

中国医学科学院病毒学研究所

研究生毕业论文

流行性乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗现象、抵抗的
机制(着重与干扰素的关系)及体外法测定疫苗效能的研究

研究生：王树声

导师：黄植祥

1964年 11月

緒 言.....	5
----------	---

第一章：流行性乙型腦炎滅活疫苗免疫早期抵抗現象及其

機制（着重與干擾素的關係）的研究.....	6-31
-----------------------	------

一、引 言.....	6-7
------------	-----

二、材料與方法.....	7-9
--------------	-----

三、實驗結果.....	9-28
-------------	------

（一） 乙型腦炎滅活疫苗免疫早期抵抗現象.....	9-12
---------------------------	------

1. 乙型腦炎滅活疫苗免疫早期抵抗現象.....	9-10
--------------------------	------

2. 乙型腦炎滅活疫苗免疫早期抵抗產生的速度...	10-12
---------------------------	-------

3. 乙型腦炎滅活疫苗免疫早期抵抗與 病毒血症的關係.....	12
------------------------------------	----

（二） 乙型腦炎滅活疫苗免疫早期抵抗機制的探討...	12-28
----------------------------	-------

1. 乙型腦炎病毒滅活疫苗免疫與干擾素的關係...	12-27
---------------------------	-------

(1) 免疫鼠組織懸液干擾素測定.....	15-20
-----------------------	-------

① 免疫鼠腦組織懸液在雞胚細胞上測定	
--------------------	--

干擾素.....	15-19
----------	-------

② 免疫鼠腦組織懸液及血漿在原代鼠胚	
--------------------	--

細胞上測定干擾素.....	19-20
---------------	-------

(2) 乙型腦炎滅活疫苗及熱滅活病毒在雞胚	
-----------------------	--

單層細胞上誘發產生干擾素的研	
----------------	--

究.....	20-27
--------	-------

① 乙型脑炎病毒經福尔馬林灭活后对其 誘发鸡胚細胞产生干扰素能力的 影响.....	20—21
② 乙型脑炎病毒經 5 6 ° — 5 8 °C 不同 時間灭活后对其誘发产生干扰素 能力的影响.....	22
③ 乙型脑炎病毒經 3 7 °C 加热灭活后对 其誘发产生干扰素能力的影响.....	22—24
④ 灭活的乙型脑炎病毒并不表現有自家 干扰的現象.....	24—25
⑤ 乙型脑炎灭活病毒对同种活病毒产生 干扰素能力的影响.....	26—27
2. 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗的特异性.....	27
3. 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗与血液中 中和抗体的关系.....	28
四、討 論.....	29—31
五、小 結.....	31
第二章：流行性乙型脑炎灭活疫苗效能体外測定方法 的研究.....	32—62
一、引 言.....	32—34
二、材料与方法.....	35—36
三、实验結果.....	36—58
（一） 乙型脑炎灭活疫苗效能体外測定方法 的建立.....	36—43

1. 乙型脑炎病毒在鸡胚单层细胞上吸	
附时间的测定.....	37
2. 乙型脑炎病毒在鸡胚单层细胞上空斑	
数的正常波动范围.....	37
3. 乙型脑炎病毒对温度的稳定性.....	37-39
4. 抗体与活病毒的结合速度.....	39-40
5. 乙型脑炎灭活疫苗与抗体结合的时间.....	40
6. 病毒量的选择.....	40-42
7. 血清稀释度的选择.....	43
(二) 乙型脑炎鼠脑灭活疫苗效能的体外法测定.....	43-51
1. 体外法测定疫苗效能的模式及计算方法.....	43
2. 鼠脑成份对体外法测定的影响.....	43
3. 不同效价的疫苗 其 效能用体内、体外法	
测定的比较.....	43-51
(1) 对不同温度灭活的疫苗的效能测定.....	48
(2) 对不同温度, 不同时间加热处理的疫苗	
的效能测定.....	48
(3) 对不同病毒浓度的疫苗的效能测定.....	49
(4) 对 37 °C 不同时间灭活的疫苗的效能	
测定.....	49-51
(5) 体外法与体内法的关系.....	51
4. 体外测定疫苗效能方法的可重复性.....	51
(三) 乙型脑炎病毒鸡胚细胞灭活疫苗效能	
的体外法测定.....	51-58

1. 疫苗中干扰素对体外法测定的影响.....	51—52
2. 福尔馬林对干扰素活性的影响.....	52
3. 疫苗經超速离心去除干扰素后的体 外法效能測定.....	53—56
4. Polio 病毒猴腎細胞疫苗中干扰素 的缺如.....	57
四、討 論.....	57—61
五、小 結.....	61—62
結 論.....	62—63
参考文献.....	65—81

緒 言

疫苗免疫机体后其免疫效果是肯定的，以往对免疫后特异性抗体的产生及其与免疫的关系研究得较多。至于免疫接种后 1—3 天之內，受免疫动物对同种病原刺激物攻击的早期抵抗现象虽为一些学者所报告，包括細菌菌苗，类毒素，病毒疫苗，但其机制是不清楚的。对于病毒疫苗的此种抵抗是否是由于抗体的作用呢？还是由于病毒之間发生了干扰或产生了干扰素呢？或者尚有其它的因素所造成，皆需要进一步研究。

目前，对于灭活疫苗效能的鑑定方法多数只是采用免疫后短時間內对病毒攻击的抵抗或者在免疫后一定時間檢查抗体的产生。流行性乙型脑炎灭活疫苗的鑑定是采用免疫后短時間內的攻击抵抗試驗，这种方法可能不能充分反映出疫苗的效能来。最近 Kreon 报告用体外法測定 Polio 灭活疫苗的效能。这种方法不但經濟又能迅速的获得結果。因此，认为有必要来探索用体外組織培养的方法測定乙型脑炎灭活疫苗的效能。

本研究分別探討了上述二方面的問題。

第一章：流行性乙型脑炎灭活鼠脑疫苗免疫

早期抵抗现象及其机制（着重与干扰素的关系）的研究

一、引言

流行性乙型脑炎灭活鼠脑疫苗（以下简称乙型脑炎疫苗）免疫动物后动物对病毒攻击具有肯定的抵抗（1—7），在人体免疫后也有一定的免疫效果（8）。过去对此种免疫的物质基础的探索大多集中于对免疫后一定长的时期里血清中和抗体的研究。而免疫后的早期抵抗现象早在1938年Hodes及Webster（9）首先报告，作者观察到用圣路易型脑炎活病毒免疫小白鼠后，在1—2天之内，动物对脑内同种活病毒的攻击已有抵抗，而血清中和抗体仅仅在免疫后8—10天才查到。1942年Turner及McLeod（10）观察到灭活的肺炎球菌注射动物后48小时，动物对同种细菌的攻击具有抵抗，此外，破伤风类毒素（11）（12）及白喉类毒素（13）注射动物后亦有类似的早期抵抗的现象。1954年Krech（14）报告用福尔马林灭活的Polio疫苗，腹腔免疫4—6周龄的小白鼠后，于免疫后第三天即对Polio活病毒静脉攻击具有抵抗，而血清中和抗体在免疫后5—8天之前不能查到。最近，许兆祥等（7）报告小白鼠经福尔马林灭活的乙型脑炎疫苗免疫后一天，即对同种活病毒皮下攻击有明显的抵抗，而抗体是在免疫后第7天才查到。虽然作者推测这种现象可能与抗体有关，但实验资料不足。从黄氏（15）的研究结果来分析，大量（ $10^{8.4}LD_{50}$ ）及小量活病毒（ $3LD_{50}$ ）皮下感染小白鼠分别于接种后第2天、第5天证明病毒已经在脑内繁

殖，而此时血清中，却不能查到有抗体。这说明中和抗体尚不能完满地来解释此种抵抗现象。除了中和抗体的免疫因素外，Hoskins (16) 及 NicoLau (17) 等人早就提出过病毒之间干扰及组织免疫的概念。近年来由于干扰素的发现 (18) 及研究，干扰素已被广泛地引进病毒病的抵抗机制中来 (18-30)，并证明干扰素无论是在体内或体外都有抗病毒合成的作用。根据多种灭活病毒在细胞培养中产生干扰素的事实，认为有必要来确定干扰素在乙型脑炎灭活疫苗免疫机制中是否起作用。目前，对于乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗现象的研究尚不足，特别对此种抵抗的性质和机制都了解不够，也需要进一步研究。本文报告即为对此种抵抗现象的进一步研究，并重点探索其与干扰素的关系。

二、材料与方 法

(一) 病毒株：采用乙型脑炎病毒京卫研 1 株 (31) 小白鼠脑内传代 36-52 代。

(二) 疫苗：以京卫研 1 株病毒脑内接种三周龄小白鼠，3-4 天后取发病鼠脑用磷酸缓冲液 (PH8.0) 制成 20% 悬液，经 3,500 - 4,000 转/分离心 30 分钟后吸取上清液，加入等量的 0.4% 福尔马林磷酸缓冲液使最终疫苗浓度为 10%。福尔马林的最终浓度为 0.2%。灭活前病毒滴度为 $10^{-8.50}$ 左右，置 4°C 灭活 21 天后使用。对照液为正常鼠脑与上述疫苗同样处理的悬液。

(三) 动物：均采用三周龄的小白鼠，此系我所动物房在防蚊条件下自行繁殖饲养。免疫抵抗试验中同批小白鼠体重相差不超过 2 克。

(四) 免疫方法：采用皮下或腹腔接种，一次或者多次免疫。

具体方法分別于实验結果中說明。

(五) 血浆分离及中和試驗：小白鼠免疫后不同時間，每組8只小白鼠，腋動脈放血，每只約1毫升，混合時，加入0.20毫升肝素，离心分离血浆，冰冻保存作中和試驗。中和試驗前，血浆不經 $56^{\circ}30'$ 熱處理。中和試驗采用固定血浆，稀釋病毒的方法，即0.15毫升血浆加入0.15毫升 $2 \times 10^{-4} - 10^{-9}$ 的鼠腦病毒悬液， 37°C 結合60分鐘，每管接種4只小白鼠，每只腦內注射0.03毫升，觀察二周，按Reed及Mueuch法計算 $\text{LD}_{50}(32)$ 。

(六) 干扰素标本制备：免疫鼠及正常鼠腦用水解乳蛋白—Hank's 溶液（以下簡稱LH溶液）研磨成20%悬液，經3,000—4,000轉/分离心30分鐘后吸取上清液，置于透析袋，經 $\text{pH}24^{\circ}\text{C}$ 透析24小時后用 NaOH 調回到 $\text{pH}7.6$ 左右，吸入中号試管，經4,000轉/分离心10分鐘后，上清液吸出分裝小管， 4°C 保存。血清干扰素标本系分离血浆后用LH稀釋1:5，用 $\text{pH}2$ 酸透析法處理。

(七) 干扰素的測定： (OEO)

1. 細胞培养：(1) 原代鸡胚細胞：以0.25%胰酶消化的10—12天齡的萊克亨鸡胎（去头，足及內脏）成单个細胞，用含有5%小牛血清的LH溶液悬浮，营养液中加入适量的 NaHCO_3 及抗菌素。每毫升液体含細胞300—400万。每50毫升体积扁井側面（ $7.5 \times 1.9 \text{ cm}$ ）接種3毫升， 37°C 孵育48小時成单层后使用。(2) 原代鼠胚单层細胞：二周齡孕鼠，无菌剖腹取胎后去头，足及內脏，用0.25%胰酶消化，培养液同上，每毫升含細胞100—200万，每試管（ $13 \times 100 \text{ cm}$ ）接種1毫升，48小時成单层后使用。

2. 攻击病毒：(1) 在鸡胚单层細胞上傳代的西方馬腦脊髓炎病毒（以下簡稱 W E E ）。(2) 在三周齡鼠鼠腦內傳代的小白鼠腦心肌炎病毒（以下簡稱 E M O ）。

3. 干扰素測定方法：(1) 鸡胚細胞——W E E 病毒空斑抑制法：即倍比稀釋的干扰素測定标本 3 毫升加入鸡胚单层細胞，37°C 24 小时培养后，棄去上述液体，不洗，加入 50—100 空斑形成单位的 W E E 攻击病毒，37°C 吸附 90—120 分鐘后，鋪以营养琼脂层，3 天后計数空斑，以較对照空斑数减少 50% 为阳性。(2) 鼠胚細胞——E M O 病毒繁殖抑制法：干扰素測定标本 1 毫升，加入鼠胚細胞管，經 37°C 孵育 24 小时后，棄去上述液体，不洗，加入大約 100 LD₅₀（鼠腦內 0.03 毫升滴度）的 E M O 攻击病毒，37°C 吸附 60 分鐘后吸出未吸附的殘余病毒，用 Honks 溶液洗一次，加入 199—LH 混合液（20% 199 溶液和 80% LH 溶液的比例）1 毫升，37°C 孵育 24—48 小时后收获，立即以小鼠腦內法測定病毒，观察一周，按照 Reed 及 Luench 氏（32）法計算 LD₅₀。

（八） 空斑技术：基本上与張汉荊（33）所报告的方法相同。W E E 在鸡胚单层細胞上形成清晰的空斑（图 I—1、I—2）。

三、实验結果

（一） 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗現象。

1. 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗現象：許氏（7）曾报告小白鼠經乙型脑炎灭活疫苗皮下免疫后 24 小时，小白鼠对小量活病毒的皮下攻击具有抵抗。但是由于其实驗数量不足以及缺少福尔馬林处理的正常鼠腦悬液作对照，免疫与攻击的部位未曾註明。因此对

此种抵抗以特异性問題尚未肯定。为了进一步肯定这种早期抵抗現象的存在，本实验将同一批三周龄小白鼠一次皮下接种 0.2 毫升的乙型脑炎灭活疫苗，并以不注射的小白鼠及皮下注射 0.2 毫升福尔馬林处理的正常鼠脑悬液的小白鼠作为对照，于接种后 24 小时，在对侧股沟皮下或者脑内行 10 倍不同稀釋的活病毒攻击。早期抵抗現象如表 I-1 所示，皮下攻击除实验 1 不能肯定外，其余三个实验都說明小白鼠經乙型脑炎灭活疫苗免疫后 24 小时即对活病毒皮下攻击有明显的抵抗，抵抗指数平均为 $2.24 \log_{10}$ ；而对脑内攻击則抵抗在可疑范围，这与对皮下攻击的抵抗相比較有显著的差别。此种抵抗是由疫苗引起的，因用正常鼠脑悬液注射后无此作用，由于攻击病毒与注射疫苗部位不同，因此也不可能是由于局部組織反应所致。

2. 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗产生的速度：上一实验已証明了疫苗免疫中存在有早期抵抗現象。为了了解此种抵抗能力产生的速度，本实验通过免疫后不同時間皮下活病毒攻击來說明此一問



图 I-1：WEE 病毒在鸡胚单层細胞上所形成的空斑

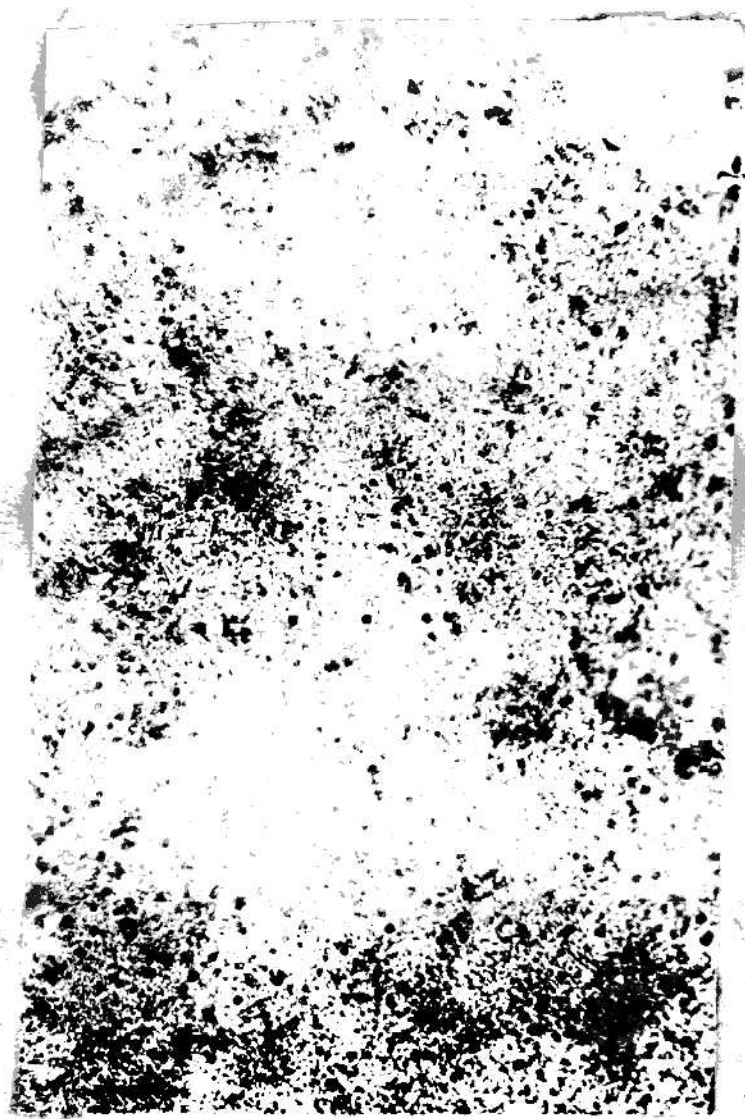


图 I-2：WEE 病毒空斑

放大相

表 I-1 小白鼠皮下一次乙型脑炎灭活疫苗注射后
24 小时对活病毒皮下及脑内攻击的抵抗

实验 次数	小白鼠 克重	组 别	活 病 毒 皮 下 攻 击						活病毒脑内 攻 击	
			攻击病毒稀释度 $\log_{10}$						抵抗 指数	LD ₅₀
			-3	-4	-5	-6	-7	-8		
1	9-11	免疫组	3/5	5/5	3/5	5/5	2/5		0.53	
		未免疫组			5/5	5/5	2/5	0/5		6.30 6.83
2	8-10	免疫组	3/5	3/5	3/5	2/5	1/5		2.38	
		未免疫组			5/5	4/5	4/5	1/5		5.0 7.38
3	7-8	免疫组	3/10	3/10	3/10	0/10	1/10		2.23	
		未免疫组			8/10	5/10	4/10	0/10		4.4 6.23
4	7-7.9	免疫组	4/5	3/5	3/5	2/5	0/5		2.23	
		正常鼠脑组	5/5	5/5	5/5	3/5	4/5		7.62	0.75
		未免疫组			5/5	4/5	4/5	2/5	≤ 0.42	8.37 8.00
5		免疫组								
		正常鼠脑组							7.83	0.67 8.50

題。結果如表 I - 2 所示。从表中可以看到其中有二次試驗表明免疫后 5 - 15 分钟即对皮下活病毒攻击具有抵抗，而免疫后 8 小时对皮下活病毒攻击的抵抗更加肯定。

3. 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗与病毒血症的关系：上述实验指出小白鼠經疫苗免疫后 24 小时对皮下活病毒攻击具有較大的抵抗，而对脑內活病毒的攻击的抵抗則很弱。为了进一步确定此种抵抗发生的环节进行了本实验。小白鼠疫苗免疫后 24 小时，用 182、234 或 3162 LD₅₀ (小白鼠脑內滴定) 活病毒皮下攻击，于攻击后 2、3、4、5 天采血，每組取出 5 只小白鼠，采血时試管内加入 0.15 毫升肝素抗凝，用 10% 脫脂奶 - LD 溶液 10 倍稀釋后用小鼠脑內法滴定病毒。結果见图 I - 2。从图 I - 2 中可以看到，免疫組的病毒滴度普遍地較对照組低，持續時間也較对照組短一天。图 I - 2 中 A、B，免疫組与对照組之間的病毒量差数較 C 中的更明显，，此可能是与攻击病毒剂量大小有关，即此种抵抗在对小量病毒攻击时表現更加明显。

(二) 乙型脑炎灭活疫苗免疫早期抵抗机制的探索。

1. 乙型脑炎灭活疫苗免疫与干扰素的关系：由于乙型脑炎灭活疫苗免疫小白鼠后，小白鼠对活病毒皮下攻击的抵抗产生十分迅速，于免疫后 8 小时即呈現明显而肯定的抵抗，而此时血清中中和抗体却远不能查到。因此，有必要从其他因素来探討这种抵抗的机制，干扰素在病毒感染早期抵抗中的作用为 Isaacs (21) 首先报告，小白鼠經流感病毒鼻內感染后 1 - 2 天肺組織內就能查到干扰素，观察到在干扰素达到高峰后肺組織內病毒亦行下降，而抗体只是在当病毒滴度已經下降的第 6 天后才出現。因而推測干扰素与病毒感染恢复有关。以后有不少学者 (18 - 30) 报告过干扰素与病毒的感染过

表 I - 2 乙型脑炎灭活疫苗早期

抵抗产生的速度

实验 次数	组 别	免疫与攻击间隔	LD 50 (log10)	抵抗指数 (log10)
1	免疫组	5 - 15 分钟	5.43	2.40
	免疫组	8 小时	5.00	2.83
	正常鼠脑	8 小时	7.83	—
	注射组			
	未处理组	—	7.50	0.33
2	免疫组	5 - 15 分钟	6.54	0.78
	免疫组	8 小时	≤ 4.75	≥ 2.57
	正常鼠脑	8 小时	7.32	—
	注射组			
	未处理组	—	6.68	0.64
3	免疫组	5 - 15 分钟	5.84	1.54
	免疫组	8 小时	6.25	1.13
	正常鼠脑	8 小时	7.38	
	注射组			

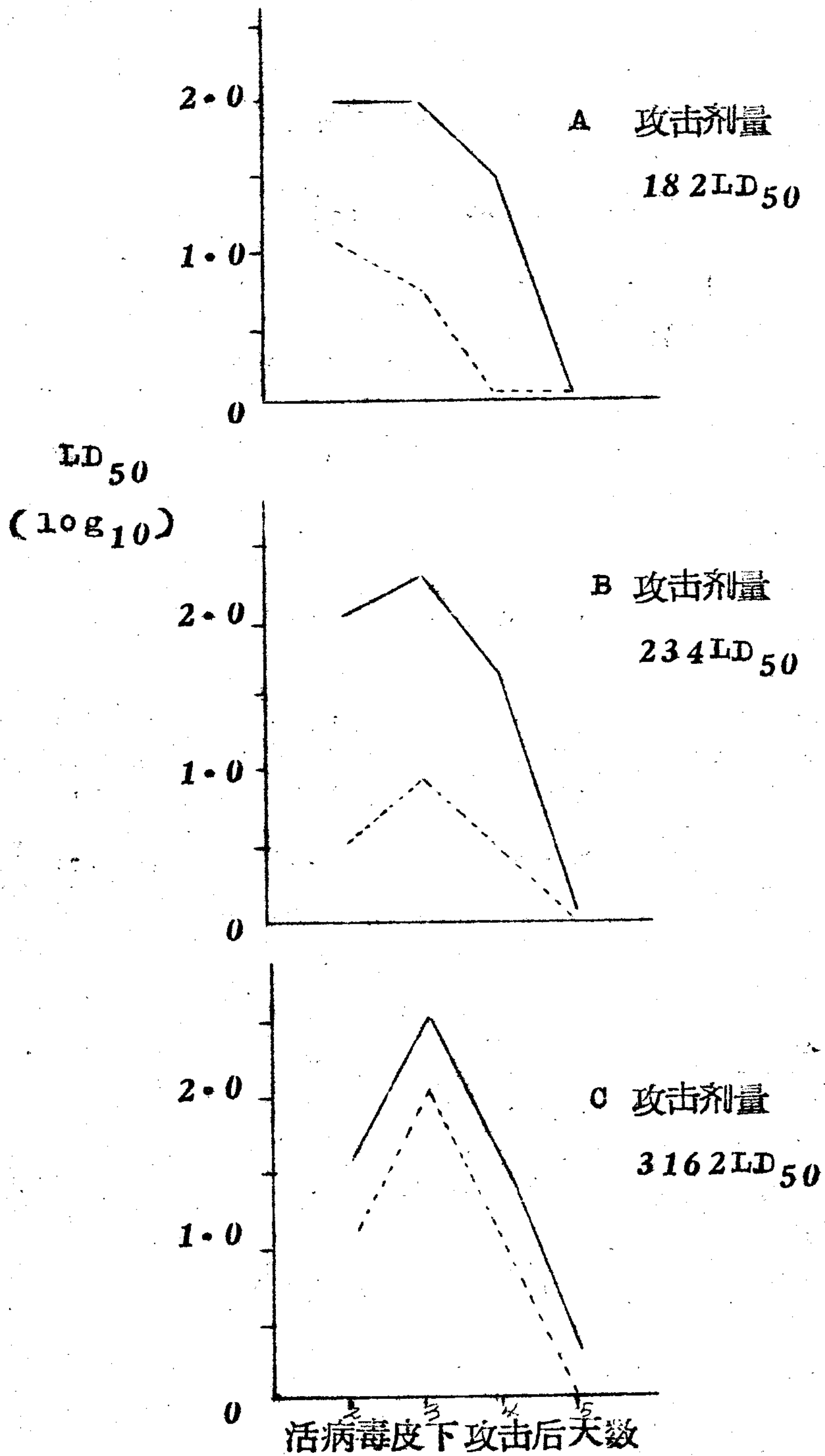


图 I - 2 免疫鼠与对照鼠皮下不同剂量活病毒攻击后的病毒血症比较

—— 对照鼠
..... 免疫鼠

程有密切的关系。进一步的研究(34)说明絕大多数病毒能在很多种类的細胞上产生干扰素，其中包括經过热或紫处綫灭活的流感(18)及牛痘病毒等(35-41)以及福尔馬林灭活的Polio I、II、III型病毒(42)也能产生干扰素，尤其是虫媒病毒中能产生干扰素者亦有所报告(43)。因此，考虑是否乙型脑炎灭活疫苗免疫的此种早期抵抗現象可能与干扰素有关，但这方面需要加以肯定或否定。为了达到上述目的，本实验从二方面进行：(I)、乙型脑炎灭活疫苗免疫小白鼠后，于不同時間內測定其組織內有无干扰素。(II)、乙型脑炎灭活疫苗及热灭活病毒接种鸡胚細胞，視其有无干扰素的产生。在为了确定乙型脑炎灭活疫苗免疫小鼠后能否产生干扰素的工作中，干扰素的測定不仅在鼠胚細胞系統也在鸡胚細胞系統进行。在鼠胚細胞系統測定干扰素是基于干扰素对細胞組織存在有相对的特异性，从細胞系統来看是較為敏感的，但由于以原代鼠胚細胞系統进行干扰素的測定在文献上报告的不夠多，对所用来做为攻击的病毒对干扰素的敏感性的了解不夠，而在鸡胚細胞系統則已有大量的研究。本室的初步工作说明 WEE、Sindbis 病毒对干扰素的敏感性較牛痘病毒高 100 倍左右(用固定干扰素的 CPE 法)(44)。干扰素虽然有組織特异性，但这并不是絕对的。Andrews (45) 报告了鸡胚、猴肾、兔肾細胞干扰素在兔皮及猴皮上有相互交叉，Takano 等(46)报告鸡胚及鼠肺干扰素在小白鼠实验中皆具有抗病毒作用。至于采用鸡胚細胞来檢查乙型脑炎灭活疫苗能否在体外細胞培养上产生干扰素是由于本室的經驗(47)証明乙型脑炎病毒在此細胞系統上能产生大量的干扰素，是一个很敏感的系统。

(1) 免疫鼠組織悬液干扰素測定

① 免疫鼠脑組織悬液在鸡胚細胞系統上測定干扰素：

三周齡小白鼠皮下接種 0.3 毫升乙型腦炎福爾馬林滅活疫苗或經 56° 30 分鐘加熱滅活的病毒，于接種后 1、3、4、5、7、15、30 天取腦，每組 10 只小白鼠，測定腦組織內干擾素，結果見表 I-3，從表中可以看到小白鼠經以上兩種滅活病毒皮下接種后 1—30 天之內，腦內均未能查到有干擾素。此種結果是小白鼠對疫苗接種不能產生干擾素呢？還是由于疫苗量小，不足以引起可查及的干擾素呢？

表 I-3 小白鼠從福爾馬林滅活疫苗及熱滅活病毒皮下接種后，腦組織在雞胚細胞上的干擾素測定

接種材料	接種后天数								
	WEE 空斑數		1	3	4	5	7	15	30
0.2% 福爾馬林滅活疫苗			174	153	132	137	95 ⁺	48	52
56° 30 分鐘加熱滅活的鼠腦病毒			134	166	150	175	153	61	50
正常鼠腦懸液			172					56	

+ 部分細胞死亡。

為此繼續進行了多次及再度免疫后鼠腦組織干擾素的測定。抗体反應的特點是多次注射較一次注射強，并有再度免疫的現象，即疫苗基礎免疫后間隔一定時間再次注射疫苗后抗体產量急劇上升，且維持時間長，H O (48) 曾報告滅活的 Sindbis 病毒本身不能產生干擾素，