

乙型腦炎疫苗製備方法的研究

I. 製備疫苗所用的稀釋液和部分除去鼠腦組織 對疫苗效價及其保存時間的影響*

柳元元 李佩筠

(中國醫學科學院病毒學系)

王逸民和黃禎祥二氏在 1949 年曾報告了用國內分離的流行性乙型腦炎病毒進行福爾馬林滅活疫苗的製備試驗，並在 1952 年做了一些有關疫苗接種方法的實驗研究^[1]。這些試驗的結果在實際的防疫工作中曾起了一定的作用^[2]。

但是關於流行性乙型腦炎疫苗的製備和保存，到目前為止還存在着一些問題，即關於疫苗免疫效價的持久性、疫苗中鼠腦組織的滅除對疫苗免疫效價的影響，和使用其他稀釋劑製備疫苗以提高疫苗的效價的可能性等問題。對這些問題過去很少報告，一般認為：一、疫苗中鼠腦組織的滅除能引起疫苗效價的降低；二、乙型腦炎疫苗效價的保存不能超過六個月。解決上述問題在實際上是十分重要的，因此本文在這些方面進行了一些探討。

我們在另一篇報告^[3]中曾指出，用一種含有 5% 的乳糖和某些鹽類的溶液製備病毒懸液時，病毒的滴度比用脫脂牛奶或生理鹽水製備時為高，而保存的時間也比用生理鹽水製備的病毒懸液為長。因此，本試驗採用上述的乳糖溶液製備疫苗，比較此種疫苗和用生理鹽水製備的疫苗的免疫效價和保存時間。

由於考慮到不同的防腐劑對疫苗的免疫效價可能有一些影響，因此本文同時觀察用硫柳汞或硝酸汞苯為防腐劑時疫苗免疫效價的差別。

材 料 和 方 法

- (一) 病毒毒株——京衛研毒株，均經在三週齡的小白鼠腦內傳到 19—20 代。
- (二) 疫苗的製備方法——基本上按照王逸民和黃禎祥二氏所述的，但稀釋液分別

* 本文的摘要於 1956 年 6 月曾在中國醫學科學院第二次論文報告會上宣讀。
1957 年 3 月 15 日收到。

用 pH 8.0 的生理鹽水(即一般採用的)和 pH 爲 7.6 的乳糖溶液¹⁾。前者標明爲生理鹽水疫苗，後者爲乳糖溶液疫苗。疫苗製備後即置於 4—5°C 的冷室內 15 天使之滅活。滅活劑採用福爾馬林，先加入於稀釋液中，按計算使製成的懸液中最後含甲醛 0.2%。在滅活期間內每天至少將疫苗振盪二次。在 15 天後同時進行疫苗效價的滴定和安全鑑定。本試驗中所製備的疫苗在 15 天的滅活後安全鑑定都合格。

(三)蛋白質的測定和滅除——在病毒懸液製成並加入一定量的福爾馬林拌攪均勻後，立即取出一部分懸液放在遠心沉澱器中，以 2,000 轉/分的速度沉澱 20 分鐘以去除一部分的鼠腦組織。用 Folin 和 Farmer 二氏的方法^[4]測定沉澱的和不沉澱的疫苗的總氮含量。沉澱的和不沉澱的疫苗在滅活後均分別用消毒的硬質玻璃管分裝，再用石蠟封口，然後放在 4°C 的冰箱內保存。

(四)疫苗免疫效價的滴定——疫苗免疫效價的滴定基本上按照 Sabin 等氏用一定量的疫苗免疫小白鼠然後用不同劑量的病毒通過腹腔攻擊的方法。取三週齡的小白鼠 30 隻(體重約爲 7—10 克)，在第 1 天各由腹腔注射 0.15 毫升不稀釋的疫苗，在第 4 天再注射同樣劑量的疫苗，在第 8 天(即第一次免疫後的第 7 天)將小白鼠分爲五組，每組 6 隻，分別用不同稀釋度的對小白鼠腹腔具有高度感染力的鼠腦病毒(對三週齡小白鼠的腹腔 LD₅₀ 滴度在 10⁻⁷ 以上)懸液接種於小白鼠的腹腔，每鼠接種 0.3 毫升。用一組年齡相同的正常小白鼠作爲對照。觀察三個星期。計算免疫組和對照組的 LD₅₀ 滴度。用對照組的 LD₅₀ 滴度的對數減去免疫組的 LD₅₀ 滴度的對數，即爲疫苗的免疫效價的對數。在疫苗的保存時期內每隔三個月滴定一次疫苗的免疫效價。

(五)在用硝酸汞苯和硫柳汞作爲防腐劑的試驗中，前者的最後濃度爲 1/50,000，後者爲 1/10,000。防腐劑均在病毒懸液製成後立即加到懸液中的。

試驗的結果

(一)生理鹽水疫苗在保存時間內免疫效價的變動——在這個試驗中製備了五批生理鹽水疫苗，均在沉澱後進行滅活然後滴定其免疫效價。其中的三批有不沉澱的對照。免疫效價滴定的結果如表 1、2 所示。從表中可以看出：

1. 經用 2,000 轉/分沉澱 20 分鐘後的疫苗比不沉澱的每毫升容積中的總氮含量平均減少 51.8%。
2. 沉澱的和不沉澱的生理鹽水疫苗的免疫效價都沒有明顯的差別，相反地，沉澱疫

1) 此溶液每 1000 毫升中有 K₂C₆H₆O₇·H₂O 1.35 克；Na₂C₆H₆O₇·2H₂O 2.45 克；K₂HPO₄ 0.61 克；MgCl₂·6H₂O 0.60 克；K₂CO₃·5H₂O 1.00 克；Lactose 50.0 克；CaCl₂(無水)1.33 克。CaCl₂ 單獨溶解在 200 毫升的蒸餾水中，其他逐一溶解在 750 毫升的蒸餾水中，相混合後加蒸餾水到 1000 毫升，用 1N 的乳酸調整 pH，再用玻璃濾器過濾除菌。

表 1 不沉澱的生理鹽水疫苗在保存時期中免疫效價的變動

		疫 苗 批 號			平均免疫 效價的對數	保存時期內的 效價和製成時 效價的比較*	平均每毫克 氮素的免疫 效價的對數
		I	II	III			
原懸液病毒的滴度 log LD ₅₀ /0.03 毫升		8.6	7.7	—			
總氮含量, 毫克/毫升		1.40	1.89	1.80			
各疫 苗保 存價 (對 數) 的 免	0	4.9	4.5	5.7	5.2	—	5.5
	3 月	4.4	4.8	—	4.6	25%	4.9
	6 月	>4.7	4.5	4.9	4.8	40%	5.0
	9 月	2.8	3.7	—	3.5	3%	3.8
	12 月	4.0	3.6	3.8	3.8	4%	4.1

表 2 沉澱後的生理鹽水疫苗在保存時期中免疫效價的變動

		疫 苗 批 號					平均免疫 效價的對數	保存時期內的 效價和製成時 效價的比較*	平均每毫克 氮素的免疫 效價的對數
		I	II	III	IV	V			
原懸液病毒的滴度 log LD ₅₀ /0.03 毫升		8.6	7.7	—	—	—			
總氮含量, 毫克/毫升		0.88	0.69	0.88	0.82	0.82			
各疫 苗保 存價 (對 數) 的 免	0	5.2	5.5	5.1	>5.3	>5.3	>5.3	—	5.9
	3 月	4.2	5.4	—	—	—	5.1	<64%	5.7
	6 月	3.9	4.5	5.2	4.6	4.7	4.7	<26%	5.4
	9 月	5.0	3.9	—	—	—	4.7	<26%	5.3
	12 月	4.8	3.4	3.7	3.5	4.3	4.2	<9%	4.9

* 根據平均免疫效價計算。

苗的效價一般比不沉澱的稍高。根據試驗的結果, 如果以每毫克氮的保護效價計算, 則沉澱的疫苗效價比不沉澱的平均高 3.5 倍。

3. 沉澱的或不沉澱的生理鹽水疫苗, 在 4—5°C 的冰箱內保存時, 疫苗的效價均繼續下降。在六個月後平均損失 60—74%, 在一年以後平均損失 91—96%, 但仍然具有某種程度的免疫作用。

因此, 試驗的結果說明, 用低速沉澱去除疫苗中 50% 以上的鼠腦組織, 並不影響疫苗的效價。但是試驗同時說明, 用生理鹽水製備的疫苗保存時是比較不够穩定的。

(二) 乳醣溶液疫苗在保存時期內免疫效價的變動——這個試驗所用的病毒材料全部和上一試驗相同, 只是在稀釋病毒時先把同一批受染的鼠腦組織分為兩分, 一分加入生理鹽水, 另一分則加入乳醣溶液。免疫效價滴定的結果如表 3、4 所示。

表 3 不沉澱的乳醣溶液疫苗在保存時期中免疫效價的變動

		疫 苗 批 號			平均免疫 效價的對數	保存時期內的 效價和製成時 效價的比較*	平均每毫克 氮素的免疫 效價的對數
		I	II	III			
原懸液病毒的滴度 log LD ₅₀ /0.03 毫升		8.6	7.7	—			
總氮含量, 毫克/毫升		1.40	2.10	1.80			
各疫 保效 存價 (對數) 的免	0	5.5	> 5.5	> 5.7	> 5.6	—	> 5.9
	3 月	> 5.2	> 5.5	—	> 5.4	63%†	> 5.7
	6 月	> 4.7	> 4.9	> 5.2	> 5.0	25%†	> 5.2
	9 月	> 5.3	5.0	—	> 5.2	40%†	> 5.5
	12 月	5.1	—	> 5.5	> 5.4	63%†	> 5.7

表 4 沉澱後的乳醣溶液疫苗在保存時期中免疫效價的變動

		疫 苗 批 號					平均免疫 效價的對數	保存時期內的 效價和製成時 效價的比較*	平均每毫克 氮素的免疫 效價的對數
		I	II	III	IV	V			
原懸液病毒的滴度 log LD ₅₀ /0.03 毫升		8.6	7.7	—	—	—			
總氮含量 毫克/毫升		0.85	0.67	0.88	0.81	0.81			
各疫 保效 存價 (對數) 的免	0	> 5.5	> 5.5	> 5.7	> 5.3	> 5.3	> 5.5	—	> 6.1
	3 月	> 5.2	> 5.5	—	—	—	> 5.4	80%†	> 6.0
	6 月	> 4.7	> 4.9	> 5.2	> 5.3	> 5.3	> 5.1	40%†	> 5.9
	9 月	> 5.3	4.7	—	—	—	> 5.1	40%†	> 5.7
	12 月	5.2	—	> 5.5	> 5.1	> 5.1	> 5.3	71%†	> 5.9

* 根據平均免疫效價計算。

† 由於實際免疫效價大多高於表中所示的, 因此這個百分數只供參考。

從表中可以看出:

1. 用低速沉澱減去平均約 54% 的鼠腦組織並不影響疫苗的免疫效價, 而沉澱後的疫苗每毫克氮的保護效價比不沉澱的平均高 2.5 倍。

2. 用乳醣溶液製備的疫苗在保存一年的時期內, 疫苗效價的降低一般不甚顯著。在保存一年的時期後平均可能只降低了 29—37%, 而效價的降低在沉澱的和沉澱的疫苗都沒有明顯的差別。

(三) 生理鹽水疫苗和乳醣溶液疫苗的比較——在圖 1 中比較了二種疫苗在各保存時期中免疫效價的變動情況。比較的結果說明, 用乳醣溶液製備的疫苗各時期的平均免疫效價不但比生理鹽水疫苗為高, 而且也比較穩定。以各時期的免疫效價的平均數看來, 前者比後者平均高 5—10 倍。如果以疫苗製成時的免疫效價為 100, 那麼在第 12

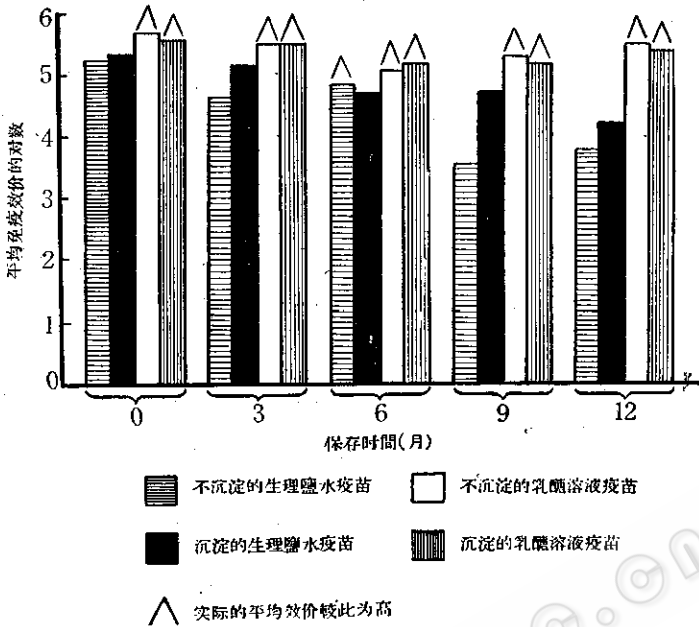


圖 1 生理鹽水疫苗和乳糖溶液疫苗在各保存時期中免疫效價的比較

個月終了時後者的效價只有原來的 4—9%，而前者則至少還有原來的 63—71%。

由於在沉澱後疫苗中所含的鼠腦組織比原來減少了 50% 以上，因此正如表中所示，二種疫苗在沉澱後每毫克氮的免疫效價都比不沉澱的至少高一倍。

(四)在用硫柳汞和硝酸汞苯作為疫苗的防腐劑的多次的試驗中得出這樣的結果：二種防腐劑所製成的疫苗的效價都沒有明顯的差別。

討 論

Sabin 等氏 1943 年^[5]曾報告，如果病毒懸液不經沉澱即用以製備疫苗，則其免疫效價比較沉澱(用每分鐘 3,000 轉，沉澱 30 分鐘)後再用以製備的要高 3—10 倍；即使以 2,000 轉/分沉澱 10 分鐘再製備疫苗，其免疫效價亦大見降低。但是在我們的試驗中，沉澱的和沉澱的疫苗效價並沒有明顯的差別(應該指出，我們是在加入規定量的福爾馬林以後再將懸液沉澱的)。

Duffy 和 Stanley 二氏雖然在 1945 年的試驗中^[6]觀察到，在加入福爾馬林以後再以 5,000 轉/分沉澱 10 分鐘，結果疫苗的效價在多數的滴定中並無降低的現象，但是却認為不能用沉澱的方法除去足夠多量的鼠腦組織，而仍然可以獲得有效的乙型腦炎病毒。我們的試驗證明減去至少 50% 的鼠腦組織並不影響疫苗的原有價。我們根據自己試驗的結果和上述作者的材料作出這樣的推論：當用一定量的福爾馬林進行該病毒的滅活時，福爾馬林加入的時間可能影響疫苗的效價。如果在病毒材料沉澱後再

加入規定量的福爾馬林，則懸液中的甲醛含量可能過多，因而在一定程度上破壞了病毒顆粒的抗原性，降低了疫苗的免疫效價。根據這個推論如果將病毒懸液沉澱後再加入福爾馬林，則後者的使用量可能需要適當地減少。福爾馬林的使用量可能和懸液中蛋白質的含量有一定的關係，但無疑地應有其最小的有效的限度。

由於沉澱可以除去一定量的鼠腦組織，我們認為這樣製備的疫苗可能減少在免疫接種時由於這些物質所引起的不良反應。這在疫苗的應用上具有實際的意義。

用福爾馬林滅活的流行性乙型腦炎疫苗在冰箱內保存時，疫苗的效價一般繼續降低。Шубладзе 等氏指出：疫苗效力的保存不能超過六個月^[7]。在我們的試驗中，生理鹽水疫苗在保存一年後效價只有原來的 4—9%，但是乳糖溶液疫苗在同一保存時期後疫苗的平均效價仍有原來的 60% 以上。因此，在製備乙型腦炎疫苗時使用這種乳糖溶液無疑地會獲得比較滿意的結果。

乳糖疫苗的免疫效價比生理鹽水高而且在保存時比較穩定的原因可能是由於：

1. 在這種乳糖溶液中，病毒比較容易從組織中釋放出來，這樣便提高了懸液中病毒的量，因而同時提高了疫苗的免疫效價。我們在另一篇報告^[8]中曾觀察到並討論了這個問題。
2. 乳糖溶液可能在一定程度上減少了病毒顆粒由於氧化和懸液中的電解質所引起的破壞作用，因此對病毒的抗原性同時起了保護作用，提高了疫苗的免疫效價及其穩定性。

摘 要

(一)乙型腦炎疫苗在用每分鐘 2,000 轉的速度沉澱 20 分鐘後，疫苗中的總氮含量比較不沉澱的減少 50% 以上，但是疫苗的效價不論在其製成時或在保存一年的各時期內，都沒有比不沉澱的低。

(二)用含有 5% 的乳糖和一些鹽類的溶液製備的疫苗的免疫效價在各保存時期內都比用普通的生理鹽水製備的疫苗為高，而且比較穩定。

(三)本文同時討論了福爾馬林的使用量和疫苗中蛋白質的含量的關係。

參 考 文 獻

- [1] 王逸民、黃禎祥：中華醫學雜誌，32：(12)，1062—1064 頁，1952 年。
- [2] 中央衛生研究院微生物學系病毒室：中華醫學雜誌，32：(1)，36—38 頁，1952 年。
- [3] 柳元元、李佩筠：中國醫學科學院第二次科學論文摘要，1956 年 6 月。
- [4] Folin, O., & Farmer, C. I.: *J. Biol. Chem.*, 11: 493, 1912.
- [5] Sabin, A. B., Duffy, C. E., Warren, J., Ward, R., Peck, J., & Ruchman, I.: *J. Am. Med. Assn.*, 122: 477, 1943.
- [6] Duffy, C. E. & Stanley, W. M.: *J. Exp. Med.*, 82: 384, 1945.

- [7] Шубладзе, А. К. и Гайддмович, С. Я.: "實用病毒學簡明教程"俄文版, 1954年, 238頁。
[8] 張永南、柳元元: pH和鹽類的濃度對乙型腦炎病毒懸液的感染效價之影響(尙未發表)。

STUDIES OF THE METHOD FOR PREPARING JAPANESE B ENCEPHALITIS VACCINE

I. Influence of Diluents and Elimination of Mouse Brain Tissue upon the Protective Titre of the Vaccine during Storage

(SUMMARY)

LIU YUAN-YUAN and LEE PEI-CHUN

Two methods for preparing Japanese B encephalitis vaccine were investigated. The protective titres of the vaccines prepared by these methods were observed and compared with that of the vaccine prepared according to the customary method, i.e., using physiological saline as diluent and prepared without centrifugation.

In the first method the vaccine was partially purified by means of low-speed centrifugation (at 2,000 r.p.m. for 20 mins.) as soon as formaldehyde and preservative had been added. After inactivation at 4°C for 15 days, it was then stored at 2—4°C for one year. A part of the same vaccine being taken without preliminary centrifugation and stored at the same condition. The protective titres of the two vaccines were determined at different intervals during storage. No significant difference was found between the two at each period.

More than 50% of the mouse brain tissue originally present in the vaccine were removed by means of low-speed centrifugation as calculated according to its N content.

In the second method a solution containing 5% lactose and certain mineral salts was used as diluent to prepare the vaccine. The vaccine was also stored at 2—4°C, and the protective titre of this vaccine was compared with that of the vaccine prepared according to the customary method and kept at the same condition. Results showed that at each period of storage, the vaccine prepared by using lactose solution as diluent gave a protective titre several times higher than that using physiological saline. At the end of one year, the former showed no significant drop in its titre, while that of the latter decreased to about 4-9 % of its original value.

The effect of formaldehyde upon the immunizing capacity of the vaccine has been discussed.