

流行性乙型脑炎自动免疫的实验研究

II. 小白鼠免疫后的保护力与攻击途径的关系

許兆祥 周明先 陈立德

(中国医学科学院病毒学系,北京)

流行性乙型脑炎是由带該病毒的蚊子叮咬而感染的,所以研究其免疫机制問題应接近于自然感染的皮下途径感染法进行。过去在研究上常用的乙型脑炎病毒如中山等,对小白鼠的皮下致死力很低,应用这些毒株进行該方面的研究有很大的困难。自黃禎祥等^[1]分离得一株对小白鼠皮下感染有高度致死力的流行性乙型脑炎病毒株(京卫研₁)后,为应用皮下途径感染法研究动物接近于自然感染的免疫机制提供了可能。

皮质素能提高小白鼠对皮下感染脑炎病毒的致死力^[2]。因此 Imam 等以皮质素处理免疫过的小白鼠来研究小白鼠对皮下攻击的保护力^[3]。但是由于皮质素可能抑制抗体生成或影响机体的某些抵抗机制^[4],所以皮质素处理的动物不能完全反映出正常动物的免疫现象。

为了进一步闡明乙型脑炎灭活疫苗注射机体后的免疫机制,我們用对小白鼠具有不同程度皮下致死力的病毒株(京卫研₁),研究了小白鼠經流行性乙型脑炎疫苗免疫后对脑内皮下攻击的保护力,此外,也进行了抗体水平与保护力关系的研究。

材料及方法

病毒 所用病毒为流行性乙型脑炎病毒京卫研₁株,經小白鼠脑内传了36—40代,对7—9克周齡小白鼠的皮下致死力仅比脑内致死力低一个对数左右^[1]。

疫苗 以京卫研₁株病毒脑内接种三周齡小白鼠,于发病后以1/200M 磷酸緩冲生理盐水(pH制成10%鼠脑病毒悬液,加入福尔馬林,其含量为病毒悬液量的0.2%,然后放至4°C冰箱,在此每天振蕩一次。經21天灭活后,作安全試驗証明无活病毒后才应用于免疫实验。所制备的疫苗其滴度为 $10^{-8.5}$ 。疫苗制成后,放4°C冰箱保存。用于实验的疫苗保存时间不超过四个月。

小白鼠 实验所用的小白鼠均为本院在防蚊設備下飼养的。鼠齡大小根据各实验要求而不同,在以下各实验中分别加以注明。

免疫及攻击方法 各实验都以皮下途径免疫,疫苗量为0.1毫升。所用疫苗稀释度,注射次数,射間隔根据各实验要求而有所不同,将在各实验中加以說明。小白鼠經免疫后,以活病毒分别进入皮下途径攻击,攻击用病毒量为系列十倍稀释的病毒悬液0.03毫升。以相同鼠齡小白鼠同样病毒作为对照。脑内攻击組的动物观察二星期,皮下攻击組动物观察三星期,以 Reed 和 Muench 算保护指数。

中和試驗 小白鼠免疫后,于不同时期以頸动脉放血法每次取10—15只小白鼠的血液,同次

本文1962年10月22日收到。

血液混合后分离血清。各时期所取血清均保存于 -20°C 冰箱, 試驗前以 56°C 加温处理 30 分钟。各时期的血清都是同在一次試驗中进行测定。中和試驗用稀释病毒法, 于系列十倍稀释的病毒悬液加入等量未經稀释的血清, 混合后在 37°C 恆温水浴中放置 2 小时, 然后以脑内途径接种小白鼠, 接种后观察二周, 以 Reed 和 Muench 法計算中和指数。

实验及实验结果

I. 小白鼠經一次疫苗免疫后, 对脑内及皮下途径病毒攻击的保护力。

以 10^{-1} (疫苗原液)、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的灭活疫苗皮下免疫 8—10 克的三周龄小白鼠一批, 免疫量为 0.1 毫升, 免疫后十天以系列十倍稀释的京卫研₁ 株病毒进行攻击。实验分两组, 一组以脑内途径攻击, 另一组以皮下途径攻击, 每稀释度用免疫过的小白鼠 5 只, 以相同鼠龄的正常小白鼠同样注射病毒作为对照, 结果见表 1。

表 1 不同疫苗量一次免疫小白鼠后脑内与皮下保护力的比较

疫苗稀释度 (0.1 毫升)	不同途径攻击的保护力			
	脑内攻击		皮下攻击	
	LD ₅₀ (log)	保护指数	LD ₅₀ (log)	保护指数
10^{-1}	8.17	1.00	<1.00	>7.40
10^{-2}	9.17	0.00	≥ 4.25	≤ 4.15
10^{-3}	8.38	0.79	7.38	1.02
10^{-4}	8.83	0.34	7.50	0.90
对照	9.17		8.40	

从表 1 可以看出, 以脑内途径攻击时, 即使以不稀释的疫苗悬液免疫小白鼠, 其保护指数也仅为一个对数, 其保护力在可疑范围内。在皮下途径攻击时就不同, 以 10^{-1} 0.1 毫升疫苗免疫时, 动物能保护大于 7.4 个对数 LD₅₀ 致死量(皮下滴度)的病毒, 以 10^{-2} 的 0.1 毫升疫苗免疫时, 也可以保护 4 个对数左右, 而以 10^{-3} 的 0.1 毫升疫苗免疫时, 其皮下保护力尚在可疑范围内。这说明小白鼠經一次皮下免疫后虽然对脑内攻击没有保护力, 但在皮下攻击时可以观察到小白鼠有很明显的保护力。

II. 小白鼠經一次疫苗免疫后对皮下攻击的保护力出现时间及其中和抗体水平。

上一实验证明, 小白鼠經一次疫苗免疫后十天时, 对皮下攻击的保护力已很强。为了进一步观察小白鼠經一次疫苗免疫后的中和抗体水平及对皮下攻击保护力的出现时间, 进行了以下实验。以 10^{-1} 的疫苗 0.1 毫升皮下免疫小白鼠, 每天免疫约 60 只, 連續 7 天共免疫 7 批小白鼠。于第 8 天将 7 批免疫后的小白鼠与对照组(鼠龄相同的正常小白鼠)同时以系列十倍稀释的病毒 0.03 毫升进行皮下攻击, 每稀释度攻击 10 只小白鼠。由此观察一次免疫后 1—7 天小白鼠对皮下攻击的保护力。同时, 将免疫 1、3、5、7 天的小白鼠, 放血取其血清, 作中和试验。结果如表 2 所示。

从表 2 可看出, 小白鼠經一次免疫后 1、2 天时, 对 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 稀释度的病毒量攻击已有保护力。小白鼠死亡减少, 其 1、2 天时保护指数分别为 2.07、2.38 对数。在小白鼠免疫后 3、4、5、6、7 天其皮下保护指数相应为 ≤ 3.52 、 ≤ 5.56 、6.43、6.81、6.88。并从实验中还可观察到, 在小白鼠免疫后 5 天内中和抗体为阴性, 在免疫后 7 天时, 中和

表 2 小白鼠一次免疫後其皮下保護力出現的時間及中和抗體水平

免疫後至 攻擊的天數	攻擊所用的病毒稀釋度								LD ₅₀ (-log)	保護指數 (log)	血清的中和指數 (log)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
1	—	—	—	7/10	8/10	4/10	2/10	0/10	5.62	2.07	0.00
2	—	—	—	9/9	6/10	3/10	0/10	—	5.31	2.38	—
3	—	2/6	5/10	5/10	3/10	5/9	—	—	≥4.17	≤3.52	-0.63
4	4/10	3/10	5/10	6/10	—	—	—	—	≥2.13	≤5.56	—
5	2/10	4/10	2/10	2/10	—	—	—	—	1.28	6.43	0.00
6	1/10	2/10	4/10	—	—	—	—	—	0.88	6.81	—
7	2/10	1/10	2/10	—	—	—	—	—	0.81	6.88	1.20
對照	—	—	—	4/5	5/5	5/5	5/5	2/5	7.69		

注：“—”為未經測定。

抗體漸出現，但抗體水平還很低。實驗說明，小白鼠一次免疫後不久，對皮下活毒攻擊即產生很強的保護力，雖然當時小白鼠血清中和抗體尚測不出來或很低。

III. 小白鼠經不同疫苗量及不同注射間隔免疫後對腦內與皮下攻擊的保護力。

為了觀察小白鼠經二次免疫後，對腦內及皮下攻擊的保護力的不同，及保護力的產生與疫苗量及注射間隔的關係，進行了以下實驗。以 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 三種稀釋度的疫苗 0.1 毫升皮下免疫小白鼠，二次注射之間隔為 1、2、3、4 星期，在第二次免疫後 10 天，以系列稀釋 10 倍的病毒 0.03 毫升進行腦內及皮下攻擊。在皮下攻擊時，有的曾以 2×10⁻¹ 0.03 毫升病毒量進行攻擊。每個稀釋度攻擊 5 只小白鼠，以相同鼠齡的正常小白鼠作同樣病毒攻擊作為對照。實驗結果見表 3。

可以看出以 10⁻¹ 疫苗 0.1 毫升進行二次免疫的小白鼠，當注射間隔為 1、2、3、4 星期時對腦內攻擊的保護指數分別為 1.34、3.14、3.00、2.00。以 10⁻² 0.1 毫升疫苗二次免疫時，上述各注射間隔組的小白鼠對腦內攻擊的保護指數分別為 0.83、1.37、1.5、0.82。以 10⁻³ 疫苗 0.1 毫升二次免疫小白鼠，其不同注射間隔組對腦內攻擊均表現很低或無保護力。由此可見，小白鼠經腦炎疫苗二次免疫後對腦內病毒攻擊可出現保護力，其保護指數高低不僅與注射量有關，而且與注射間隔有關，注射間隔為一星期者，其腦內保護指數很低，而注射間隔長者（2—4 星期），則其保護指數一般表現較高。

當皮下攻擊時，從表 3 可以看到，以 10⁻¹、10⁻² 0.1 毫升不同注射間隔二次免疫小白鼠後，在各不同注射間隔組都有很高的皮下保護力，即使以 2×10⁻¹ 病毒量攻擊，動物也不死亡或很少死亡。所以其對皮下攻擊的保護力大大超過了腦內攻擊組。以 10⁻³ 0.1 毫升小量疫苗二次免疫的小白鼠表現很低或無保護力出現。

IV. 不同注射間隔免疫的小白鼠，其保護力與中和抗體水平的關係。

以 10⁻¹ 的疫苗 0.1 毫升皮下免疫三組小白鼠，各組的疫苗注射量及注射次數相同，僅注射間隔不同，第 1、2、3 組分別注射間隔為 5、15 及 30 天，在第二次免疫後 5、15、30、60 天時，每組各取出 10—15 只小白鼠放血液，按組將血液混合，分離血清，測定其中和抗體。與取小白鼠血液的同時，以一部分免疫的小白鼠用系列 10 倍稀釋的病毒進行腦內攻擊後觀察其保護力與中和抗體水平的關係。結果見圖 1。

從圖 1 中可見到，在實驗範圍內免疫注射間隔越長，小白鼠的中和抗體反應越高，如

表 3 不同免疫量及不同注射间隔免疫小白鼠后其脑内与皮下保护力的比较

注射间隔	疫苗稀释度	不同途径攻击的保护力																	
		脑内攻击					皮下攻击												
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	LD ₅₀ (log)	保护指数	2×10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	LD ₅₀ (log)	保护指数
1 星期	10 ⁻¹	5/5	5/5	3/5	3/4	1/4	—	7.16	1.34	0/3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	0.00	≥7.50
	10 ⁻²	5/5	5/5	5/5	5/5	1/4	—	7.67	0.83	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5	—	—	≤1.10	≥6.40	
	10 ⁻³	—	5/5	5/5	5/5	3/5	3/5	8.78	< 0	—	—	—	4/4	4/5	4/5	5/5	≥7.10	≤0.40	
	对照	—	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	8.50	—	—	—	—	5/5	4/5	4/5	5/5	≥7.50	—	
2 星期	10 ⁻¹	—	3/5	4/5	1/5	0/5	0/5	6.24	3.14	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	0.00	>6.25	
	10 ⁻²	—	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	8.00	1.37	—	1/4	0/5	1/5	1/5	—	—	≤1.00	>5.25	
	10 ⁻³	—	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	8.50	0.87	—	5/5	4/5	4/5	2/5	3/5	—	≥4.00	≤2.25	
	对照	—	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	9.37	—	—	—	5/5	5/5	4/5	5/5	4/5	>6.25	—	
3 星期	10 ⁻¹	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	—	5.50	3.00	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	0.00	≥4.18	
	10 ⁻²	5/5	5/5	5/5	2/5	1/5	—	7.00	1.50	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	<1.00	≥4.18	
	10 ⁻³	5/5	5/5	4/5	2/5	2/5	—	7.00	1.50	—	4/5	3/5	3/5	4/5	4/5	—	≥4.18	0.00	
	对照	—	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	8.50	—	—	5/5	3/5	4/5	3/5	3/5	—	≥4.18*	—	
4 星期	10 ⁻¹	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5	—	6.50	2.00	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	0.00	≥2.86	
	10 ⁻²	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	—	7.68	0.82	2/5	0/5	0/5	1/5	1/5	—	—	≤1.00	≥1.86	
	10 ⁻³	—	—	5/5	5/5	5/5	1/5	8.63	< 0	—	2/5	2/5	2/5	0/5	—	—	1.63	≥1.23	
	对照	—	5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	8.50	—	—	3/5	3/5	1/5	2/5	4/5	—	≥2.86*	—	

* 皮下 LD₅₀ 随免疫龄增加而降低

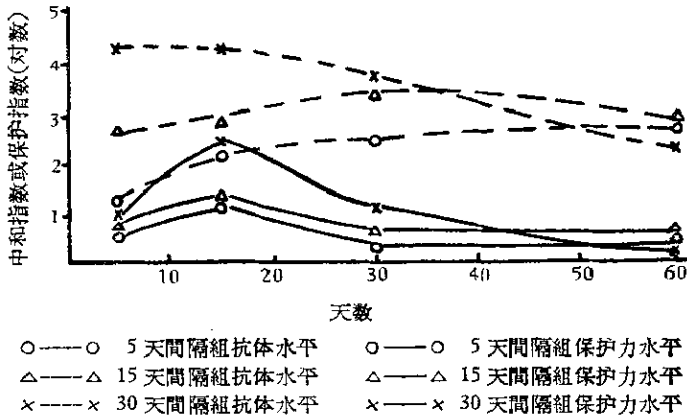


图1 不同注射间隔免疫小白鼠后其中和抗体水平与保护力的关系

在5、15、30天间隔组在第二次注射后5天时中和抗体水平相应为1.15、2.58、4.20。30天间隔组的抗体水平在第二次注射后30天内都超过5、15天间隔组,在第二次注射后60天时三组的抗体水平逐渐接近。

各不同注射间隔组的小白鼠在第二次注射后5天时,对脑内攻击的保护指数都在1个对数左右,在第二次注射后15、30天时可见到注射间隔越长,对脑内攻击的保护力越高,尤其是在第二次注射后15天时表现更为明显,在60天时对脑内攻击的保护力各组都降至很低。

很明显,动物经二次免疫后中和抗体水平维持的时间比保护力(脑内攻击)维持时间为久,动物对脑内攻击的保护力,仅在第二次免疫后15天左右表现较高,在其他的时间中和抗体水平虽然相当高,但其对脑内攻击的保护力都不很高,这说明经疫苗免疫的小白鼠对脑内攻击的保护力维持时间不长,而中和抗体水平维持时间较长。

讨 论

本文的实验结果证明对脑炎敏感的小白鼠经脑炎灭活疫苗一次免疫后以病毒脑内攻击时往往表现不出保护力,而在皮下攻击时,受一次免疫的动物却能耐受大量的病毒攻击,而使动物免于死亡。这说明脑炎灭活疫苗免疫小白鼠后其保护力与攻击途径有关。对免疫动物的保护力的大小因攻击途径不同而有所不同现象是易于解释的。因为以脑内途径攻击时病毒直接进入高度敏感的脑组织,机体不易对病毒进行抵抗。但以皮下途径攻击时,病毒进入脑组织需要一个过程,在这过程中机体的保护性反应及体液中的抗体就可以阻止病毒进入脑组织。所以,经一次免疫的小白鼠对脑内攻击未表现出保护力时,即能对皮下攻击表现出很高的保护力。

小白鼠经较大的脑炎疫苗(10^{-1} , 0.1毫升)一次免疫后一、二天对皮下途径攻击已有一定的保护力,为什么对皮下攻击的保护力出现得这样快呢?从实验中可见到,小白鼠经大量的疫苗免疫后一、二天主要对 10^{-7} 、 10^{-8} 病毒稀释度有对皮下攻击的保护力。少量的病毒,可能一时还不易侵入脑组织,实际上以 10^{-6} — 10^{-8} 稀释度的病毒皮下接种时小白鼠发病潜伏期较长,约需8—10天,可能是因为由少量病毒繁殖至相当量的病毒需一定

的时间,而经过免疫的小白鼠在这过程中争得了时间,使机体获得了一定的免疫力。在本实验中可观察到小白鼠在一次疫苗注射后 7 天时已有抗体产生,这样,关于小白鼠免疫注射后不久对少量病毒的皮下攻击有保护现象就得到了解释。当然很可能还有其他保护性反应参与作用。

小白鼠经脑炎灭活疫苗一次免疫后对脑内攻击没有保护力或保护力很低,但当经二次一定量的疫苗免疫后对脑内攻击就能出现保护现象。其保护力的大小与注射间隔有关,注射间隔短者保护力较弱,注射间隔长者保护力较强。中和抗体的反应也有同样的规律。至于小白鼠经二次疫苗注射后对皮下攻击有极高的保护力是极易理解的。因为小白鼠经一次免疫后即能产生相当高的皮下保护力。从实验中并可观察到,经 10^{-3} 疫苗 0.1 毫升免疫的小白鼠也有一定的保护现象,这说明使小白鼠产生保护力的疫苗量,约需含有几万至 10 万个 LD_{50} 病毒量(经福尔马林灭活的)。必需指出,在皮下攻击组当二次免疫间隔过长时,由于对照组正常鼠龄增大而对皮下感染病毒逐渐变为不敏感^[5]。因此皮下攻击时,免疫组与对照组的 LD_{50} 之间的差异不易观察到。

小白鼠经二次免疫后,其对脑内攻击保护力与其中和抗体水平相比,具有对脑内攻击的保护力的时间很短,一般在第二次免疫后 15 天左右对脑内保护力较高,以后就很快降低,但小白鼠经二次免疫后其中和抗体维持较久。这说明免疫动物对脑内攻击的保护现象更要考虑到除中和抗体而外的其他保护性反应。

本文对小白鼠经不同疫苗量及不同注射间隔免疫后的保护力观察,可能对改进脑炎疫苗的检定方法有一定参考意义。如在测定疫苗效价时,是否可考虑将疫苗注射间隔适当延长,这样可使疫苗效价更易测出来。

Hodes 等曾报导以圣路易脑炎活病毒皮下免疫小白鼠后,在未查出中和抗体时即出现脑内保护力,而在中和抗体逐渐增高时,则对脑内攻击的保护力逐渐消失。Hodes 等由此得出结论说,该抗体在小白鼠免疫中不起多大作用^[6]。我们认为这结论是不够全面的,因为免疫动物在脑内攻击时不出现保护力,若由皮下途径攻击则就可能出现保护力。流行性乙型脑炎发病机制的研究说明,病毒是由血行侵入中枢神经系统的^[7,8]。那末不言而喻,当病毒经自然感染途径(蚊子叮咬或皮下注射)侵入机体时,机体的中和抗体及其他的保护性反应对阻止病毒侵入中枢神经系统必将起很大的作用。而当以非自然感染途径(脑内注射)攻击免疫的动物时,其免疫机制可能不一样,在这种情况下中和抗体可能不起主要作用,因此,即使有中和抗体存在,而对脑内攻击可以不出现保护力,机体对脑内攻击虽然不出现保护力但不等于机体没有免疫力。所以,断定机体有否保护力,应指对自然感染途径的感染动因的不敏感性而言更为恰当。

摘 要

本文研究了小白鼠经流行性乙型脑炎疫苗免疫后对脑内与皮下攻击的保护力。此外,也进行了抗体水平与保护力关系的研究。

实验证明小白鼠经一次脑炎疫苗免疫后虽然对脑内攻击没有保护力或保护力很低,但在皮下攻击时可以观察到小白鼠有很强的保护力,而且在免疫后一、二天对少量病毒的皮下攻击已有保护现象。

腦炎疫苗二次免疫小白鼠后,小白鼠不仅对皮下攻击有很高的保护力,而且对脑内攻击也能表现有保护现象,其保护指数不仅与疫苗量有关,而且与注射间隔有关,一般注射间隔短者其保护力较低,注射间隔长者其保护力则较强。实验并说明免疫的小白鼠对脑内攻击的保护力持续时间不长,而在血液中的中和抗体持续时间较久。

最后,本文对机体的保护力与感染途径的密切关系进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] 黃禎祥、周明先:微生物学报, 6(1):32, 1958。
- [2] Iman, Z. E. and Hammon. W. Mcd.: *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, **95**:6, 1957.
- [3] Iman, Z. E. and Hammon. W. Mcd.: *J. Immunol.*, **79**:243, 1957.
- [4] Iman, Z. E. and Hammon. W. Mcd.: *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**:12, 1957.
- [5] 黃禎祥:中华医学杂志, **44**:109, 1958。
- [6] Hodes. H. L. and Webster L. T.: *J. Exp. Med.*, **68**:263, 1938.
- [7] 松本稔:最新医学, **11**:72, 1956。
- [8] 汪 壘、黃禎祥:微生物学报, **8**:85, 1959。

EXPERIMENTAL STUDIES ON ACTIVE IMMUNIZATION AGAINST JAPANESE B ENCEPHALITIS

II. RELATION BETWEEN THE INDEX OF PROTECTION OF IMMUNIZED MICE TO THE ROUTE OF CHALLENGE

HSÜ CHAO-HSIANG, CHOW MING-SIEN, AND CHENG LI-TE

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

The results of the experiments showed that there was evident difference in resistance when the immunized mice were challenged by different routes of inoculation.

There was no or, if any, a very weak protection in mice vaccinated with a single dose of the formalinized Japanese B encephalitis vaccine, when these mice were challenged with active virus intracerebrally. However, if these mice were challenged subcutaneously, the index of protection was high, and the development of resistance was rapid. In the latter case, the vaccinated mice could survive a challenge with high diluted virus suspension already on the 2nd or 3rd day after vaccination. Beginning from the 5th day after vaccination, a high index of protection was developed.

When mice were vaccinated twice at definite intervals, all showed high resistance against challenge by both routes. The degree of resistance as well as the level of neutralizing antibody of the immunized animals were found to be in proportional to the quantity of the vaccine injected, and to the interval between two the injections. In general, the longer the interval between the two injection, the higher is the degree of resistance, and a higher titer of neutralizing antibody could also be observed.

The relationship between the degree of resistance against intracerebral challenge and the level of neutralizing antibody of the mice vaccinated by two injections were also followed. The results indicated that the duration of protection against intracerebral challenge was short. In this case, the animals showed highest resistance against the intracerebral challenge on the 15th day after the 2nd injection, then it rapidly subsided. However, the level of the neutralizing antibody persisted longer.

Finally, the relation between the index of protection of the immunized mice and the routes of challenge were discussed.