

羊肝浸液在百日咳菌苗生產上的應用*

何秋民 陳正仁

(衛生部生物製品研究所)

自1906年 Bordet 及 Gengou^[1] 二氏發明土豆甘油培養基分離出嗜血性百日咳桿菌以來，迄今世界各國仍多採用。雖經許多學者對該培養基所用的血液種類及含量加以改變，以及增加朊等方面有些改進；然一相嗜血百日咳桿菌仍然生長的很薄，因之在大量製造百日咳菌苗時受到一定的限制。近年來許多學者如 Cohen^[2]，Gray^[3]，Verwey 和 Sage^[4]，淺野淺雄^[5] 諸氏從事了百日咳菌的液體培養及液體菌苗的製造，但目前仍未能廣泛使用，故進一步改良土豆甘油培養基，使嗜血性百日咳桿菌能生長得厚，而且仍為有高度免疫力之一相菌，是值得我們從事生物製品工作者應注意的事。

1942，Silverthorne^[6] 發現牛肝浸液加於僅含血的瓊脂培養基內可使百日咳菌生長較厚，且仍為有高度免疫力之一相菌。我們重複了他的工作並發現在肝浸液血瓊脂培養基上生長的百日咳菌苔雖然很厚，但顯得特別乾而且粗糙。隨後我們將肝浸液加在含朊的土豆甘油培養基，或含朊的可溶性澱粉培養基內，則能使一相百日咳桿菌生長更厚，而且顯得光潤並無粗糙及發乾的現象。同時因工作方便改用羊肝浸液代替了牛肝浸液。兩年來我們利用加羊肝浸液的培養基從事了百日咳菌苗的生產，本文報告羊肝浸液對百日咳菌生長方面的影響及在生產方面使用的情況。

試 驗 材 料

(一) 使用的百日咳菌種

58019, 18380 均為國際菌種，18323 專為腦內攻毒用國際菌種，CV; P₃V; P₅V 為適應於含朊培養基上的北京地方性菌種。

(二) 羊肝浸液的製備^[7]

將新鮮羊肝用絞肉機絞碎每 500 克加於 1000 毫升熱水內，加熱煮沸 5 分鐘，用鹽酸矯正 pH 至 5；置水溫箱加熱 80°C 經 20 分鐘後用氫氧化鈉再矯正 pH 至 7.6—7.8，加氯化鈉 0.5%，用濾紙過濾，最後用賽氏機除菌過濾，置冰箱內備用。

* 1956年10月12日收到。

(三) 培養基的製造

1. 一號培養基: 蒸餾水內加瓊脂 4%, 氯化鈉 0.5%, 不測定 pH (一般 pH 為 6.5--6.8), 高壓滅菌後加羊血及羊肝浸液各 20%。
2. 二號培養基: 土豆甘油培養基加羊血 25% 羊肝浸液 5%。
3. 三號培養基: 用二號培養基, 惟加羊血 30% 不加羊肝浸液。
4. 四號培養基: 同二號培養基, 惟另加入 0.5% 胰。
5. 五號培養基: 同四號培養基, 惟只加羊血 30% 不加肝浸液。

試驗方法及結果

(一) 一相百日咳桿菌在五種不同培養基上生長情況及檢定結果

用 CV 及 18380 菌株在五種培養基上於 37°C 經 48 小時培養, 可看出在加羊肝浸液的一號、二號及四號培養基上生長的菌苔顯著的厚, 且在一、二號培養基上者則較乾且粗糙。菌落方面也有光潤、乾粗之別但在菌形方面均為陰性球菌樣短桿菌, 血清學毒力、毒性、家兔皮膚壞死試驗以及免疫力等方面均一致無差別。茲將菌落的形狀、菌苔生長濃度及免疫力試驗等方面作詳細介紹於下。

1. 菌落: 將 CV 及 18380 兩菌株在五種不同培養基平板上各接種適當濃度菌液 0.1 毫升, 於 37°C 經 72 小時培養, 約有 50 個菌長出, 於第三日及第五日觀察, 發現菌落在不同培養基上經不同時間培養而有顯著之不同詳見表 1。

表 1 CV 及 18380 菌株在五種不同培養基上菌落之比較

菌落情況 培養日數 接種濃度	表 面		邊 緣		色 澤		光 潤	
	三日	五 日	三日	五日	三日	五 日	三日	五日
	一號培養基	光滑	呈細顆粒狀粗糙中央凸出	整齊	整齊	灰白色	中央大部白色, 四週灰白色	有珍珠樣特有光澤
二號培養基	光滑	呈細顆粒狀粗糙中央凸出	整齊	整齊	灰白色	中央大部白色, 四週灰白色	有珍珠樣特有光澤	無光澤
三號培養基	光滑	光滑扁平	整齊	整齊	灰白色	大部仍為灰白色, 中央小部稍白	有珍珠樣特有光澤	有珍珠樣特有光澤
四號培養基	光滑	光滑中央凸出少數菌落表面有少數花紋	整齊	整齊	灰白色	中央大部白色, 四週灰白色	有珍珠樣特有光澤	有珍珠樣特有光澤
五號培養基	光滑	光滑扁平	整齊	整齊	灰白色	大部仍為灰白色, 中央小部稍白	有珍珠樣特有光澤	有珍珠樣特有光澤

由表 1 可以看出菌株在 5 種培養基上，於 37°C 經 3 日培養的菌落均光滑，有特有光澤無差別。但經過 5 日的培養，則在含肝浸液的一、二、四號培養基上者均較凸起且較白，但一、二號培養基上者且表面呈顆粒狀不光滑，四號培養基上者仍光滑，三、五號培養基上者不凸起仍為灰白色最光潤。

2. 生長情況：用 CV, 18380, P₅V, 58019 菌株各接種五種培養基克氏瓶平板，於 37°C 培養 42 小時，三、五號培養基生長較薄，一、二、四號培養基生長較厚，三、四、五號培養基上者均光潤；但一、二號培養基上者菌苔發乾且粗糙，刮入鹽水內不易作成均勻懸液。用力搖盪用棉花過濾後作凝集反應無自身凝集現象。

每一克在瓶菌苔（每瓶培養基裝量為 100 毫升）刮入 10 毫升鹽水，共 3 批經純菌及無菌試驗合格後，各合併於裝有玻璃珠之立瓶內，搖盪後用光電比濁計測濃度（濃度標準以衛生部生物製品檢定所分發的比濁管為準，至於濃度之計算則以每毫升培養基能生長的菌數計算）。因培養基的不同，濃度有顯著的不同。詳見表 2。

表 2 CV, 18380, 58019, P₅V 四菌株在五種培養基上之濃度的比較

菌株 培養基號	CV	P ₅ V	18380	58019	四菌平均濃度	五種培養基 濃度的比例
一號	31 億*	34 億	24 億	36 億	31 億	7.8
二號	37 億	32 億	25 億	47 億	35 億	8.8
三號	5 億	4 億	4 億	4 億	4 億	1.0
四號	43 億	50 億	31 億	37 億	40 億	10.0
五號	6 億	5 億	4 億	5 億	5 億	1.3

* 億菌體/1 毫升培養基。

由表 2 可看出 4 株一相百日咳菌在三號、五號不加肝浸液的培養基上生長很薄，在一號、二號、四號加肝浸液的培養基上生長較好，假如以三號培養基上生長的濃度為 1，則在加肝浸液的一號、二號及四號培養基上的濃度比例為 1:7.8—1:10。顯示加肝浸液後濃度增加 7 倍至 10 倍。本試驗所用之濃度是按我國百日咳濃度標準，美國濃度標準比我國淡 3.8 倍即美國濃度 100 億等於我國濃度 26.32 億，不論以任何濃度為標準，土豆、甘油、馬鈴薯加肝浸液後菌苔生長濃度顯著增加。

3. 用 5 種不同培養基所作菌苗免疫力試驗之比較：用 CV, 18380 菌株及 5 種不同培養基所作之菌苗免疫 7—9 克小鼠，每只注射 5 億/0.5 毫升於皮下，連續兩次，每次相距 10 日，第二次注射後 10 日，用腦內注射方法注射。在三號培養基於 37°C 經 24 小時培養，刮於 1% 胰素消化的乳酪素液的 18323 號毒菌，觀察 14 日所得免疫力試驗

結果見表 3。

表 3 不同培養基所作菌苗免疫力的結果

試驗號	免疫用菌 苗種類	用 LD ₅₀ 方法計算的結果		用絕對致死量法計算的結果	
		對照小鼠 LD ₅₀ 之菌數	免疫小鼠能保 護 LD ₅₀ 數目	對照小鼠一絕 對致死量菌數	免疫組注射一絕 對致死量活存率
1	一號培養基菌苗	46	95,280	800	92 %
	四號培養基菌苗	46	6,223	800	83 %
	五號培養基菌苗	46	12,250	800	100 %
2	一號培養基菌苗	270	1,906	800	78 %
	四號培養基菌苗	270	796	800	100 %
	三號培養基菌苗	270	1,626	800	100 %
3	一號培養基菌苗	245	7,180	800	90 %
	四號培養基菌苗	245	5,985	800	100 %
	五號培養基菌苗	245	4,208	800	70 %

由表 3 可看出一相百日咳菌生長最厚且光潤的四號培養基及生長較厚但粗糙的一號培養基，以及生長較薄但光潤的土豆、甘油、不加肝浸液的三號、五號培養基所作的菌苗，免疫小鼠均能使小鼠有相當強度的免疫力且無差別。

(二) 四號羊肝浸液培養基在生產上使用的結果

1. 濃度方面 一相百日咳桿菌 *CV*, *P₅V*, *18380* 及 *58019* 菌株在四號培養基上經六次傳代後仍為一相菌。兩年來用四號培養基經六次傳代，大批生產百日咳原液 130 批，其濃度與小量試驗均一致，其最低、最高及平均濃度如表 4。

表 4 四號培養基生產百日咳 130 批的濃度 (億菌體/1 毫升培養基)

百日咳原液批數	58 批	72 批
生產原液所用菌種	<i>CV</i> , <i>P₅V</i> , <i>P₅V</i> , <i>18380</i>	<i>CV</i> , <i>P₅V</i> , <i>P₅V</i> , <i>18380</i> , <i>58019</i>
平均濃度	33 億	36 億
最高濃度	44 億	46 億
最低濃度	21 億	23 億

2. 免疫力試驗方面 兩年來用四號培養基所作百日咳原液及菌苗中抽作免疫力試驗 16 批，用 LD₅₀ 方法免疫小鼠能保護數千到數萬個 LD₅₀，用對照及免疫小鼠各注射一絕對致死量方法，對照小鼠 100% 死亡，免疫小鼠有 75—100% 活存。故均對小鼠

有相當強的保護力，詳見表 5。

表 5 用四號培養基所作百日咳原液及菌苗免疫力試驗的結果

免疫用菌苗或 原液批號	用 LD ₅₀ 方法		對照組及免疫小鼠各注射一絕對致死 量方法	
	對照小鼠 LD ₅₀ 菌數	免疫小鼠能保護 LD ₅₀ 數目	對照小鼠一絕對 致死量菌數	免疫小鼠注射一絕 對致死量活存率
百日咳菌苗 200 批	310	25,800	8,000	90 %
百日咳菌苗 210 批	470	12,000	8,000	89 %
百日咳菌苗 220 批	265	30,000	8,000	100 %
百日咳菌苗 246 批	154	5,110	8,000	87 %
百日咳菌苗 264 批	190	41,700	8,000	90 %
百日咳菌苗 266 批	470	4,250	8,000	89 %
百日咳菌苗 267 批	265	30,200	8,000	100 %
百日咳菌苗 271 批	44	10,400	8,000	80 %
百日咳菌苗 290 批	308	21,700	8,000	100 %
百日咳菌苗 299 批	55	29,180	8,000	100 %
百日咳原液 55-1A	80	1,968	8,000	100 %
百日咳原液 55-3A	46	26,190	8,000	75 %
百日咳原液 55-10A	80	3,030	800	91 %
百日咳原液 55-13B	155	9,370	8,000	91 %
百日咳原液 55-20A	46	21,240	8,000	90 %
百日咳原液 55-28A	249	3,212	800	100 %

討 論

我們在小量試驗，及兩年來大批生產中，證實了四號加羊肝浸液的培養基能在保證質量的前提下增加產量。另外我們也發現在一、二號加羊肝浸液的培養基上百日咳桿菌生長雖厚但發乾且粗糙。我們知道細菌受了外界的影響，可能由光滑毒力強之 S 型變為粗糙毒力低且抗原性及免疫力有所改變之 R 型。但有些菌株如無毒 EV 鼠菌株雖為粗糙之 R 型但在抗原性及免疫方面仍無改變，他如結核桿菌 H₃₇ 菌株雖為 R 型但仍具有高度毒力。由病人新分離之一相百日咳桿菌很易變異且在抗原性及免疫力方面有所改變^[8, 9] 所以我們發現一相百日咳生長厚且發乾粗糙時是應當警惕的。但同一株百日咳桿菌在不同培養基上有厚薄乾粗與光潤的不同。經我們的試驗證明在一號、二號培養基上，生長乾粗之百日咳桿菌與在三、四、五號培養基上生長光潤的百日咳桿菌在菌形、血清學、毒力、毒性、家兔皮膚壞死試驗以及免疫力等方面無差別。此外百日咳桿菌在土豆甘油培養基內加入血者也比加羊血者生長的厚且粗糙，在菌形、毒力、血清學以及家兔皮膚壞死等方面也無差別。且將一、二號培養基及加入血的土豆甘油培養基

上生長乾粗的菌苔接種於三、四、五號培養基上則仍能變為光潤。另外在血清學、毒力及免疫力等方面已改變的非一相菌株在三、四、五號培養基上也光潤。因此我們認為一相百日咳桿菌菌苔的光潤與粗糙不能代表它是否在血清學、毒力及免疫力方面有所改變。加羊肝浸液之一號與四號培養基均能使百日咳生長較好但有乾粗光潤之別。雖然二者初步試驗在菌形、血清學、毒力、免疫力等方面一致無差別,但究竟在其他方面有無不同,是值得進一步研究的。

Dawson^[10] 用數種牌號的腺作試驗,認為各種腺對百日咳桿菌均有抑制作用。我們在工作中也遇到有些百日咳菌株,特別是新分離之菌株,在含腺之土豆甘油培養基或可溶性澱粉培養基上,有時有生長極薄或不生長之現象。但在無腺的不同批土豆甘油培養基上雖也有生長厚薄之別,但無生長極薄及不長的現象。在土豆甘油培養基內加羊肝浸液,可使百日咳菌生長濃度增加 8 倍,但菌苔乾粗。如在土豆甘油培養基內加羊肝浸液及 0.5% 腺則不但可使百日咳菌生長濃 10 倍且菌苔光潤。在加肝浸液及腺之四號培養基上,新分離的百日咳桿菌生長很厚且光潤,但有時也有生長極薄及不生長之現象。用人工方法獲得的適應性地方菌株則在該培養基上生長穩定^[11],因此我們認為腺在偶然的情況下可能有抑制某些新分離菌株生長的作用,但在一般的情況下,是對更多的新分離菌種以及試驗室內保存之一相菌的生長是有利的。

我們知道肝浸液內有動物澱粉,氨基氮生長因素等很豐富的營養物及有力的生長刺激物質。除 Silverthorne 外尚有 Farrel^[12] 用肝浸液從事百日咳液體培養, McLead^[7] 從事鏈球菌及肺炎球菌之培養,但到底肝浸液內何種生長因素是刺激百日咳桿菌的主要物質,是值得我們研究。我們測定了 25 批羊肝浸液,初步結果證明羊肝浸液內含總氮量 0.77—0.95 毫克/毫升,蛋白質 0.07—0.25 毫克/毫升,氨基氮 0.26—0.61 毫克/毫升,胱氨酸 0.10—0.13 毫克/毫升,其他方面的測定,正在設法進行研究中。

摘 要

(一) Dawson 1951^[10] 認為一相百日咳菌在 Silverthorne 氏的肝浸液血培養基上生長不如土豆甘油培養基上好,但我們證實了 Silverthorne 氏的肝浸液瓊脂培養基能使一相百日咳菌生長的比在土豆甘油培養基上厚,且在毒力、免疫力等方面仍很好。另外我們發現在該培養基上生長之菌苔較乾粗。並因工作方便用羊肝浸液代替了牛肝浸液。

(二) 用國際及地方性百日咳菌種各一株,在一號羊肝浸液血瓊脂培養基,二號羊肝浸液羊血土豆甘油培養基,三號羊血土豆甘油培養基,四號羊肝浸液羊血及含腺土豆甘油培養基以及五號羊血含腺土豆甘油培養基上進行試驗,證明在該五種培養基上菌

形、血清學、毒力、毒性、家兔皮膚壞死試驗以及免疫力等方面均一致無差別。唯在一、二號培養基上，生長之濃度較三號培養基濃 7—8 倍，但菌苔發乾且粗糙。在四號培養基上生長之濃度較三號培養基濃 10 倍，但菌苔仍光潤不粗糙。

(三) 用四株一相百日咳菌，兩年來用四號培養基生產百日咳原液 130 批，並作了多次免疫力試驗，充分證明該培養基在保證質量的前題下可增加產量 5—10 倍。

參 考 文 獻

- [1] Bordet, G. & Gengou, O., *Ann. Inst. Pasteur.* 20: 731, 1906.
- [2] Cohen, S. M. & Wheeler, H. W., *A. J. P. H.* 36: 371, 1946.
- [3] Gray, D. F., *J. Immunol.* 67: 35, 1948.
- [4] Verwey, W. F. & Sage, D., *J. Bact.* 49: 520, 1945
- [5] 淺野淺雄, 日本細菌學雜誌, 9 (2): 279, 1957.
- [6] Silverthorne, N., *J. Pediat.* 20: 16, 1942.
- [7] McLead, C. M., *J. Exper. Med.* 72: 217, 1940.
- [8] Bordet, J. & Sleswyk, *Ann. Inst. Pasteur.* 24: 476, 1910.
- [9] Leslie, P. H. & Gardner, A. D., *J. Hyg.* 31(3): 423, 1931.
- [10] Dawson, B., Farnworth, E. H., McLead, J. W. & Nicholson, D. E., *J. Gen. Microbiol.* 5(2): 408, 1951.
- [11] 陳正仁、何秋民，適應性百日咳菌種的獲得與應用。(印刷中)
- [12] Farrell, L. & Taylor, E. M., *Can. J. Pub. Health*, 36: 326, 1945.

APPLICATION OF SHEEP LIVER EXTRACT FOR THE PREPARATION OF CULTURE MEDIUM IN THE PRODUCTION OF PERTUSSIS VACCINE

HO CHIU-MIN and CHEN CHEN-JEN

National Vaccine and Serum Institute, Peking

(ABSTRACT)

Various modifications of Bordet-Gengou medium have been used satisfactorily for the isolation of *H. pertussis* but are not suitable for the mass production of vaccine on account of scanty growth. Silverthorne obtained luxuriant growth on beef liver extract agar to which sheep blood had been added. We have worked with several formulas consisting of sheep liver extract in combination with Bordet-Gengou medium:

1. Medium I plain agar medium with 20% sheep blood and 20% sheep liver extract.
2. Medium II Brodet-Gengou medium with 25% sheep blood and 5% sheep liver extract.
3. Medium III Bordet-Gengou medium with 30% sheep blood.
4. Medium IV Bordet-Gengou medium with 25% sheep blood, 5% sheep liver extract and 0.5% peptone.
5. Medium V Bordet-Gengou medium with 30% sheep blood and 0.5% peptone.

Phase I organisms have been inoculated on these media and their morphology, virulence, toxicity, necrotic skin reaction, serological reaction together with immunogenicity have been studied with identical results except that the growth on media I and II appeared to be dry and coarse, while growth on the other media was moist and smooth. The amount of bacterial growth harvested from these media has also been studied quantitatively and medium IV has been shown to produce the highest yield, about 10 times more than media III or V. Since then, medium IV has been chosen for the production of pertussis vaccine and used for the preparation of 130 lots in the last two years with constant yield. Repeated potency tests of vaccines thus produced have testified their good quality.

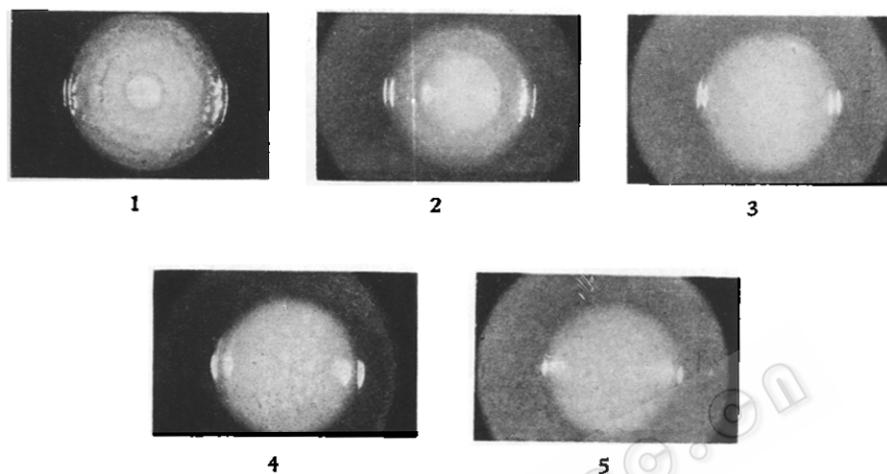


圖 1 *CV* 菌株在 5 種不同的培養基上，於 37°C 經過 5 日培養後菌落的形狀 (×44)
1. 一號；2. 二號；3. 三號；4. 四號；5. 五號培養基。

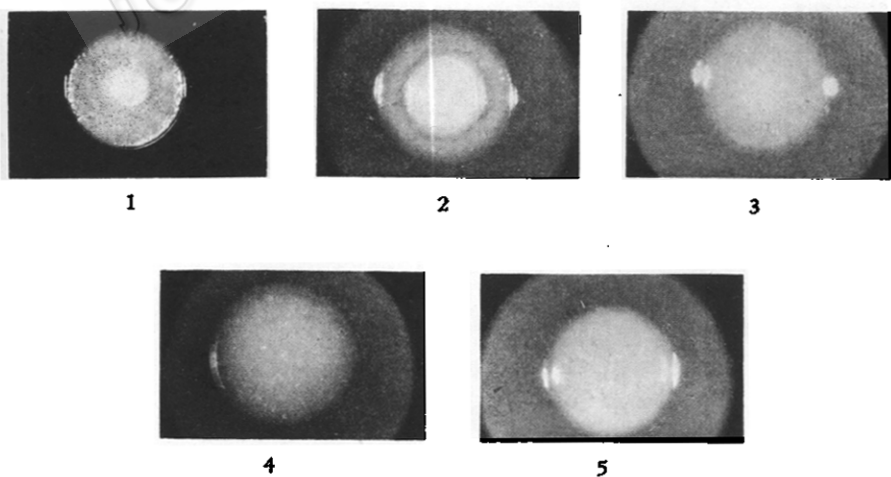


圖 2 *18380* 菌株在 5 種不同的培養基上，於 37°C 經過 5 日培養後菌落的形狀 (×44)

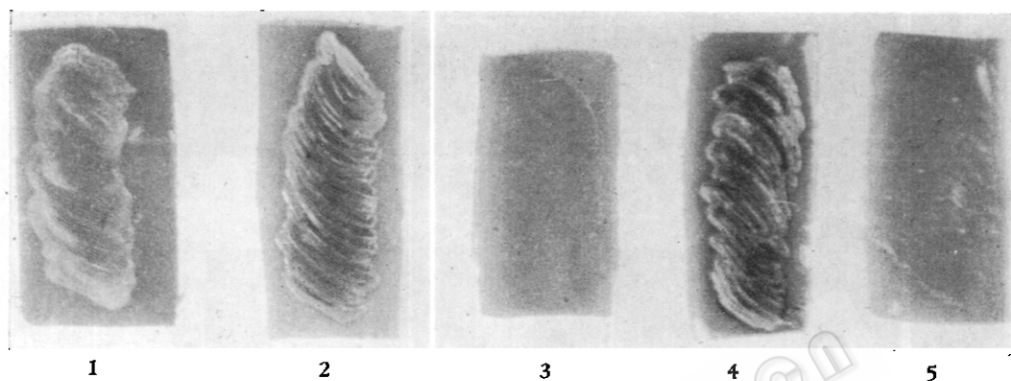


圖 3 CV 菌株在 5 種培養基上經過 42 小時培養後的菌苔

1. 一號；2. 二號；3. 三號；4. 四號；5. 五號培養基。

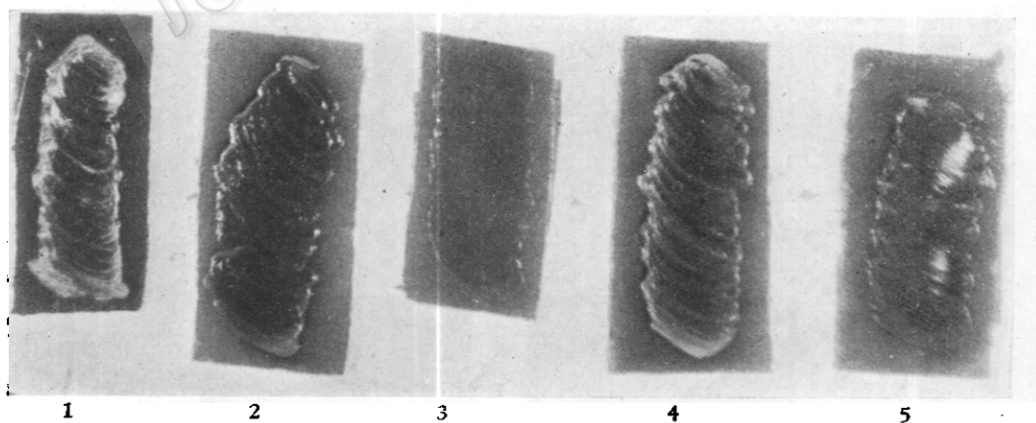


圖 4 18380 菌株在 5 種培養基上經過 42 小時培養後的菌苔