

用眼結合膜下注射法製備沉澱素血清

郭 景 元

(中山醫學院病理解剖學教研組法醫學小組)

作者於另文^[1]介紹的滴眼法免疫，得到良好的結果，免疫動物不致死亡，沉澱素效價很高。但是，滴眼法免疫所需時間和次數都嫌多，又不能製備抗血紅蛋白沉澱素。因此，免疫方法還有改進的必要。我們認為如果將抗原直接注入眼結合膜下，以避免抗原浪費及因顆粒較粗而不能被吸收的缺點，則各種抗原，包括血紅蛋白，都有可能產生優良的沉澱素抗體。經過一年來的實驗研究，結果各免疫動物全都產生高效價的沉澱素抗體，也沒有死亡例。至於免疫次數，所需日期，抗原用量等不但遠比滴眼法優越，也比對照組(腹腔內及靜脈內注射)優越。現將實驗結果報告如下：

實驗材料和實驗方法

抗原： 人的普通血清、血紅蛋白溶液和凝固蛋白混懸液及它們的製備和貯藏方法同前^[1]。

免疫方法： 將抗原置於無菌的結核菌素注射器內，其次使兔站穩，用左手固定兔頭，並以拇指撥開其上眼瞼；右手持注射器，將針頭很小心地稍稍插入眼瞼穹窿部結合膜內(插入約 2 毫米深)，注入適量抗原。一般每次注射 0.1 毫升，3 天注射 1 次。若一次要注射更大量抗原，最好分注於兩側眼結合膜內。

對照組腹腔內注射和耳靜脈內注射均如常法進行。

採血、測定效價和保存沉澱素血清等均同前^[1]。

實 驗 結 果

我們用人血清蛋白和血紅蛋白對 20 隻家兔作結合膜下注射，計分為 3 組：第 1 組兔 5 隻，用人普通血清抗原；第 2 組兔 11 隻，用 10% 人血紅蛋白抗原；第 3 組兔 4 隻，用 10% 人凝固血清抗原。各組均有腹腔內和靜脈內注射作對照(見表 1)。

從表 1 可以看到，用人血紅蛋白抗原作結合膜下注射的 11 隻家兔，全部得到抗人血紅蛋白沉澱素。其中 10 隻(92%)的效價達標準(20,000 倍，60 分鐘內)，只有 1 隻

表 1

注射法	抗 原		免		免 疫 注 射			最 高 效 價			
	種 類	%	總 數	死 亡	最高次數	最長日期 (天)	抗原總量 (毫升)	< 5,000	5,000— 20,000	20,000— 40,000	50,000— 200,000
眼結合膜下	血 清	100	5	0	4—10	8—16	0.4—1.0		1	1	3
	血紅蛋白	10	11	0	3—10	11—16	0.3—1.6		1	1	9
	凝固血清	10	4	0	3—6	12—21	0.3—0.6			2	2
腹腔內	血 清	100	2	0	3	21	30	1		1	
	血紅蛋白	5	5	4	10	39	50				1
		10	5	2	6—8	19—28	30—40		1		2
	凝固血清	10	25	3	4—13	10—52	8—26	1	4	9	8
靜脈內	血 清	100	5	2	3—10	10—62	3—10		1	2	
	血紅蛋白	5	5	3	7,8	22,31	35,40				2
		10	2	2							
	凝固血清	2	1	1							
		10	1	1							

未達標準(10,000倍),沒有死亡例。對照組中,腹腔內注射10隻家兔,計死亡6隻(60%),沉澱素效價達標準的只有3隻(30%);靜脈內注射7隻中死亡5隻(71%),其餘2隻的效價達到標準。

達到標準效價的各例中,結合膜下注射法的免疫次數平均為6次,延續日期最長的只要16天(平均13天),所用抗原最多的只要1.6毫升。而腹腔內和靜脈內注射的免疫次數最少6次,延續日期最少19天,抗原用量均在30毫升以上。

從表1又可以看到,用人普通血清免疫時,結合膜下注射的5隻家兔,有4隻(80%)得到標準的抗人血清沉澱素,另1隻的效價為10,000倍,無死亡例;腹腔內注射2隻中只有1隻的沉澱素效價達標準;靜脈內注射5隻中死亡2隻(40%),得到標準沉澱素的只有2隻。各法的免疫次數和延續日期雖差別不大,但抗原用量則以結合膜下注射法遠較節省(1毫升以內)。

最後,從表1還可看出,用凝固血清作靜脈內注射是不合適的,免疫2例均死亡。而結合膜下注射的4隻家兔,則全部得到標準的沉澱素。腹腔內注射25隻家兔中,沉澱素效價達標準的雖有17隻(68%),但死亡3隻,而免疫次數和延續日期,尤其是抗原用量均較結合膜下注射的為多。

討 論

實驗結果表明，結合膜下注射法無論是對動物的安全性或免疫技術的簡單性，不論是沉澱素的產量或延續日期和抗原用量的節省方面都要比腹腔內或靜脈內注射優越。尤其在抗原用量方面最為顯著：一般免疫全程只需 1.0 毫升以內的抗原，而對照組最少需要 3 毫升以上。而且，在製備抗人血紅蛋白沉澱素時，抗原濃度是 10%，則實際所需紅血球僅 0.1 毫升，或全血 0.2 毫升左右。這點對於小動物血液的沉澱素的製備將更重要。

結合膜下注射法的免疫間隔期，我們通常是 3 天 1 次，從實驗結果看來似尚合適。每日連續注射或 2 日 1 次者未發現什麼優點，徒然增加免疫次數。抗原用量每次以 0.1 毫升較為合適，用 0.2 毫升注射的 2 例，也無更好的效果。但是否可以更延長間隔期以減少免疫次數，或減少每次抗原用量以更節省抗原，尚須進一步實驗證明之。

結合膜下注射法所以有顯著良好的結果，我們認為顯然是與局部感受器對抗原較敏感有關。當然，很可能還由於抗原是集中於一個較小的區域（較之腹腔或血管），可以更有效地刺激感受器，反射地產生更多的抗體。而向腹腔內或靜脈內注射抗原時，則迅速被沖淡或分散，對感受器的刺激是比較微小的，因而，縱然有較結合膜下注射法大數倍或數十倍量的抗原進入體內並與效應器接觸，但產生的抗體卻不見更高。本項試驗的結果似可進一步證明作者在另文^[1]的討論意見。但是否正確，還需作進一步研討。

但是，結合膜下注射法最重要的優點還在於製備抗人血紅蛋白沉澱素方面。由於抗人血清沉澱素不但能與人血清蛋白發生反應，還能與人的某些體蛋白（如各種體液、唾液、精液、乳汁、鼻涕、痰、膿、蛋白尿等）發生反應。因此，用抗人血清沉澱素進行沉澱反應試驗的結果，只能判斷檢材有無人體蛋白，不能證明是否人的血液。雖然，在法醫學血痕檢驗實踐上，檢材已先用化學法、顯微鏡法和分光鏡法檢驗證明含有血（有血紅蛋白存在），然後才作沉澱反應試驗以判斷該血是否人血。如果這時（用抗人血清沉澱素）得到陽性結果，按理可以推論該檢材含有人血。可是，這僅僅是推論，並不是直接證明；在某種特殊場合，譬如一條手帕上先揩了人鼻涕，後再沾上牛血，這種檢材自然可以證明含有血痕（牛血），用抗人血清沉澱素作沉澱反應也會得陽性結果（有人鼻涕），通常，檢驗的結論會是：“該手帕上含有人血”，明顯的，這是錯誤。可是抗人血清沉澱素無法避免這個錯誤。這時，如果應用抗人血紅蛋白沉澱素，就不致發生錯誤。因為，抗人血紅蛋白沉澱素有所謂臟器特異性，即它只能與人血紅蛋白發生反應，不與其他的人體蛋白發生反應：這是抗人血紅蛋白沉澱素的一個重要優點。其次，一般認為抗血清沉澱素的效價不得超過 20,000 倍，因為微痕的蛋白到處都可能存在，太靈敏的抗血清沉澱素有時要發生錯誤^[2]。但是，在法醫學鑑定實踐中，有時檢材上血痕量很少，還往往要遭

受惡劣處理（如污染腐敗、淋雨或洗滌等等），所剩可溶性蛋白很少，如果不應用高效價沉澱素就有可能得不到陽性結果。此時如果應用抗血紅蛋白沉澱素則無此困難，因其效價不必受限制（動物的體蛋白可能因分泌物和排洩物而到處存在，血紅蛋白則很少有這種可能）。所以，高效價的抗血紅蛋白沉澱素是判定血痕種屬最理想的抗體。抗血紅蛋白沉澱素雖早於 1905 年由 Klein 氏^[1]製成，但由於製備上的困難，它的應用還不廣泛，國內外各實驗室大都還是應用抗血清沉澱素。本文介紹的結合膜下注射法則解決了這問題，絕大多數免疫動物都產生標準或更高效價的抗人血紅蛋白沉澱素。而且，要使其效價更高是有可能的，相信從提高動物中樞神經興奮性以及選擇更適當的免疫間隔期和抗原劑量等方面繼續探討，當能獲得解決。這樣，就可能使血痕的種屬判定更完善更可靠。

結 論

本文介紹另一種製備沉澱素血清的新方法——結合膜下注射法。實驗結果證明，所免疫的 20 隻家兔無一死亡，絕大多數都得到標準或更高效價的沉澱素血清。而從免疫次數、所需日期、免疫操作技術，尤其是抗原用量等各方面來作比較，也均較對照組（腹腔內注射和靜脈內注射）優越。

結合膜下注射法更解決了抗人血紅蛋白沉澱素血清的製備技術問題。如果推廣採用，各實驗室就可以普遍應用更理想的抗人血紅蛋白沉澱素，這樣，也就會使法醫學血痕鑑定更完善更可靠。

本文承科內陳安良教授領導，又得到本院微生物學教研組主任白施恩教授和病理生理學教研組主任湯澤光教授的熱情指導，以及科內同事們的協助，特此誌謝。

參 考 文 獻

- [1] 郭景元：用滴眼法製備沉澱素血清，微生物學報，5（4）：400—405，1957。
- [2] 波波夫，中國醫科大學法醫學教研組譯：法醫學，第 336 頁，人民衛生出版社，北京，1955 年。
- [3] 松下禎二：免疫學，第 2 版，第 825 頁，南江堂京都支店，京都市，1925 年。

PRODUCTION OF PRECIPITIN SERA BY THE SUBCONJUNCTIVAL INOCULATION METHOD

KUO CHING-YUAN

*Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Chung Shan
Medical College, Canton*

Since the results of our experiments with conjunctival instillation showed that the body reacts better to the antigen, we tried to improve the procedure for the production of precipitin sera by the subconjunctival route of inoculation.

Twenty rabbits were used for immunization with three kinds of human protein (normal serum, coagulated serum and hemoglobin). Among them eighteen rabbits (90%) produced anti-sera with a titer of 1:20,000 or above, while none of them died. As control, fourteen other rabbits immunized by intravenous inoculation and thirty-seven by intraperitoneal inoculation showed a total mortality of 33%. As regards to the number of injections of the antigen, the days required for the production of satisfactory precipitation, the technic of immunization, and, especially, the dosage of antigen, the subconjunctival inoculation method is definitely superior to the conventional method in current use, especially, in the preparation of anti-hemoglobin serum, which is of great significance in forensic medicine.