese B encephalitis vaccine, neutralizing antibodies appeared in the circulating blood, but the animals remained susceptible to intracerebral challenge with the virus. However, when the mice were immunized with a live Japanese B encephalitis virus Strain M-47 (by the above routes as well as by the intranasal route), the animals not only showed high antibody titre in the blood, they also showed increased resistance to intracerebral challenge. In neither, was the virus neutralizing antibody found in the brain. However, after the virulent virus was injected either into the vein or into the brain, there was only a very slight amount of virus recovered 72 hours and 5 days after intracerebral injection, and none after intravenous injection.

White mice immunized with inactivated virus vaccine intracerebrally acquired resistance to intracerebral challenge with the homologous virus but not to Russian Spring-Summer encephalitis virus.