

羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬疫苗的 試驗室比較

徐修夏 倪恩令 黃相臣 朱旣明

目前我国狂犬疫苗的制造在使用动物上并没有硬性的规定,羊、兔皆可使用。这种态度在目前来说很客观,因为到现在为止,究竟羊、兔二脑孰佳问题,尚欠充足的试验材料加以证明。因此著者在这方面有意作一个全面的试验室方面的比较。考虑到小白鼠脑可以制成乙型及森林脑炎疫苗而大量使用于人体,而鼠脑固定毒的毒力滴定度常较羊脑为高,故除比较羊脑及兔脑外并加鼠脑一项,比较项目包括如下:

- 一、羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬病固定毒对石炭酸及温度的抵抗力比较。
- 二、羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬病固定毒的毒力(即病毒的滴度)比较。
- 三、羊脑、兔脑及鼠脑三种疫苗的毒性比较。
- 四、羊脑、兔脑及鼠脑三种疫苗含致麻痺因素的试验比较。
- 五、羊脑、兔脑及鼠脑三种疫苗的效力稳定性试验的比较。

試驗材料

所用毒种为北京株,每二月于家兔脑内传代一次保存。将此毒种以生理盐水研磨稀释成20倍乳剂,然后分别注入羊脑内1毫升;兔脑内0.2毫升及鼠脑内0.03毫升。羊的体重为90市斤上下,兔的体重为1,500—2,000克,小白鼠的体重为16—20克。三种动物发病后取其脑,所采得的羊、兔及鼠脑即称为羊、兔或鼠脑狂犬病固定毒。三种脑皆按山浦氏法作成疫苗,所得之疫苗称羊、兔或鼠脑疫苗。正常羊、兔及鼠脑则直接用含石炭酸0.5%的生理盐水稀释成5%乳剂,但未经37°C加温处理。

試驗方法及試驗結果

1. 三种狂犬病固定毒对石炭酸及温度的抵抗力比较——将羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬病固定毒各加入1%的石炭酸生理盐水研磨稀释成10%的乳剂,用纱布滤过后,三种乳剂各等量分装在5个瓶内,然后放37°C水浴中(玻璃罐盛水,放37°C孵箱内使水温达到37°C)。放水浴内24、48、72、96及120小时之后,各取出一瓶,再加一倍生理盐水稀释成5%的脑乳剂,然后分别注入2—5区体重18—20克的小白鼠脑内0.03毫升,观察14天,以求在同样浓度的石炭酸及同样温度下何种病毒的抵抗力较强。考虑到疫苗作灭活试验时并不进行离心沉淀,故在作本试验时未经沉淀即进行动物试验。

按上法共作三次试验,三次试验所用的羊、兔及鼠脑固定毒都是试验前新制作的。三

次試驗的結果以表 1 为代表。抵抗力強弱的判定系根据小白鼠发病数目的多少及潛伏期的长短而定。

表 1 三种固定毒的灭活試驗(第三次試驗)

37°C 加温時間	固定毒种类	羊 脑	兔 脑	鼠 脑
24 小时		(6)(6)(7)(7)	(8)(8)(9)(-)	(7)(7)(8)(-)
48 小时		(6)(7)(9)(-)	(7)(8)(8)(-)	(10)(14)(-)(-)
72 小时		(7)(7)(-)(-)	(8)(-)(-)(-)	(11)(-)(-)(-)
96 小时		(-)(-)(-)(-)	(-)(-)(-)(-)	(-)(-)(-)(-)
120 小时		(-)(-)(-)(-)	(-)(-)(-)(-)	(-)(-)(-)(-)

由表 1 来看,三次試驗都是羊脑的抵抗力比兔、鼠病毒略強,发病鼠的潛伏期亦較短,但是这次試驗的区别不够显著。

2. 三种狂犬病固定毒的毒力(病毒滴度)比較——将三种脑各用 10% 兔血清作成 10% 的乳剂,每分鐘 1,000 轉离心沉淀 10 分钟后,取其上清液再以 10% 兔血清进行連續 10 倍稀释,取 10^{-1} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 及 10^{-8} 五个稀释倍数分别注入体重 14—15 克小白鼠脑内 0.03 毫升,每个稀释倍数注射 6 区小白鼠,注射后观察 14 天,按 Reed 及 Muench 二氏的方法求出三种病毒的 LD_{50} 終点,以比較三者的毒力。按上法共作三次試驗,結果如表 2。

表 2 羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬病固定毒的毒力比較

試驗次数	固定毒种类	羊 脑	兔 脑	鼠 脑
第 一 次		$10^{-5.50}$	$10^{-5.99}$	$10^{-7.17}$
第 二 次		$10^{-6.50}$	$10^{-6.63}$	$10^{-7.86}$
第 三 次		$10^{-6.50}$	$10^{-6.37}$	$10^{-6.82}$

由表 2 来看,鼠脑病毒的毒力最強,而羊脑与兔脑病毒的毒力相差不大。

中国科学院微生物研究所在 1955 年以前,每批疫苗的效力試驗所用攻击毒全系鼠脑,所以每次試驗的对照鼠即等于滴定了一次鼠脑病毒的毒力。几年来的試驗結果也确証鼠脑病毒的毒力比兔脑为強。

3. 羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬病疫苗的毒性試驗比較——辛鈞等^[1]曾报告正常小白鼠脑悬液或乙型脑炎疫苗及森林痘炎疫苗的沉淀后上清,經靜脉注入小白鼠后能引起毒性死亡,死亡一般在注射后数分鐘之內发生。为了比較羊、兔及鼠脑組織及由其所制成的狂犬疫苗在毒性方面有无区别而进行了以下的試驗。

羊脑、兔脑及鼠脑固定毒各加入 1% 石炭酸生理盐水制成 10% 的乳剂,經紗布滤过后放 37°C 孵箱內 24 小时后取出,加一倍生理盐水稀释成 5% 的乳剂,然后再放 37°C 乳箱內,此时羊脑乳剂放 120 小时,兔脑放 48 小时,鼠脑放 24 小时。取出后作灭活試驗,試驗合格后即为羊脑、兔脑及鼠脑疫苗。羊脑乳剂在稀释一倍后放 37°C 孵箱內 96 小时曾做过一次灭活試驗,結果有的小白鼠发病,故又加温 24 小时后(共 120 小时)重試始合格;兔脑乳剂在 24 小时后也作过灭活試驗也未通过,故又加温 24 小时(共 48 小时),始灭活完

全;但鼠脑在 24 小时后即完全达到灭活的程度。从灭活試驗当中也可以看到羊脑狂犬病固定毒对石炭酸及温度的抵抗力較兔及鼠为强。

另取正常羊、兔及鼠脑組織,直接用 0.5% 石炭酸食盐水研磨稀释成 5% 的乳剂,未經过 37°C 加温。

以上 6 种乳剂各吸取数毫升放小試管内,每分鐘 4,000 轉离心沉淀 25 分鐘,取其上清分为原倍、2 倍及 4 倍稀释后(稀释液为生理盐水),分別注入体重 18—20 克小白鼠尾靜脉內 0.5 毫升,然后观察 24 小时,結果如表 3。

表 3 三种疫苗的小白鼠靜脉注射毒性試驗比較(第一批)

乳剂种类	倍 数	原 倍	1:2	1:4	总 計
羊脑疫苗		6/12	0/12	0/12	6/36
兔脑疫苗		10/12	6/12	4/12	20/36
鼠脑疫苗		8/12	2/12	2/12	12/36
正常羊脑乳剂		8/12	4/12	0/12	12/36
正常兔脑乳剂		10/12	9/12	5/12	24/36
正常鼠脑乳剂		11/12	7/12	6/12	24/36

註: 分子 = 死亡数, 分母 = 小白鼠总数。

由表 3 来看, 正常脑乳剂致死的小白鼠数比疫苗多, 而無論正常脑乳剂或疫苗, 都是羊脑上清致死的小白鼠数为最少, 同时未死亡者在注射后的反应也較輕, 恢复正常状态的时间也較短。正常脑乳剂所以致死小白鼠較多, 在很大的程度上可能是因为疫苗經過 37°C 加温灭活过程, 而正常脑乳剂則未經过 37°C 加温。这种試驗結果也合乎辛鈞等^[1]认为毒性物质对热是不稳定的結論。

第二批試驗所用三种正常脑乳剂仍为与第一批三种疫苗同时制造者, 但放在 0—4° 冰箱一个月。其毒性与第一批相比, 似乎比一个月以前稍有所降低。从而可以看出, 含 0.5% 石炭酸的脑乳剂放 0—4° 冰箱內一个月后, 毒性能減少一部分, 这一点也符合辛鈞氏等^[1]的报告。

为了弄清温度对毒性的影响, 而将三种疫苗及三种正常脑乳剂的沉淀上清放 56°C 水浴內加温 30 分鐘, 然后注射小白鼠尾靜脉內 0.5 毫升, 結果如表 4。

表 4 56°C 30 分鐘加温对三种疫苗及三种正常脑乳剂毒性的影响

試驗次数	乳剂种类	羊脑疫苗	兔脑疫苗	鼠脑疫苗	正常羊脑乳剂	正常兔脑乳剂	正常鼠脑乳剂
第 一 次		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
第 二 次		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

由表 4 来看, 毒性可借 56°C 加温 30 分鐘而完全去掉。但在疫苗制造过程当中是不能用較高温度来灭活病毒的, 按山浦氏法只可用 37°C, 因此又作了以下的試驗, 以期利用 37°C 达到既能灭活又能去掉毒性的目的。試驗方法是将三种含病毒的脑組織及三种正常脑組織均用 0.5% 石炭酸生理盐水直接研磨稀释成 20 倍的乳剂, 然后全放 37°C 加温

120 小时,取出后每分鐘 4,000 轉离心沉淀 25 分钟,取其上清注入体重 18—20 克小白鼠尾静脉內 0.5 毫升,同时取加温前的乳剂作对照,試驗結果如表 5。

表 5 37°C 加温(120 小时)前后的毒性比較

乳剂种类	倍数	原 倍		1:2		1:4		总 計	
		加温前	加温后	加温前	加温后	加温前	加温后	加温前	加温后
羊脑固定毒乳剂		8/10	4/8	2/10	0/8	0/10	0/8	10/30	4/24
兔脑固定毒乳剂		8/10	7/8	6/10	2/8	5/10	2/8	19/30	11/24
鼠脑固定毒乳剂		9/10	8/8	4/10	1/8	3/10	1/8	16/30	10/24
正常羊脑乳剂		6/12	2/8	1/10	0/8	1/10	0/8	8/32	2/24
正常兔脑乳剂		12/12	7/8	8/10	0/8	2/10	0/8	22/32	7/24
正常鼠脑乳剂		11/12	1/8	6/10	1/8	4/10	0/8	21/32	2/24

由表 5 可以看出,無論三种正常脑乳剂或三种含病毒脑乳剂,經 37°C 120 小时加温后,小白鼠死亡数都有所減少。但此法并未能將毒性物質完全去掉。若延長加温時間,也許有可能將毒性物質去淨,但在抗原性上是否有損失,有待今后的研究。

总的情况是:無論疫苗或正常脑乳剂,也不論加过温(37°C 加温)或未加过温都以羊脑的毒性为最小。此处所謂毒性,显然并不是病毒所具有,而是属于脑組織本身的特性。

4. 羊脑、兔脑及鼠脑三种狂犬疫苗含致麻痹因素的測定——試驗基本上是按照 Hottle 及 Peer 二氏^[1]的方法进行的。先作每毫升含 2 毫克卡介苗的液体石蜡悬液,然后取出石蜡 4.5 毫升,加入羊毛脂(Lanolin) 0.5 克,再加疫苗 5 毫升,研磨混合后备作动物試驗。每区体重 300—400 克的豚鼠頸部皮下注射此混合液 1 毫升(实注脑組織量为 25 毫克),注射后观察 30 天。麻痹症状一般出现在注射后 11—25 天左右,在观察期間若出現麻痹現象即認為是变态反应性脑炎。一般症状是豚鼠先消瘦,然后出現后肢麻痹。共作 4 次試驗,結果如表 6。

表 6 羊、兔及鼠脑疫苗致麻痹因素的測定

試驗次数	乳剂种类	羊脑疫苗	兔脑疫苗	鼠脑疫苗	正 常 羊脑乳剂	正 常 兔脑乳剂	正 常 鼠脑乳剂
第一次試驗		0/4	2/4	0/4	—	2/4	—
第二次試驗		3/4	2/4	4/4	—	—	—
第三次試驗		2/4	2/4	1/4	2/3	4/4	0/4
第四次試驗		2/4	2/4	0/4	1/4	2/4	0/4

由表 6 可以看出,致麻痹因素不但存在于疫苗內,而且正常脑組織內也含有,这就証明致麻痹因素是来自脑組織本身,而不是来自病毒。在此試驗內正常鼠脑乳剂并未发现致麻痹因素,并且鼠脑疫苗內的致麻痹因素似乎也比羊及兔脑疫苗为少;正常鼠脑致麻痹因素所以尚未被发现可能与試驗动物数目尚少有关。由于試驗次数及动物数目皆不多,以現有的材料尚不能認為何种脑的致麻痹因素含量大或小,但可以認為三种疫苗內都含有致麻痹因素。

5. 羊脑、兔脑及鼠脑三种疫苗的效力稳定性試驗——按山浦氏法作三种疫苗,灭活試

驗合格后放 37℃ 孵箱內,按不同時間取出一部分用 Habel 氏法^[6]作效力試驗,結果如表 7。

表 7 羊、兔及鼠腦三種疫苗放 37℃ 的效力穩定性

批号	疫苗种类	放 置 期 間	未放 37℃ 前效力	三天后效力	一週后效力	二週后效力	三週后效力	四週后 效力	六週后 效力	八週后 效力
第一批	羊腦疫苗		10,000	—	363,100	234,400	2,291	12,590	1,738	—
	兔腦疫苗		19,950	1,000	2,291	31,620	29	24	141	—
	鼠腦疫苗		676	31	63	114	< 20	< 10	—	—
第三批	羊腦疫苗		21,380	—	501,200	12,590	—	46	83	—
	兔腦疫苗		5,888	—	1,413	1,000	—	42	17	—
	鼠腦疫苗		208,900	—	3,981	158	—	< 4	10	—
第四批	羊腦疫苗		15,850	—	—	—	—	12,300	—	< 5
	兔腦疫苗		708	—	—	—	—	489	22	—
	鼠腦疫苗		< 4	—	—	< 5	—	< 5	—	—
第五批	羊腦疫苗		25,120	—	—	17,780	—	128,800	302	50
	兔腦疫苗		660	—	—	489	—	467	18	—
	鼠腦疫苗		25	—	5	1	—	—	—	—

註:表中之数字为保护之 LD₅₀ 数。

由表 7 来看,第一批三種疫苗中的羊腦疫苗放 37℃ 八週后失去效力;兔腦疫苗三週后失去效力;鼠腦疫苗在未放 37℃ 前效力即不太好,放 37℃ 三天后即失去效力。第三批三種疫苗中的羊腦疫苗經四週失去效力;兔腦疫苗亦經四週而失效;因第三週未作試驗,根据推測也可能兔腦疫苗在第三週即失效。鼠腦疫苗則兩週即失效。第四批三種疫苗中的羊腦疫苗經八週失效;兔腦疫苗原来效力达不到 1,000 LD₅₀, 放六週后完全失效。鼠腦疫苗在未經加温之前效力即不好,因此处理前后无从比較。第五批三種疫苗和第四批的情况略同。总计由四批三種疫苗的試驗結果来看,虽批与批之間失效時間不同,但由每批內的三種疫苗的失效時間已可看出一个規律,即羊腦疫苗效力最稳定,兔腦次之,鼠腦最差。

除測定三種疫苗在 37℃ 的穩定性外,并将第一批三種疫苗的一部分放 5℃ 冰庫內六个月及九个月后作效力試驗。

結 果

放 5℃ 冰箱內六个月后羊腦及兔腦疫苗的效力都很好,但鼠腦已失效。九个月后兔腦亦失去效力,羊腦疫苗在九个月后未再进一步作效力試驗,因根据以往的試驗証明,羊腦疫苗放 0—5℃ 冰室內一年效力尚很好,部分批号一年半后尚超过 1,000 LD₅₀, 故此处从略。由此可以看出,羊腦疫苗無論在 5℃ 或 37℃ 效期均較长且稳定,而兔腦次之,鼠腦最差。

結 論

1. 羊腦、兔腦及鼠腦三種固定毒对石炭酸及温度的抵抗力以羊腦固定毒为最强,兔腦及鼠腦次之。羊腦固定毒的这种較强的抵抗力,可能与羊腦疫苗的有效期較长有关。

2. 羊脑、兔脑及鼠脑三种固定毒的毒力以鼠脑为最强, 羊兔之間无差别。
3. 羊脑疫苗或正常羊脑乳剂內所含对小白鼠静脉注射致死的毒性物质, 较兔脑疫苗或正常兔脑乳剂, 鼠脑疫苗或正常鼠脑乳剂为少, 但目前尚无根据认为这种物质与狂犬疫苗注射后所发生的种种反应有何联系。
4. 用羊、兔及鼠脑制备的三种疫苗都含有致麻痹因素, 根据目前的試驗材料尚不能认为那一种脑的致麻痹因素含量多或少。
5. 三种疫苗以羊脑疫苗效期最长且稳定, 无论放 37°C 或 5°C 都是如此, 兔脑次之, 鼠脑最差。

参 考 文 献

- [1] 刘宗芳、刘汉明、辛鈞、张保如、楊簡, 生物制品通訊, 2: 305, 1957
- [2] Hottle G. A. and Peer J. H.: J. Immunol., 72: 236, 1954

COMPARATIVE STUDIES ON RABIES VACCINE PREPARED WITH SHEEP, RABBIT AND MOUSE BRAINS

Hsu, H. L., Ni, E. L., HUANG, H. C. AND CHU, C. M.

The authors prepared rabies vaccine by infecting sheep, rabbit, and mice, and the brain materials treated with phenol according to Semple's method. They found that:

1. Among the three vaccines, that prepared from the sheep brain material was most resistant to heat and to phenol, and it remained potent longest when stored either at 37°C or at 5°C.
2. The fixed virus passed through the mouse brain showed the highest virulence for the white mice.
3. The sheep brain contained least toxic materials when it was injected intravenously into white mice.
4. All three vaccines contained a factor which would induce the production of allergic encephalitis in the guinea pigs.