

流行性乙型腦炎疫苗效力的研究

王用楫 戚迦陵 戚景彝 李美容 王欽臣

(中央生物製品研究所, 北京)

流行性乙型腦炎的病原發現比較晚近, 腦炎疫苗的歷史更短。1942年 Sabin 氏^[1]用小白鼠製造疫苗。1945—47年鼠腦疫苗才大量用於人體^[2]。1942年 Smorodintseff 氏^[3]也製成類似的疫苗並報告使用有效。1946年 Warren 及 Hough 氏^[4]試用雞胎製造疫苗; 同年 Koprowski 及 Cox 氏^[5]也製成雞胎疫苗。1947年雞胎疫苗才正式使用^[6]。

近十幾年來北京每年夏秋間都有腦炎病例發生, 近年來全國許多城市中都會有本病病例的報告^[7]。自1950年我們開始腦炎疫苗的研究, 初步的製品為鼠腦疫苗, 1951年春又製成雞胎疫苗。如湯氏所言^[8]注射腦炎疫苗後的效果, 還不能肯定。在製造當中我們曾作了些疫苗的效力試驗。本文的主要目的即在於報告小白鼠效力試驗的結果和人類注射疫苗後血清中抗體產生的情形; 附帶將免疫前血清中和試驗結果作一分析報告。

材 料 和 方 法

1. 病毒

試驗用及製造疫苗所用的病毒係1949年秋北京流行期間中央衛生研究院黃禎祥醫師所分離的流行性乙型腦炎病毒(京衛研2)。

2. 疫苗

鼠腦疫苗即以上述病毒傳染鼠腦製得的10%去毒懸液, 雞胎疫苗即受染雞胎的20%去毒懸液。用作人體免疫的疫苗先經過安全及效力試驗認為合格, 保存溫度為攝氏4°, 使用時離製造日期之間隔在鼠腦約為4—8月, 雞胎約為二月。疫苗於應用之前曾加入適量的酸性亞硫酸鈉(NaHSO_3)以中和疫苗中含有的福麻林而免注射時刺痛^[9]。

3. 腹腔注射病毒效力試驗法^[10]

選擇體重 9—12 公分的正常小白鼠 60 隻，分爲試驗及對照兩組。試驗組再分爲四小組，一律施行腹腔注射疫苗兩次，間隔三日，各小組接收疫苗分量按一定倍數遞減。首次免疫後第七日各小組同受 10 倍稀釋鼠腦病毒 0.3 毫升的腹腔注射。對照組分爲兩組，第一小組接受與試驗組同量的病毒，第二小組注射 100 倍稀釋的病毒。各小鼠一律觀察 14 日，逐日記載死亡數目，據 Reed-Muench 氏法^[11]計算疫苗的 50% 免疫量 (50% Immunogenic Dose)。50% 免疫量即爲使試驗小白鼠中 50% 獲得保護力的疫苗分量。附帶說明，此法測出的保護力並非由於病毒的干涉現象 (Interference Phenomenon) 所致，因爲免疫後 1—2 日內，在干涉現象發生最多的時候我們注射病毒，並沒有保護小鼠的生命。

4. 腦腔注射病毒的效力試驗法

此法曾用作測定狂犬疫苗的效力^[12]。選擇體重 7—9 克的小白鼠，分爲試驗組及對照組，試驗組間日施行腹腔注射疫苗，每次注射 0.25 或 0.3 毫升，共免疫六次，末次免疫後第四日對試驗組及對照組各鼠行不等分量病毒的腦腔注射，病毒稀釋以十倍連續稀釋由 10^{-1} — 10^{-9} 。每個病毒稀釋接種小白鼠 4—6 隻，繼續觀察 14 日，逐日檢查記載死亡數目。依 Reed-Muench 氏法^[11]計算試驗組及對照組之 50% 致死量，將兩者 50% 致死量之比來表示疫苗的保護力或免疫力。這個比稱做免疫指數。

5. 免疫的對象和方法

我所 57 位職工 (男 35, 女 22) 先後受腦炎疫苗的免疫試驗，年齡大都在 20 歲左右：計 16—20 歲者 19 人，21—30 歲者 25 人，31—40 歲者 8 人，41 歲以上者 5 人；受鼠腦免疫者 30 人，注射雞胎疫苗者 27 人。在開始免疫前每人先取血 10 毫升，除註明者外，疫苗均係二次皮下注射，每次 2.0 毫升，間隔三日。首次免疫後第 14 日及第 28 日各再取血一次，其中有四人更注射第三次，並作第三次血清試驗。

6. 血清

於空腹時取血，置室溫中 $\frac{1}{2}$ —1 小時後，以每分鐘 2000 次速度沉澱 20 分鐘，分離血清。一、二日內如不試驗，冰凍於低溫冰箱中。

7. 中和試驗

病毒係以毒種腦腔注射體重 7—9 克的小白鼠於發病後死亡前取腦研碎加含

有 10% 滅能健兔血清之生理食鹽水而成。

中和試驗採用病毒稀釋法，即以未經稀釋的血清與 10 倍連續稀釋的病毒各 0.2 毫升，放於小試管中，振盪各管使血清與病毒充分混合，置攝氏 37° 水浴中培育兩小時然後以腦腔注射法接種體重 12—15 克的小白鼠，每隻血清病毒混合液的接種量為 0.03 毫升，每個病毒稀釋度注射五隻，在注射過程中各管保存在冰槽中依次注射。同時以滅能健兔血清作對照血清組依同樣方法與病毒混合培育，但在試驗注射的最後接種小白鼠。逐日觀察並記錄小白鼠的死亡直至第 14 日為止。

用雞胎做中和試驗時用同樣方法將血清與病毒混合培育選用，孵育已八日的雞胎以卵黃囊注射法每隻接種血清病毒的混合液 0.1 毫升，然後置於 35°C 的孵卵室內逐日檢查並記錄雞胎的死亡至第 14 日為止。

試驗結果依 Reed-Muench 氏法^[11]分別計算，試驗組及對照組的 50% 致死量，以試驗組與對照組的 50% 致死量之比來表示該血清的中和力，這個比稱做中和指數，血清的中和指數在 50 以下者視為陰性，50 以上者視為陽性。

試 驗 和 結 果

1. 腦炎疫苗的腹腔注射病毒效力試驗

自從製造腦炎疫苗以來，先後曾以腹腔注射病毒的效力試驗法測定疫苗的效力。所得到的結果列為表 1。由表中可以看出鼠腦疫苗中加福麻林滅活前，病毒對小白鼠的 50% 致死量除第 77 批外均在 8.5 左右或以上，疫苗 50% 免疫量除第 77 批外均在 0.01 毫升以下。0.01 毫升即腦炎疫苗之最低效力標準。第 77 批疫苗的效力不及最低標準甚遠，顯然是由於該批鼠腦中病毒發育太少（50% 致死量 6.65）的原故。其餘各批病毒 50% 致死量與疫苗 50% 免疫量之間看不出直接的關係，如第 18 批疫苗 50% 致死量為 9.15 由其所製造的疫苗 50% 免疫量為 0.007 毫升第 14 批 50% 致死量為 8.48，疫苗 50% 免疫量反為 0.0045 毫升。第 52 批疫苗於製造後二個月與三個月效力試驗，沒有差別，根據我們的經驗製造與試驗日期的間隔在 1 月與 7 月之間，對疫苗的效力似無顯著的影響。

雞胎疫苗中，滅活前病毒對小白鼠 50% 致死量較鼠腦病毒為低，大都在 7.00—8.00 之間；疫苗之 50% 免疫量不超過 0.01 毫升者 9 批中只有 4 批，且製造與試驗的間隔均在 1 月左右。滅活前病毒 50% 致死量與疫苗 50% 免疫量間看不出顯然的關係，雞胎疫苗的效力與貯存時間之久暫具有關係，如第 210 批疫苗於製造

後第 27 日測定效力, 50% 免疫量為 0.0056 毫升, 第 45 日為 0.01 毫升, 第 88 日為 0.034 毫升。

表 1 用腹腔注射病毒法試驗腦炎疫苗效力的結果*

疫苗種類	疫苗批號	滅活前病毒滴定小白鼠 ^x 50%致死量 ⁺	製造與試驗 間隔日數	疫苗 50% 免疫量 (毫升)
鼠 腦	1	8.67	46	0.0042
	7	8.85	28	0.0068
	14	8.48	51	0.0045
	18	9.15	46	0.0070
	20	8.49	43	0.0055
	38	8.68	224	0.0075
	52	8.75	59	0.0085
	52	8.75	94	0.0085
	77	6.65	33	0.05
雞 胎	1	7.03	29	0.005
	2	7.23	28	0.015
	3	7.50	27	0.019
	17	7.65	30	0.035
	28	8.19	32	0.025
	52	7.00	19	0.0052
	76	7.21	19	0.01
	108	7.48	22	0.0053
	201	7.55	27	0.0056
	201	7.55	45	0.010
	201	7.55	88	0.034

*效力試驗中對照小白鼠注射 10^{-1} 稀釋病毒的 90% 以上死亡, 10^{-2} 的 50% 左右死亡。

*病毒滴定係製造疫苗當日內進行, 以肉湯及生理鹽水各半溶液作稀釋液, 每一稀釋度腹腔注射五隻小白鼠觀察十日, 每隻注射量為 0.03 毫升。

⁺50% 致死量是以病毒稀釋度的倒數的對數表示的, 如病毒稀釋度為 $10^{-8.67}$ 以 8.67 表示。

腦炎疫苗由製造開始至注射為止, 時刻應保存在攝氏 4° 左右, 如在室溫 (23° – 25°C) 保存兩天則完全失效^[1]。為明瞭室溫對疫苗效力的影響起見, 曾做了一次

試驗結果見表 2。鼠腦疫苗在室溫保存 24 及 72 小時，然後免疫小白鼠所得到的效力分別為 0.0065 及 0.0076 毫升 (50% 免疫量) 與在冰箱保存的同批疫苗所得的結果並沒有差別，後者的效力為 0.0085 毫升。雞胎疫苗亦曾做同樣試驗，在室溫保存 24 小時效力無大變化，但至 48 小時時，效力只餘原來的 $\frac{1}{2}$ 。

表 2 腦炎疫苗在室溫中保存與效力的關係

疫苗種類 和批號	使用前疫苗的處理	製造與試驗的 間隔日數	疫苗 50% 免疫量 (毫升)
鼠腦 52 批	存冰箱中(4°C)	59	0.0085
	存室溫中 24 小時(21-23°C)	60	0.0065
	存室溫中 72 小時(21-26°C)	63	0.0076
雞胎 108 批	存冰箱中(4°C)	94	0.0085
	存室溫中 24 小時(21-23°C)	22	0.0053
	存室溫中 48 小時(21-23°C)	23	0.0056
		24	0.0145

2. 腦腔注射病毒效力試驗

爲了進一步瞭解腦炎疫苗的效力，施行腦腔注射病毒的試驗效方法，免疫及試驗方法如前所述，第一次試驗中所用的鼠腦疫苗係 52 批於 3 月 7 日製造，雞胎疫苗係第 201 批於 5 月 23 日製造兩種疫苗均於 6 月 3 日開始免疫小白鼠，6 月 17 日分別用鼠腦及雞胎病毒行腦腔試驗注射，兩種病毒試驗結果全不一致(表 3)。爲了證實此項結果，更於 9 月 2 日以同法重做試驗。第二次所用鼠腦疫苗爲第 73 批於 7 月 4 日製造，雞胎疫苗爲 289 批於 5 月 24 日製造，兩次試驗結果如表 3 所示。以鼠腦病毒試驗疫苗的效力至爲顯著，鼠腦疫苗較雞胎者爲優；但雞胎確有其效力存在。前者免疫指數二次均爲 6,300 而後者分別爲 200 及 500。

再看兩次用雞胎病毒試驗之結果，免疫指數均在 50 以下鼠腦疫苗爲 25 及 20，雞胎爲 25 及 10。與鼠腦病毒試驗所得的結果不能相比。

Sawyer 及 Lloyd 氏^[13]用小白鼠試驗對黃熱病之免疫力時曾採用腹腔注射病毒，同時腦腔注射 2% 可溶性澱粉的生理鹽水溶液，以提高小鼠對黃熱病病毒的

表 3 用腦腔注射病毒法試驗腦炎疫苗效力的結果

試驗次數	疫苗種類	免疫次數	疫苗總量(毫升)	試驗病毒來源	免疫組小白鼠 50%致死量*	對照組小白鼠 50%致死量	免疫指數
I	鼠腦	6	1.8	鼠腦	4.7	8.5	6,300
	鷄胎	6	1.8	鼠腦	6.2	8.5	200
	鼠腦	6	1.8	鷄胎	4.8	6.2	25
	鷄胎	6	1.8	鷄胎	4.8	6.2	25
II	鼠腦	6	1.5	鼠腦	3.5	7.3	6,300
	鷄胎	6	1.5	鼠腦	4.6	7.3	500
	鼠腦	6	1.5	鷄胎	4.2	5.5	20
	鷄胎	6	1.5	鷄胎	4.5	5.5	10

*50% 致死量是以病毒稀釋度的倒數的對數表示的，如病毒稀釋度為 $10^{-4.7}$ 以 4.7 表示。

感受性，Webster 及 Clow 氏^[14]以此法腹腔滴定病毒亦可增強聖路易型腦炎病毒對小白鼠的感受性，我們曾以流行性乙型腦炎病毒試驗，亦得相似的結果，因此如第二次試驗中的方法用鼠腦及鷄胎疫苗免疫小白鼠（每隻免疫 6 次每次 0.25 毫升）用腹腔注射鼠腦病毒腦腔注射澱粉法作效力試驗，先腦腔注射 2% 可溶性澱粉的生理鹽水溶液 0.03 毫升，隨即腹腔注射不同稀釋的腦炎病毒懸液 0.3 毫升，稀釋液係肉湯，生理食鹽水各半混合而成，試驗注射後觀察 14 日，結果列為表 4，表中對照組小白鼠因腦腔注射澱粉使腹腔注射病毒的 50% 致死量的稀釋度提高至 6.4 與免疫組小白鼠的 50% 致死量比較能顯著的看出疫苗的效力，鼠腦疫苗的免疫指數在 250,000 以上，鷄胎疫苗的為 25,000，前者效力仍較後者為優。

表 4 用腹腔注射病毒腦腔注射澱粉法試驗腦炎疫苗效力的結果

疫苗種類	免疫次數	疫苗總量(毫升)	試驗病毒來源	試驗組小白鼠 50%致死量	對照組小白鼠 50%致死量	免疫指數
鼠腦	6	1.5	鼠腦	1.0 ⁻	6.4	250,000 ⁺
鷄胎	6	1.5	鼠腦	2.0	6.4	25,000

3. 免疫前中和試驗

免疫前的血清係於首次注射疫苗之直前抽取的，共做六次試驗。有取血後 2-

4日內即行試驗者，有等至與免疫後血清一併試驗者，試驗分析結果列為表5。在57例受試者的血清中，中和指數不足50者15人(男6女9)，年齡無在41歲以上者，平均年齡為24.6歲，佔受試者26.3%；中和指數在50與5,000之間者28人(男18,女10)平均年齡為24.5歲，佔49.1%；中和指數超過5,000者14人(男11,女3)，年齡無20歲以下者，平均年齡為30.87歲，佔24.6%。總計中和指數在50以上者42人(男29,女13)，佔受試者73.7%。

表5 腦炎疫苗免疫前血清對流行性乙型腦炎病毒的中和指數(用小白鼠腦腔注射法)與性別及年齡的關係

中和指數	性別		年齡				總數	百分比	平均年齡
	男	女	16—20	21—30	31—40	41以上			
<50	6	9	5	8	2	0	15	26.3%	24.60
50—5,000	18	10	14	8	3	3	28	49.1%	24.50
>5,000	11	3	0	9	3	2	14	24.6%	30.87
總數	35	22	19	25	8	5	57	100.0%	26.11

4. 免疫後中和試驗

由免疫前中和試驗受試者中有15例血清不含中和抗體。茲將他們免疫前後血清中和試驗結果列入表6。受試者免疫後曾取血兩次，個別人有取血一次或三次者。如表6所示，接受鼠腦疫苗者六人，其中三人的血清(第18,41及42例)於第一次取血(開始免疫後第14日)中和指數已達160,63及160，參與第二次取血(開始免疫後第28日)者僅三人，結果有二人(第17,18例)中和指數增至130及630。接受雞胎免疫者9人，第一次取血試驗有二人(第29,30例)中和指數超過50(80,160)，九人中第12及48例於免疫前曾作皮內試驗，似對雞胎組織過敏，故行皮內注射雞胎疫苗0.1毫升兩次。參與第二次試血者僅第10,11及12三例，中和指數未見增加乃於免疫開始後第31日復以鼠腦疫苗2.0毫升行皮下注射，11日後取血試驗，中和指數均顯著上昇。又第17例原注射鼠腦疫苗二次中和指數於第二次試血時已上昇至130，首次免疫後第43日又用雞胎疫苗皮下注射2.0毫升，15日後取血試驗，中和指數增至5,000。

表 6 免疫前血清中和指數不足 50 者對疫苗注射的反應

血 清 號 數	疫 苗 種 類	免 疫 前 血 清 中 和 指 數	免 疫 後 第 一 次 血 清 中 和 指 數	免 疫 後 第 二 次 血 清 中 和 指 數	第 三 次 免 疫 後 血 清 中 和 指 數
1	鼠腦	1 ⁻	1	1	—
17	”	2.5	3.2	130	5,000*
18	”	16	160	630	—
40	”	1	8	—	—
41	”	2.5	63	—	—
42	”	10	160	—	—
10	雞胎	4	40	10	1,000*
11	”	8	8	16	400*
12 ⁺	”	10	5	16	1,600*
26	”	1 ⁻	1 ⁻	—	—
27	”	1 ⁻	1 ⁻	—	—
28	”	1 ⁻	4	—	—
29	”	1 ⁻	80	—	—
30	”	1	160	—	—
48 ⁺	”	1.3	1 ⁻	—	—

△1⁻ 表示中和指數在 1 以下者。

*第 17 例開始免疫後第 43 日又皮下注射雞胎疫苗 2.0 毫升, 中和指數係第三次免疫後 15 日取血試驗的結果。

+第 12 及 18 例免疫前曾皮內試驗似對雞胎組織過敏, 故行皮內注射雞胎疫苗 0.1 毫升兩次。

*第 10, 11 及 12 例於開始免疫後第 31 日又皮下注射鼠腦疫苗 2.0 毫升, 中和指數係第三次免疫後 11 日取血試驗的結果。

免疫前血清中和試驗中, 八例中和指數在 50 與 1,000 之間。其免疫後血清反應情形詳表 7。八例中除 33 例外免疫後中和抗體均急劇增加, 如以免疫前血清中和指數為基礎, 免疫後中和指數增加倍數在 80—4,000 之間。免疫前中和指數超過 1,000 者, 免疫後中和抗體同樣急劇上昇(數字從略)。

表7 免疫前血清中和指數在50—1,000之間者對疫苗注射的反應

血清 號數	疫苗 種類	免疫前 血清中和指數	免疫後第一次血清		免疫後第二次血清	
			中和指數	增加倍數*	中和指數	增加倍數
13	鼠腦	630	160,000	250	160,000	250
19	雞胎	200	32,000	160	200,000	1,000
20	”	250	63,000	250	100,000	400
31	”	200	80,000	4,000	—	—
32	”	400	250,000	600	—	—
33	”	800	400	0.5	—	—
34	”	800	160,000	200	—	—
43	”	800	6,300	80	—	—

*增加倍數係免疫前後血清中和指數之比，如第13例免疫後第一次血清 $\frac{160,000}{630} = 250$ 。

5. 雞胎中和試驗

第17, 19, 20, 21, 22, 25血清給血者曾受鼠腦疫苗免疫二次，免疫前及免疫後兩次血清同時以雞胚及小白鼠做中和試驗，其結果列為表8。如第17例以小白鼠測定免疫前血清原本不含抗體（中和指數為2.5），免疫後第二次血清抗體出現（中

表8 鼠腦疫苗免疫前後的血清對流行性乙型腦炎病毒中和試驗的結果
(用雞胎卵黃囊注射法)

血清 號數	中和試驗 所用動物	免疫前 血清中和指數	免疫後第一次 血清中和指數	免疫後第二次 血清中和指數
17	8日雞胎	1.6	50	500
	小白鼠	2.5	3.2	130
19	8日雞胎	160	1,600	25,000
	小白鼠	200	32,000	200,000
20	8日雞胎	160	2,500	25,000
	小白鼠	250	63,000	100,000
21	8日雞胎	500	8,000	8,000
	小白鼠	2,000	50,000	200,000
22	8日雞胎	2,500	16,000	25,000
	小白鼠	3,200	50,000	130,000
25	8日雞胎	3,200	1,000	250,000
	小白鼠	32,000	25,000	400,000

和指數增至 130); 同時以雞胎測定亦得相似的結果(中和指數由 1.6 增至 500)。其他諸例以小白鼠試驗原本含有程度不等的中和抗體,與雞胎試驗所得到的結果頗為平行;免疫後血清以兩種方法測定,結果亦屬一致。

討 論

自 Sabin 氏^[1]及 Smorodintseff 氏^[3]製得鼠腦疫苗應用小白鼠測定其效力以來,小白鼠已廣泛應用於腦炎疫苗效力試驗^[10,15]。

就我們試驗結果,鼠腦疫苗的效力一般較雞胎者為好。前者 50% 免疫量一般均在 0.01 毫升以下,而後者在 0.01 毫升以上的超過半數;此種差別或以鼠腦及雞胎組織中病毒發育量不同之故。此外雞胎疫苗效力亦甚不安定,雖保存於攝氏 4° 的冰箱中亦不能阻止其效力降低。Smadel 等氏^[6]曾提供了真空乾燥雞胎疫苗來克服這個缺點,我們也正在試驗乾燥雞胎疫苗中。

鼠腦疫苗在室溫 (21—26°C) 保存 24 及 72 小時與在冰箱內的同批疫苗對小白鼠所產生的保護力沒有顯然差別。此點與 Sabin 氏在室溫 (23—25°C) 保存兩日即歸無效的說法^[1]顯有出入。但雞胎疫苗在室溫放至 48 小時,效力顯著降低。

腹腔注射病毒以測定疫苗效力有其缺點存在。盡管對試驗病毒加上(1)腦腔注射 50% 致死量的稀釋不少於 $10^{-8.0}$ (2) 對照小白鼠的死亡率應在 80% 以上兩項限制,但病毒的強弱頗難管制,同時小白鼠對腹腔注射病毒的感受性隨年齡增加而減低^[16],如開始免疫時用體重 18—20 克的小白鼠,^[10]照我們的經驗對照組小鼠的死亡率往往不能超過 80%;為此,開始免疫時,我們採用了體重 9—12 克的小鼠。Koprowsk 及 Cox 氏謂^[5]雞胎疫苗如以雞胎病毒測定效力則較鼠腦者為高;我們曾作數次試驗,結果對照組小鼠死亡僅及 50% 左右,據此甚難解釋疫苗之效力。用腹腔注射病毒法測定的疫苗效力是以 50% 免疫量的大小表示的,但此數字與試驗所用病毒的強弱及疫苗效力的高低同有直接的關係,據此非同一次試驗的疫苗因所用病毒的強弱不同效果不能比較。

為了克服以上缺點,我們試驗了六次腹腔免疫法,並用二種不同的方法注射試驗病毒。六次用鼠腦疫苗行腹腔免疫,每次 0.25—0.3 毫升,然後腦腔試驗注射鼠腦病毒,可使小白鼠抵抗 6,300 個 50% 致死量;同法試驗雞胎疫苗可使小白鼠抵抗 200—500 個 50% 致死量。依同法免疫,如以雞胎病毒行腦腔試驗注射,兩

種疫苗同樣無顯明的保護力(免疫指數為 10—25)。按一般原則,同原的疫苗對同原的病毒應顯較強的保護力,但雞胎疫苗對雞胎病毒則不現此種現象。根據上述結果,雞胎病毒或新鮮雞胎組織(因試驗病毒均係新鮮者)中,似含有一種物質,對疫苗所產生的保護力有阻止作用;此點已獲得實驗證明。

六次鼠腦及雞胎疫苗免疫的小白鼠經腹腔注射病毒同時腦腔注射澱粉後,鼠腦疫苗免疫的小白鼠獲得的保護力足可抵抗 250,000 個以上的 50% 致死量,雞胎疫苗免疫的小白鼠亦可抵禦 25,000 個 50% 致死量。

據前述試驗結果,六次定量疫苗免疫小白鼠,然後以不等量的稀釋鼠腦病毒行腦腔或腹腔(同時輔以腦腔注射澱粉)試驗注射,均可測得疫苗的效力。此項效力是以免疫指數的多少表示的,即非同一次試驗結果亦可比較。

據三田村氏等於 1943 年報告^[17],南京上海正常成人血清 104 份中有 83% 能中和流行性乙型腦炎病毒;又 Sabin 氏於 1947 年報告,^[18] 19 份天津成人(年齡在 17—57 歲平均 32.68)血清中 17 份(89%)含有中和腦炎病毒的抗體,13 份上海成人(年齡 16—51 歲平均 30.23 歲)血清中 11 份(85%)亦呈陽性。這次免疫前試驗的 57 份(年齡在 16—54 歲平均 26.11 歲)血清中 42 份含有中和抗體(最低的中和指數為 200),佔全數 73.7%。如與三田村氏等或 Sabin 氏所得結果比較均顯稍低。但可能因這次受試者一般年齡較低,故有此種差別。如 57 人中平均年齡為 26.11 歲,30 歲以下者佔 44 人;而 Sabin 氏報告^[18]的天津及上海成人的平均年齡分別為 32.68 及 32.23 歲;三田村氏報告的年齡不詳,無法比較。

在免疫前中和抗體陽性的血清中,中和力亦有強弱的不同,中和指數有數百數千者有高達 50,000 以上者。中和指數的大小與年齡有相當的關係,如中和指數超過 5,000 的 14 例中平均年齡為 30.87 歲而 50 以下的 15 例中平均年齡 24.6 歲,二者顯然有別,又 50 與 5,000 間的 25 例中平均年齡為 24.5 歲,後二組的歲數極近似,這種近似是因為受試者大都在 20 歲左右之故。若有低齡兒童參與這次試驗,則中和指數在 50 以下的平均年齡必將大大下降。

15 例陰性血清經免疫後 9 例(佔全數 60%)中和抗體顯著增加,其中三例係經第三次免疫後始出現者。據此第三次注射疫苗確有其顯著效果。Sabin 氏 1947 年^[19]亦有相同的報告,以鼠腦疫苗三次免疫 3—5 歲兒童每次 1.0 毫升,首兩次注射相隔六日第三次於開始免疫後一月行之,第二次免疫後第 10 日的中和指數增加者 10 例中僅三例(30%),第三次免疫後第 10 日試血,10 例之中和指數全部

增加。

由第 17 例血清可知抗體於第 14 日後仍有出現可能，於第 14 日試血為陰性時，第 28 日仍有重複試血必要。

同例係以鼠腦疫苗免疫二次，第三次易以雞胎疫苗，又第 10, 11 及 12 三例首二次注射雞胎疫苗，第三次易以鼠腦，此四例經第三次試血均獲得良好效果。

為避免 Morgan 氏等^[20,21]所述注射神經組織可能引起的過敏性腦脊髓炎的危險性，首次或首一、二次可用鼠腦疫苗，然後再用雞胎行第三次注射，或完全注射雞胎疫苗。

15 例中於第一次(第 14 日)試血時顯陽性結果者 5 例(33.3%)，如第一二次試血結果合併計算則為陽性 6 例(40%)，然有 10 例並未參與第二次取血。如此，陽性者或不止 6 例；如以三次試血結果合併計算共有 9 例(60%)。如依二種疫苗分別估計其效果，則鼠腦疫苗僅 6 例，4 例獲得陽性(66.7%)，雞胎疫苗 9 例，5 例陽性(55.6%)，但其中有三例係於第三次改用鼠腦疫苗免疫後，始轉為陽性者。因試驗人數過少，尚難區別其優劣。

血清中原本含有抗體者，免疫後抗體急劇上昇；此點可以說明原本抗體屬特异性者，其來源似為腦炎流行區域的隱性傳染。

Burnet 氏^[22]曾倡議用雞胎做中和試驗，Koprowski 等^[23]曾以雞胎滴定流行性乙型腦炎病毒，我們也做過同樣的滴定試驗均獲得規則的結果，與用小白鼠所得者相埒。據此，曾對免疫前後的血清同時以雞胎及小白鼠兩種不同的宿主做中和試驗，兩組所得的結果頗屬一致。於白鼠供應不足時或為了節省開支的情況下，可用雞胎代替小白鼠進行中和試驗。

結 論

1. 兩次不等量腦炎疫苗腹腔免疫小白鼠，再由腹腔注射定量的鼠腦病毒，鼠腦疫苗的 50% 免疫量一般不超過 0.1 毫升；而雞胎疫苗則否。此種效力試驗方法有其一定缺點。

2. 六次等量腦炎疫苗，腹腔免疫小白鼠然後以不等稀釋的鼠腦病毒行腹腔或腹腔(同時輔以腦腔注射澱粉)試驗注射，兩種疫苗均有顯著的保護效力。鼠腦疫苗的效力較雞胎者為優。如以雞胎病毒行腦腔試驗注射，兩種疫苗均不現顯著保護現象。

3. 57 人參與腦炎疫苗免疫試驗，結果 42 人免疫前的血清中含有中和流行性乙型腦炎病毒的抗體，佔試驗人數的 73.7%，中和指數的大小似與年齡有關。

4. 15 例免疫前血清陰性者，免疫後有 9 例中和抗體變成了陽性，佔試驗人數的 60%。注射三次比二次得出更好的結果。爲了避免注射神經組織可能引起的過敏性腦脊髓炎的危險性，我們提供了先以鼠腦疫苗基礎免疫後以雞胎疫苗刺激免疫的方法。

5. 六例免疫前後的血清，同時用雞胎及小白鼠行中和試驗，得出一致的結果。據此可用雞胎代替小白鼠進行血清中和試驗。

誌謝 湯飛凡所長，朱旣明醫師對本文諸多指正之處特此誌謝。

參 考 文 獻

- [1] Sabin, A. B., *J.A.M.A.*, 1943, **122**, 477.
- [2] Sabin, A. B., *J.A.M.A.*, 1947, **133**, 281.
- [3] Smorodintseff, A. A., *Mikrobiol. Immunol. Moskva.*, 1942, 11-12, 61. (由文獻[1]引證)
- [4] Warren, J., and Hough, R. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1946, **61**, 109.
- [5] Koproski, H. and Cox, H. R., *J. Immunol.*, 1946, **54**, 357.
- [6] Smadel, J. E., Randall, C. R., and Warren, J. *Bull. U.S. Army Med. Dept.*, 1947, **7**, 963.
- [7] 黃禎祥, 宋幹, 田鳳調, 中華醫學雜誌, 1951, **37**, 253.
- [8] 湯飛凡, 中華新醫學報, 1950, **1**, 50.
- [9] Sabin, A. B., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1947, **65**, 127.
- [10] Federal Security Agency, N. I. H., Minimum Requirements, Japanese B Encephalitis Vaccine, Feb. 5, 1945.
- [11] Reed, L. J. and Muench, H., *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [12] Federal Security Agency, N.I.H., Minimum Requirements, Rabies Vaccine, 1946, Oct. 1.
- [13] Sawyer, W. A. and Lloyd, W., *J. Exp. Med.*, 1931, **54**, 533.
- [14] Webster, L. T. and Clow, A. D., *J. Exp. Med.*, 1936, **63**, 433.
- [15] Federal Security Agency, N.I.H., Minimum Requirements, Japanese B Encephalitis Vaccine, Chick-embryo Type, Aug. 7, 1947, (由文獻[8]引證)
- [16] Lennette, E. H. and Koprowski, H., *J. Immunol.*, 1944, **49**, 175.
- [17] Mitamura, T., *Jintendo Ijikenkyu Zasshi*, 1943, No. 589, 1. (日文, 由文獻[19]引證) (醫事研究雜誌。)
- [18] Sabin, A. B., Schlesinger, R. W., and Ginger, D. R., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1947, **65**, 183
- [19] Sabin, A. B., Ginger, D. R., Matumoto, M., and Schlesinger, R. W., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1947, **65**, 135.
- [20] Morgeg, I. M., *J. Exp. Med.*, 1947, **85**, 131.
- [21] Kabat, E. A., Wolf, A. and Bezzer, A. E., *J. Exp. Med.*, 1947, **85**, 117.
- [22] Burnet, F. M., Keogh, E. V., and Lush, D., *Australian J. Exp. Biol. and Med. Sc. (Supp)*, 1937, **15**, 231.
- [23] Koprowski, H. and Cox, H. R., *J. Immunol.*, 1946, **52**, 171.

STUDIES ON THE POTENCY OF EPIDEMIC JAPANESE B ENCEPHALITIS VACCINE

WANG, Y. T., CHIH, C. L., CHIH, C. E., LI, M. Y. and WANG, C. C.

National Vaccine and Serum Institute, Peking.

1. Experiments on mice immunized by two intraperitoneal injections with graded doses of encephalitis vaccine and challenged by the same route with a constant dose of mouse brain virus showed that the 50% immunogenic dose of the mouse brain vaccine was, in general, less than 0.01 ml.; however that of chickembryo vaccine was often larger. The defect of such potency is discussed.
2. When mice were immunized intraperitoneally by six constant doses of encephalitis vaccine and challenged intracerebrally or intraperitoneally (in the latter case, starch solution is given intracerebrally) with different dilutions of mouse brain virus, both types of vaccine gave apparent protection. The mouse brain vaccine appeared to be better than the chickembryo type. However, if the immunized mice were challenged intracerebrally with the chickembryo virus, both types of vaccine showed no protection.
3. Among 57 persons volunteered in the immunization experiments of encephalitis vaccine, 42 serum samples (73.7%) before immunization were found capable of neutralizing the epidemic Japanese B encephalitis virus. The magnitude of the neutralization indexes seemed to be related with age.
4. Of 15 cases whose serum showed no neutralization before immunization, nine (60%) turned positive after receiving two or three doses of vaccine. Result obtained was better three as compared with two injections. In order avoid the risk of allergic encephalomyelitis possibly induced by injecting nerve tissue, we suggest a vaccination method in which the mouse brain vaccine was given to induce a basic immunity and the chickembryo type used later as booster dose.
5. In parallel neutralization tests on six sera in chickembryo and in mice, the results obtained are comparable. On this basis, chickembryo may be used in place of mice in serum neutralization.