

適應性百日咳菌種的獲得與應用

陳正仁 何秋民

(衛生部生物製品研究所)

菌苗製造工作中主要的問題有二，一為尋找良好的培養基，一為選擇適宜的菌種。在我們工作中曾遇到過培養基不好時，百日咳菌苔生長很薄，雖經加入前文^[1]所報導的肝浸液而解決了問題的一部分，但仍有時遇到不長的現象。尤其是新分離的菌株生長得更加不穩定，從而使製造工作受到很大的困難。為了克服這個困難，並使菌株生長得很均衡，我們進行了選種工作。本文要報告這種適應性百日咳菌種的獲得方法，並說明兩年來應用該項菌株製造百日咳菌苗的情況。

使用材料

1. 菌種：本試驗所用的菌種有下列 7 株：

(一) C 及 P₅ 菌株 這種菌株為地方性菌株，經分離後在馬鈴薯甘油羊血瓊脂培養基上移種三代後，即用冷凍乾燥法製備，真空保存。

(二) C_{S20} 及 P_{5S20} 菌株 此種菌株為 C 及 P₅ 菌株在可溶性澱粉肝浸液羊血瓊脂培養基上(六號培養基)廣續移種經 20 代後，用冷凍乾燥法製備，真空保存。

(三) C_V 及 P_{5V} 菌株 此種菌株為 C 及 P₅ 菌株在六號培養基上所獲得的適應性菌株。

(四) C_{VBC20} 菌株 此種菌株為 C_V 菌株在馬鈴薯甘油羊血瓊脂培養基上，移種 20 代後，用冷凍乾燥法製備，真空保存。

2. 培養基：(一)三號培養基——即馬鈴薯甘油羊血瓊脂培養基，係用馬鈴薯甘油水浸液與瓊脂作成，加入 30% 羊血；(二)四號培養基——即馬鈴薯甘油肝浸液血瓊脂培養基，係於馬鈴薯甘油基礎培養基內加入 0.5% 胰，滅菌後再加入 25% 羊血及 5% 羊肝浸液；(三)六號培養基——即可溶性澱粉甘油肝浸液血瓊脂培養基，內含 2% 可溶性澱粉、1.5% 鹼性磷酸鹽、1% 胰、25% 羊血及 5% 羊肝浸液。

試驗方法及結果

為了使百日咳能在培養基上生長穩定，我們試用了兩種方法進行選種工作。

1957 年 3 月 6 日收到。

1. 多次傳代法：取百日咳菌 C 及 P₅ 號菌株，在六號培養基上移種，放置 37°C，經 48 小時培養後，再移種至另一批六號培養基上，希望通過多次移種而獲得有適應性的菌株。經移種 20 代適應後該兩菌株即命名為 C_{S20} 及 P_{S20} 菌株。經檢定仍為第一相百日咳菌，與未經多次傳代前的特性一致；惟以此菌株用於大批生產時在六號培養基上仍生長得不很穩定。由表三中可見 21 次接種中只有 14 次(66.6%)顯正常生長，而有 3 次(14.5%)生長很薄，另外 4 次(18.9%)不生長。由此很清楚看出該類菌株與原菌株同樣呈不穩定現象，以這樣傳代的方法並未能使菌種生長穩定。

2. 在不適宜的情況下培養：Miller 與 Bohnhaff^[2] 曾將腦膜炎球菌移種至含有鏈霉素的培養基上，因而獲得了兩種不同的菌落：一種菌落可以在標準的培養基上生長而仍保持對鏈霉素的抵抗力，另一種菌落僅只能在含有鏈霉素的培養基上才生長，而且這種對鏈霉素的抵抗力能長久保持。我們推測在不適宜的情況下使百日咳菌生長或可獲得有適應性的菌種。當我們發現百日咳菌在某一批培養基上不生長時，說明有某一種因素對它不利但繼續培養至 72—96 小時後，即見有少數單顆菌落長出。取出單顆菌落而獲得 C_V 及 P_{5V} 號菌株。

3. 獲得的適應菌株的檢查：爲了解所獲得的 C_V 及 P_{5V} 菌株的性質，我們對它與原菌種同時進行檢查。在菌形、紅血球凝集反應、血清學、對小鼠之毒力及毒性、家兔皮膚壞死以及免疫力試驗等方面均一致沒有差別。但 C_V 及 P_{5V} 在四號培養基上生長的菌落，較 C 及 P₅ 大，且 C_V 及 P_{5V} 在四號培養基上有顯著之適應性而且穩定。茲將血清學等方面檢查結果詳述於下：

(一) 血清學方面：取該四個菌株與同一批一相血清作凝集反應均能到達血清之效價(1:25600)。同時用四個菌株分別免疫家兔所得血清，與本菌及相關的菌液作交叉凝集反應，結果均無差別。隨後用 C 及 C_V 各分別吸收 C_V 及 C 血清；用 P₅ 及 P_{5V} 各分別吸收 P_{5V} 及 P₅ 血清。結果 C 及 C_V 血清內抗體均能被 C 及 C_V 菌液吸收到相當低的程度並且一致；P₅ 及 P_{5V} 血清用 P₅ 及 P_{5V} 交叉吸收後也可能到達一定程度而且一致。結果如表 1 所示：

由表 1 可看出所獲得的適應性菌株與原菌株在抗原性、凝集能力及吸收能力三方面均無差別。

(二) 免疫力試驗：取該四菌株用同批培養基製作小量菌苗，同時用它來使小鼠免疫，採用皮下二次免疫法，每次 5 億/0.5 毫升，中間相距七日。第二次免疫後十日，用腦內方法注射 18323 毒菌，觀察 14 日，按 Reed 及 Muench 氏法計算 50% 致死量(LD₅₀)。結果均有相當之免疫力，且各個菌株之間的免疫力並無差異。同時取適應性菌株單獨作免疫力試驗數次，所得結果見表二。另外此類適應性菌株在生產上已使用兩年而且用所製出的原液已作了百餘次的免疫力試驗，試驗結果亦均合乎要求。至於使用該項菌

苗進行預防接種的效果，據初步觀察亦屬有效。詳細流行病學調查正在觀察中。

表 1 C, C_V, P₅ 及 P_{5V} 交叉
吸收試驗之比較

血 清	吸收用抗原	作凝集反應用抗原及結果	
		C	C _V
C	—	1:12,800 (++)	1:12,800 (++)
	C	1:400 (-)	1:400 (-)
	C _V	1:400 (-)	1:400 (-)
C _V	—	1:6400 (++)	1:6400 (++)
	C _V	1:400 (-)	1:400 (-)
	C	1:400 (-)	1:400 (-)
P ₅	—	1:6400 (++)	1:6400 (++)
	P ₅	1:800 (-)	1:800 (-)
	P _{5V}	1:800 (-)	1:800 (-)
P _{5V}	—	1:6400 (++)	1:6400 (++)
	P _{5V}	1:800 (-)	1:800 (-)
	P ₅	1:800 (-)	1:800 (-)

表 2 適應性菌株 C_V, P_{5V} 與原菌
株 C 及 P₅ 免疫力試驗結果

試 驗 號	免疫用菌種	免疫力試驗之結果	
		對照小鼠 LD ₅₀ 菌數	免疫小鼠保護 LD ₅₀ 數目
1	C	167	4,490
1	C _V	167	6,832
2	C	338	23,610
2	C _V	338	23,610
3	C	142	5,129
3	C _V	142	8,512
4	P ₅	112	78,200
4	P _{5V}	112	41,818
5	P _{5V}	649	2,780
6	P _{5V}	473	8,000
7	P _{5V}	1083	6,920
8	C _V	112	13,400
9	C _V	425	27,600
10	C _V	184	2,822

(三)適應性之檢查：兩年來，用那些在四號培養基上大批生產百日咳原液時，曾將 C_V 及 C 作了 64 次並將 P_{5V} 及 P₅ 作了 48 次生長情況詳細觀察，又將每克氏瓶培養基上生長之菌苔各刮入 20 毫升 0.125% 福馬林鹽水內，經純菌試驗、無菌試驗合格後，分別各合併在一個裝有玻珠之瓶內，經搖盪後用光電比濁法測定濃度。結果見表 3。

表 3 適應性菌株與原菌株生長濃度之比較

菌種 號	接種克氏 瓶次數	生長正常		生長稍薄		不 長		平均 濃度*	平均濃度 之比例 以 C 及 P ₅ 之濃 度為 1
		次 數	百分率	次 數	百分率	次 數	百分率		
C	64	39	61.37%	12	18.7%	13	20.03%	23 億	1
C _V	64	60	93.8%	4	6.2%	0	0%	51 億	2.2
C _{S20}	21	14	66.6%	3	14.5%	4	18.9%	29 億	1.3
C _{VBG20}	21	21	100%	0	0%	0	0%	84 億	3.7
P ₅	48	27	57.9%	8	16.6%	13	25.5%	20 億	1
P _{5V}	48	45	93.5%	3	6.5%	0	0%	46 億	2.3

* 億菌體/1 毫升培養基。

由表 3 可以看出在 64 批不同培養基上，C_V 有 60 次生長正常，4 次稍薄，無一次

生長特薄或不生長之情況。但 C 則有 13 次生長特薄及不生長之現象。在 48 批培養基上, P_{5V} 有 45 次生長正常, 3 次稍薄, 無不長現象, 但 P_5 有 13 次生長特薄及不生長之現象, 且 C_V 及 P_{5V} 之平均濃度比 C 及 P_5 濃 2.2 倍。因此可明顯看出 C_V 及 P_{5V} 在四號培養基上有顯著之適應性。

(四)穩定性之檢查: 新獲得的菌株雖顯示有適應性, 但所獲得的適應性是否穩定值得檢查。因此取 C_V 菌株改在三號培養基上傳代, 經 20 次接種後的菌稱為 $C_{VBG_{20}}$ 菌株, 隨後再詳細檢查。經檢定其仍為一相百日咳菌, 且在 21 次大批生產百日咳原液中與 C_V 有同樣之適應性, 菌苔生長較厚, 且穩定(表 3)。同時用 C, C_V 及 $C_{VBG_{20}}$ 菌株分別製造之菌液。作免疫力試驗, 結果對小鼠均有相當的免疫力(表 4)。

表 4 C, C_V 及 $C_{VBG_{20}}$ 菌株免疫力之比較

試驗號	免疫苗	對照小鼠 LD ₅₀ 菌數	免疫小鼠能保護 LD ₅₀ 數目
11	C	282	9,883
	C_V	282	1,729
	$C_{VBG_{20}}$	282	1,115
12	C	275	6,088
	C_V	275	9,409
	$C_{VBG_{20}}$	275	4,704

由表 3 表 4 可以看出已適應於含膽之六號培養基上之 C_V 菌株, 雖在不含膽之三號培養基上經 20 代之傳代仍能很穩定地保持在含膽培養基上之適應性。

討 論

細菌在不完全適合的培養基上, 有時有不易生長或生長很少的現象, 但經多次傳代後可能逐漸適應於某一種培養基, 如 Pollock^[5] 氏用多次傳代方法, 使一相百日咳菌能逐漸生長於含血少以致不含血之培養基上。列維茨卡婭^[4] 將大腸桿菌於含煮沸殺死的痢疾菌液的培養內多次傳代可使大腸桿菌逐漸在生化反應及血清學反應方面獲得痢疾菌之特性。因此我們相信用多次傳代方法可獲得適應於該培養基的菌種。但我們曾用百日咳菌在六號培養基上經 20 次連續傳代, 仍未能獲得顯著之適應於該培養基之穩定性。原因是複雜的, 一方面可能是 20 次傳代次數太少, 尚需更多次傳代; 另外考慮到可能是所使用的培養基本身不穩定的緣故。Dawson^[5] 認為膽對百日咳菌有抑制生長作用, 特別是新分離之菌種, 我們的 C 及 P_5 菌株在不含膽之三號培養基上, 生長穩定, 無不生長之現象, 但在含膽之四號六號培養基以及含膽不加羊肝浸液之六號培養基上則均生長得不穩定, 因此我們認為 C 及 P_5 生長不穩定之情況可能與膽有關, 但關鍵問題

似乎不僅是 C 及 P₅ 不能利用膽的問題。我們的經驗在不同批甚至同批同瓶的膽所作之不同批培養基上，百日咳菌有時仍有不生長的情況，故認為可能是製造過程及操作過程中未能完全一致而形成培養基本身批與批間有些質量方面的改變，而形成影響百日咳菌生長不好的因素。百日咳菌 C 及 P₅ 在 20 次傳代中，只有三次生長較薄且無不生長現象，這一事實可說明在 20 次傳代過程中未遇到嚴重不利於生長的因素，及未經常遇到稍不利於生長之因素，所以就很難對此不利因素獲得適應性。

C 及 P₅ 在某一含膽之六號培養基上於 37°C 經 24 小時培養後，未見生長，繼續培養到 72 小時，大多數菌仍未繁殖，僅少數菌克服了對它不利的因素，因而形成 C_V 及 P_{5V} 之適應性菌株。大家都知道生物是有變異及遺傳的特性的，有機體發生變異的原因是因外界生活條件的影響及個體之差異，因此許多同一株之百日咳桿菌雖然受到同一種不利因素，但因百日咳菌個體之不同而大部不能生長，但有少數經長時期鬥爭，克服了不利因素而繼續繁殖。C_V 及 P_{5V} 是在對百日咳菌不利的情况下發育出來的，由此可見，P_{5V} 及 C_V 在不利的環境中經過長期培養可獲得穩定的適應性的這一事實，在理論上是可以得到說明的。

據文獻所載，細菌因培養基成份的改變，可使它增加適應的酶，如 Stephenson^[6] 及 Yudkin^[7] 等氏證明大腸桿菌所以能從葡萄糖或甲酸中產生氫，是由適應的葡萄糖脫氫酶與甲酸脫氫酶所致，但有時菌株也可能因除去抑制因素而使生長繁殖不受阻礙。在我們的工作中，適應性百日咳菌株的獲得是否因該菌增加了適應酶抑或除去了抑制因素，我們尚缺乏試驗，有待於今後作進一步的研究。至於適應酶與細菌既有酶亦可能因培養基的情況不同而有所改變，適應酶增加以後亦可變成既有酶，即成為細菌的構成部分，經過長期傳代後亦不消失；如果我們獲得的適應性百日咳菌株是因增加了適應酶，那麼這種酶在這些菌株中可能已變成既有的酶，因為這些菌株在另外的環境下，即不含膽的三號培養基傳代 20 次再返回四號培養基時仍生長穩定，因此可說 C_V 菌株所獲得之適應酶已變為既有酶了。C_V 及 P_{5V} 菌株適應性之獲得，並未改變它的一相特性，很可能只是營養方面酶的增加與改變並未影響它的抗原性與免疫性，故仍可用作菌苗。

摘 要

1. 用多次傳代方法在六號培養基上，經 20 代傳代所獲得之 C₈₂₀ 菌株，雖仍為一相百日咳桿菌，但未獲得在含膽培養基上生長穩定之適應性。

2. C 及 P₅ 菌株在不適宜的情况下長期培養而獲得之 C_V 及 P_{5V} 菌株，經多次全面檢查仍為一相百日咳桿菌，合乎生物製品法規之要求。在血清學、毒力、毒性、免疫力等方面與原菌株 C 及 P₅ 均一致，但在含膽之四號培養基上生長穩定有顯著之適應性。

3. 兩年來 100 批大量生產百日咳原液中充分證明了 C_V 及 P_{5V} 在四號培養基上之適應性，且在免疫力方面與原菌株所作原液無差別。因 C_V 及 P_{5V} 生長穩定，故較原菌株 C 及 P_5 所生產之原液之濃度提高 200% 以上。該適應性地方性菌株是理想而適合於生產百日咳菌苗用的菌種。

參 考 文 獻

- [1] 何秋民、陳正仁：羊肝浸液在百日咳菌苗生產上的應用，微生物學報，5 (1): 75: 82.
- [2] Miller, C. P. & Bohnhaff M.: *J. Bact.*, 54: 467, 1947.
- [3] Pollock, M. R.: *Brit. J. Exp. Path.*, 28: 295, 1947.
- [4] 列維茨卡婭：微生物學譯報，2: 6, 393, 1954.
- [5] Dawson, B. Farnworth, E. H. McLead, J. W. & Nicholson, D. E.: *J Gen. Microbiol.*, 5: 2, 408, 1951.
- [6] Stephenson, M. & Stiekland, L. H.: *Biochem. J.* 26: 712, 1932. *Biochem. J.*, 27: 1528, 1932.
- [7] Stephenson, M. & Yudkin, J.: *Biochem. J.*, 30: 506, 1936.

ADAPTATION OF *H. PERTUSSIS* AND APPLICATION

CHEN C. J. and Ho C. M.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

One of the important steps in the preparation of vaccines, including pertussis vaccine, is the choice of suitable strains of the micro-organisms which not only fulfill the antigenic requirements but show consistent good growth in a given medium. It is general experience that phase I *H. pertussis* grows very poorly especially when freshly isolated irrespective of nutritional adjustment. For this reason, means was sought for improvement in this direction.

The conventional method of simple adaptation has been used. A number of local strains has been subjected to serial transplantations on starch medium but with no noticeable improvement after 20 passages. Incidentally, two cultures (C & P_5) which gave no growth during the first 48 hours' incubation presented existence of multiplication in the form of scanty single colonies upon prolonged incubation. Subcultures (C_V & P_{5V}) taken from these colonies showed regular and luxuriant growth on Bordet-Gengou medium containing peptone. They were compared with the corresponding original parent cultures with respect to morphology, serology, virulence, toxicity, immunogenity and skin reactions, and the results were identical. Repeated examinations revealed that the variant strains could maintain the phase I cultural and immunological characteristics and that they were stable in their growth behaviour, and comparing with the corresponding original C & P_5 cultures they gave much higher yield in vaccine production.