

乙醚處理後流行性感胃病毒的崩裂現象

朱 既 明

(中央生物製品研究所, 北京)

Andrewes 及 Horstmann 等氏^[1]曾報告乙醚對三十五種病毒的作用, 他們將病毒分成二類: 第一類包括痘類病毒、噬菌體、口蹄病及脊髓前角灰白質炎等, 不為乙醚所損害; 另一類包括大部分其他病毒, 於乙醚處理後即部分或完全喪失其感染力, 流行性感胃病毒即屬於第二類。但這些作者對於乙醚如何損害病毒的感染力, 則未作解釋。本文作者^[2]於 1949 年發現新分離的流行性感胃病毒中有大量長條形形態存在後, 即致力研究如何能使長條形的病毒變為顆粒形。於試驗過程中發現含有大量長條形流感病毒的尿囊液於用乙醚處理後再用電子顯微鏡觀察, 即不復見到長條形態, 而僅顯示許多大小不等的顆粒。以後復經繼續研究, 發現在實驗室中久經傳代保存而呈顆粒形的流感病毒種如 PR₈ 及 Lec, 經乙醚處理後, 亦發生崩裂現象, 因此判定乙醚之作用, 不僅限於長條形的病毒, 且亦能破壞顆粒形的病毒。此項發現曾經作者與 Elford 氏共同於英國國立醫學研究院 1949 年的年報中加以報道^[3]。簡單敘述之, 即正常的流感病毒用 Elford 及 Dawson 二氏^[4]的方法使之吸着於雞的紅血球膜上, 於電子顯微鏡下, 呈完整的圓球形顆粒或不同長度的條形, 其直徑約為 100 毫微米, 但經乙醚處理後再用同法觀察則除不復見長條形者外, 僅偶有完整的圓球形顆粒, 所看到的主要成份有下列二種: 一種為凝集成塊, 形態不整的扁平盤形及腫脹棍棒形結構, 似係由破壞後的病毒外殼凝聚而成; 另一種為直徑約 20—30 毫微米大小不甚一致的小顆粒。設於乙醚處理後再經每分鐘 10,000 轉的高速沉澱 2 小時, 取上清液觀察之, 則僅可見到 20—30 毫微米的小顆粒。以上電子顯微鏡照片均由 Elford 氏收藏整理, 惜於氏逝世之前還未見發表。本文作者則於以上形態學研究的同時, 進行了血清學的研究, 其結果亦經於該年報中提及, 茲將研究結果於本文內作詳細的報告。

材料及方法

病毒種 試驗所用病毒種為 PR₈ (甲型), Lee (乙型) 及巴黎-1 (A/Paris-1/1949, 亞甲型) 三種, 其詳細歷史業經報道^[5]。

病毒材料 一般用孵育 9—11 日的雞胚, 用 1:1000 的毒種作尿囊接種, 於 35°C 培育 40—48 小時後收集其尿囊液, 有少數試驗中曾直接使用尿囊液, 但於絕大多數試驗中則先用 1% 皂精溶解後的雞紅血球膜用吸着及放出法加以純製, 將純製病毒放出在 PH 7.2 的 M/15 磷酸緩衝鹽水中, 該項純製病毒液用肉眼觀察呈輕度乳白色, 在電子顯微鏡下 PR₈ 及 Lee 株呈完整的球形顆粒, 而巴黎-1 株則呈多數之長條及棍狀形態。

乙醚處理方法 除個別另行註明之特殊試驗外, 一般於二份病毒液內, 加入一份乙醚 (麻醉用), 放置 4°C 中劇烈震搖之, 以後每半小時震搖一次, 共 1—2 小時, 取出用純淨氮氣通入吹泡使乙醚揮發淨盡, 此時見有少量絮狀沉澱物出現, 即上述在電子顯微鏡下看到的凝塊結構。此混合物稱為“乙醚處理病毒”。次用每分鐘 10,000 轉的高速沉澱 1 小時, 將凝塊及剩餘的小量病毒顆粒除去而獲得澄清的上清液稱為“高速上清液”。將高速沉澱物再懸於 M/15 磷酸緩衝鹽水中則成為不能完全搖散的混懸液稱為“高速沉澱物”。

病毒滴定 於 9—11 日雞胚尿囊腔內注射 10 倍遞續稀釋的病毒, 每個稀釋度用四個雞胚, 接種量為 0.1 毫升, 72 小時後試尿囊液中的紅血球凝集素, 用 Reed 及 Muench 法計算 50% 感染量 (ID₅₀)。

血球凝集試驗及血球凝集抑制試驗 其方法已經作者詳細敘述^[5], 但為得到更精確的結果起見, 採用 $1/10$, $1/15$, $1/20$, $1/30$, $1/40$ ……的遞續稀釋法。

補體結合試驗 本報告中所用者主要為小白鼠痊癒後的免疫血清, 但於個別試驗中亦曾採用雪貂恢復後血清。小鼠免疫血清中除含有抗病毒的抗體外, 尚含有抗溶解性抗原的抗體。而雪貂血清中則主要的為抗病毒的抗體。兩種血清的特異性均高, 因用純製甲型及亞甲型病毒作為抗原作補體結合試驗時, 僅有極微弱的交叉反應。補體結合試驗用 Fulton 及 Dumbell 二氏^[6]所創的“人造玻璃板上微量試驗法”, 以資節約試劑, 但僅用一個固定補體量, 內含 5 個單位的補體。本報告的試驗中將抗原作 $1/1$, $1/2$, $1/3$, $1/4$, $1/6$, $1/8$ ……稀釋而用固定量的血清 (1:4), 於 4°C 中放置 16—18 小時後加入敏感化羊血球, 再經放 37°C 培

育 1 小時後讀取結果。讀取結果時以大約達一半溶血的抗原稀釋度為抗原效價；若溶血超過或不及一半時，則在兩個稀釋度之間估計出抗原效價。

試驗結果

病毒經乙醚處理後所發生的變化

取純製的巴黎-1 病毒，一部分用乙醚處理，另一部分則不處理作為對照，二份皆用每分鐘 10,000 轉的速度離心沉澱 2 小時，收集其上清液及沉澱物。於試驗過程中每個步驟均保留一部分樣品，作成電子顯微鏡標本以觀察其形態，並作病毒滴定，血球凝集試驗及補體結合試驗。

本試驗所得結果見表 1，本表中所列的結果可摘要敘述如下：

表 1 乙醚處理後巴黎-1 病毒的變化

材料	肉眼外觀		電子顯微鏡觀察	50% 感染量	血球凝集效價	補體結合效價
對照病毒	純製病毒液	輕微乳白色	多數直徑約 100 毫微米的條形棍形病毒	$10^{-8.7}$	2,560	32
	高速沉澱物	輕微乳白色	多數直徑約 100 毫微米的條形棍形病毒	$10^{-8.7}$	1,920	24
	高速上清液	澄清	極少數同上形態的病毒	$10^{-7.3}$	160	3
乙醚處理的病毒	純製病毒液	混白色有絮狀沉澱	—	$>10^{-7.0}$	1,280	40
	高速沉澱物	不能完全搖散的絮狀懸液	扁平形態及腫脹棍棒形態，大部凝集成塊	$>10^{-6.0}$	240	10
	高速上清液	澄清	直徑約 20—30 毫微米大小不等的小顆粒	$>10^{-5.0}$	800	16

註：1. 電子顯微鏡觀察係將標本用錫紅血球膜吸收後所作，故所見祇代表附着於血球膜上的結構。
2. 補體結合效價係用抗原稀釋法，故所列數字代表抗原效價。

乙醚處理破壞了病毒的正常形態，其一部分變為不整形的結構，凝集成為肉眼可見的絮狀物；其另一部分變為直徑約 20—30 毫微米的小顆粒，此種顆粒，雖用每分鐘 10,000 轉的速度離心沉澱 2 小時後，仍浮懸於上清液中，且仍保有吸着於紅血球膜上的能力，故可於電子顯微鏡下觀察之。設與未經乙醚處理的對照病毒相比較：在高速沉澱以後，對照的上清液中所含的 50% 感染量，血球凝集與補體結合效價均顯著減少，估計僅達原病毒液的 10%，其餘的大部分效價則均出現於高速沉澱物中；相反地，經乙醚處理後的病毒感染力顯著降低，且經高速沉澱後，其上清液中仍保有 $1/2$ 左右的血球凝集及補體結合效價，而出現於高速沉澱物中的效價則較對照為少。

由於以上的觀察，我們可以推測到在原來的病毒液中，感染力、血球凝集素及補體結合抗原三者均與病毒的顆粒本身相結合，乙醚處理破壞了病毒的結構，減低了病毒的感染力，同時放出了較小顆粒的形態，此種小顆粒，不能為每分鐘 10,000 轉的離心力所沉澱，但仍具有血球凝集力與補體結合抗原性。為了方便起見，我們將存在於乙醚處理後高速上清液中的血球凝集素，稱謂“溶解性血球凝集素”；其中的補體結合抗原則稱謂“溶解性抗原”，以與病毒本身結合的血球凝集素及抗原相區別。

乙醚處理後所產生的溶解性血球凝集素和溶解性補體結合抗原

為了證明乙醚處理後所產生的溶解性血球凝集素和溶解性抗原是否具有特異性，我們又進行了以下的試驗。

用同法處理巴黎-1 病毒的純製液，再經高速沉澱，取其一部分上清液用相當於 5% 容量的鷄紅血球吸收二次，每次在 4°C 吸收 30 分鐘，以除去其中的血球凝集素。於第一次吸收後的紅血球中，加入等於原量的緩衝鹽水，放置 37°C 2 小時，以試驗血球凝集素是否放出。對照為純製病毒，除不用乙醚處理外，亦經過同樣手續處理。於每個步驟留取樣品，即高速上清液，吸收後的上清液，血球放出液及高速沉澱物，測定其感染力，血球凝集及補體結合效價。為了試驗血球凝集素及補體結合抗原的特異性起見，我們曾用抗巴黎-1 及抗 PR₈ 的血清來作血清學反應：血球凝集抑制試驗中所用的是雪貂的痊癒後血清；補體結合試驗中所用的是小鼠的痊癒後血清。

試驗結果見表 2 及表 3。表 2 中的結果除證實了表 1 中已觀察到的現象外，

表 2 巴黎-1 病毒經乙醚處理後所產生的溶解性血球凝集素與溶解性抗原

對照病毒	材 料	50%感染量	血球凝集效價	補體結合效價		比 例 本血清：異血清
				巴黎-1血清	PR ₈ 血清	
	純製病毒液	10 ^{-8.3}	3,840	48	1	48 : 1
	高速上清液	10 ^{-7.0}	120	3	0	
	血球吸收後的上清液	—	< 5	2	0	
	血球放出液	—	40	0	0	
	高速沉澱物	10 ^{-8.7}	1,920	24	0	
乙醚處理的病毒	高速上清液	10 ^{-4.0}	640	14	4	3.5 : 1
	血球吸收後的上清液	—	< 5	8	2	4 : 1
	血球放出液	—	320	3	0	
	高速沉澱物	10 ^{-7.0}	480	7	1	7 : 1

註：0 表示在抗原不稀釋時無反應 — 表示未作 以後表中作相同解釋

表 3 溶解性血球凝集素在凝集抑制試驗中的抗原特異性

血 清	純製病毒液	乙醚處理高速上清液	乙醚處理高速沉澱物
巴黎-1 血清	240	960	240
PR ₈ 血清	20	40	20
正常雪貂血清	20	80	40

註：本試驗中應用雪貂的痊癒後血清，表中數字代表血清的抑制效價，試驗中用八個凝集單位的抗原。

又進一步說明乙醚處理後高速上清液中的溶解性血球凝集素及溶解性抗原，可以用血球吸收的方法來分開。高速上清液用紅血球吸收後，血球凝集效價降至 $1/5$ 以下，而補體結合效價則僅稍微降低。如將吸收後的紅血球放置 37°C 中，則血球凝集素又復放出。由表 2 與表 3 中的血清學反應結果看來，放出液中的溶解性血球凝集素與本血清的反應效價均高過於異血清的反應效價，故可以看到它的抗原性是比較特異性的。相反地，溶解性抗原與本血清的補體結合效價為 $1/8$ ，與異血清的效價為 $1/2$ ，其比例為 4 : 1，若與原來未經乙醚處理的純製病毒液相比較（與本血清的效價為 $1/48$ ，與異血清的效價為 $1/1$ ，其比例為 48 : 1），則可以看到溶解性抗原的抗原性是比較非特異性的。

為了更進一步闡明以上的觀察，我們又用 PR₈ 病毒與另一批巴黎-1 病毒重複了以上的試驗，並又增加了兩個試驗步驟：其一是將處理後的乙醚層分開，於真空中蒸發至乾後，將所餘的提取物用緩衝鹽水溶化而成為微帶混濁的懸液，滴定其血球凝集及補體結合效價；其二是將不能完全搖散的高速沉澱物於低速沉澱，並用鹽水洗滌二次後又復滴定其血球凝集及補體結合效價。所得結果列表 4。

表 4 中的結果基本上證實了以前試驗中的觀察，不論用 PR₈ 或巴黎-1 病毒作為試驗材料，所得的結果是相同的。試驗結果說明原來的純製病毒液的補體結合抗原性是非常特異的，其本血清效價和異血清效價的比例 PR₈ 為 42 : 1，巴黎-1 為 16 : 1，但經乙醚處理後的高速上清液的抗原特異性顯著降低，其血清比例 PR₈ 為 2.3 : 1，巴黎-1 為 2.2 : 1。用雞紅血球吸收後，將血球凝集素完全除去，但補體結合效價則與吸收以前相差甚微，且其特異性似乎變得更低，PR₈ 為 1.2 : 1，巴黎-1 為 2 : 1。相反地，若將吸收後的血球分離置於 37°C 則幾乎全

表 4 PR₈ 及巴黎-1 病毒經乙醚處理後所產生的溶解性血球凝集素及溶解性抗原

材 料		PR ₈ 病 毒				巴 黎-1 病 毒			
		血球凝集效價	補 體 結 合 效 價			血球凝集效價	補 體 結 合 效 價		
			PR ₈ 血清	巴黎-1 血清	比 例 本血清：異血清		PR ₈ 血清	巴黎-1 血清	比 例 本血清：異血清
對 照 病 毒	純製病毒液	7,500	64	1.5	42 : 1	3,840	3	48	16 : 1
	高速上清液	160	1.5	0		80	0	1.5	
	血球吸收後的上清液	< 5	0	0		< 5	0	1	
乙 醚 處 理 病 毒	處理後的純製病毒	2,560	80	32	2.5 : 1	1,280	14	24	1.7 : 1
	乙醚提取物	—	—	—		< 10	0	0	
	高速上清液	800	32	14	2.3 : 1	800	8	18	2.2 : 1
	血球吸收後的上清液	0	14	12	1.2 : 1	0	7	14	2 : 1
	血球放出液	640	24	2	12 : 1	—	—	—	
	高速沉澱物	1,120	—	—		320	—	—	
	高速沉澱物洗滌二次	400	48	14	3.4 : 1	80	0	3	> 3 : 1

部血球凝集素又復放出，放出液的補體結合反應特異性較高，似屬介乎純病毒與吸收後的上清液之間，如 PR₈ 為 12 : 1。高速沉澱物雖經二次洗滌後，仍能凝集紅血球，且呈非特異性的補體結合反應，如 PR₈ 為 3.4 : 1。乙醚提取物中則不含有任何凝集或抗原效價。

由於以上的試驗結果，我們作出以下的初步結論：乙醚處理將病毒破壞的同時，放出了兩種較病毒顆粒為小的物質，即溶解性血球凝集素與溶解性補體結合抗原，此二者可用血球吸收法分開。溶解性血球凝集素能凝集雞的紅血球，亦具有補體結合抗原性，且仍保持血清學的特異性，故除缺乏感染力外，與病毒甚相類似。溶解性補體結合抗原沒有凝集雞紅血球的能力，且其補體結合的抗原性是屬於非特異性的，其性質似與鼠肺及雞胚絨毛尿囊膜中的溶解性抗原相類似。乙醚處理後的高速沉澱物亦具有血球凝集與補體結合性能，且經二次洗滌後，仍有較高的效價，故目前可以假定此種性能係沉澱物本身所固有，並非由於一部分上清液中的凝集素與抗原被附着所致；在抗原性方面，沉澱物在血球抑制試驗中仍保有特異性（表 3），但在補體結合試驗中則顯得是非特異性的，於此我們可以推論在沉澱物中，兩種抗原均混合存在。

溶解性血球凝集素與溶解性抗原的物理學與生物學性能

1. 沉澱試驗與濾過試驗

爲了測定乙醚處理後高速上清液中的溶解性血球凝集素與溶解性抗原在顆粒大小方面是否有所區別，我們作了以下的試驗。

取前述試驗中用乙醚處理後的 PR₈ 病毒的高速上清液，用 Schlesinger 氏的方法^[7]，於三個沉澱管底墊好一層濾紙，上置欲分析的液體至一厘米的高度，然後置於 Ecco 離心器中，用每分鐘 10,000 轉的速度離心沉澱，於一、二、三小時後各取出一管吸取其上清液，測定其血球凝集效價及補體結合效價（表 5）。

表 5 溶解性血球凝集素及溶解性抗原的離心試驗

	PR ₈ 病 毒			巴黎-1 病 毒		
	血球凝集效價	補體結合效價		血球凝集效價	補體結合效價	
		PR ₈ 血清	巴黎-1血清		PR ₈ 血清	巴黎-1血清
高速上清液	800	32	14	800	8	18
Schlesinger 法離心 1 小時	160	12	5	320	4	7
Schlesinger 法離心 2 小時	100	6	2	200	2	4
Schlesinger 法離心 3 小時	80	3	1	120	1.5	3

由表 5 所列結果，可以看到在離心過程中，血球凝集及補體結合效價均逐漸下降，且二者下降的程度大致上平行。此外，似乎有一些證據可以說明溶解性血球凝集素的大小非十分均勻的，此點亦可能係由於高速上清液中尚有少量病毒顆粒混雜在內之故。總的說來，由於滴定技術的準確性不夠，以上的離心試驗在定量意義上是不夠的，但已足以說明溶解性血球凝集素與溶解性抗原的顆粒大小大致相近，且均較流感病毒爲小。

在濾過試驗中，用乙醚處理後的巴黎-1 高速上清液與等量 pH 7.6 的 Hartley 氏肉湯混合分成數部分，通過平均濾孔直徑爲 660、300、150 及 95 毫微米的超濾膠膜，收集濾液並測定其血球凝集及補體結合效價。爲了對照起見，取純製的巴黎-1 病毒液用同法濾過濾孔 150 毫微米的膠膜，並測定其血球凝集及補體結合效價（表 6）。

表 6 溶解性血球凝集素及溶解性抗原的超濾試驗（巴黎-1 病毒）

	對 照 病 毒			乙 醚 處 理 病 毒*		
	血球凝集效價	補體結合效價		血球凝集效價	補體結合效價	
		PR ₈ 血清	巴黎-1 血清		PR ₈ 血清	巴黎-1 血清
純製病毒液	10,240	2	64	2,560	24	48
660 毫微米濾液	—	—	—	1,600	8	32
300 毫微米濾液	—	—	—	320	12	24
150 毫微米濾液	0	0	0	32	2	8
95 毫微米濾液	—	—	—	0	0	0

* 用作過濾之原始材料為乙醚處理後之高速上清液

由表 6 的結果，可以看到血球凝集效價極高的純製巴黎-1 病毒於濾過 150 毫微米的膠膜後即不復呈現任何血球凝集或補體結合的性能。而用乙醚處理後的巴黎-1 病毒的高速上清液則於濾過 150 毫微米的膠膜後仍有 $1/32$ 的血球凝集效價與 $1/8$ 的補體結合效價。於濾過 95 毫微米的膠膜後，則濾液中不復有血球凝集與補體結合性能。由此依照 Elford 氏的計算法^[8] 以濾粒直徑為濾孔直徑之 $1/2$ 計算，則溶解性血球凝集素及溶解抗原之直徑應在 50—75 毫微米之間。但由於血球凝集與補體結合試驗的靈敏度遠較病毒滴定為差，故實際的濾粒直徑當較求得的數值為低，大致上可與電子顯微鏡下所測得溶解性血球凝集素的直徑數值（20—30 毫微米）相符合。由本試驗中通過 660、300 及 150 毫微米膠膜的濾液血球凝集素與補體結合抗原效價降落的比例看來，似乎補體結合抗原的顆粒較之血球凝集素略小，但此點尚難予以肯定。

2. 溫度對溶解性血球凝集素的影響

流感病毒於加溫至 56°C 15 分鐘或半小時後，凝集紅血球的效價僅稍微減低，但一般地喪失了由血球放出的能力^[9]；如加溫至 60°C—62°C 左右時（具體溫度因毒種、病毒濃度、懸液種類而略有不同），則可將血球凝集力完全破壞^[10]。於以下的加溫試驗中，我們將凝集效價相等的純製 PR₈ 病毒與乙醚處理後所產生的 PR₈ 溶解性血球凝集素放入 52°C，54°C，56°C，58°C 及 60°C 的水箱中加溫 15 分鐘，再測定其血球凝集素。由表 7 的結果，可以看到溶解性血球凝集素比較容易為溫度所破壞；如加溫至 54°C 或 56°C 後，凝集效價顯著降低，於加溫至 58°C 後則不復能凝集血球；而純製的 PR₈ 病毒則僅於加溫至 60°C 後始失去

凝集血球的能力。

表 7 溫度對溶解性血球凝集素的作用

材料	不加溫	52°C	54°C	56°C	58°C	60°C
純製 PR ₈ 病毒	2,560	1,230	960	960	240	< 5
乙醚處理後的 PR ₈ 溶解性血球凝集素	2,560	960	240	50	< 5	< 5

註： 加溫時間為 15 分鐘

3. 溶解性血球凝集素的吸收及放出作用

流感病毒於接觸紅血球後，即被吸着於血球的表面，經過一個時間後又由血球表面放出。在 4°C 的溫度中，結合力較強，故放出作用進行甚緩；在 37°C 時則吸着與放出作用幾乎同時進行。設將流感病毒與血球混合後，於 4°C 放置 1 小時，再將血球分離，測定其上清液中的凝集效價時，則發現由於大部病毒為血球所吸收而效價顯著降低。如於分離之血球中加入等量鹽水而移置 37°C 中，則病毒逐漸由血球表面放出，而上清液中的血球凝集價又復上升，病毒放盡後則血球不復凝集。此種吸着與放出作用為病毒血球凝集現象的特徵。在前述的試驗中已經證明乙醚處理後所產生的血球凝集素仍保有類似的吸着與放出作用，並可利用此種作用將血球凝集素與溶解性抗原分開。但用溶解性血球凝集素在室溫中作凝集試驗時，我們屢次發現其效價終點比較容易變動，如將試管於室溫中放置逾 6 小時以上，再觀察之，則凝集現象已全部消失。由此我們推測溶解性血球凝集素由血球放出較之病毒為快。本試驗中取血凝效價相等（均為 1 : 2560）的純製 PR₈ 病毒及 PR₈ 溶解性血球凝集素，各加入相當於容積 2.5% 的雞紅血球，放置於 2°C 中，於不同時間取樣離心分離血球後測定上清液剩餘的凝集效價（圖 1 甲）。又將 2°C 放置 1 小時後已飽和吸着的紅血球離心分離，加入原量的鹽水，放置 37°C 中，於不同時間取樣離心分離血球後測定上清液中放出的凝集效價（圖 1 乙）。

由圖 1 甲及圖 1 乙所示吸收與放出曲線，可知在 2°C 時，純製流感病毒逐漸與紅血球結合，至 4 小時後仍無放出；而溶解性血球凝集素則於 1 小時後開始由血球放出，但速度甚慢。放入 37°C 後，二者均迅速由血球表面放出，但溶解性血球凝集素放出得更快且更完全。由此證明溶解性凝集素與血球的結合較病毒為弱，而遊離力則較病毒為強。在別的試驗中，我們曾將病毒及溶解性血球凝集

圖 1 甲

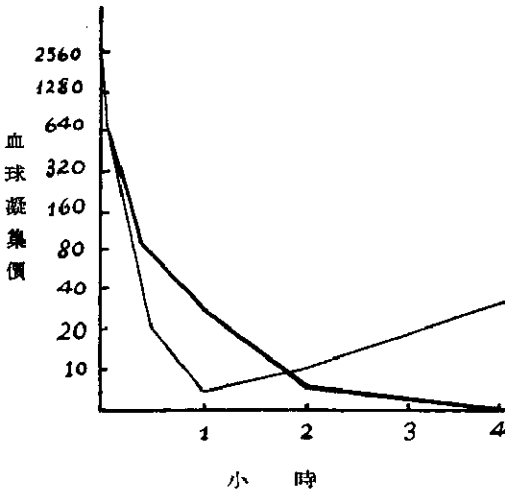


圖 1 乙

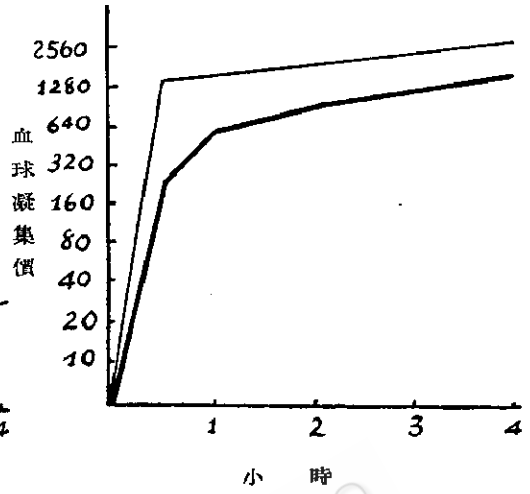


圖 1 甲 純製 PR₈ 病毒與溶解性血球凝集素在 0°C 吸收後上清液中血球凝集效價下降情況。

乙 純製 PR₈ 病毒與溶解性血球凝集素在 37°C 中上清液中血球凝集效價放出情況。

圖中粗線為純製 PR₈ 病毒，細線為溶解性血球凝集素。

素加溫至 52°C 及 54°C 15 分鐘，再進行類似的試驗，證明二者均仍為血球所吸收，但在 37°C 中純製病毒僅放出 6% 左右，而溶解性血球凝集素則可放出 25% 左右。由此說明病毒加溫後放出力大為減弱，而溶解性血球凝集素則雖於加溫後仍保持一定的放出力。以上的分別可能係由於溶解性血球凝集素的顆粒較病毒為小，因而其運動能力較大的緣故。

4. 溶解性血球凝集素對血球受體的作用

Hirst 氏^[11]於發現流感病毒的血球凝集現象不久之後，便發現病毒自血球放出後仍能凝集新的血球，而放出病毒後的血球則不復為新的病毒所凝集，因而創立受體學說，認為流感病毒具有酶的作用，先與血球表面的受體結合，後又於破壞受體後自血球表面放出，血球因受體破壞故不能再與新的病毒結合。Burnet 等氏^[12]發現霍亂弧菌之濾液中含有能破壞血球受體的酶，因而用霍亂濾液處理後的血球不復能為流感病毒所凝集。為了證明溶解性血球凝集素的血球受體是否與病毒受體相同，我們進行了以下的試驗。

於純製 PR₈ 病毒，PR₈ 溶解性血球凝集素及霍亂濾液中，各加入相當於容

積 2.5% 的鷄紅血球，置 37°C 水箱中 4 小時，不時震盪之，4 小時後病毒已完全放出故血球不復凝集，乃取出離心分離之，並用鹽水洗滌一次，稀釋成 0.5% 的懸液；同時用鹽水同樣處理血球一份作為對照。以此四種血球懸液與含 32 凝集素單位的純製 PR₈ 病毒及溶解性血球凝集素作凝集試驗。結果見表 8。

表 8 溶解性血球凝集素對血球受體的作用

鷄紅血球先用下列材料 於 37°C 處理 4 小時	用下列材料作血球凝集試驗		
	PR ₈ 純製病毒	PR ₈ 溶解性血球凝集素	鹽水
純製 PR ₈ 病毒 1/4	—	—	—
PR ₈ 溶解性血球凝集素	—	—	—
霍亂濾液 1/10	—	—	—
鹽水	++	++	—

本試驗結果說明純製 PR₈ 病毒與 PR₈ 溶解性血球凝集素能互相破壞血球受體，且二者的受體均為霍亂濾液所破壞，由此可判定溶解性血球凝集素的血球受體和病毒的血球受體是相同的。

溶解性血球凝集素與溶解性抗原的免疫學性能

流感病毒中 PR₈ 代表典型的甲型病毒，而巴黎-1 則為亞甲型。二者的溶解性抗原相同，故又稱為非特異性抗原，而病毒本身的抗原性則各具特異性。乙醚處理後的病毒的非特異性增加，其中血球凝集素仍有較高的特異性，而溶解性抗原則幾乎完全為非特異性的。溶解性抗原和本血清與異血清的補體結合效價雖相差不多，但在與異血清的反應中常常可觀察到不完全結合的情形，茲舉例說明如下：

抗 原	血清(小白鼠)	抗 原 稀 釋 度				
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16
乙醚處理後的 PR ₈ 溶解性抗原	抗 PR ₈ , 1/2	++++	++++	+++	+	—
乙醚處理後的 PR ₈ 溶解性抗原	抗巴黎-1 1/4	++	+++	++	+	—

故以上的抗原與本血清與異血清的反應效價雖同，而在補體結合的完全程度上則似有所差別，為了瞭解此種現象的本質，作者應用了 Fulton 及 Dumbell 二氏^[6]所創的微量定量補體結合法，其原則為於不同抗原稀釋度的同時，兼用不同

量的補體，如此則可測定每個稀釋度中結合補體的量，關於操作的詳細方法，可參考 Fulton 及 Dumbell 二氏的原文。圖 2 所示的試驗中比較了三種 PR₈ 抗原與本血清及異血清補體結合試驗的結果：（甲）用純製 PR₈ 病毒為抗原，其血球凝集效價為 1:6,400。（乙）用乙醚處理後 PR₈ 病毒的高速上清液，再用血球吸收與放出而獲得的溶解性血球凝集素，其血球凝集效價亦為 1:6,400。（丙）用以上血球吸收後的上清液，不凝集血球。所用血清為小白鼠痊癒後的血

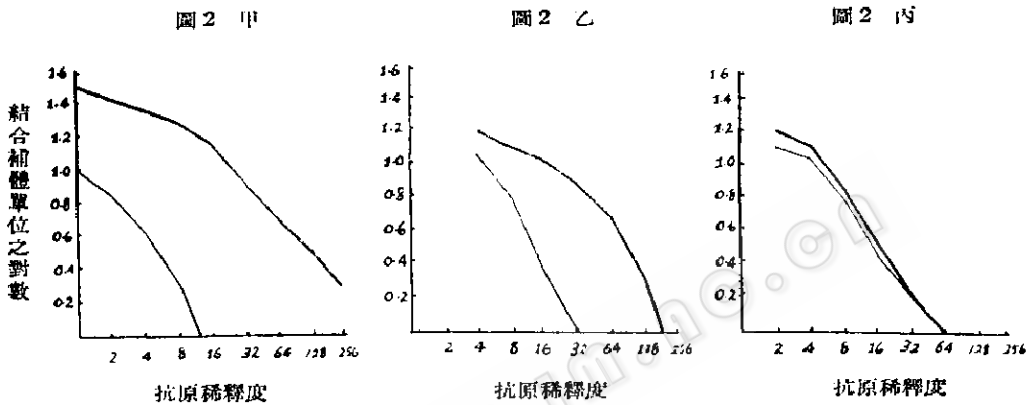


圖 2 三種 PR₈ 抗原與抗 PR₈ 血清及抗巴黎-1 血清間的補體結合反應

- 甲 純製 PR₈ 病毒
乙 PR₈ 溶解性血球凝集素
丙 PR₈ 溶解性抗原

圖中粗線為抗 PR₈ 血清，細線為抗巴黎-1 血清。

清，稀釋 $\frac{1}{2}$ 使含過量的抗體。試驗結果如圖所示，直軸代表結合補體單位的對數，如結合 10 個補體單位，則應為 1.0。橫軸代表抗原稀釋度。由此可知原來的純製病毒與本血清及異血清的結合上，不但效價不同，且每個稀釋度所結合的補體量亦有很大的差別，換言之，其抗原特異性非常顯著（圖 2 甲）。溶解性血球凝集素與本血清及異血清的結合效價雖然不同，但在低稀釋度時所結合的補體量則相近（圖 2 乙）。溶解性抗原與本血清及異血清的結合效價相同，但在每個稀釋度所結合的補體量則本血清略高於異血清（圖 2 丙）。Fulton 及 Dumbell 二氏^[6]認為效價表示抗體量的差別，而結合的補體量則表示抗體質的差別。小白鼠於流感痊癒後的血清中有兩種抗體，其一是針對病毒抗原的，具有特異性，另一個是針對溶解性抗原的，不具有特異性。據此我們似可假定在純製病毒的反應中（圖 2 甲），本血清與異血清中起作用的是針對病毒的抗體，故不論在質與量上

均有很大的差別；在與溶解性抗原的反應中（圖 2 丙），本血清與異血清中起作用的是針對溶解性抗原的抗體，在量上相同，而在與抗原結合的完全程度上則仍有所差別。在與溶解性血球凝集素的反應中（圖 2 乙），則可能二種抗體均參加作用，因此在反應的特異程度上介於二者之間。以上假定是否正確，須待較大量製備純淨的三種抗原，用來自動免疫動物後取其血清作詳細的研究方能證明。

Cetyl trimethyl ammonium bromide 對流感病毒的作用

乙醚對流感病毒的崩裂作用，可能係由於溶媒作用而破壞病毒的外表組織所致。爲了進一步瞭解此種作用的性質，我們試驗了一種能減低表面張力的藥劑（Cetyl trimethyl ammonium bromide, C. T. A. B.），對流感病毒的作用。

於純製的巴黎-1 病毒 10 毫升中，加入 0.10% C. T. A. B. 1 毫升，使最終濃度爲 0.01%，於室溫中放置 3 小時，並不時震盪之，即出現了絮狀凝塊。於 4°C 中用鹽水透析 4 日以除去多餘的 C. T. A. B.，加鹽水至原量，然後取一半透析液用超音波處理 1 分鐘，將經處理及未經處理的透析液用高速（每分鐘 10,000 轉）離心 1½ 小時，然後吸取其上清液，並將沉澱物重新浮懸於原量緩衝鹽水中，各滴定其血球凝集效價及補體結合效價（表 9）。

表 9 用 Cetyl trimethyl ammonium bromide 處理後巴黎-1 病毒的變化

材 料	血清凝集效價	補體結合效價		比 例 本血清：異血清
		PR ₈ 血清	巴黎-1 血清	
純製病毒液	1,920	2	23	14 : 1
處理後的病毒液	7,680	23	56	2 : 1
透析後高速上清液	1,920	8	24	3 : 1
透析後高速沉澱物	1,920	24	32	1.3 : 1
透析後超音波處理之高速上清液	3,200	12	23	2.3 : 1
透析後超音波處理之高速沉澱物	3,200	16	36	2.3 : 1

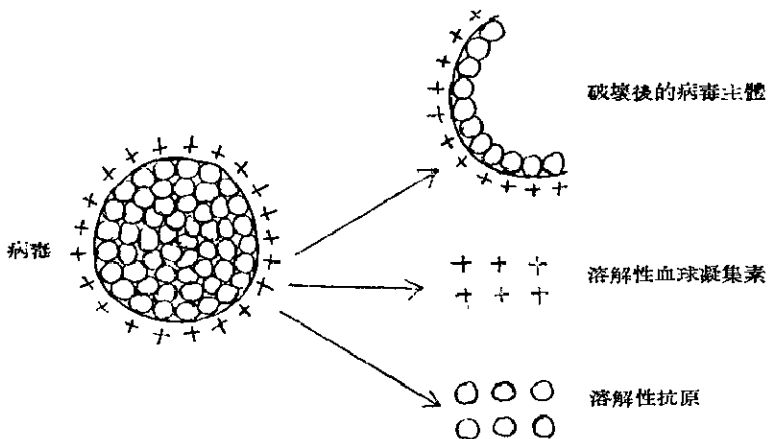
由表 9 所示結果，C. T. A. B. 與乙醚有類似的作用，即破壞病毒並使之結成凝塊，而於上清液中則出現了溶解性血球凝集素及溶解性抗原。用 C. T. A. B. 處理後的病毒液，血球凝集效價幾乎增加 4 倍，此點與乙醚處理後凝集效價略有損失的情形，稍有不同。在本試驗中超音波處理似乎稍稍提高了血球凝集及補體結合效價，但效果並不顯著。

討 論

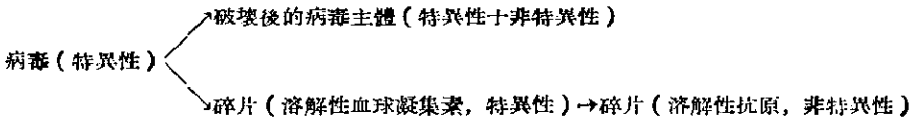
乙醚崩裂病毒的過程，可以有各種不同的解釋。根據電子顯微鏡的觀察及 C. T. A. B. 的作用，我們可以假定其作用在於破壞病毒的表面結構，而產生了三種產物：(1) 凝集成塊的變形結構，依其形態判斷，似乎係由遭受破壞後的病毒主體所構成，仍具有凝集血球的能力，且在血球抑制試驗中仍保有特異性，但在補體結合試驗中則表現為非特異性的抗原。(2) 顆粒大小約在 20—30 毫微米的溶解性血球凝集素，不論在血球抑制或補體結合試驗中，其抗原性都是比較特異的。(3) 顆粒大小與溶解性血球凝集素相仿的溶解性抗原，不能凝集血球，且在補體結合試驗中缺乏特異性。以上三種物質的產生過程與相互間的關係，目前尚無足夠的試驗根據足資說明。

根據本報告中試驗的結果，似乎血球凝集力存在時，抗原特異性也存在；血球凝集力消失時，抗原特異性也隨之消失。從一般免疫學的原則來看，我們對病毒變化的過程，可作以下的兩種推測：

(1) 病毒本身含有兩種抗原，一種是特異性的，位置在病毒的表面，與血球凝集作用有密切的關係；另一種是非特異性的，存在於病毒內部，只有在病毒本體遭受破壞後方能發生反應。乙醚作用是破壞病毒的本體；其主體部分變成絮狀凝塊物，含有特異的與非特異的抗原；同時因崩裂作用而放出一部遊離的特異性抗原（即溶解性血球凝集素）與非特異性抗原（即溶解性抗原）。其關係可圖示如下：



(2) 病毒本身只含有特異性的抗原。乙醚一方面破壞了病毒的主體結構並放出了許多碎片，同時又對抗原起了變質的作用。當變質作用不徹底時，抗原仍保有凝集血球的性能，其特異性只是略為減低；但在變質作用更進一步時，抗原完全變為非特異性，同時亦失去了凝集血球的能力。其關係可圖示如下：



在血球凝集現象發現的最初數年中，許多學者曾證明血球凝集乃係流感病毒顆粒本身的活力，而並非由於溶解性的血球凝集素所致；以後用電子顯微鏡研究病毒與紅血球的結合現象，更證實了以上的結論。但近年來對流感病毒生活史的研究又發現了許多新的現象，Von Magnus^[13]用大量流感病毒接種於雞胚尿囊中，於遞續數代後發現在尿囊液中有一部分較正常病毒稍小的顆粒，能凝集血球，但感染力甚低，因此該作者稱之為不完全的病毒。Hoyle 氏^[14]發現流感病毒在雞胚絨毛尿囊膜的發育過程中先有一個完全靜止的時期，以後首先出現了溶解性補體結合抗原，繼之又出現了血球凝集素，最終方出現了感染性的病毒；因此認為流感病毒於進入細胞後必須經過以下的發育階段始成為成熟的病毒即：不活動階段→溶解性抗原→血球凝集素→病毒。Schlesinger 氏^[15]最近證明流感病毒於接種小鼠腦內後產生大量血球凝集素，但小鼠腦組織並無感染力，因此認為流感病毒在小鼠腦內僅能發育成為不完全的病毒。本報告中的試驗說明由病毒開始，經過乙醚的崩裂作用，可以產生顆粒遠較病毒為小的血球凝集素與溶解性抗原，此種現象似乎係病毒發育過程的一種逆行倒轉。是否病毒於進入細胞後，因細胞內酶的作用而發生類似本報告中所述的一系列改變，而進入不活動期，然後再發育繁殖經過幾個階段而又成為成熟的病毒。此類問題，與解決病毒的本質密切攸關，值得注意研究的。在實用方面 Hoyle 氏^[16]曾應用作者的方法作成非特異性的補體結合抗原，證明其效果與鼠肺或絨毛尿囊膜所製成的抗原相彷彿，但方法更為簡單。乙醚破壞後的流感病毒，是否可用作免疫用的疫苗，亦尚待研究發展。

總 結

乙醚能破壞流感病毒的結構並減低其感染力。病毒崩裂的結果產生了三種產

物：(1) 絮狀凝塊物，似係由破壞後的病毒主體所構成，仍具有凝集血球及補體結合的性能，其抗原性一部分是特異性的，一部分是非特異性的；(2) 溶解性血球凝集素，顆粒直徑約 20—30 毫微米，對紅血球有凝集作用，在血球抑制試驗中抗原特異性顯著，在補體結合試驗中的抗原特異性介乎病毒與溶解性抗原之間；(3) 溶解性抗原，其大小似與血球凝集素相近，不能凝集紅血球，在補體結合試驗中表現為非特異性的抗原。本報告中對以上產物的物理學、生物學及免疫學性能加以探討，並對此種崩裂現象的意義，予以申論。

參 考 文 獻

- [1] Andrewes, C. H. & Horstmann, D. M., 1949, *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 290.
- [2] Chu, C. M., Dawson, I. M. & Elford, W. J., 1949, *Lancet*, **1**, 602.
- [3] Annual Report of National Institute for Medical Research, London, 1949.
- [4] Dawson, I. M. & Elford, W. J., 1949, *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 298.
- [5] Chu, C. M., Andrewes, C. H. & Gledhill, A. W., 1950, *Bull. World Hlth. Org.*, **3**, 187.
- [6] Fulton, F. & Dumbell, K. R., 1949, *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 97.
- [7] Schlesinger, M., 1934, *Kolloidzshr.*, **67**, 135.
- [8] Elford, W. J., 1938, *Handbuch der Virusforschung*, **1**, 126.
- [9] Chu, C. M., 1948, *J. Hyg.* **46**, 239.
- [10] Salk, J. E., 1946, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **63**, 134.
- [11] Hirst, G. K., *J. Exp. Med.*, **75**, 49.
- [12] Burnet, F. M., McCrea, J. F. & Stone, J. D., 1946, *Brit. J. Exp. Path.*, **27**, 228.
- [13] von Magnus, P., 1951, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **28**, 278.
- [14] Hoyle, L., 1950, *J. Hygiene*, **48**, 277.
- [15] Schlesinger, B. W., 1950, *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., **47**, 541.
- [16] Hoyle, L., 1950, *J. Hyg.*, **48**, 277.

DISINTEGRATION OF INFLUENZA VIRUS BY ETHYL ETHER

CHU C. M.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

Treatment of influenza virus preparations with ethyl ether causes the disintegration of the virus particles and reduces its infectivity. Virus disintegration yields the following products: (1) a flocculent precipitate which is apparently formed by clumping of the residues of the broken virus particles, possesses both haemagglutinating and complement fixing properties and is antigenically partly strain-specific and partly non strain-specific; (2) a soluble haemagglutinin, with an approximate particle diameter of 20-30 μ being strain-specific in the haemagglutination inhibition test and intermediate in specificity in the complement fixation test; (3) a soluble antigen, approximating the soluble haemagglutinin in particle size, but devoid of haemagglutinating property and being non strain-specific in the complement fixation test, thus closely resembling the soluble antigen present in the infected mouse lung and the chorioallantoic membrane of infected chick embryos. Some of the physical, biological, and immunological properties of these products were investigated. The possible significance of the *in vitro* disintegration phenomenon to virus reproduction *in vivo* is briefly discussed.