

流行性乙型腦炎疫苗免疫方法的研究 豚鼠和家兔以不同途徑免疫 后血中抗体的測定

盧錦漢 張永福 刘鳳岐

(中央生物制品所, 北京)

关于生物制品采用不同免疫途徑与免疫力產生的关系, 很早就有人注意过, 伤寒菌苗和伤寒霍乱混合菌苗用皮內注射, 經國內外学者們的試驗, 都認為是可以產生相当高的抗体^[1,2,3]。破伤風类毒素免疫家兔, 肌肉注射較皮下注射所產生的抗毒素高2倍^[4]或高5—10倍^[5]; 狂犬疫苗用 Habel 氏的方法^[6]做效力試驗, 腹腔免疫較皮下免疫保护指数要高很多^[7], 此点我們亦有試驗証实。流行性乙型腦炎(以后简称腦炎)疫苗据王氏的报告^[8], 腦炎疫苗在家兔的免疫注射試驗中, 虽然皮內的注射量較皮下者小10倍, 就血中抗体產生的情况却没有顯著差別。腦炎疫苗的制造歷史很短, 1942年 Sabin 氏^[9]才試制鼠腦疫苗, 1945—1946年才大量用于人体^[10]。我國腦炎疫苗的制造开始于1950年, 1951年始正式应用^[11]。关于免疫方法, 正如湯氏所言: “注射部位与免疫力的產生有莫大关系……我們應該努力研究。”^[12]本文目的是报告用豚鼠和家兔以皮下、皮內及肌肉三种途徑注射后, 分別以中和試驗的方法測定血中抗体產生的情况。

材料和方法

材料: 免疫动物所用的疫苗为本所1954年產品, 經檢定合格者, 效力試驗用 P₃ 毒株的攻击可保护200个 LD₅₀, 对 47 毒株的攻击可保护2500个 LD₅₀。所用的家兔和豚鼠皆为本所試驗动物飼养所供給。

方法: 將試驗动物分为三組, 每組家兔豚鼠各4只, 分別于腹部皮下、腹部皮內及后大腿內側肌肉進行免疫。皮下和肌肉每次1毫升, 皮內每次0.1毫升, 共免疫三次, 每次間隔一星期。于末次免疫后第1、2、3、5、8、12、16、21周由心臟采血, 分出血清, 以56°C加温滅能后, 用47株毒种做中和試驗。

中和試驗的方法,系將血清稀釋一倍后,再于等量的血清中加等量不同稀釋度的病毒懸液(感染鼠腦研磨后用 pH7.2 的緩冲生理鹽水稀釋之,由 10^{-1} — 10^{-9}),混合后放入 37°C 孵箱,中和 2 小时后立即放置冰浴中,每一稀釋度注射 9—12 克体重的小白鼠 4 只,观察 14 天,3 日前死亡者不算,用 Reed 及 Muench 氏^[13]的方法計算結果,以中和指数表示。

結 果

每次試驗皆于采血后一周內進行中和試驗,試驗前血清冻结保存。由圖 1 可以看

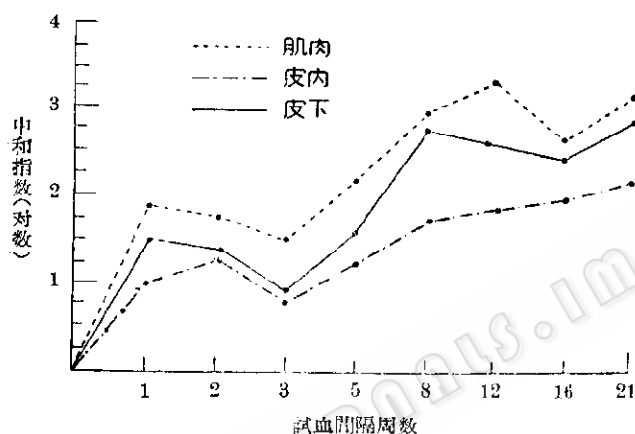


圖 1 豚鼠免疫后不同時間試血的平均結果

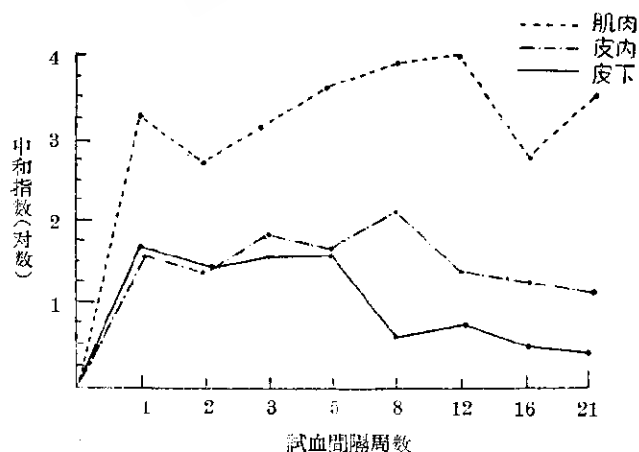


圖 2 家兔免疫后不同時間試血的平均結果

出:豚鼠于末次免疫后第五周,皮下及肌肉注射組抗体开始顯著增加,皮内注射組抗体增加較慢,所有免疫試驗豚鼠抗体的產生直至 21 周仍未見顯著下降,皮内注射組且有繼續上升趋势,肌肉注射組在第 8—12 周抗体之產生最高,在每次測定血中抗体时,肌肉注射組所得中和指数都較皮下皮内注射組高。从圖 2 可以看出:家兔于末次免疫后第 7 天,血清中就可以測出抗体,由于免疫途徑不同,抗体產生的多少与維持時間不一致,肌肉注射組至 21 周仍有很高的抗体存在,而皮下于第 8 周抗体已漸消失,皮内注射組于第 8 周为抗体產生的最高峰,以后亦有下降趋势。在每次測定中,肌肉注射組的中和指数和豚鼠一样,皆顯著为高。此外,由于动物种类不同,虽免疫方法一样,而抗

體產生情況亦有區別，中和抗體的出現家兔較豚鼠為早。

討 論

由以上的結果，不論豚鼠或家兔，用腦炎疫苗免疫後，肌肉注射組所產生的抗體皆顯著為高，根據 Р. Я. Зольмановиц 及 Д. Ф. Площитвей 氏用破傷風類毒素做抗毒免疫形成上的試驗結果^[4]，以巴甫洛夫關於病理過程和防禦機能統一的概念來看問題，認為肌肉的神經組織對破傷風類毒素是特別敏感的。那麼我們的試驗結果，用腦炎疫苗免疫亦有同樣現象，肌肉注射組較皮下和皮內組都好，這樣是否在肌肉組織中對腦炎免疫形成上亦有特別敏感的神經末梢。本試驗結果再次證明注射部位對所引起效果有其一定的意義，免疫注射亦同樣應考慮到注射部位與方法問題。但目前預防注射一般多採用皮下注射法，我們認為關於免疫方法的問題應作更進一步的研究。

血中抗體量的多少對腦炎的免疫，我們認為是有意義的，腦炎系由蚊蟲吸血而傳染，多年來經國內外學者們的研究^[14,15,16]已追証實。臨床診斷往往亦以抗體的增加而得到確診^[18]。就這些現象來看，既然腦炎是由血液循環所傳染的疾病，那麼血中抗體的多少，對腦炎的免疫來說是有其作用的，抗腦炎血清的應用^[20]更可說明此點，這與流行性感胃血中抗體量增多不能完全代表免疫^[19]是有不同之處的。

對照組 LD_{50} 之高低，對中和指數是有影響的，王用楫等^[11]在作腦炎疫苗效力試驗時，亦有相似情況。對照組 LD_{50} 在 $10^{-7.5}$ — $10^{-8.5}$ 之間所得的結果比較可靠，如對照組 LD_{50} 高，測得的中和指數一般偏高。中和指數在 50 以下無意義，此亦與免疫指數在 50 以下無意義一樣^[11]。

在我們末次試驗中家兔肌肉注射組因採血死亡僅剩 2 只，似乎代表價值不大。根據我們試驗的經驗，在進行中和試驗時所用毒株的毒力必要有相當的把握，每次試驗所用工具和操作人員應相同，中和後亦應於 1—2 小時內注射完畢，每次試驗的條件都要一致，才能得出比較準確的結果。

結 論

(1) 腦炎疫苗用肌肉注射法免疫，不論是豚鼠或家兔所產生的抗體不但較高，且維持時間較長。

(2) 家兔的結果，皮下和皮內免疫的量雖相差 10 倍，所得的效果卻無區別，與王氏的報告符合。

(3) 採用同樣免疫方法，中和抗體的出現家兔較豚鼠為早。

参 考 文 献

- [1] 胡修元: 中華医学雜誌, 1953年11号, 810—814.
- [2] 毛采章: 医务生活, 1953年12号, 1—2.
- [3] Siler, J. F. & Dunham: *Am. J. Pub. Health*, 1939, 29: 75.
- [4] 微生物学譯报: 1954年, 1(2): 146—147 (張寬厚譯自苏联微生物学流行病学及免疫学雜誌, 1953年1月号, 69—71頁).
- [5] 东北医学雜誌, 1952年7月, 636—640 (小萌譯自苏联医学1951年11期).
- [6] Federal Security N. I. H. Minimum Requirement, rabies vaccine, 1946.
- [7] Habel, K: *Pub. Health Rep.* 1940, 55: 1473—1487.
- [8] 王逸民、黃禎祥: 中華医学雜誌, 1952年12号, 38: 1062.
- [9] Sabin, A. B. *J.A.M.A.*, 1943, 122: 177.
- [10] Sabin, A. B. *J.A.M.A.*, 1947, 133: 281.
- [11] 王用楫等: 微生物学报, 1953, 1(1): 97—110.
- [12] 湯飛凡: 微生物学会通訊, 1954, 1: 4, 17.
- [13] Reed, L. J. & Muench, H. *Am. J. Hyg.* 1938, 27: 493.
- [14] 黃禎祥等: 中華医学雜誌, 1951年4号, 296—299.
- [15] 黃禎祥等: 中華医学雜誌, 1951年4号, 300—340.
- [16] Mitamura, T., Kitaoka, M., Mori, K. and Okubo K. *Tokyo Ijt, Shinshi*, 1938, 62: 820 (由文獻 14引証).
- [17] Reeves, W. C. & Hamomon, *Med. J. Exp. Med.*, 1946, 83: 185.
- [18] 宋齡等: 中華医学雜誌, 1951年, 4号, 287—295.
- [19] Fazakas, *Austr. J. Exp. Biol. & Sci.*, 1951, 29: 322—352.
- [20] 戚景儒: 微生物学报, 1953年, 1(2): 202—210.

STUDIES ON ANTIBODY TITRE AFTER INOCULATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VACCINE BY DIFFERENT ROUTES

LU CHIN-HAN, CHANG YUNG-FU AND LIU FENG-CHI

National Vaccine Serum Institute, Peking

In a previous report from Central Health Research Institute, Wang stated that when rabbits were inoculated with the vaccine of Japanese Bencephalitis, the antibody response in the circulating blood was the same no matter which route was adopted for the injection of the vaccine. The present communication is a continuation of such an approach in both rabbits and guinea pigs with a third route of inoculation added, namely, intramuscular route of inoculation. The results of the present experiments, besides confirming those of the previous report, indicate that when rabbits or guinea pigs were given the vaccine intramuscularly, an antibody of even higher titre was obtained than that from the injection by other routes previously employed. Moreover, it also remained elevated for a longer period of time. It was further found that rabbits responded with an earlier production of neutralizing antibody than guinea pigs. An interpretation of these results is briefly made in this paper.