

流行性乙型腦炎病毒免疫血清 的製造與檢定

戚景彝 戚迦陵 劉雋湘

(中央生物製品研究所, 北京)

關於抗病毒的免疫機轉，我們瞭解的仍很不夠；特別是關於被動免疫，所知更少。1952年本所曾對於抗流行性乙型腦炎血清，進行了若干試驗，初步結果證明血清在動物試驗中有效^[1,2]。在1952年所獲經驗的基礎上，我們今年又進行了較有系統的研究。本文概括介紹我們在製造與檢定流行性乙型腦炎病毒免疫馬血清上的一些經驗。

血清的製造

(一) 免疫用抗原

1. 病毒

用作抗原的流行性乙型腦炎病毒，鼠腦毒種係用京衛研₂株，雞胎毒種係1952年中央衛生研究院新分離之檢10株及檢20株。

2. 抗原製備

馬匹免疫用的抗原分鼠腦及雞胎二種。鼠腦抗原係用體重7—9克小白鼠，腦腔注射經離心沉澱之 10^{-2} 新鮮病毒均勻懸液，每隻接種0.03毫升，3日後由心臟放血致死，以無菌手續取出鼠腦，每腦作一培養，次日將無菌試驗陰性者合併，研磨用 $M/_{10}Na_2HPO_4$ 及生理鹽水各半稀釋成10%懸液，不加防腐劑，於研磨之當日免疫馬匹。雞胎抗原選用8日胚胎，卵黃囊注射經稀釋 10^{-3} 的新鮮雞胎病毒均勻懸液，每卵接種0.1毫升，3日後以無菌手續取出胚胎，除去胎眼，每五胚胎作一培養，次日將無菌試驗陰性者研磨，用 $M/_{20}Na_2HPO_4$ 及生理鹽水各半稀釋

成 20% 懸液，不加防腐劑，於研磨之當日免疫馬匹。

(二) 馬匹免疫及採血

本年新免疫馬匹共 25 匹。馬匹產地為察北張市 20 匹，東北區林東 2 匹，內蒙錫盟 3 匹。性別雄性 19 匹，雌性 6 匹。年齡 6—9 歲 18 匹，10—13 歲 7 匹。分為兩羣：鼠腦抗原羣 13 匹，內包括新馬 12 匹，另有一匹係去年曾用流行性乙型腦炎鼠腦抗原免疫過者（#220）；雞胎抗原羣 15 匹，內包括新馬 13 匹，另有二匹係去年曾用鼠腦抗原免疫過者（#218#219），馬匹一律皮下注射，每週一次，先注射流行性腦炎疫苗 2—3 次，作為基礎免疫後，即開始注射活毒，免疫量逐次增加，由 10 毫升至 120 毫升後為止，全程免疫約 12—15 次即可全身或部分採血。

(三) 中和試驗

選用體重 12—14 克小白鼠分為試驗組及對照組做中和試驗。試驗組以待試血清與 10 倍連續稀釋的病毒（京衛研₂）各 0.2 毫升，放在小試管中，振盪各管使血清與病毒充分混合。同時依同樣方法以滅能健免血清與病毒混合作為對照組。混合後置 37°C 水浴中加溫 2 小時，隨即以腦腔注射法注射小白鼠，每種稀釋度注射 5 隻，每隻注射 0.03 毫升。觀察 14 日逐日記錄死亡，按 Reed-Muench 氏法計算 50% 致死量，對照組與試驗組之比值為中和指數。即

$$\text{中和指數} = \frac{\text{對照組 LD}_{50}}{\text{試驗組 LD}_{50}}$$

(四) 免疫結果

1. 免疫前血清中和指數滴定的結果：

馬匹未經免疫時，採取血樣，做中和試驗，在 25 例受試的血清中，最低的中和指數是 50（1 例），最高的為 650,000（1 例）多數馬匹血清的中和指數在 1,000—10,000 之間，詳見表 1。

2. 免疫後血清中和指數滴定的結果

(1) 鼠腦抗原羣 本羣馬 13 匹，接受 3 次疫苗注射 8 次活毒免疫後試血，中和指數較免疫前約增加百倍至千倍，個別馬匹如 #24 之中和指數急劇上昇約為免疫前 34,000 倍，#220 曾於去年用鼠腦抗原免疫，去年免疫血清中和指數為 2,000,000 休息六個月後試血時中和指數為 168,000，今年再度免疫中和指數為 2,820,000 結果見表 2。

表 1 25 例馬血清免疫前對流行性乙型腦炎病毒的中和指數

中和指數	總數	產 地			性 別		年 齡	
		張 市	林 東	錫 盟	♂	♀	6-9	10-13
10 ^{1.2}	1	1			1		1	
10 ²	2	2			2		1	1
10 ³	11	7	1	3	9	2	10	1
10 ⁴	10	9	1		6	4	5	5
10 ⁵	1	1			1		1	
總 數	25	20	2	3	19	6	18	7

*10^{1.2} 表示中和指數 2 位，餘類推。

表 2 鼠腦抗原羣馬匹免疫後血清中和指數增加的情況

血 清 號 數	免 疫 前 血 清			免 疫 後 血 清*		
	試驗組 LD ₅₀	對照組 LD ₅₀	中和指數	試驗組 LD ₅₀	對照組 LD ₅₀	中和指數
85	3,167	7,834	46,000	2,429	8,616	1,539,000
137	3,222	8,167	88,000	1,482	8,616	13,620,000
156	4,815	7,765	892	1,682	8,616	4,809,000
157	3.5	8.0	11,000	2,375	8,616	1,742,000
176	3,832	8,0	14,000	2,0	8,616	4,131,000
178	4,0	8,0	10,000	1,625	8,616	9,795,000
206	3,184	7,54	22,000	2,0	8,616	4,131,000
220*	2,607	7,834	168,000	2,166	8,616	2,820,000
235	3,765	7,834	5,000	1,8	8,616	6,547,000
238	2,35	8,167	656,000	1,75	8,616	7,346,000
241	5,834	7,54	50	2,375	8,616	1,742,000
263	4,0	7,765	5,000	2,167	8,616	2,812,000
332	4,5	7,54	11,000	1,682	8,616	8,591,000

* 注射疫苗 3 次活毒 8 次

* 係去年免疫過之馬匹

(2) 鷄胎抗原羣 本羣馬 15 匹，接受 2 次疫苗及 8 次活毒免疫後試血，中和指數增加約為免疫前之百倍至千倍，馬匹 #218，#219 係去年曾用鼠腦抗原免疫過者，去年血清中和指數二者皆為 5 位，休息六個月後今年改用鷄胎抗原免疫，免疫前測定其中和指數 #218 仍為 5 位數字，而 #219 則僅 4 位，結果見表 3。

表 3 鷄胎抗原羣馬匹免疫後血清中和指數增加的情況

血 清 號 數	免 疫 前 血 清			免 疫 後 血 清*		
	試驗組 LD ₅₀	對照組 LD ₅₀	中 和 指 數	試驗組 LD ₅₀	對照組 LD ₅₀	中 和 指 數
107	4.25	7.834	3,000	2.834	8.616	605,000
123	4.429	8.0	3,000	2.834	8.616	605,000
164	3.834	8.0	14,000	2.375	8.616	1,742,000
165	4.5	8.0	11,000	2.834	8.616	605,000
168	4.5	8.0	11,000	1.6	8.616	10,300,000
181	5.0	8.0	1,000	2.482	8.616	1,362,000
190	3.833	7.54	5,000	3.0	8.616	413,000
197	3.833	7.765	8,000	1.482	8.616	13,620,000
200	4.375	7.54	1,000	2.0	8.616	4,131,000
230	4.682	7.834	1,000	2.222	8.616	2,478,000
237	5.0	7.834	600	2.625	8.616	979,000
256	4.375	7.54	1,000	2.75	8.616	734,000
304	3.59	7.54	8,000	1.777	8.616	6,903,000
218*	3.204	8.167	91,000	2.375	8.616	1,742,000
219*	4.334	8.167	6,000	2.777	8.616	690,000

* 注射疫苗 2 次活毒 8 次

* 係去年免疫者

由表 2 及表 3 得知，鼠腦羣 13 匹血清中和指數均達七位數字，鷄胎羣馬匹血清中和指數僅半數達七位數字。

血清效力檢定

(一) 保護力試驗：

中和試驗，係先在試管內，將病毒與血清混合，然後注入動物體內，其中和

反應，係在動物體外進行，故與用血清預防或治療時的情況，是基本上不同的，在保護力試驗中，則病毒與血清不在體外接觸，與血清用於預防或治療時之情況較為相似。

我們用了二種方法做保護力試驗。

第一種方法：病毒用滅能兔血清稀釋行腦腔注射。

選體重 12—14 克小白鼠分為試驗羣及對照羣，每羣又分為若干小組，每組小白鼠各 5 隻，試驗羣各組分別在不同的時間，腹腔注射免疫血清 0.3 毫升，對照羣各組則不注射免疫血清，將病毒用 10% 滅能健兔血清稀釋為各種稀釋度，每一稀釋度，注射對照羣小白鼠一組及試驗條件不同的小白鼠各一組，均為腦腔注射病毒懸液 0.03 毫升，注射後觀察 14 日，記錄死亡數目按 Reed-Muench 氏法計算 50% 致死量，對照羣 LD_{50} 與試驗羣 LD_{50} 之比值為保護指數。

第二種方法：病毒用黏液素 (Mucin) 稀釋行腹腔注射。

在未確定採用此法之前，我們曾用 5% 粘液素與 10% 滅能健兔血清作病毒稀釋液，進行小白鼠腹腔滴定，小白鼠按體重分為二羣，一羣為 7—9 克，一羣為 16—18 克。滴定的結果證明腦炎病毒用粘液素稀釋者在 7—9 克的小白鼠 LD_{50} 固見增高 (10% 滅能兔血清稀釋病毒組 $LD_{50} = 10^{-7.25}$ ，5% 粘液素組 $LD_{50} = 10^{-8.37}$)，在 16—18 克體重之小白鼠，毒力提高尤為明顯 (10% 滅能兔血清組 $LD_{50} = 10^{-4.0}$ ，5% 粘液素組 $LD_{50} = 10^{-6.8}$)。多次試驗結果相似。如僅注射 5% 粘液素或 10% 滅能兔血清則小鼠不見死亡。故我們認為用 5% (或用 3%) 粘液素作病毒稀釋液，可以增加腦炎病毒的毒力，使注射小白鼠腹腔時所需的病毒劑量易於控制，因而用來檢定血清的效力時，可以得到明顯的結果。

對於小白鼠體重的選擇，我們也做過比較試驗，我們曾用體重不同的小白鼠 (一羣 7—9 克，一羣 16—18 克) 用不同的病毒稀釋液 (10% 滅能兔血清，5% 粘液素) 來測定同一批血清的保護指數，結果以用 5% 粘液素者保護指數明顯，尤以體重 7—9 克小白鼠為更明顯。在試驗方法上我們也曾用同一批血清用不同的方法比較保護指數 (一種是腦腔注射病毒法，一種是腹腔注射病毒法)，也是腹腔注射法結果較為明顯 (見表 4)

用粘液素作保護力試驗之方法為選用 7—9 克小白鼠分為試驗組及對照組，每組用小鼠 20 隻分為 4 個小組，接種用 3% 或 5% 粘液素稀釋不同稀釋度之病毒，每鼠腹腔注射 0.3 毫升，24 小時後，試驗注射免疫血清 0.3 毫升。餘同腦腔注射法。

表 4 測定抗流行性乙型腦炎血清保護力試驗方法之比較

流行性乙型腦炎病毒				免 疫 血 清							
毒 種	稀 釋 液	注 射		對 照 組 LD ₅₀	種 類	中 和 指 數	注 射 血 清 的 時 間	注 射		試 驗 組 LD ₅₀	保 護 指 數
		部 位	量					部 位	量		
鼠 毒	10%滅活兔血清	腹腔	毫升 0.03	7.834	C123	147,300	病毒注射 後 2 小時	腹腔	毫升 0.5	7.834	○
京衛研 ₁	10%滅活兔血清	腹腔	毫升 0.03	7.834	M220	3,170,000	病毒注射 後 2 小時	腹腔	毫升 0.5	5.705	134
京衛研 ₂	10%滅活兔血清	腹腔	毫升 0.03	7.834	精製	333,000	病毒注射 後 2 小時	腹腔	毫升 0.5	7.384	○
京衛研 ₃	5%粘液素	腹腔	0.3	8.256	C123	147,300	病毒注射 後 24 小時	腹腔	毫升 0.5	3.757	31,500
京衛研 ₃	5%粘液素	腹腔	0.3	8.256	M220	3,170,000	病毒注射 後 24 小時	腹腔	毫升 0.5	1.7	3,590,000
京衛研 ₂	5%粘液素	腹腔	0.3	8.256	精製	333,000	病毒注射 後 24 小時	腹腔	毫升 0.5	4.782	3,000

○係表示無保護

(二) 檢定結果

1. 病毒用滅能兔血清稀釋。腹腔注射法，測定血清效力所得的結果列為表4。由表中可以看出血清的中和指數與保護指數是有關係的，中和指數七位的血清其保護指數較四位五位者為高。其他，如給予血清的時間，注射途徑與注射量的關

表 5 腹腔注射病毒法測定的保護指數與血清中和指數的關係

馬 血 清	中 和 指 數	注 射 部 位	血 清 量 (毫升)	在病毒注射前後不同時間注射血清所得的保護指數		
				前 一 日	同 時	後 一 日
#240 免疫前血清	50	腹 腔	0.3	○	○	○
#156 免疫前血清	890	腹 腔	0.3	○	○	○
#235 免疫前血清	5,000	腹 腔	0.3	○	○	○
#218* 血清	91,000	腹 腔	0.3	310	○	○
#263 免疫後第 1 次血清	642,000	腹 腔	0.3	1740	○	○
#220* 免疫後第 1 次血清	5,630,000	腹 腔	0.3	6398	863	○
#220* 免疫後第 1 次血清	5,630,000	腹 腔	3▽	—	253,600	—
#220* 免疫後第 1 次血清	5,630,000	皮 下	3▽	—	990	—
#220* 免疫後第 1 次血清	5,630,000	腦 腔	0.03	—	○	—

○表示無保護

—表示未做

▽每日給血清 0.3 毫升共 10 日

*係去年免疫過之馬匹

係一併見表 5。

2. 病毒用 5% 粘液素稀釋，腹腔注射法測定血清效力所得結果列為表 6。

表 6 腹腔注射病毒法測定的保護指數與血清注射時間之關係

馬血清	中和指數	注 射 部 位	血 清 量 (毫升)	在病毒注射後不同時間注射血清所得 的保護指數			
				24小時	48小時	72小時	96小時
M206	6,320,000	腹 腔	0.3	1,080,000	74,000	317	65
C200	3,170,000	腹 腔	0.3	126,000	17,100	317	178

由表中可以看出，血清注射愈早保護指數愈高。

我們曾用病毒行腹腔注射，然後每隔 24 小時取被染小鼠三隻取其腦作病毒量測定，結果發現 24 小時病毒已開始在腦中發育。測定結果為 24 小時 $LD_{50}=2.0$ ，48 小時 $LD_{50}=5.0$ ，72 小時 $LD_{50}=6.375$ ，96 小時 $LD_{50}=8.25$ ，由此可以證明在病毒已在腦中發育後注射血清仍有保護作用。

討 論

1. 用流行性乙型腦炎的鼠腦及雞胎抗原免疫馬匹，血清中和抗體一般均增加至免疫前血清的百倍至千倍，免疫前中和指數 50 者 (#241) 經免疫後抗體增加倍數較其他馬匹為高 (約數萬倍)，免疫前中和指數六位者有二匹，一匹 #220 於去年曾免疫過流行性乙型腦炎鼠腦抗原數十次，另一匹為 #238 為天然陽性者，抗體增加僅數十倍，#220 去年中和指數與今年繼續免疫之中和指數似無更變，故於製造過程中測得中和指數到達七倍時即可開始採血。

2. 作者等認為用腦腔注射病毒法作血清的保護力試驗是不合適的，因為腦腔注射後，病毒直接侵入腦組織，即迅速造成腦神經組織的病變，而不經過“病毒血症”的階段。在這種情況下，血清是不易發揮作用的。同時，這樣一種感染途徑，也是與自然界中本病發病的機轉完全不同的。

腹腔、肌肉或皮下注射病毒，應當是比較合理的途徑。但是在腹腔注射時，雖然病毒量較自然感染時蚊蟲的叮刺大的多，但常常由於病毒的毒力不夠，因而試驗的結果不規律。既然用粘液素代替健康滅能兔血清來稀釋病毒，可以增加毒力，使腹腔注射病毒成為可能，則做保護力試驗時，不論血清或疫苗，似乎還是以採取腹腔注射病毒的方法為宜。

3. 用馬匹來製備流行性乙型腦炎免疫血清，業已成功，但臨床效驗如何還須決定於許多因素。

(一) 我們認為血清中所含抗體的多寡是很重要的。在動物試驗中，我們發現免疫血清在小白鼠體內的療效與抗體的含量成正比，即抗體愈多，療效愈大。這一規律在文獻中也可得到類似的例證。以傳染性腮腺炎的血清療法為例；據 Gallis 等氏^[3]的研究，健康人血漿對於腮腺炎沒有什麼療效，恢復期人血漿，只有不明顯的效驗，但由恢復期血漿提煉出來的三種球蛋白，則有明顯的效驗；在用血清預防麻疹及治療傳染性黃疸時也有類似的情況^[4,5]這完全是因為抗體多少的緣故。實際上即是劑量問題，要增加劑量，一種辦法是注射大量的血清，但大量注射血清會引起反應，故應當避免採用此法。合理的辦法是盡量提高血清單位體積中之抗體含量，同時設法減少血清中的無效成份及能夠引起不良反應的成份。因此一方面改進馬匹免疫方法，另一方面研究血清的加工純製將是必要的。

(二) 根據血清療法的一般經驗血清注射愈早結果愈好，我們的試驗也證實了這點。

(三) 腦炎病毒在病程的後一階段，病毒侵入腦神經組織後，一般血清不易對它發生作用，必須設法使抗體能夠進入腦腔才能與病毒接觸。未經純製的馬血清由脊柱腔注射時，抗體雖較易與病毒接觸，但可能引起反應，故使用時應當慎重。馬抗體蛋白分子不易滲入腦腔，如果我們能夠設法改變其物理性質，（如用酶消化法）同時還不失去抗病毒的效力，則血清的療效當可大大增加。

除了以上所述各點外，對於血清的貯存，應用等問題，也必須進行週密的研究。尤其是對於臨床應用的結果，必須有計劃地加以科學的分析與統計，才能得出對於流行性乙型腦炎高價免疫血清的正確的評價。

結 論

1. 用流行性乙型腦炎的鼠腦及雞胎抗原免疫馬匹，均能得到高價免疫血清。
2. 免疫血清對於小白鼠實驗感染的效驗已經試驗證明。根據我們的初步試驗結果，效果的大小與血清中的抗體量，感染的病毒量與開始注射血清的時間有關。
3. 用粘液素稀釋病毒腹腔注射小白鼠，作血清保護力試驗較用健康兔血清稀釋病毒行腦腔注射所得結果為明確。

4. 對本血清的應用曾加討論。

參 考 文 獻

- [1] 鍾昆, 劉蔭湘: 未發表材料, 1952。
- [2] 王用楫, 戚迦陵, 王欽臣, 鍾昆: 微生物學報, 1953, 1, (2)。
- [3] Gallis, S. S., et. al., *Am. J. Med. Sci.*, 1945, **210**, 661.
- [4] Ordman, C. W., Jennings, C. G. and Janevay, C. A., *Clin. Invest.* 1944, **23**, 541.
- [5] Enders, J. E., *Clin. Invest.*, 1944, **23**, 510.

THE PRODUCTION AND STANDARDIZATION OF THE EPIDEMIC TYPE B ENCEPHALITIS IMMUNE SERUM

CHIH, C. E., CHIH, C. L. and LIU, C. H.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

1. Immune serum against epidemic type B encephalitis has been produced by immunizing horses with formalin-killed vaccine followed by living virus suspension. Although both mouse brain and chicken embryo antigens have been proved satisfactory, the former seemed more effective.

2. The immune serum has been proved highly protective against experimental infection in mice. It has been shown preliminarily that the effect of the serum therapy depended upon the titre of the serum used, the dose given and the time when it is started.

3. A procedure has been introduced for the estimation of the protective power of the immune serum. 3-5% gastric mucin instead of 10% normal rabbit serum was used to dilute the virus suspension, and the mice were challenged intraperitoneally instead of intracerebrally. More consistent and clean-cut results were obtained.