

內部資料

生物制品集刊

1960—1962



卫生部生物制品研究所

1963.10. 北京

前 言

本刊是我所从一九六〇至一九六二年的一些工作总结和研究试验报告，但大部分未经发表。今为了积累资料 and 便于学术交流起见，特汇集成册。内容除研究报告和论文外，还包括我所一部分生产经验及技术改进总结等，共六十篇，其中有些是初步资料，极不成熟；有些是阶段性总结，而正个工作还在继续，因此本刊仅供内部参考，请予批评指正。

卫生部生物制品研究所

目 录

- 1 純化伤寒付伤寒甲乙三联菌苗研究組1960年总结报告.....执笔人：陈正仁、王秉瑞 (1)
- 2 銘明矾对伤寒付伤寒甲乙純化抗原减毒試驗的初步报告.....
.....执笔人：陈正仁、关 鏊、王立亚 (7)
- 3 胰酶番瓜酶真菌旦白酶消化豆餅应用于伤寒三联菌苗液体培养.....闕毓筠、王立亚 (9)
- 4 真菌旦白酶消化豆餅消化条件的研究.....闕毓筠、黃文萱 (13)
- 5 两种純化三联菌苗的人体反应.....代 科、李太然 (15)
- 6 純化伤寒付伤寒菌苗的流行病学效果观察.....
.....費克芬、连文远、白荣英、代 科、陈正仁 (19)
- 7 1961年地方性痢疾菌种篩选工作总结.....张振宜、黃其寿 (22)
- 8 冻干鼠疫活菌苗耐热性初步研究.....刘德铎、陆士良 (26)
- 9 提高卡介苗产量的研究 (摘要)郑翼宗、都本业、簡国模、陈正仁、刘純謙 (29)
- 10 布魯氏菌免疫力試驗的探討.....陆士良、刘德铎、陈正仁 (30)
- 11 皮上皮下接种 P^{32} 标记的布魯氏杆菌在豚鼠体内分布动向之观察
.....苏万年、刘德铎、邓玉平、周爱婷、陆士良 (35)
- 12 冷冻干燥布魯氏菌苗的活菌数与培养基中含糖量的关系.....
.....黃文萱、陆士良、刘德铎 (40)
- 13 I相百日咳不同菌株間抗原构造的初步分析.....何秋民、陈正仁 (44)
- 14 百日咳杆菌液体培养試驗.....謝秋成、闕毓筠、何秋民 (49)
- 15 半綜合活性琼脂培养基中影响百日咳杆菌凝集性及免疫力的因素的探討.....
.....謝秋成、张凝瑞、何秋民、陈正仁 (56)
- 16 半綜合琼脂培养基中加入味精以培养百日咳杆菌的試驗研究.....謝秋成、闕毓筠 (65)
- 17 斑疹伤寒玻片血凝試驗.....赵树萱 (70)
- 18 单层鸡胎組織培养制备的流行性乙型脑炎疫苗
 - I 病毒在单层細胞中的生长.....王用楫、顾佩韦、孙 勉、馬文信、周宁珍 (73)
 - II 鸡胎細胞的培养.....
.....王用楫、顾佩韦、馬文信、謝彥博、孙 勉、孙盛豪、周宁珍 (80)
 - III 病毒培养和疫苗制造.....
.....顾佩韦、孙 勉、馬文信、孙盛豪、周宁珍、李美蓉、王用楫 (87)
 - IV 疫苗效力和效期观察.....
.....孙 勉、顾佩韦、馬文信、衣秀云、周宁珍、王用楫 (95)
 - V 人群反应观察及效果調查.....王用楫、连文远、周宁珍、代 科 (101)
 - VI 疫苗的稳定性.....李美蓉、孙 勉、顾佩韦、王用楫 (105)
- 19 用鸡胎分离流行性乙型脑炎病毒从血液分离成功二例.....王用楫、李美蓉 (109)
- 20 鼠脑組織自溶或染菌与变态反应性脑脊髓炎发生的关系.....卢錦汉、张永福、刘凤岐 (113)

- 21 豚鼠实验性脑脊髓炎的病理变化.....陈醒民、张永福(119)
- 22 亚洲甲型流感病毒发源的研究
 - I 1957年洛阳市两次流感流行的病毒类型及其相互关系.....梁荣根、张育琴、馬美松、楊 敏(125)
 - II 亚洲甲型 (A₂) 与亚洲甲型 (A₁) 流感病毒的抗原关系.....梁荣根(130)
- 23 流行性感活毒疫苗的选种試驗.....
 -张育琴、王植崙、王太江、王桂秋、李翰唐、林南靖、楊 敏、薛凤举(138)
- 24 丁型流行性感活病毒在小白鼠群中引起的肺炎流行.....
 -王用楫、刘培生、荣子林、李美容(144)
- 25 牛痘病毒种选择的研究。I 国内外三株毒种免疫原性和致病性的比較.....
 -赵 鎧、张永福、严子林、錢汶光等(148)
- 26 全身性牛痘病因的探討.....张永福、赵 鎧(154)
- 27 小儿麻痺减毒活疫苗猴体病理检定方法的探討.....
 -陈醒民、张姍姍、罗国祥、华慧蓮、庞其方(158)
- 28 17D黄热疫苗人体接种后反应观察及中和抗体的測定
 -张永福、李一飞、刘凤岐、卢錦汉(163)
- 29 麻疹灭活疫苗流行病学效果观察.....
 -连文远、費克芬、关学鑫、代 科、吳紹源、章以浩(167)
- 30 沙眼病毒的电子显微镜观察.....黃元桐、王克乾(171)
- 31 沙眼病原研究VII沙眼病毒血清学性质的研究.....王克乾、黃元桐(176)
- 32 沙眼病毒疫苗的猴体免疫試驗.....王克乾、黃元桐(183)
- 33 热水和晾干作为沙眼預防措施的实验資料.....黃元桐、王克乾(186)
- 34 明矾吸附提純丙种球旦白.....刘雋湘、王佩玗、张晓琴(188)
- 35 胎盘球旦白生产中发生热原問題的原因分析.....刘雋湘、王佩玗(193)
- 36 胎盘球旦白液注射反应調查.....許健音(200)
- 37 丙种球旦白預防传染性肝炎效果观察.....刘雋湘、于 潜、許建音、刘毓琦(203)
- 38 精制麻疹免疫血清的制备 (初步报告).....刘雋湘、张晓琴(208)
- 39 精制抗毒素方法改进初步探討.....刘雋湘、陈永煌(211)
- 40 精制白喉抗毒素中胃酶消化及加溫变性于不同 pH 的比較陈永煌(213)
- 41 酚在抗毒素馬血浆中对效价損失及精制过程的影响.....陈永煌(214)
- 42 破伤风抗毒素使用情况及血清反应調查.....許健音(218)
- 43 用鸡胚单层細胞滴定白喉抗毒素单位的試驗 (初步报告) ...原明达、王淑敏、刘凤岐(222)
- 44 白喉毒素深层培养初步经验总结.....方箭筠(225)
- 45 磷酸鋁吸附精制白喉类毒素三年生产总结.....田世昭(229)
- 46 1960年白喉毒素生产中遺留問題的补充試驗.....田世昭(232)
- 47 白喉毒素采用先精制后解毒方法的探討.....田世昭(235)
- 48 P. W. No.8 Weissensee 菌株在 Pope 氏培养基上产毒的研究.....田世昭、赵鈺、王福賢(241)

- 49 用白喉毒素皮肤划痕法测定人群对白喉的易感性……………安作桥、王淑敏、卢锦汉(246)
- 50 自猩紅热病例分离的 925 株溶血性鏈球菌血清学分类及其毒素性质的研究……………
……………刘雋湘、何 亨等(249)
- 51 鏈球菌分群分型血清的制备和試驗方法……………孙文宪、何 亨、陈維玲、刘雋湘(254)
- 52 溶血性鏈球菌培养方法的一些观察……………孙文宪、何 亨(260)
- 53 綠脓杆菌血清学分类的初步研究……………舒 溶(262)
- 54 发鹼—殊异菌的一个新的血清型 2 : 6 (L) ……………舒 溶(267)
- 55 无菌試驗增菌培养法……………卢锦汉(269)
- 56 快速組織培养剥离染色法……………陈醒民、华慧蓮(272)
- 57 大型冷冻干燥机供热加温方法的改进……………王凤岐、尹冠群(274)
- 58 小型簡易冻干血浆实验总结……………尹冠群、王凤岐、刘守銳(276)
- 59 真空安瓿一次冻干多次熔封总结……………尹冠群(280)
- 60 冻干制品真空封口技术介紹……………尹冠群、罗树勛(281)

純化伤寒副伤寒甲乙三联菌苗

研究組1960年总结报告

卫生部生物制品委员会純化伤寒研究組 *

执笔人 陈正仁 王秉瑞

1959年年底，所长會議決定大量生产純化三联菌苗，生物制品委员会立即召集各所有关人員討論，制訂出“純化三联菌苗制造及檢定暫行办法”，各所按照暫时办法进行制造，60年5月試用，发现反应較强，加之副伤寒乙抗原的免疫力亦不高，立即再次召开經驗交流会，依照會議的決定，并经生委会批准，由各所抽調有关人員組織研究小組，在北京卫生部生物制品研究所进行有关純化三联菌苗的各项試驗研究。重点为設法降低抗原的毒性并維持其免疫性，自6月25日起至11月15日止，經同志們的努力，在四个半月的期間內，进行了一系列的試驗，茲将本阶段工作总结如后。

一、純化抗原毒性試驗方法的选择：

众所周知，伤寒抗原具有毒性，但缺乏敏感的檢定方法，为了測定抗原的毒性，希从实验动物中找出較敏感的方法，因而进行了各种选择試驗。

1. 豚鼠毒性試驗：

取純化三联抗原，以不同浓度抗原腹腔或皮下注射体重300~400克豚鼠。注射前称体重并測体温，注射后在不同時間內測体温及量体重，发现皮下注射后体温变化区别不大，24小时后体重均增加。腹腔注射1小时后体温均逐漸下降，且多数死亡。此法不易掌握，因此未作更多的試驗。

2. 豚鼠測血糖試驗：

据文献所載，沙門氏菌之內毒素注射家兔后引起血糖增高，我們因缺家兔改用豚鼠，以数只为一組。腹腔注射抗原，隔1、2、4、6小时后心脏取血，按改良 Somogyi 氏測糖法进行試驗，第一次发现注射抗原后血糖較正常为高，第一小时血糖上升，2小时后下降，4小时后又略上升，6小时后逐漸下降。第二次測出血糖变化不大，与正常动物相近。此法使用动物过多，且以影响血糖升降的因素众多，不易掌握，因而放弃。

3. 小鼠毒性試驗：

取不同浓度抗原腹腔或皮下注射体重14~16克小鼠，于注射前及注射后24、48及72小时称体重及观察死亡情况，腹腔注射抗原量多时，在短时期內死亡，根据不同浓度及死亡情况計算百分之五十最小致死量 (LD50)，皮下注射后，体重多普遍下降，若抗原毒性低則体重很快上升，此法簡而易行。

* 小组成员：

卫生部生物制品檢定所：王秉瑞、王耐芬、关 鏞

武汉生物制品研究所：江先觉

长春生物制品研究所：楊钟琪、刘增余

上海生物制品研究所：楊关海

兰州生物制品研究所：張曼奇

成都生物制品研究所：張国光

卫生部生物制品研究所：陈正仁、赵韶蕊、卢錦汉、謝彦博
王立亚、刘玉珍、肖振亚、高子仪

4. 家兔皮肤試驗：

为了比較经过减毒处理与未处理抗原的毒性，茲将抗原作家兔皮內注射。观察到有未处理者引起明显的紅肿，例如伤寒抗原稀释至1/64毫克，仍能引起15×15mm的反应，而处理者則只有5×5mm的反应，惟因家兔缺少，未能作更多試驗。

5. 家兔热原质試驗：

取純化抗原靜脉注射家兔可引起体温升高的現象，曾以醋酸处理过的抗原作靜脉注射观察到体温有所增高，但处理过的抗原引起体温升高的程度較未处理者为低，两者相差近一度左右。

6. 組織培养法：

取豚鼠腎細胞或鸡胚細胞培养于37°C，观察細胞发育情况。正常情况下細胞形成单膜，然后加入抗原，如抗原具有毒性，观察到細胞死亡脫落，经过少量試驗认为此法不够敏感。

根据上述各种方法，认为小鼠毒性試驗、家兔皮內試驗及热原质試驗，均可作为检查抗原毒性的方法。如检查半成品时，抗原浓度高，可稀释成不同浓度，腹腔注射小鼠，观察死亡数以計算百分之五十最小致死量（LD₅₀），如检查成品时，含抗原浓度低，可腹腔注射后，观察体重升降情况来衡量反应的强弱。在家兔来源充足时可采用皮肤試驗方法。

二、免疫力試驗的选择及减量免疫試驗結果：

按照苏联法規的規定，含有吸附剂的純化抗原，只須皮下免疫一次，隔10日后攻击毒菌，而菌体菌苗則須皮下免疫两次，間隔7日，末次免疫后10日攻毒，对不含吸附剂的純化抗原如何檢定，未曾提及。我們曾以不含吸附剂的抗原作一次及二次免疫作对比試驗。

純化菌苗注射后反应較强，因之考虑是否可能象菌体菌苗一样，减量注射，为了明确减

量是否影响菌苗的免疫效果，进行了免疫力对比观察。

取北京所出品的純化菌苗两批及菌体菌苗三批，各按規定剂量及减半量分別免疫小鼠。并以生理盐水将菌苗按5倍稀释后分別免疫小鼠。所得結果綜合于表1。

从免疫次数来看，免疫一次者，純化菌苗对伤寒及副伤寒甲的免疫力較菌体菌苗为佳，副伤寒乙則略差。经两次免疫后，純化菌苗的免疫力更为增强，副伤寒乙亦能达到与菌体菌苗相同的免疫程度。由此可見免疫一次亦能显示免疫效果，且較两次免疫为敏感。所以在以后大多数試驗中决定采取一次皮下免疫，10日后攻毒的办法，经多次試驗甚为滿意。

从减量免疫情况来看，全量及半量免疫的效果完全一致，均符合并超过規程的要求，有待人群免疫后作流行病学效果观察。

表一 伤寒純化菌苗与菌体菌苗免疫力对比試驗結果

免疫剂量		攻击后小鼠存活率					
		伤寒攻击 1~4个 致死量		副甲攻击 1~4/5 致死量		副乙攻击 2~4/5 致死量	
	純化菌苗	菌体菌苗	純化菌苗	菌体菌苗	純化菌苗	菌体菌苗	純化菌苗
一次免疫	0.075毫克	5亿	100	93.4	86.6	26.6	96.7
	2×	2×	100	80	80	13.3	100
	10×	10×	83.4	50	80	6.6	86
	50×	50×	43.3	11.7	40	0	66.7
	250×	250×	30.7	15	26.6	13.3	46.7
两次免疫	1250×	1250×	20.3	0	33.3	20	36.9
	0.075毫克	5亿	100	93.3	100	76.6	100
	2×	2×	100	86.7	95	60	100
	10×	10×	100	70	71.7	49.2	76.7
	50×	50×	80	56.7	51.2	47.7	60
免疫	250×	250×	50	23.3	56.7	40	50
	1250×	1250×	30	23.3	51.7	36.7	13.3

三、磷酸铝吸附剂配制方法的試驗

各所使用純化三联菌苗时，所得反应不一致，有强有弱，虽均用磷酸鋁作为吸附剂，但

含量各不相同，每毫升含量自1.5至3.0毫克不等，同时配制方法亦各有不同，因此进行了吸附剂配制方法的试验。以三氯化铝与磷酸钠配合后所含之游离磷酸根最少，同时不出現铝离子則较为理想，曾将三氯化铝及磷酸钠分别配成10%及15.75%之溶液，然后按其容量以1:1.05、1:1、1:0.95、1:0.9及1:0.85进行混合，随后取各混合剂的上清液测定其PH及铝和磷酸根的含量，试验结果以1:1.05之比例較好，PH为5.73，铝离子反应微弱，磷酸根很少，每100毫升内含55.8毫克。若磷酸钠含量逐渐减少，PH亦逐趋酸性，铝离子亦增加，当PH达3.5以下时，磷酸铝呈混悬液，无下沉现象。

四、福木林处理抗原减低毒性的试验：

曾对北京所58年及60年所作抗原进行制造过程中的检查。发现58年系按苏联法规的方法，将抗原稀释使含量为成品的一倍（1:2），而60年系按暂行办法将抗原浓度增至成品的二十倍（1:20）同样加入福木林使最后含量均为0.3%，考虑到福木林含量不同，可能与脱毒完善与否有关，因而进行两种方法的对比试验，将配制不同浓度的抗原放40°C经5及10日脱毒后取出进行毒性试验，发现58年与60年抗原，不论是按1:2或1:20浓度脱毒，不论是脱毒5日或10日，从小鼠试验来看，毒性均未有任何区别，从人体反应观察亦无差异。

福木林对于伤寒的减毒作用，文献上有不同的报导，为了获得較肯定的答案，曾作了一些试验，取纯化三联抗原，分别配成两种浓度，一组为每毫升含3毫克，另一组为每毫升含20毫克，各分别加福木林使含量为0.5%，1%，2%，及4%，放置37°C经3、5、14……日

抽样进行毒性试验，为了脱除福木林，曾加入乙醇，取沉淀的抗原稀释成每毫升含1、2、4及8毫克，注射小鼠。观察毒性，到目前为止已进行放置3、5及14日的试验，结果四种不同浓度的福木林，对不同浓度的纯化伤寒、副伤寒甲及副伤寒乙抗原，经放置14日后尚未见有减毒作用。综合结果如表二。

表二 福木林处理伤寒副甲及副乙抗原后的毒性试验结果

抗原种类	组别	4毫克	2毫克	1毫克	0.5毫克	LD50
伤寒抗原	第一组3毫克	52/55	54/60	44/55	19/56	.67mg
	对照	15/15	13/15	12/15	4/15	.73mg
	第二组20毫克	56/60	46/60	37/60	16/60	.90mg
	对照	14/15	15/15	11/15	6/15	.67mg
副伤寒甲	第一组3毫克	41/60	26/60	15/60	1/60	2.33mg
	对照	12/15	11/15	3/15	0/15	1.61mg
	第二组20毫克	40/60	26/60	11/60	1/60	2.30mg
	对照	8/15	4/15	1/15	1/15	3.03mg
副伤寒乙	第一组3毫克	59/60	59/60	50/60	40/60	<.5mg
	对照	15/15	13/15	15/15	9/15	<.5mg
	第二组20毫克	60/60	59/60	59/60	50/60	<.5mg
	对照	15/15	15/15	13/15	9/15	<.5mg

注：分母为使用小鼠数，分子为死亡数。

五、氢氧化钠处理抗原减低毒性试验：

文献上有不少用碱处理肠道细菌抗原，获得降低毒性的报告，我们曾先后试用两种抗原，一为纯化伤寒副甲及副乙混合抗原（3毫克/毫升），另一为单价副乙抗原（16毫克/毫升），分成若干组，每组分别加入0.1N、0.25N及0.5N的氢氧化钠，分别放置于4°C、37°C及54°C水浴中，经30、60、120及240分钟进行处理，随后每分标本均用1N醋酸调节PH至6.0~7.2，再进行毒性及免疫力试验，所得结果见表三、表四。

表三 混合抗原经氢氧化钠处理后毒性试验结果

次 数	抗原处理方法	注射前体 重(克)	注射三日 后体 重 (克)	注射五日 后体 重 (克)	死亡%	血 清 学 反 应 检 查											
1	.25N54°C60' 对 照	75 76	75.5 69	77.2 73.5	0 0	用 作 副 沉 乙 淀 血 反 清 应	补 体 结 合 反 应	用 副 乙 血 清 作									
2	1N54°C60' 对 照	82.5 80	78 73.7	85.7 80.7	0 0												
3	1N54°C120'	81 81	74 62	81 68.5	0 20												
		对 照	82	—	—							100					
			78	—	—							80	1:10	1:10	1:20	1:20	1:40
4	1N54°C60'	73.2 74	80 83.5	83.7 84.9	0 0							卅	卅	—	—	—	—
		1N54°C120'	77 81	82.2 89.2	83.2 88.2							0 0	卅	卅	—	—	—
	对 照		76 73.5	— 69.5	— 72.1							80 0	卅	卅	卅	卅	卅

表四 副乙抗原经氢氧化钠处理后毒性及补体结合试验结果

次数	抗原处理方法	4死 毫亡 克%	2死 毫亡 克%	1死 毫亡 克%	1/2死 毫亡 克%	补 体 结 合 试 验									
						mg/ml	2 ×	4 ×	8 ×	16 ×	32 ×	64 ×	128 ×	256 ×	512 ×
5	.1N54°C60'	100%	100%	60%	0%	卅	卅	—	—	—	—	—	卅	卅	卅
	.1N54°C120'	40	20	20	0	卅	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅
	.1N54°C240'	0	0	0	0	卅	—	—	—	—	—	—	卅	卅	卅
	.25N54°C30'	40	20	0	0	卅	卅	—	—	—	—	—	—	卅	卅
	.25N54°C60'	20	0	0	0	卅	卅	卅	—	—	—	—	—	卅	卅
	对 照	80	100	100	60	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6	.1N37°C120'	100	80	20	20	—	—	—	—	—	+	+	+	+	卅
	.1N37°C240'	100	20	20	0	—	—	—	—	—	—	—	+	+	卅
	.1N54°C60'	100	20	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	.1N54°C120'	60	0	0	0	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
	.25N37°C30'	60	40	40	0	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	.25N37°C60'	100	60	20	0	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	.25N37°C120'	100	40	0	0	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	.25N4°C240'	100	60	20	0	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
	.25N4°C8小时	100	60	20	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	卅
	.25N4°C24小时	100	100	20	0	卅	—	—	—	—	—	—	—	—	卅
	对 照	100	100	80	60	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7	.1N37°C240'	100	80	20	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	.25N37°C120'	100	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	.25N4°C8小时	100	100	20	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	对 照	100	100	100	80	—	—	—	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

从所得结果来看，腹腔注射混合纯化抗原0.1毫克以上即可引起小鼠死亡，但经氢氧化钠处理过之抗原，注射0.15毫克并不引起死亡，可见用碱处理能减低抗原的毒性。可是从沉淀反应结果来看，对付伤寒乙血清虽呈阳性，但滴定度较对照为低，用补体结合反应来检查，则又不能测出抗原的存在，说明经处理后的抗原可能有所损坏。此项血清学检查的结果与免疫力试验的结果亦相符合。曾用第4批号的抗原作免疫力试验。对一个绝对致死量仅获50%~60%，对两个致死量以上则不能保护，而对照组注射八个致死量仍保护100%，显示两者的免疫力有显著的差别。

用不同浓度的碱，在不同温度经不同时间处理的副伤寒乙抗原，其毒性有显著的降低，惟补体结合反应呈现不规则的现象，但仍能看出反应不若未处理者，曾以第7批号的抗原作免疫力试验亦证实免疫力不合格。

我们目前选用的碱处理纯化抗原，虽能减低抗原的毒性，但免疫性亦随之下降，不适合作为处理的方法。

六、醋酸水解处理抗原减低毒性的试验：

取不同浓度的抗原，如干燥抗原每毫升内含16毫克，液体抗原含5毫克，混合抗原含1毫克，分别加入不同浓度的醋酸。如0.1、0.25及0.5N的醋酸，在56°C或100°C水浴中，加温30、60及120分钟，经处理后用氢氧化钠调节PH至6.2~7.2，然后作小鼠毒性及免疫力试验。经过82批次（伤寒28批次，副伤寒甲21批次，副伤寒乙33批次）的试验，所得结果综合如表五。

抗原经用弱醋酸处理后，可以降低毒性，伤寒降低4~8倍，副伤寒甲3~4倍，副伤寒乙则比较不稳定。用同一浓度的醋酸处理不同时间来看，处理时间愈长，毒性也就愈低，若使用醋酸的浓度增高，则毒性降低也较快。就免疫力来看，伤寒抗原较为稳定，百分之五

十最小免疫剂量在0.000058~0.00064毫克之间，而对照组为0.000031~0.0005毫克之间，

表五 伤寒副伤寒甲乙抗原经醋酸处理后的毒性及免疫力试验结果

抗原批号	处理方法	毒性 LD50	免 疫 力 ED50	对 1 DCL 保获率	对 2 LCD 保获率	
伤 寒	干燥抗原	.5N60'	2.6mg	.000399mg	100%	90%
		90'	3.4	.000135	"	
	60—V	120'	3.8	.000486	"	100%
		对照	<.5	.000302	"	"
抗 原	干燥抗原	.5N60'	2.4	.00059		
	60—IV	120'	2.6			
		对照	0.5	.000127		
抗 原	液体抗原	.1N30'	3.2	.000041		
		45'	3.3	.000040		
		60'	3.7	.000366		
		.25N30'	2.0	.000131		
	60—VI	45'	3.4	.000040		
		60'	> 4	.001829		
		90'	> 4	.000040		
		对照	<.5	.000060		
副 甲	干燥抗原	.5N90'	> 4	.000110		60%
	7 批	120'	> 4	.000838		
		对照	1.5	.01253		50%
		抗 原	液体抗原	.1N30'	1.2	>0.025
60'	> 4			"		
60—VII	.25N30'		4.0	"		
	60'		4.0	"		
	对照		1.2	.0062		
付 乙	干燥抗原	.5N30'	0.84			
		60'	1.6	.00668		100%
		120'	3.3			55%
		对照	0.5	.000334		70%
	60—V	.5N90'	1.4	>0.025		40%
		120'	2.0	.02061		
		对照	<.5	.01212		33%
		抗 原	液体抗原	.1N50'	.8	.000454
60'	1.6			.004257		
90'	> 3					
60—VII	.25N30'		1.0	.000713		
	60'		1.8	.01292		
	90'		2.8			
	对照		<.5	.003238		

說明两者基本一致。副伤寒甲因尚未具体掌握操作技术，同时試驗次数不够多，所得結果尚有出入，有时处理組較对照組为强，有时又恰恰相反，副伤寒乙虽作过30余次試驗，看来尚不稳定，均有待作进一步的試驗。

曾取經不同浓度及不同時間处理过的三种抗原作56批次补体結合試驗，观察到处理者与未处理者基本上没有什么差別。

由这些試驗說明以弱醋酸处理伤寒及付伤寒抗原可以降低毒性且保持其免疫性，惟应設法寻找出适合的浓度及時間。

七、鉻明矾处理抗原减低毒性的試驗：另有專題总结，故从略。

八、小结：

此次集中全国七所有关人員对减低純化伤寒抗原的毒性問題，进行了广泛的試驗，初步摸索出一些結果。如找出检查毒性的方法，对半成品采用不同剂量腹腔注射小鼠观察死亡情况，以計算百分之五十最小致死量；对成品菌苗可于腹腔注射后观察体重以測定毒性。另外对减低毒性方面进行了多种試探性的試驗，如用福木林处理不同浓度的抗原，用乙醚提取企图去掉毒性物质，用硫酸鋅、硫氰酸鉀、明矾、鉻酸鉀、重鉻酸鈉、过碘酸鉀、甲基肼酸、碱或酸水解及鉻明矾等方法来降低抗原的毒性，經試驗后找出鉻明矾处理抗原可降低毒性4倍以上，且不影响其免疫力，这些試驗均有待今后作进一步的研究。

鉻明矾对伤寒副伤寒甲乙純化抗原 減毒試驗的初步报告

卫生部生物制品委员会純化伤寒研究組

执笔人：陈正仁 关 鎔 王立亚

伤寒或副伤寒杆菌对实验动物具有毒性，早经证实；用伤寒杆菌制成的菌苗对人体亦引起不同程度的反应，在推行預防接种时不容易为群众所接受。曾有不少学者設法减低其毒性，如安东氏 (1,2) 等报导用鉻明矾处理伤寒菌苗能除去毒性而保持其免疫性。我們取深层培养的伤寒或副伤寒甲乙菌液，按Topley氏方法、用胰酶消化、酒精沉淀、经透析后，获得較純的抗原，取純化抗原经鉻明矾处理后，观察到确能降低毒性，减少反应，且保持其原有的免疫性，本文报导初步試驗的結果。

取純化抗原用生理盐水稀释成6—8毫克/毫升的浓度，加入定量的鉻明矾，进行处理，随后作抗原处理前后的毒性及免疫力試

驗。

毒性試驗：将处理前后的抗原，分別稀释至不同浓度，每个稀释度腹腔注射体重16—18克小鼠5只，观察三日，計算百分之五十致死剂量 (LD_{50})。

免疫力試驗：曾用两种方法进行检验，一为用定量抗原进行免疫，而以变量毒菌进行攻击，以求出对一个或数个绝对致死量的保护数；另一法为用变量抗原免疫，而以定量毒菌进行攻击，以求出百分之五十的最小免疫剂量 (ED_{50})。

经用数十批抗原，作多次試驗，获得比較規律的結果，茲綜合如下表：

純化抗原鉻明矾处理前后毒性及免疫力試驗結果

抗 原 种 类	毒 性 (LD_{50})			免 疫 力 (ED_{50})	
	处 理 前	处 理 后	减低倍数	处 理 前	处 理 后
伤 寒	0.39毫克	4.43毫克	11 倍	4.04×10^{-4} 毫克	1.82×10^{-4} 毫克
副 伤 寒 甲	0.79 "	3.60 "	4.6 "	3.08×10^{-3} "	1.67×10^{-3} "
副 伤 寒 乙	0.32 "	4.79 "	15 "	2.6×10^{-4} "	2.4×10^{-4} "

从試驗的結果可看出伤寒或副伤寒乙純化抗原经鉻明矾处理后，确能降低毒性11倍以上，个别批号达30倍；副伤寒甲的毒性降低倍数不如伤寒或副伤寒乙显著，可能系原来毒性較低的原因。就免疫力試驗来看，鉻明矾处理前后的抗原沒有区别。如将鉻明矾的含量增大来处

理抗原，則見到毒性降低更为显著，惟見到免疫力有下降的趋势，且皮內注射家兔时，見到加大鉻明矾剂量的抗原能引起局部化脓的现象，故认为鉻明矾的用量要适当，不宜过大。为了再度降低毒性而又不引起局部化脓，曾将鉻明矾剂量加大以处理抗原，随后再进行透析，

試驗結果說明透析雖然能除去部份鉻明矾的含量，可是毒性又隨之增高，由此可見鉻明矾與抗原的結合也許為可逆反應，值得作進一步試驗來解釋鉻明矾減毒的機制問題。

以選擇的鉻矾濃度處理純化抗原後，用兩種免疫方法測定，均證明能維持其原有的免疫性。傷寒及副傷寒乙對一個致死量攻擊時，不論處理前後均能保護85—100%，對二個致死量均能保護70—85%，對四個致死量傷寒抗原仍能保護80%以上，而副傷寒乙抗原則在50%以下。若用百分之五十最小免疫劑量來測定，傷寒及副傷寒乙抗原的免疫劑量均小，且處理前後均一致。副傷寒甲抗原免疫的小鼠，對一個致死量雖能保護90%以上，可是對二個致死量則多在50%以下；從上表的結果也看出副傷寒甲抗原的免疫力較傷寒或副傷寒乙為差，惟用鉻明矾處理並不損壞其免疫性。

將鉻明矾處理過的抗原，用生理鹽水稀釋成菌苗，使每毫升含抗原0.15毫克，再次作毒性試驗，腹腔注射0.5或1.0毫升菌苗，每日稱

體重，從動物體重的升降亦可看出毒性的區別。未經處理的對照抗原所製成的菌苗，注射後第一、二日內引起體重普遍下降，至第三、四日才恢復到注射時原來的體重，至第四、五日體重才開始上升，至第七日體重較健康對照組為輕。經鉻明矾處理的菌苗注射後，體重並不下降或略有下降，至第二、三日隨即上升，至第七日與健康對照組的體重相似，由此可見用小劑量抗原注射動物後，以稱體重的方法亦可觀察到毒性的高低，而處理前後抗原之間是有區別的。

曾以鉻明矾抗原菌苗作小量人體反應觀察，皮下注射0.5毫升所引起的反應，較菌體菌苗或未經處理的抗原為低，隨後擴大試驗，注射數十萬人次，未見到不良反應，且較菌體菌苗反應降低三、四倍。至於人群的免疫效果，現正在進行流行病學效果觀察。

總的看來，鉻明矾處理傷寒純化抗原是個新的工作，現已確定能降低毒性，維持其免疫性，惟對減毒機制尚不清楚，有待繼續試驗。

參 考 文 獻：

1. Ando R, & Nakamura Y Jap. J. Exp. Med. 21 : 149, 1951.
同上 22 : 485, 1952
2. 下條實人 Jap. J. Bact. 8 : 381, 1953

胰酶番瓜酶真菌蛋白酶消化豆餅应用于 伤寒三联菌苗液体培养

闕毓筠 王立亚

黄豆蛋白中含有丰富的氨基酸，組成与酪蛋白相似^①。宋世銑等氏^{②③}曾用黄豆浸液蛋白胨培养霍乱，林飞卿氏^④将黄豆蛋白水解液用以伤寒菌苗液体培养。长春生物制品研究所应用胰酶黄豆蛋白培养基生产鼠疫活菌苗。黄豆价廉易得，如能代替牛肉則比較理想。此外，除胰酶外，也可設法用植物蛋白酶代替动物蛋白酶，以解决供应問題。番瓜酶消化牛肉^⑤作用快，用量少。Ramon和Mercier^{⑥⑦⑧}曾用番瓜酶消化馬肉制造白喉，葡萄球菌，破伤风等培养基。Iohuse氏^⑨找出了番瓜酶消化黄豆蛋白的最适条件。真菌蛋白酶在食品，制革工业上早已被广泛应用。湯汉芬^⑩应用真菌蛋白酶代替胰酶制造蛋白胨已经获得初步結果。我們证明伤寒菌在真菌蛋白酶黄豆蛋白琼脂培养基上生长良好^⑪。本实验系用胰酶，番瓜酶，真菌蛋白酶消化黄豆蛋白制造培养基，培养伤寒及副伤寒甲，乙，因条件所限只作了搖瓶培养。

材料和方法

(一) 真菌蛋白酶：将曲霉 (*Aspergillus Terrecolla* 3.374) 孢子接种于灭菌麸皮上，于28°C培养48小时，将溫度降至18°C，继续培养3—4天，于室溫自行干燥。

(二) 豆餅消化：

1. 胰酶豆餅：豆餅粉100克加水1000毫升，調至PH7.8~8.0，加入胰

酶粉2.5克，于37°消化24小时，再調至PH7.0消化24小时后即行停酶，过滤和脫色。

2. 胃酶胰酶联合消化豆餅粉：豆餅粉100克加水1000毫升，浓盐酸10毫升，胃酶2.5克，于50°C消化24小时，停酶及过滤，滤液再按上法消化。

3. 番瓜酶豆餅：豆餅粉100克加水1000毫升，調至PH5，加入番瓜酶(1:350)10克，于50°C消化24小时后随即停酶，过滤并用活性炭脫色

4. 真菌蛋白酶黄豆蛋白：30克黄豆蛋白加水100毫升，麸曲2克，于PH7.0 37°消化3天。

(三) 培养基制造：按后金格尔法。

(四) 搖瓶培养：将制造伤寒和副伤寒甲乙菌苗的常規菌种，接种于250毫升三角瓶內，每瓶裝有50毫升培养基，使每毫升培养基內含有0.5亿菌，于37°振蕩培养14小时。

(五) 化学測定：氨基氮按 Sorensen氏甲醛滴定法；还原糖按Somogyi氏法。

实验与结果

(1) 豆餅粉的处理：

直接以豆餅粉为基质，結果不佳。原因是豆餅粉含糖量高(12)，用以制成的胰酶消化液还

原糖含量高达11.54毫克/毫升，用以配制培养基培养伤寒菌，在培养过程中大量产酸，PH急剧下降，即使加入大量缓冲剂也不能控制；培养后的细菌菌形很不规则。因此，我们在消化以前将豆饼粉作如下处理：豆饼粉用水煮沸，调PH至黄豆蛋白的等电点，析出蛋白，过滤压干。这样可以除去大部份糖类和其他水溶性杂质。（下称减糖豆饼）、应用此种减糖豆饼消化液，制造简单，有可能应用于生产。胃胰酶联合消化豆饼，步骤长，没有突出的优点，未作进一步的探讨。

表1 豆饼粉经过不同方法处理对伤寒菌生长的影响

培养基种类	还原糖 毫克/毫升	培养后 PH	生长 浓度 亿/毫升	菌形
胰酶消化豆饼	11.54	7.6	338	G(-)杆菌菌形不规则
胰酶消化减糖豆饼	2.70	8.2	255	G(-)杆菌菌形一致
胰酶消化豆蛋白	1.03	8.4	250	G(-)杆菌大小一致整齐
胃酶胰酶联合消化豆饼	11.93	6.8	150	G(-)菌体多呈球形
胃酶胰酶联合消化减糖豆饼	7.23	8.2	200	G(-)杆菌
后金格尔		8.2	216	G(-)杆菌大小一致

(2) 消化条件

(i) PH的影响；胰酶作用最适PH为7.8~8.0，但减糖豆饼或豆蛋白，在此PH下过滤非常困难。将消化液调至黄豆蛋白的等电点，以析出未被消化的蛋白质，但仍不能改善过滤速度。我们进行了不同PH消化的比较，在PH7.8~8.0消化豆饼，消化开始后PH下降，24小时以后多数降至PH7.0以下，分别将PH调整至7.0，7.4，7.6，7.8，继续消化24小时，自表2，3中可看出：PH不同对消化程度及细菌生长并没有影响，但对过滤速度有了一定的改善。

表2 不同pH对消化的影响

消化维持 PH	7.0	7.4	7.6	7.8
消化后氨基氮含量 毫克/毫升	1.76	1.79	1.90	1.83
过滤速度				

表3 不同pH消化液对伤寒菌生长的影响

培养基种类	消化维持 PH	培养后 PH	生长浓度 亿/毫升	菌形
胰酶减糖豆饼	7.8~8.0	8.2	200	菌形正常
" "	7.8~8.0	8.2	255	"
胰酶减糖豆饼	7.0	8.2	275	"
" "	7.0	8.2	350	"
" "	7.0	8.2	345	"

(ii) 酶用量和基质浓度的影响：

表4 酶用量和基质浓度对消化的影响

酶量 NH ₂ -N mg/ml	基质浓度					
	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%	0.25%	0.40%
10%	1.61	1.87	1.97	1.98	2.23	2.43
15%	—	2.51	2.78	2.81	3.45	3.40

从表4可以看出基质浓度高，消化液氨基氮的含量也高。15%基质消化液氨基氮虽比10%的高，但消化液太稠，150克豆饼粉仅能收得400ml消化液，而用10%基质，100克豆饼粉则可得600ml。培养基含有200mg/ml氨基氮才能满足伤寒菌的需要，可见以10%基质和0.25%胰酶为宜。

(iii) 加热的影响：黄豆中含有胰酶抑制素，一般必须将其除去或破坏，消化才能正常进行。我们作了不同的加热实验，自表5可看出：加热处理对消化程度并无影响，可能是豆饼粉在去糖过程中，部份胰酶抑制素已被除去或破坏。

表5 减糖豆饼粉经过不同加热处理对消化的影响

处理方法	不加热	10磅20分 蒸汽加热	15磅40分 蒸汽加热
氨基氮含量 mg/ml	1.51	1.58	1.54

(3) 几种氨基酸和无机盐对伤寒菌生长的影响。

自表6可看出在胰酶消化减糖豆餅培养基中，

加入不同浓度的NaCl, MgSO₄, 檸檬酸鈉, 谷氨酸鈉和天門冬氨酸, 对伤寒菌的生长都沒有显著的刺激作用。

表6 几种无机盐和氨基酸对伤寒菌生长的影响

附 加 物	NaCl			MgSO ₄			檸檬酸鈉	谷氨酸鈉	胱 氨 酸	天門冬氨酸	对 照		
加 量 %	0.3	0.5	0.7	0.001	0.01	0.1	0.5	0.05	0.5	0.01	0.05	0.01	—
培 养 后 PH	8.2	8.2	8.2	8.2	8.4	8.4	8.0	8.2	8.2	8.4	8.4	8.2	8.2
生长浓度 亿/毫升	337	352	337	342	305	305	330	323	330	335	335	260	335

(二) 真菌蛋白酶消化黄豆蛋白

(1) 真菌蛋白酶不同時間消化黄豆蛋白和减糖豆餅的比較:

从表7看出, 应用真菌蛋白酶消化减糖豆餅培养基培养伤寒, 菌形不好。应用真菌蛋白酶消化黄豆蛋白培养基, 生长浓度高, 菌形正常。真菌蛋白酶消化黄豆蛋白, 在前三天进行的比較快, 三天以后氨基氮增加的很緩慢。消化不同時間的消化液, 对伤寒菌的生长并无影响。为了使消化更彻底, 我們采用了三天以上的消化時間。

表7 消化不同時間的黄豆蛋白和减糖豆餅对伤寒菌生长的影响

培 养 基 种 类	消化時間	培养后 PH	生长浓度 亿/毫升	菌 形
真菌蛋白酶黄豆蛋白	1天	8.2	205	菌形正常
" "	2天	8.4	195	" "
" "	3天	8.2	180	" "
" "	5天	8.2	190	" "
真菌蛋白酶减糖豆餅	1天	8.0	220	菌形不整齐大小不一致
" "	2天	8.0	205	" "
" "	3天	8.2	174	" "
" "	5天	8.0	175	" "
" "	7天	8.0	170	" "

(2) 表8表明氨基氮含量过低, 不能滿足伤寒菌营养需要, 以2.0毫克/毫升生长浓度最高。继续增加氨基氮含量, 是否能再提高生长浓度沒有继续实验。

表8 不同氨基氮含量对伤寒菌生长影响

培 养 基 氨 基 氮 含 量	培养后 PH	生长浓度	菌 形
0.5 毫克/毫升	8.2	110	G(-)杆菌大小一致
1.0 "	8.2	165	" "
1.5 "	8.2	205	" "
2.0 "	8.2	275	" "

(三) 番瓜酶消化豆餅

如表9所示: 伤寒菌在番瓜酶减糖豆餅培养基上能获得良好生长, 但在番瓜酶豆餅培养基上則与胰酶豆餅培养相似, P^H不穩浓度低, 菌形不好。自表10可看出細菌生长浓度随氨基氮的增加而增加。

表9 番瓜酶消化豆餅粉和消化减糖豆餅的比較

培 养 基 种 类	培养后 PH	生长浓度	菌 形
番 瓜 酶 豆 餅	6.8-	135	G(-)杆菌短粗肥大
" "	6.8-	112	" "
" "	6.8-	120	" "
番瓜酶减糖豆餅	8.4	235	G(-)杆菌, 菌形典型
" "	8.2	190	" "
" "	8.4	190	" "

表10 不同氨基氮对伤寒菌生长的影响

培 养 基 氨 基 氮 含 量	培养后 PH	生长浓度	菌 形
1.0 毫克/毫升	8.2	234	G(-)杆菌菌形正常
1.5 "	8.4	300	" "
2.0 "	8.4	350	" "

(四) 用不同培养基培养伤寒及副伤寒菌
结果如表11

表11 应用胰酶, 番瓜酶 真菌蛋白
酶减糖豆餅培养基培养伤寒,
副甲副乙的比較

菌	培养基种类	培养后 pH	生长浓度	菌 形
伤 寒	胰酶减糖豆餅	8.4	320	G(-)杆菌菌形正常
	番瓜酶减糖豆餅	8.4	250	" "
	真菌蛋白酶减糖豆餅	8.4	280	" "
	后金格尔	8.2	245	" "
副 甲	胰酶减糖豆餅	8.2	280	" "
	番瓜酶减糖豆餅	8.2	230	" "
	真菌蛋白酶减糖豆餅	7.2	35	" 較肥大
	后金格尔	8.2	272	" 菌形正常
副 乙	胰酶减糖豆餅	8.4	335	" "
	番瓜酶减糖豆餅	8.4	260	" "
	真菌蛋白酶减糖豆餅	8.4	320	" 較肥大
	后金格尔	8.4	290	" 菌形正常

总 结

- (1) 胰酶消化减糖豆餅, 番瓜酶消化减糖豆餅, 真菌蛋白酶消化黄豆蛋白制成的培养基, 培养伤寒及副伤寒甲, 乙, 除付甲在真菌蛋白酶黄豆蛋白培养基上生长浓度不高之外, 其他均可达到200亿/毫升以上。菌形正常。可达到后金格尔培养基的水平。其中以胰酶减糖豆餅培养基的结果最好, 該培养基操作简单, 原料易得, 可能应用于生产。但所得的細菌抗源性如何尚須加以考察。
- (2) 豆餅粉中; 除蛋白质外尚含有大量糖类不利于伤寒, 付伤寒甲乙杆菌的生长, 必須要经过适当处理才能应用。

参 考 文 献

1. Altschul A. M.: Processed plant Protein Foodstuffs 879, 1958.
2. 宋世銑、陈宗賢: Chines Med. J, 46: 603, 1932.
3. 宋世銑: 中国医学杂志, 34: 521, 1948.
4. 郑宝芬、林国编、余傅霖、林飞卿: 微生物学报, 2: 5, 1954.
5. Gottschall G. Y. & Kies M. W.: Food Research 7; 373, 1942.
6. Ramon G. Germain Amouneux and Jaques Pochon: Compt. rend, 213: 846, 1941.
7. Ramon G, Mercier P. Pochon J. and Amoureux G.: Compt rend, Soc. Biol, 136; 329 1942.
8. Ramon G. Amoureux G. and Pochon J.: Compt, rend, Soc. biol., 137; 8, 1943.
9. L. Vernon & Smith K.: Cereal Chem, 25: 77, 1948.
10. 湯汉芬、方沁芳: 微生物学报, 4: 247, 1956.
11. 未发表。
12. Altschul A. M.: Processed Plant Protein Foodstuffs: 374, 1958.
13. L. H. Bailey, R. G. Capen and J. A. leclerc, Cereal chem, 12; 441, 1985.