

# 關於破傷風毒素及類毒素的研究

盧 錦 漢

(中央生物製品研究所)

## 前 言

製造破傷風毒素用來高度免疫馬匹產生抗毒素或變成類毒素作為預防劑已經有數十年的歷史了。在我國目前情況下，究竟以那些產毒條件與解毒條件最為適宜於大量生產，是生物製品製造中的一個重要問題。

本文總結了作者一些試驗結果，謹提供國內同道參考。

## 材 料 和 方 法

### 1. 菌種：

- (1) Haffkine 來自印度孟買哈佛金研究院。
- (2) Coca 來自美國國立衛生實驗院。
- (3) 方 取自北京大學醫學院細菌科。

### 2. 培養基：

- (1) 1% 蛋白胰碎肉肉湯。

蛋白胰	10克
氯化鈉	5克
肉 渣	200克
肉 湯	加至 1000毫升
	pH 7.0

- (2) 0.5% 蛋白胰碎肉肉湯。

蛋白胰	5克
氯化鈉	5克

肉 渣	200克
肉 湯	加至 1000毫升
	pH 7.0

## (3) Mueller 氏半綜合性培養基 [1]

乾酪素	15克
牛心湯*	500毫升
葡萄糖	7.5克
氯化鈉	5克
鹼性磷酸鈉	0.5克
酸性磷酸鉀	0.17克
硫酸鎂	0.05克
胱氨酸	0.125克
酥氨酸	0.125克
蒸溜水	加至 1000毫升
	pH 7.0-7.2

## \*牛心湯的製備:

新鮮牛心	500克
蒸 餾 水	1000毫升

煮沸 30 分鐘,過濾,取用濾液。

## (4) 豬肚消化肉湯

## (甲) 豬肚消化液

新鮮豬肚	350克
濃鹽酸	8.8毫升
自來水	1000毫升

- ①取新鮮豬肚,除去表面脂肪和其內容物,用水沖洗乾淨,但黏液必須保留。
- ②將豬肚切成小塊,用絞肉機絞碎之。
- ③將絞碎的豬肚,裝入立瓶中,按照以上比例,加入自來水及濃鹽酸,混合均勻,放置 50—54°C, 水浴箱中 24 小時,前 6 小時,每小時攪拌一次。
- ④靜置冷室一夜,以虹吸法吸出其澄清液,棄去上層油脂及底層沉渣。
- ⑤蒸汽加熱 100°C, 30 分鐘,用粗布過濾,收集濾液備用。

## (乙) 牛肉湯

新鮮牛肉	500克
自來水	1000毫升

將新鮮牛肉，除去脂肪、皮筋等，切成小塊，以絞肉機絞碎之，按以上比例加入，搖動均勻，放置冷室一夜。翌日，取出搖勻，用五磅蒸汽加熱 45 分鐘，用布過濾，得黃色清晰肉湯。

### (丙) 培養基的製備

- ①量取豬肚消化液，每升內加入 20% 氯化鈣溶液 6 毫升，混合均勻。
- ②等量混合豬肚消化液及牛肉湯，並加溫至 100°C。
- ③用 40% 氫氧化鈉溶液矯正 pH 至 7.8—8.0。此時即有大量沉澱分出，因附着作用而除去培養基中過量的鐵的成分。
- ④用濾紙過濾，量取濾液，於每升內加入：

食鹽	2.5克
葡萄糖	7.5克

- ⑤用鹽酸矯正 pH 至 7.2—7.4
- ⑥分裝，10 磅蒸汽 20 分鐘滅菌。

### (5) 消化牛肉湯

#### (甲) 製法

新鮮牛肉	500克
自來水	1000毫升

將新鮮牛肉，除去脂肪及皮筋等，切成小塊，以絞肉機絞碎之，按照以上比例加入，大力攪拌 10 分鐘，加入濃鹽酸（每升內約加 12 毫升，使成 pH 3.0—3.5），大力攪拌 10 分鐘，加入胃蛋白消化素一克，攪拌 10 分鐘，放置 50°C。水浴箱內消化兩小時。取出，用 40% 氫氧化鈉溶液矯正 pH 至 7.8—8.0，於每升內加入：

胰素液*	50毫升
氯仿	3毫升
甲苯	30毫升

大力搖動 15 分鐘，放入 37°C。溫室內消化一星期，每兩日搖動一次使均勻。一星期後，用虹吸法取出消化液，煮沸 30 分鐘。於每升消化肉湯內加入 20% 氯化鈣溶液 6 毫升，矯正 pH 至 7.8，用紙過濾，於每升濾液內加入：

食鹽	2.5克
葡萄糖	7.5克

用鹽酸矯正 pH 至 7.0—7.2。分裝，以 10 磅蒸汽 20 分鐘滅菌。用此法製得的培養基九批，平均每毫升內含總氮量為 5.74—7.51 毫克，氨基氮量為 1.74—1.82 毫克。

\*胰素液的製備

胰 臟	100克
酒 精	100毫升
蒸餾水	300毫升

- ① 將牛或豬的新鮮胰臟除去表面脂肪及不需要的組織。
- ② 切碎，按比例混合，放置室溫三日，每日搖動數次。
- ③ 以數層紗布過濾，在濾液內加入濃鹽酸使成 0.1%。
- ④ 靜置室溫一日，用虹吸法取出澄清溶液，保存冰箱內備用。

(6) 豬肚消化牛心湯培養基

(甲) 豬肚消化液製造法

與豬肚消化肉湯中的豬肚消化液製造方法相同，但需用氯化鈣溶液沉澱去鐵三次，第一、二次用綢布代替濾紙過濾，第三次用濾紙反覆過濾幾次，即成透明的液體。

(乙) 牛心湯製造法

絞碎的牛心	450克
蒸餾水	1000毫升

按照成份混合，放置冷室一夜，次日取出，先加熱至 45° C. 30 分鐘，再煮沸一小時，濾出清液，矯正 pH 至 7.6，用氯化鈣溶液沉澱去鐵三次。去鐵方法如次：

(a) 第一次於每 100 毫升濾液中加入

鹼性磷酸鈉	0.25克
酸性磷酸鉀	0.085克
氯化鈣溶液(25%)	5毫升

(b) 第二次於每 100 毫升濾液中，加 10% 氯化鈣溶液 0.3 毫升。

(c) 第三次於每 100 毫升濾液中，加 10% 氯化鈣溶液 0.2 毫升。

(d) 每次去鐵，必須先矯正 pH 至 7.6—8.0，然後加溫，過濾。

### (丙) 培養基的製備

① 豬肚消化液 1份

② 牛心湯 1份

③ 將以上兩種液體按照成份混合後，進行下列處理：

(a) 矯正 pH 至 7.4

(b) 加葡萄糖 0.75% 克

(c) 每升培養基內加入菸草酸 0.2 毫克。

(d) 分裝，高壓滅菌 12 磅 30 分鐘。

### 3. 毒素製備

破傷風毒素培養基，在接種前應先加熱 100 °C，30 分鐘，以排去溶解的空氣。加熱後放於室溫，待溫度下降至 60 °C 左右，以無菌操作合併培養基，使滿至瓶頸，以減少培養基與空氣接觸的面積。待培養基溫度下降至 45 °C 左右，將在相同培養基中預先培養過 24 小時的菌種接種入瓶內，置於 36 °C 溫室中 7—9 日。取出作革蘭氏染色檢查，如無雜菌，即進行過濾。

毒素過濾時先通過滅菌的紙漿或濾紙，再用塞氏機作除菌過濾。濾後，即時取出一部毒素作毒力測定，其餘保存於冰箱內。

### 4. 測定毒力的方法

用緩衝鹽水將毒素稀釋成不同稀釋度，每一稀釋度皮下注射動物 2—4 隻，注射量小鼠(體重 20—22 克) 0.5 毫升，豚鼠(體重 350—380 克)及家兔(體重 1,500—1,700 克)各一毫升。動物注射後，觀察七日，對三種動物的最小致死量都是取其 96 小時內死亡者。計算每毫升毒素所含最小致死量時，豚鼠及家兔取毒素之稀釋倍數即得，小鼠最小致死量是以其稀釋倍數乘 2 求得。

### 5. 解毒方法

毒素經除菌過濾後，以無菌方法加入 0.3—0.4% 甲醛水，充分搖勻，置於 37 °C 溫室中，以後每隔 3—5 日取出樣品作毒力測定，直至解毒試驗合格後，才從溫室中取出，保存於冰箱內。

### 6. 解毒試驗

將類毒素由皮下注射於體重 330—380 克的健康豚鼠四隻及 18—22 克的健康小鼠四隻。每隻豚鼠注射 5 毫升，小鼠 0.5 毫升。觀察三星期。若所有試驗動物均健康生存且無破傷風症狀者，解毒試驗即為合格。

## 試驗結果

### 1, 毒素的產生條件

(1) 菌種：破傷風菌種產生毒素的能力，各菌株間互有差別，有的菌株產毒很強，有的菌株產毒很弱，甚至有完全不產毒者；同時產毒菌株對培養基是有選擇性的，如某種培養基雖適合某些菌株產毒，但是對於其他菌株並非一定適合的。我們曾經試驗幾個菌株在幾種不同培養基內產毒情況，結果找出：蛋白胰碎肉肉湯及豬肚消化肉湯雖適合“方”菌株產毒，但是“Coca”及“Haffkine”菌株在該培養基內產毒較弱；相反，Mueller 氏培養基適合“Coca”及“Haffkine”菌株產毒而不適合“方”菌株產毒，四次試驗結果，大致相同(見表 1)。

表 1 破傷風菌株在各種培養基內產毒情況

菌 株	培養基 毒 力		
	豬 肚 消 化 肉 湯	0.5%蛋白胰碎肉肉湯	Mueller 氏基
	每毫升之最小致死量	每毫升之最小致死量	每毫升之最小致死量
Coca	100,000—140,000	20,000—40,000	180,000—200,000
Haffkine	280,000—350,000	60,000—100,000	140,000—180,000
方	200,000—240,000	180,000—200,000	40,000—80,000

根據試驗的結果，我們認為選擇菌株時，應在具體培養基內經過多次產毒比較試驗後，取其產毒最高者，才應用於大量生產較為恰當，如更換培養基時，菌種的使用，也應加考慮。

(2) 培養基：破傷風產毒培養基，一般多採用蛋白胰肉湯，產毒強弱與蛋白胰種類有密切的關係，有的蛋白胰甚至完全不適合於產毒之用，相同種類蛋白胰每批產毒亦不一致。蛋白胰的用量在 0.5—1.0% 之間時，所產毒量並無區別。蛋白胰肉湯內加入碎肉，產毒較高，若不加碎肉，則毒力下降。用各種消化培養基來生產破傷風毒素的研究，曾經屢次報告<sup>[2,3,4,5]</sup>。本文作者曾用胃素及胰素消化肉湯，豬肚消化肉湯及豬肚消化牛心湯培養基等三種培養基作多次試驗。其中以豬肚消化牛心湯培養基產毒最強，所產毒素每毫升約含 500,000 個小鼠最小致死量；其次是豬肚消化肉湯，所產毒素每毫升約含 200,000—400,000 個小鼠最小致死量，僅次於豬肚消化牛心湯培養基，且各批產毒穩定。胃素及胰酶消化肉湯

產生的毒素每毫升約含 120,000—160,000 個小鼠最小致死量(見表 2)。

表 2 破傷風“Haffkine”菌株在各種培養基內的產毒情況

批號	培養基			
	豬肚消化中心湯基	豬肚消化肉湯	消化肉湯	0.5%蛋白胨碎肉肉湯
毒力	每毫升的最小致死量	每毫升的最小致死量	每毫升的最小致死量	每毫升的最小致死量
試 1	520,000	320,000	120,000	200,000
試 2	420,000	400,000	160,000	180,000
試 3	480,000	350,000	120,000	220,000

(3) 產毒過程的觀察：製造破傷風毒素所需的培育時間，雖因所用培養基或菌株的不同而有區別，但是一般多採用 7—14 日。我們曾試驗“Haffkine”菌株於豬肚消化肉湯內，孵育 36°C 的產毒過程，多次試驗結果證明：24 小時後毒素則已出現，1—3 日產毒較慢，4—8 日毒力迅速高升，8 日以後毒力開始下降(見圖 1)。因此，我們認為用“Haffkine”菌株在豬肚消化肉湯內產毒時，在 36°C 孵育 6—8 日後取出過濾，最為合宜。奧原廣治氏<sup>[6]</sup>認為破傷風桿菌在酸性肉水內的產毒情況可以觀察其產氣現象來決定，培養開始後 13—24 小時，細菌發育達於高點，此時並有大量氣體產生，此後產氣逐漸減弱。以至於完全停止，於產氣停止後，毒素迅速增加，至 48—72 小時達到最高點，以後逐漸減弱。但是陳立予氏等<sup>[7]</sup>研究的結果中未能證明產氣現象與毒素的產生有關。我們試驗的結果也未能發現產氣與產毒間的規律。

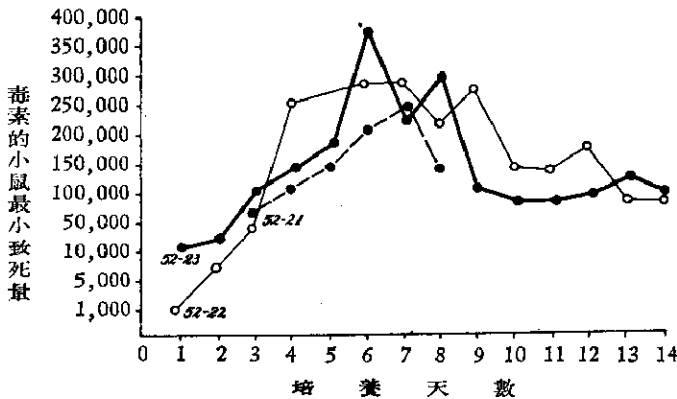


圖1 “Haffkine”菌株於豬肚消化肉湯內，孵育 36°C 的產毒過程

## 2. 毒素的生物學性狀

(1) 不同菌種與不同方法所產生的毒素——本試驗中用乾燥毒素三批,係用不同菌種在不同的培養基內所產生,每批曾用小鼠、豚鼠及家兔三種動物測定其毒力兩次,兩次所得結果很為接近。三種動物最小致死量的比率,因毒素不同而有很大的差別(見表3)。

表3 不同菌種與不同方法所製得的毒素對各種動物的最小致死量

毒 菌		小 鼠		豚 鼠		家 兔		最小致死量的比率	
批號	菌 株	體重	每毫升的致死量	體重	每毫升的致死量	體重	每毫升的致死量	豚鼠/小鼠	家兔/小鼠
50-21	北 京	21克	80,000	350克	22,000	1600克	80	0.275	0.001
		21克	30,000	370克	9,000	1500克	30	0.300	0.001
昆明	Coca	21克	70,000	380克	10,000	1500克	<40	0.143	<0.0006
		21克	20,000	350克	2,800	1700克	<5	0.140	<0.0003
丹麥	Copenha- gen	21克	200,000	350克	50,000	1550克	<40	0.250	<0.0002
		21克	150,000	350克	38,000	1700克	5	0.253	0.00003

(2) 相同菌種在不同培養基內所產生的毒素——破傷風 “Haffkine” 菌株於三種不同的培養基內所產生的毒素,其對各種動物的毒力的比率無顯著的差別(見表4)。

表4 “Haffkine” 菌株在不同培養基內所產生的毒素對各種動物的最小致死量

培 養 基	小 鼠		豚 鼠		家 兔		最小致死量的比率	
	體重	每毫升的致死量	體重	每毫升的致死量	體重	每毫升的致死量	豚鼠/小鼠	家兔/小鼠
豬肚消化肉湯	21克	110,000	350克	24,000	1500克	1	0.218	0.00001
Mueller 氏基	21克	30,000	350克	6,000	1500克	0.25	0.200	0.000083
蛋白豚煮肉肉湯	21克	120,000	350克	30,000	1500克	2	0.250	0.000016

(3) 不同菌種在相同培養基內所產生的毒素——三株破傷風菌種於豬肚消化肉湯內所產生的毒素,對各種動物之最小致死量之比率不同,其中尤以家兔與小鼠的最小致死量比率間的差別更為顯著(見表5)。



表 5 不同菌種在豬肚消化肉湯內所產生的毒素對各種動物的最小致死量

菌 種	小 鼠		豚 鼠		家 兔		最小致死量的比率	
	體重	每毫升的致死量	體重	每毫升的致死量	體重	每毫升的致死量	豚鼠/小鼠	家兔/小鼠
北 京	21克	240,000	350克	74,000	1480克	220	0.308	0.00092
Haffkine	21克	350,000	350克	100,000	1500克	20	0.285	0.000057
Coca	21克	170,000	350克	26,000	1490克	4	0.152	0.000023

### 3. 毒素的解毒問題

#### (甲) 0.3% 甲醛水對毒素的解毒過程

毒素經除菌過濾後，矯正 pH 至 7.2，取出樣品作毒力測定後，加入甲醛水 0.3%，用力搖勻，放置於 36° C. 溫室內解毒，以後每隔 3—5 日取出樣品 5 毫升作小鼠毒力測定。若每毫升內所含毒力低於 10 個小鼠最小致死量時，下次除照常測定對小鼠的毒力外，同時以不稀釋的減毒毒素皮下注射 5 毫升於體重 350—380 克的健康豚鼠兩隻，皮下注射 0.5 毫升於體重 18—20 克的健康小鼠四隻。觀察三星期，如所有試驗動物均健康生存且無破傷風症狀時，證明解毒成功。

本試驗共用毒素三批，每毫升內含 120,000—160,000 個小鼠最小致死量，加入 0.3% 甲醛水 (0.096% 甲醛)，於 36° C 孵育五日後，毒力被解除約佔 99.98%。但是以後解毒進行很慢，賸餘的微量毒素，直至 15 日後對小鼠的毒力方完全解除；直至 20 日為止，以 5 毫升注射豚鼠皮下仍能殺死豚鼠。孵育 25 日後，對豚鼠的毒力才完全解除 (見表 6)。

#### (乙) 0.3% 甲醛水在不同 pH 對毒素的解毒過程取

毒素三升 (每升內含 120,000 個小鼠最小致死量)，等量分裝於三個滅菌小立瓶內，每瓶一升，加入 0.3% 甲醛水。矯正 pH，第一瓶用 10% HCl 溶液矯正 pH 至 6.8；第二瓶不矯正，pH 7.3；第三瓶用 4% NaOH 溶液矯正 pH 至 7.8。三瓶毒素同時放入 36° C. 溫室內解毒。每隔五日，取出樣品如以上方法作毒力測定。結果毒素在 pH 6.8、7.3 或 7.8 時，解毒進行無區別。

#### (丙) 不同甲醛水濃度對毒素的解毒速率

毒素分裝於三個滅菌小立瓶內，每瓶一升。矯正 pH 至 7.2。第一瓶加入甲醛水 0.3% (0.096% 甲醛)；第二瓶 0.35% (0.112% 甲醛)；第三瓶 0.4% (0.128%

表6 0.3% 甲醛水對破傷風毒素的解毒過程

批 號 解 毒 日 數	50-27		50-29		50-30	
	小鼠反應 (每毫升的致死量)	豚鼠反應 (每毫升的致死量)	小鼠反應 (每毫升的致死量)	豚鼠反應 (每毫升的致死量)	小鼠反應 (每毫升的致死量)	豚鼠反應 (每毫升的致死量)
0	160,000	—	140,000	—	120,000	—
5	<1,000	—	5	—	5	—
10	5	—	2	—	2	—
15	無反應	—	無反應	注射後 8日死亡	無反應	注射後 6日死亡
20	無反應	注射後 19日死亡	無反應	注射後 19日死亡	無反應	注射後 11日死亡
25	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應

附註：(i) — = 未作試驗。

(ii) 死亡的豚鼠都有顯著的破傷風症狀。

甲醛)。搖勻後，同時放入 36 °C. 溫室內解毒。以後每隔 3—5 日取出樣品如上述法作毒力測定。

在三種不同甲醛濃度中破傷風毒素對小鼠的毒力，均於三日內迅速下降。以後解毒進行均趨和緩，其速度大致上與甲醛濃度成正比。若用豚鼠作試驗，則用 0.4% 甲醛水 (0.128% 甲醛)，可於 15 日完全解毒；用 0.35% 甲醛水 (0.112% 甲醛)，須 20 日；用 0.3% 甲醛水 (0.096% 甲醛)，須 25 日才能完全解毒 (見表 7)。

本試驗又證實以前所得結果，即在毒素變成類毒素的過程中，當絕大部分毒力解除而僅剩餘微弱毒力時，雖在小鼠身上不引起任何反應，但仍能使豚鼠中毒死亡。因此，我們認為破傷風類毒素的解毒試驗採用豚鼠法較小鼠法為穩當。

(丁) 0.3% 甲醛水對芽胞的殺滅能力：破傷風 "Haffkine" 菌株接種於豬肚消化肉湯內，於 36° C. 培育 8 日後，已有大量芽胞形成。以無菌操作傾注毒素培養液一升於滅菌小立瓶內，加入甲醛水 0.3%，緊塞瓶口，搖勻，放置 36° C. 溫室內。以後每隔五日，取出 40 毫升，用高速沉澱使菌體沉澱，傾去上清液，以無菌操作用鹽水洗滌菌體沉澱三次，除去游離甲醛，最後將所得菌體沉澱稀釋於八毫升肉水內，製成懸液，分別接種半固體，碎肉肉湯，硫乙醇酸鈉肉湯及瓊脂斜面各兩管，每管接種 0.5 毫升，培育於 36° C. 溫室內，一星期後，觀察有無細菌生長，並作細菌鑑別。若無菌生長，即以該菌體懸液三毫升，加入 10% 氯化鈣溶液

表7 不同甲醛水濃度對毒素的解毒過程

解毒日數	0.096%		0.112%		0.128%	
	小鼠反應 (每毫升的致死量)	豚鼠反應 (每毫升的致死量)	小鼠反應 (每毫升的致死量)	豚鼠反應 (每毫升的致死量)	小鼠反應 (每毫升的致死量)	豚鼠反應 (每毫升的致死量)
0	140,000	——	140,000	——	140,000	——
3	32	——	32	——	8	——
5	16	——	8	——	2	——
10	1	——	無反應	注射後 10日死亡	無反應	注射後 10日死亡
15	無反應	注射後 12日死亡	無反應	注射後 18日死亡	無反應	無反應
20	無反應	注射後 19日死亡	無反應	無反應	無反應	無反應
25	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應	無反應

0.3 毫升，注射於體重 350—380 克的健康豚鼠兩隻皮下，每隻一毫升。觀察動物三星期。

本試驗共用毒素培養液五批，於 35° C. 培育 10 日後，其中四批已無菌生長，其餘一批，15 日內破傷風芽胞亦被殺滅，動物注射後，除局部因氯化鈣而有潰爛外，並無破傷風症狀發生。

## 討 論

爲了加強祖國的國防建設及保障勞動人民的健康，破傷風類毒素及抗毒素的大量供應是很重要的。我國現時以那一個菌種，那一種培養基產毒最適宜於大量生產是值得研究的。根據初步試驗的結果，我們認爲菌種對培養基是有選擇性的，也就是說培養基對各菌株是有其適應性的，如“方”種在蛋白胨碎肉肉湯內產毒很好，但是在 Mueller 氏培養基內產毒就較差了；“Haffkine” 菌株在豬肚消化肉湯內產毒很高，但是在蛋白胨碎肉肉湯內產毒較低；“Coca” 菌株在 Mueller 氏培養基內產毒強，但是在蛋白胨碎肉肉湯內產毒很弱。換句話說，蛋白胨碎肉肉湯適合“方” 菌株產毒而不適合“Coca” 菌株產毒；相反，Mueller 氏培養基適合於“Coca” 菌株產毒而不適合於“方” 菌株產毒。以上結果說明了產毒條件是決定於菌種、培

養基及培育情況三方面，而且這三方面的因素是相互關聯的，相互制約的，如果孤立地去研究任何一方面，都不能解決產毒的問題。

“Haffkine” 菌株在豬肚消化肉湯內，於  $36^{\circ}\text{C}$  培育 6—8 日產毒很高，各批所得結果也很穩定。但是在該菌株的同一培養中常可分離得光滑型與粗糙型的菌落；光滑型生長於肉湯內成均勻混濁狀，粗糙型者成絮狀沉澱生長，關於菌落的形態與產毒的關係正在研究中。

豬肚消化肉湯所用原料我國各地均可獲得，完全不用舶來品，成本低廉。製造方法簡單，產毒高而且穩定。製成類毒素抗原性好，在我國目前尚未大量生產蛋白朊之前，這種培養基是值得推廣的。豬肚消化牛心湯培養基產毒很強，在易於獲得牛心的地區是值得採用的。

本文產毒比較試驗僅限於菌種與培養基的關係，對於培育條件，未作試驗，各菌株在各種培養基內產毒情況，可能因培育條件不同而變化，尚待繼續研究。

“Haffkine” 菌株在豬肚消化肉湯內，於  $36^{\circ}\text{C}$ ，孵育 24 小時後，毒素開始出現；1—3 日產毒較慢，4—8 日毒力迅速高升，8 日之後；開始下降，且下降速度與日俱增。因此，收穫毒素應在培育之第 6—8 日最為合適。據奧原廣治氏等報告破傷風桿菌在酸性肉湯內，48—72 小時產毒達到最高峯，以後毒力開始下降，與本文中所報告的過程不同，這可能是由於菌種、培養基及培育條件不同之故，需要繼續研究。

菌種、培養基及培育條件的不同，不但影響產毒之強弱及產毒過程的快慢，且可能影響及所產毒素的生物學性狀。此點由本報告中所述各種不同菌種所產毒素對各種動物的毒力差異上可以窺知。但毒力的差異還不過是生物學性狀差異的一種表現。Ipsen 氏等<sup>[8,9,10]</sup> 早已報告過不同菌株及在不同成分的培養基上所產生的毒素，與抗毒素的結合力可能有很大的區別，此點在選擇測定破傷風抗毒素單位的標準毒素時有很大的關係。此外，不同菌種及在不同培養基上所產生的毒素或類毒素，其抗原性的強弱是否亦有不同，是個很重要的實際問題，須待研究解決的。

毒素中加入 0.3—0.4% 甲醛水，於  $36^{\circ}\text{C}$  孵育 72 小時後，毒力迅速下降，但是毒力下降至某一程度時，解毒進行則趨和緩。毒素在 pH 6.8—7.8，解毒進行無區別。解毒進行的速度與所加入甲醛的濃度成正比。至於不同方法製成的毒素，可能有不同解毒過程。為了保證類毒素的安全，解毒試驗用的動物應選擇

對破傷風毒素最敏感者，根據比較試驗的結果，以豚鼠較小鼠為敏感，應予採用。

0.3% 甲醛水於 36° C 溫室內，15 日後，確能殺死全部破傷風桿菌及其芽胞。因此，我們認為在破傷風類毒素製造過程中，解毒前可以不用塞氏機或其他除菌過濾法過濾。培養液用消毒紙漿過濾後，雖然仍有極少數破傷風細菌或其芽胞存在，但是在解毒時間內，甲醛水能將全部細菌殺死，解毒成功後，再用塞氏機作除菌過濾即可。如此，不但可以減少不必要的操作；同時還可以節約物資。

## 總 結

1. 產生破傷風毒素時，菌種對培養基是有選擇性的。亦即，培養基對菌種是有其適應性的，在選擇菌種或更換培養基時應作考慮。

破傷風 "Haffkine" 菌株在豬肚消化肉湯內，於 36° C 孵育 6—8 日，產毒高而且穩定；該培養基所用原料在我國各地均易獲得，成本低，製造方法簡單，適宜於大量生產。

2. 破傷風毒素的生物學性狀，因不同菌種所產生的毒素而有差別，相同菌種在不同培養基內所產生的毒素，其生物學性狀大致相同。

3. 破傷風毒素加入 0.3—0.4% 甲醛水，於 36° C. 溫室內孵育 72 小時後，毒力迅速下降，但是毒力下降至某一程度時，解毒進行則趨和緩。毒素用 0.4% 甲醛水 15 日完全解毒，用 0.35% 甲醛水須 20 日，用 0.3% 甲醛水須 25 日才能完全解毒成功。在解毒過程中當絕大部份毒力解除而僅剩餘微弱毒力時，雖在小鼠身上不能引起任何反應，但仍能使豚鼠中毒死亡。因此破傷風類毒素的解毒試驗採用豚鼠法較小鼠法為穩當。

(4) 0.3% 甲醛水於 36° C. 溫室內，15 日後能殺死全部破傷風細菌及其芽胞。

## 參 考 文 獻

- [1] Mueller, J. H. & Miller, P. A., *J. Immunol.* 1947, **56** (2), 143-147.
- [2] Mueller, J. H. & Miller, P. A., *J. Immunol.* 1945, **50** (6), 377-384.
- [3] Mueller, J. H. & Miller, P. A., *J. Immunol.* 1943, **47** 15-22.
- [4] Taylor, E. M., *J. Immunol.* 1945, **30** (6), 385-389.
- [5] Basu, P. N. & Sen, S. N., *Ind. Jour. Med. Res.* 1941, **29** (4), 689-690.
- [6] 奧原廣治, 大連衛生研究所彙刊, 1951, **1**(3), 89—90.
- [7] 陳立予, 劉士敏, 大連衛生研究所彙刊, 1951, **1**(3), 84—88.
- [8] Ipsen, J., *Bull. Hlth. Org. L.O.N.* 1940, **9**, 452-475.
- [9] Ipsen, J., *Bull. Hlth. Org. L.O.N.* 1941, **9**, 447-451.
- [10] Miles, A. A., *Bull. World Hlth. Org.* 1949, **2**, 59-63.

## EXPERIMENTS ON THE PRODUCTION OF TETANUS TOXIN AND TOXOID

Lo C. H.

*National Vaccine and Serum Institute, Peking, China*

Experiments with three strains of *Clostridium tetani* in four types of media showed that the various strains of the microorganism produced different amount of toxin in different media. The "Haffkine" strain yielded toxin in high titre in pig stomach digest medium. The raw materials for the preparation of the latter medium are cheap and readily available in China, consequently this medium is suitable for large scale toxin production. Different preparation differs in their relative toxicity for rabbits guineapigs and mice depending particularly on the strains used and less so on the culture medium. The bearing of this difference in biological properties of different tetanus toxin preparation is discussed. The course of conversion of tetanus toxin into toxoid in relation to pH and the concentration of formalin was studied and it was concluded that guineapigs are more sensitive than mice to any toxin left in the preparation and consequently should be used in the safty test of tetanus toxoid. At 36°C, 0.3% formalin consistently killed tetanus spores in 15 days. In view of this finding whole culture after clarifying filtration may be used for the preparation of tetanus toxoid and filtration through Seitz pads is necessary only after detoxification.