

一种新的小白鼠病毒的研究

I. 發現經過

朱既明 梁榮根 聞仲权

(中央生物制品研究所, 北京)

引起肺炎的小白鼠本身的病毒, 文献上已經描述过的, 有小白鼠肺炎病毒(P.V.M.)^[1]及 Nigg氏病毒^[2]。

自 1953 年 3 月起由于工作上的需要, 我們曾先后將几株流行性感胃病毒 (以下简称流感病毒), 通过小白鼠并進行盲目傳代, 借以獲得能使小白鼠致病的適應株, 其中五次獲得了預期的結果, 即于通过若干代后病毒对小白鼠的致病力提高, 接种入雞胚尿囊腔时, 其血球凝集的滴度亦有顯著的增高。但是与之同时五个適應株的抗原性却都發生了部分或全部的改变。流感病毒在小白鼠体内傳代后可能發生抗原性的改变, 在文献中曾經有过报道^[3], 但一般說來这种抗原性的改变是比較微小的, 并不是經常可以遇到的^[4]。而我們則連續五次發現了这样的情况, 且在多数場合下, 適應株完全不能被原株的血清所抑制; 在另一些場合下, 起初呈不完全抑制, 而在雞胚中傳若干代后, 又变成完全不被原株血清所抑制。由于这些特征, 使我們考慮到有無毒种混雜, 或为小白鼠本身所攜帶的某种病毒所污染的可能。以后, 經過多方面的試驗結果証明以上的五株流感病毒, 有的确已完全为另一种病毒所代替, 有的則是原株流感病毒与另一种病毒的混合物, 可以用中和試驗方法將它們分开。繼續的研究又証明从未接种的小白鼠中, 通过盲目傳代的方法, 可以獲得一株表面上与流感病毒性狀極相似的病毒。关于以上这些試驗的詳細情况將于本文中加以敘述。有关这种病毒的生物学性狀的研究証明它与以前在小白鼠中發現过的小鼠肺炎病毒(P.V.M.)及 Nigg氏病毒完全不相同, 而与人的流感病毒有一部分类似之处, 亦有許多不同之点, 因此我們暂时称之为“小鼠类流感病毒”。有关这一部分材料, 將另作报告^[5]。

材料与方法

(一) 流感病毒株

PR₈-1、PR₈-15 为甲型 PR₈ 的兩個亞株, 自不同來源取得, 取得前均曾經小白鼠

适应。

Lee-2 为乙型, 取得前, 曾經小白鼠适应。

FM₁-3, FM₁-17 为亞甲型 FM₁ 的两个亞株, 自不同來源取得, 其中 FM₁-3 从未适应于小白鼠, 而 FM₁-17 于取得前曾經小白鼠适应。

53-4, 53-7 为 1953 年自北京分离的二株亞甲型病毒, 均連續在鷄胚中傳代, 未曾适应于小白鼠。

病毒株名称根据下列方法表示之:

1. 凡未經本試驗室通过小白鼠之病毒株加上 E 字, 表示只在鷄胚傳代, 如 Lee-2E。
2. 凡是經過本試驗室通过小白鼠之病毒株加上 M 字, 表示在小白鼠适应之毒株, 如 Lee-2M。
3. 凡是經過本試驗室通过小白鼠之病毒株, 經發現其抗原性与原來毒株有改变时, 加上 MV 字, 如 Lee-2MV。

我們作过小白鼠适应之病毒株有下列几个:

未 适 应	适	应
PR ₁ -15E	PR ₁ -15M	PR ₁ -15MV
Lee-2E	Lee-2M	Lee-2MV
FM ₁ -3E	FM ₁ -3M	FM ₁ -3MV
FM ₁ -17E	FM ₁ -17M	FM ₁ -17MV
53-4-E	53-4M	53-4MV

(二) 鷄胚中傳代方法

用普通肉湯(pH 7.2—7.6)將病毒稀釋 10^{-3} , 接种 0.1 毫升于 9—11 日來亨鷄胚的尿囊腔中。培育于 35—36°C 經 40—44 小时后, 將鷄胚放 0—5°C 冰箱中至少 4 小时, 然后收取其尿液。傳代的毒种放置 -35°C 冰箱內冷冻保存。

(三) 小白鼠

- 1 号小白鼠: 为本所自己飼养的鼠种。
- 2 号小白鼠: 为本所飼养的另一鼠种, 原为瑞士种。

(四) 小白鼠中傳代方法

1. 小白鼠連續傳代法

將病毒接种 0.05 毫升于輕度麻醉的小鼠鼻腔, 小鼠体重除特別标明者外一般为 12—14 克, 每次接种 4—5 只, 隔 2 天或 3 天后將其中 2 只殺死, 取出肺組織做成懸液, 然后再通过 4—5 只小白鼠。余存 2—3 只小白鼠于 7—10 日后剖殺之并观察其病变。每

次傳代之肺懸液，于每个 0.1 毫升中加入約 200 單位青霉素及 200 單位鏈霉素后，接种 0.1 毫升于雞胚尿囊腔，以探測病毒之存在。

2. 小白鼠雞胚交遞傳代法

先用病毒尿液 0.05 毫升接种于 4—5 只輕度麻醉的 12—14 克小白鼠鼻腔，隔 2—3 天后，將其中 2 只殺死，用無菌手續取出肺組織，做成懸液，于每 0.1 毫升中加入 200 單位青霉素及 200 單位鏈霉素，接种 0.1 毫升于雞胚尿囊腔，其余 2—3 只留作觀察。

接种后之雞胚培育于 35°C，2 天后取出其尿液接种于 4—5 只小白鼠鼻腔，隔 2—3 天后取其中 2 只鼠肺做成懸液再接种雞胚。如是一代雞胚与一代小白鼠交遞進行傳代。

3. 气管及肺洗液傳代法

傳代方法如 1，但通过时不用肺懸液，而用气管及肺洗液。操作方法为將小白鼠頸部皮膚剪开，暴露出气管上部，用 1 毫升注射器及 26 号針头吸取 0.25 毫升生理鹽水，插入气管，用鑷子固定周圍，輕輕將鹽水挤入肺中，然后用注射器回抽，約可抽出 0.2 毫升微帶混濁的液体，即用此作傳代材料。此法用于各株病毒的开始代数：PR₃-15 为 13 代，Lee-2 为 5 代，FM₁-17 为 11 代，53-4 为 34 代，FM₁-3 未应用。

(五) 血球凝集試驗

病毒稀釋自 1:10 开始，用二倍稀釋法稀釋于 0.25 毫升生理鹽水中，加入 0.5% 雞血球懸液 0.25 毫升，搖勻后置室温 45 分鐘觀察結果。方法詳見文献^[6]。

(六) 血球凝集抑制試驗

雞血清制备：用体重 3 斤之白色來亨雞，于靜脉注射尿囊液 2 毫升，同时腹腔注射 8 毫升，第二天重复一次，至 8—10 天采血。

抗原：采用未稀釋或用鹽水稀釋 4 倍保存于 0—5°C 之尿囊液，各小白鼠适应株抗原之代数均与制备雞血清的免疫抗原为同一代。

PR ₃ -15MV	16 代
Lee-2MV	12 代
FM ₁ -3MV	27 代
FM ₁ -17MV	14 代
53-4MV	32 代

方法：1. 血清稀釋病毒定量法

將血清置 56°C 水浴中加温半小时，將血清从 1:10 起用二倍法稀釋，使每管內含 0.25 毫升，加入 0.5% 雞血球 0.25 毫升，搖勻后，再加入 4 个單位抗原 0.25 毫升，搖勻后置室温 45 分鐘觀察結果，以完全抑制一管为血清滴度。試驗方法詳見文献^[6]。

2. 血清定量病毒稀釋法

將病毒自 1:10 開始，用二倍法稀釋于生理鹽水中，取另一根吸管從最高稀釋度起將各個稀釋度之稀釋液分配到兩排小試管中，每管 0.1 毫升，于第一排中加入 1:10 的血清 0.1 毫升，于第二排中加入鹽水 0.1 毫升，最后于每管中，加入 1% 鷄血球 0.1 毫升，搖勻后 30 分鐘觀察結果，比較兩排的病毒滴度的差別。

(七) 中和試驗

採用血清定量病毒稀釋方法。

血清：鷄血清 1:10 稀釋，如用兩種以上的混合血清則應使其每一血清之最后濃度為 1:10。血清于試驗前置 56°C 水浴中加溫半小時。

病毒：尿囊液用普通肉湯作十倍遞續稀釋，稀釋用之肉湯中加入抗生素，使每毫升含青霉素及鏈霉素各 1000 單位。

方法：血清與不同稀釋度的病毒等量混合后置 0—5°C 冰箱中 1 小時。每稀釋度接種 10—11 日齡鷄胚三個的尿囊腔中，每鷄胚接種 0.2 毫升。接種后置於 35—36°C 孵箱培育，72 小時分別取出各胚之尿液作直接血球凝集試驗。呈現典型血球凝集現象者判為受感染，反之判為未感染，結果以 Reed 及 Muench 氏法^[7]計算 ID₅₀。每個病毒須做一組對照，以肉湯代替 1:10 血清，亦用同法計算出對照組的 ID₅₀。各個試驗未被中和之最高稀釋度的陽性鷄胚之尿囊液均保存下來，留作進一步研究。

(八) 病毒小白鼠滴定

1. 50% 致死量 (LD₅₀):

病毒用肉湯作 10 倍遞續稀釋，從最高稀釋度起自小白鼠的鼻腔滴入 0.05 毫升，每稀釋度接種小白鼠 5 只，逐日觀察 10 天，將死亡小鼠取出解剖觀察肺部病變。凡 24 小時內死亡或肺部無病變者均從試驗中剔除。10 日后計算各個稀釋度死亡小鼠的數目并依 Reed 及 Muench 氏法算出 LD₅₀。

2. 50% 感染量 (ID₅₀)

病毒滴定方法同上，10 天后將全部存活小白鼠剖殺之，檢查其肺部病變，病變以 + + + +, + + +, + +, + 記錄之。

+ + + + 全部或幾乎全部鼠肺呈現紫紅色實變。

+ + + 鼠肺 $\frac{3}{4}$ 呈現紫紅色實變。

+ + 鼠肺 $\frac{1}{2}$ 呈現紫紅色實變。

+ 鼠肺 $\frac{1}{4}$ 呈現紫紅色實變。

如小鼠死亡，而鼠肺全部實變者作 + + + + + 計算，算出每個稀釋度的 + 號數，并

依 Reed 及 Muench 氏法計算出 ID_{50} 。

試驗結果

(一) 小白鼠適應過程中的抗原性改變

从 1953 年 3 月起先后將 FM_1-3E , $53-4E$, $53-7E$ 用小白鼠連續傳代法適應小白鼠 7 次, 其中 FM_1-3E 一次, $53-4E$ 二次, $53-7E$ 四次, 均獲陰性結果。考慮到可能是我們用的小白鼠對流感病毒不敏感, 或者是與毒株的本質有關。因此同年 6 月起改用小白鼠雞胚交遞傳代法通過 FM_1-3E , $53-4E$, $53-7E$ 各一次, 結果能使 FM_1-3E 及 $53-4E$ 適應于小白鼠, $53-7E$ 通過小白鼠 9 代只能維持病毒的延續不至失掉, 但對小白鼠仍然不能致病。

1953 年 10 月起又將 PR_8-15E , $Lee-2E$, FM_1-17E 三株流感病毒, 連續通過小白鼠, 獲得了小白鼠的適應株, 但是這些 FM_1-3M , $53-4M$, PR_8-15M , $Lee-2M$ 及 FM_1-17M 等所謂小白鼠適應株, 經過血清學檢查, 首先發現 FM_1-3M , $53-4M$, FM_1-17M 之抗原性已有顯著的改變, 就是這三株適應株已不被原株血清所抑制。後來, 用中和試驗方法亦發現 PR_8-15M 及 $Lee-2M$ 之抗原性亦有改變。

為了稱謂的方便, 將抗原性改變了的適應株叫作“變性株”。

下面就五株流感病毒的適應過程以及在適應過程中觀察到的一些現象, 如抗原性變化, 病毒接種雞胚後, 其尿液血凝滴度, 對小鼠的致病力等情況作簡要的介紹。

測定抗原性變化, 病毒在雞胚中的血凝滴度, 以及對小白鼠的致病力時, 均用適應小白鼠過程中的不同代數的鼠肺材料接種雞胚後收獲的尿囊液作試驗材料。檢查各代病毒抗原性的方法, 乃用各代保存下來的尿液對原株血清作試驗, 由於血凝抑制試驗簡單快捷, 因此絕大部分的檢查均用此方法, 如病毒不為原株血清所抑制, 或抑制滴度與抑制原株滴度差別很大者, 叫作變性株, 否則仍認為抗原性未有變化。如果同一代病毒同時又用中和試驗來檢查, 結論以中和試驗為準。必須指出, 用血清稀釋病毒定量法作血凝抑制試驗, 由於所用病毒量固定為四個血凝單位, 因此污染了少量的病毒是不能被發現的, 只是在污染了大量的其他病毒才容易發現, 例如 PR_8-15MV 及 $Lee-2MV$ 起初亦曾因此而忽略了, 後來用中和試驗方法才能確實證明。

1. 茲將 $FM_1-17E \rightarrow FM_1-17MV$, 在小白鼠中傳代歷史及觀察到的性狀的改變列作表 1。

2. $53-4E \rightarrow 53-4MV$

本株為 1953 年於北京分離者, 從未有通過小白鼠, 開始時用小白鼠雞胚交遞傳代

表1 FM₁-17E 的傳代过程及其性状的改变

代 数	动 物	血 凝 滴 度	小鼠 ID ₅₀	小鼠 LD ₅₀	FM ₁ 血清的抑制效价
未傳代	鷄 胚	480			
1—6	小 鼠	1280(3) 80(6)			
7	鷄 胚	80	10 ^{5.3}	10 ^{4.5}	未变*
8	小 鼠				
9	鷄 胚	80	—	10 ^{5.0}	3840
10—13	小 鼠	240(12)			
14	小 鼠				<20
15	小 鼠	1280—2560			<10
10'—12'	小 鼠	240(10') 80(11') 320(12')	10 ^{5.2}	—	2240

* 用 Blaskovic 及 Salk 氏法^[5], 試驗結果与原株一致。

() 中数字表示代数。

10'—12' 系由未变性的第 9 代重新开始連續傳小白鼠 3 代。

法通过共 11 代, 其后在小白鼠連續通过, 但中間在 16, 21, 23, 24, 26 及 32 各代曾通过鷄胚, 至 35 代停止。

各代病毒接种鷄胚后的血凝效价: 未傳代 320, 16 代 40, 22 代 960, 31 代 1280, 35 代 1280—5120。

抗原性檢查結果: 第 10 代未变, 16, 18, 21, 23, 30, 32, 35 代均發生改变。

对小白鼠之毒力: 在 21 代 ID₅₀ 为 10^{5.7}, LD₅₀ 为 10^{5.2}。

3. FM₁-3E → FM₁-3MV

本株曾用盲目傳代法通过小白鼠結果陰性, 因此, 此次通过改用小白鼠鷄胚交遞傳代法, 通过四代, 其后在小白鼠連續通过, 在 10, 14, 16, 18, 24, 27, 各代曾通过鷄胚, 至 27 代停止。

各代病毒接种鷄胚后的血凝效价: 未傳代 640—1280, 7 代 640, 22 代 40, 24 代 20, 27 代 1600—2560。

抗原性檢查結果: 12, 18, 22 均未有改变, 24 代用血凝抑制試驗檢查也未發現有改变, 但将此病毒在鷄胚遞傳 5 代后再用 Blaskovic 及 Salk 氏中和試驗法^[8]檢查, 發現与原株抗原性完全不同。27 代用血凝抑制試驗及中和試驗均發現抗原性改变。

对小白鼠的毒力: 在 24 代 ID₅₀ 10^{4.3}, LD₅₀ 10^{3.8}。

4. PR₈-15E → PR₈-15MV

本株原为小鼠适应株，所以用小鼠連續通过法傳代，僅在 6, 11 兩代曾通过鷄胚，至 16 代停止。

各代病毒接种鷄胚后的血凝效价：未傳代為 640，3 代為 1280，6 代為 640，11 代為 640，16 代為 1120。

抗原性檢查結果：第 6, 13 代未有改变，16 代用血凝抑制試驗檢查也未發現抗原性改变，但是將病毒接种鷄胚 1、2 代后再用血凝抑制試驗檢查發現同株血清对病毒虽仍有較高的抑制效价，但是各管中抑制均不完全，就是病毒中大部分为血清所抑制，而仍有一小部分表現凝集現象，以后，再用中和試驗檢查發現在此一代已不能为原株血清所中和。

5. Lee-3E → Lee-2MV

本株原为小鼠适应株，所以用小鼠連續通过法傳代，僅在 3 代通过鷄胚，至 12 代停止。

各代病毒接种鷄胚后的血凝效价：未傳代為 800，8 代為 2560，9 代為 2560，10 代為 1120，12 代為 1280—2560。

抗原性檢查結果：5、8、9 三代未变，12 代用血凝抑制試驗檢查，也未發現抗原性改变，但是將病毒接种鷄胚 1、2 代后再用血凝抑制試驗檢查，發現原株血清对病毒虽仍有較高的抑制效价，但各管中的抑制都不完全。以后，再用中和試驗檢查，亦發現在此一代不能为原株血清所中和。

对小白鼠的毒力：12 代 $LD_{50} 10^{5.8}$ 。

从上述五株病毒适应过程中观察到下面几个現象：

1. 被認為对小白鼠适应的五株流感病毒，在小白鼠傳代过程中，5 株病毒的抗原性都發生全部或部分的改变。

2. 与抗原性改变的同时，病毒接种鷄胚后血凝滴度有顯著的提高，这一点在 FM₁-3MV, 53-4MV, FM₁-17MV 表現得很顯著。

3. 抗原性开始变化的代数，用血凝抑制試驗方法是难于發現的，但是病毒經鷄胚遞傳 1、2 代，作血凝抑制試驗，就發現有不完全抑制現象，若是用中和試驗方法就更可以確証其抗原性發生改变，这一点在 PR₈-15MV, Lee-2MV, FM₁-3MV，都有相同之处。

(二) 抗原性改变的适应株的初步血清学檢查

1. FM₁-17MV, FM₁-3MV, 53-4MV 的血球凝集抑制試驗結果

自从發現 FM₁-17E, FM₁-3E, 53-4E 三株在适应过程中的抗原性变化后，怀疑到

此三株病毒中是否混雜了試驗室中其他的流感病毒,因此將三个变性株作鷄免疫血清 (FM₁-17MV 用 14 代, FM₁-3MV 用 27 代, 53-4MV 用 32 代病毒) 与本室常用的 FM₁-3E, 53-4E, 53-7E 及 PR₈-1E 作交叉血凝抑制試驗, 試驗中并加入 Lee-2E, FM₁-3M 及 FM₁-17M 三株抗原 (后二者即已經適應于小白鼠, 但未發現变性的代数: FM₁-3M 用 18 代, FM₁-17M 用 12 代)。

几株病毒交互血凝抑制試驗結果如下:

表 2 FM₁-17MV, FM₁-3MV, 53-4MV 与本室常用流感毒株交互抑制試驗結果

病 毒	FM ₁ -17M	FM ₁ -17MV	FM ₁ -3E	FM ₁ -3M	FM ₁ -3MV	53-4E	53-4MV	53-7E	PR ₈ -1E	Lee-2E
血 清										
FM ₁ -17MV	>640	400	480	400	140	50	140	18	240	<20
FM ₁ -3E	>1280	<20	>2560	>2560	<20	480	<20	560	<20	<20
FM ₁ -3MV	<10	480	<10	<10	160	<10	280	<10	<10	<10
53-4E	160	<20	240	240	<20	280	<20	120	—	—
53-4MV	<10	640	15	<10	140	<10	240	<10	<10	<10
53-7E	1920	<20	1920	2240	<20	2240	<20	2240	—	—
PR ₈ -1E	25	<10	15	—	—	—	—	—	800	—

注: 表示变性种。

表 2 結果中, 可以看到下列几点:

(1) FM₁-3E, 53-4E, 53-7E 血清能抑制它本株病毒及 FM₁-3M, FM₁-17M 两个未变性株, 但不能抑制 FM₁-3MV, FM₁-17MV 及 53-4MV 三个变性株。

(2) FM₁-3MV, 53-4MV 之血清只对三个变性株有抑制作用, 对其他病毒則沒有抑制作用。FM₁-17MV 血清对于三个变性株有抑制作用, 但是对原来未变毒株以及其他亞甲型或甲型病毒均有程度不同的抑制效价。

(3) 三种变性株的血清对 PR₈ 及 Lee 的病毒 (除 FM₁-17MV 血清对 PR₈ 外) 均沒有抑制作用。

从这里得出如下結論:

(1) FM₁-3MV, 53-4MV, FM₁-17MV 之抗原性質極為相似, 就是說此三株流感病毒經過小白鼠適應后其抗原性趋向一致。

(2) FM₁-3MV 与 53-4MV 两个变性株对其他各株的抑制試驗結果是一致的, 因而初步認為此二株病毒純粹含有与原病毒不同的同一抗原成分。

(3) FM₁-17MV 与前二者不同, 除了与前二者含有同一抗原成分外, 亦含有本株抗原成分。

以上的情況可能有兩種解釋: 一种是病毒确实發生了变异, 如 FM₁-3MV 及 53-4MV

为完全变异株, 而 FM₁-17MV 为中間性質; 另一种是流感病毒已为另一类病毒所污染, 如 FM₁-3MV 及 53-4MV 并已完全为另一类病毒所替代, 为了确定以上的假設何者为正确, 單憑血凝抑制試驗是不够的, 必須用中和試驗作進一步檢查。

2. 中和試驗和純化病毒的再分离

由于在初步試驗中 PR₈-15MV, Lee-2MV 似乎具有原株与变性株的兩重抗原性, 故我們挑选了这两株病毒作为檢查对象, 另外并加入曾通过小白鼠但初步試驗中未發現抗原变性的 FM₁-17M 株。所用血清为 PR₈-1E, Lee-2E, FM₁-3E 的雞免疫血清。中和試驗按血清定量病毒稀釋法進行。每个血清的中和指数均用原株病毒对照求出。按此法進行的預期結果如下: 如果某病毒的小白鼠適應株抗原性不变, 亦沒有混雜其他病毒的話, 其結果是很明确的, 下引 FM₁-17M 就是一例, 或是完全被中和, 或是在血清抗体量不够的場合下不能中和病毒量大的稀釋度, 这样, 可以將中和試驗的最高稀釋度的陽性雞胚的尿液取出再用血清定量病毒稀釋的血凝抑制試驗方法来判別, 即这些不被中和的病毒應該仍为原血清所抑制。另一方面如毒株混雜了另一株病毒, 即使其量甚微, 也不能为本株病毒所中和, 这样, 取中和試驗的最高稀釋度的陽性雞胚的尿液, 用血清定量病毒稀釋的血凝抑制試驗方法就可以証明它不为原血清所抑制。此外中和試驗还有一个重大的实用价值, 就是能自混雜了的病毒株中將純病毒再分离出來, 下面二个純化病毒株乃用此一方法分离出來的。

由下面結果可以看到:

(1) Lee-2MV 不被 PR₈-1E, Lee-2E, FM₁-3E 三种血清所中和, 但用 PR₈ 及 FM₁ 血清中和后再分离病毒只為 Lee 血清所抑制, 故判定为 Lee 病毒, 而自 Lee 血清中和后再分离則不被任何血清所抑制, 故判定为未知病毒, 且由于已被 Lee 血清中和过一次, 故其中大概不再混雜有 Lee 的病毒。

(2) PR₈-15MV 不被 PR₈-1E, Lee-2E, FM₁-3E 三种血清所中和, 从三种血清中和后再分离的病毒均不被三种血清所抑制, 故判为未知病毒, 其自 PR₈ 血清中和后再分离的病毒大概不再混雜有 PR₈ 病毒。

(3) FM₁-17M, 不被 PR₈-1E, Lee-2E 血清所中和, 但为 FM₁-3E 血清所中和, 故判定本株病毒不混雜有其他成分。

这些結果說明: FM₁-17M 的抗原性与原株一致, 是 FM₁-17E 的小鼠適應株。Lee-2M 为 Lee 与一种未知病毒的混合物。PR₈-15MV 則可能为 PR₈ 与未知病毒的混合物, 亦可能完全为未知病毒所替代。

由于此病毒接种雞胚能產生一般流感病毒难以达到的很高的血凝效价, 因此联想

表3 PR₈-1E, Lee-2E, FM₁-3E 血清对 PR₈-15MV, Lee-2MV, FM₁-17M
的中和試驗及中和后再分离病毒的血凝抑制試驗結果

中和試驗結果				再分离病毒的血凝抑制試驗結果					
組 別	血 清	病 毒	ID ₅₀	再分离 胚号	加入 1:10 血清后滴度			对照滴度	初步結論
					PR ₈ 血清	Lee血清	FM ₁ 血 清		
試 驗 組	PR ₈ -1E	Lee-2MV	>10 ^{8.0}	① ②	640 >960	<10 35	640 >960	800 >960	Lee Lee
試 驗 組	Lee-2E	"	>10 ^{6.0}	③ ④	>960 560	>960 480	>960 640	>960 800	未知 未知
試 驗 組	FM ₁ -3E	"	>10 ^{8.0}	⑤ ⑥	3200 2240	35 <10	>3840 >960	>3840 2560	Lee Lee
对 照 組	—	"	10 ^{9.0}	⑦ ⑧	200 200	200 200	200 200	640 640	未知 未知
試 驗 組	PR ₈ -1E	PR ₈ -15MV	>10 ^{6.0}	⑨ ⑩	>960 >240	>960 160	>960 >240	2240 560	未知 未知
試 驗 組	Lee-2E	"	>10 ^{8.0}	⑪ ⑫	560 >960	160 800	560 >960	560 >960	未知 未知
試 驗 組	FM ₁ -3E	"	>10 ^{8.0}	⑬ ⑭	800 800	640 800	800 800	>960 >960	未知 未知
对 照 組	—	"	10 ^{8.3}	⑮ ⑯	560 2560	200 2560	480 3200	640 >3840	未知 未知
試 驗 組	PR ₈ -1E	FM ₁ -17M	10 ^{4.7}						
試 驗 組	Lee-2E	"	10 ^{7.3}						
試 驗 組	FM ₁ -3E	"	<10 ^{1.0}						
对 照 組	—	"	10 ^{7.5}						
試 驗 組	PR ₈ -1E	PR ₈ -1E	<10 ^{1.0}						
对 照 組	—	"	10 ^{9.0}						
試 驗 組	Lee-2E	Lee-2E	<10 ^{1.0}						
对 照 組	—	"	10 ^{6.2}						
試 驗 組	FM ₁ -3E	FM ₁ -3E	<10 ^{1.0}						
对 照 組	—	"	10 ^{8.5}						

到前面 FM₁-3MV, FM₁-7MV, 53-4MV 的变性株以及 PR₈-15MV, Lee-2MV 都可能混雜同一种未知病毒。既然这种病毒是如此經常的出現, 根据試驗材料与 方法推断最大可能有小白鼠与鷄胚二种來源, 自鷄胚而來的可能性是存在的, 但由于所有的鷄胚傳代的毒种中从未發生过这种情况, 而五株适应于小鼠的病毒則都發生了改变, 顯然自小白鼠方面來的可能性就更大。因此我們就把 Lee-2MV 病毒被 Lee-2E 血清中和后再分离的病毒, 即 Lee-2MV③, 以及 PR₈-15MV 病毒被 PR₈-E 血清中和后再分离的病毒, 即 PR₈-15MV(9)保存下來, 作進一步研究的对象。

(三) 抗原性改变的适应株及再分离的純病毒株的交叉血抑凝抑制試驗

为了進一步了解 Lee-2MV 及 PR₈-15MV 所含抗原成分以及 Lee-2MV ③ 和 PR₈-15MV⑨与 FM₁-3MV 之关系, 并确定上面之推論是否正确, 乃用 Lee-2MV 及其再分离病毒 Lee-2MV③, PR₈-15MV 及其再分离病毒 PR₈-15MV⑨ 与 FM₁-3MV 免疫鷄以制备血清, 并作交互血凝抑制試驗。此外加上 PR₈-1E, Lee-2E, 及 FM₁-3E 三个标准毒株及其免疫血清。因为, 如果两种病毒的混合物由于混合量的关系即使不能用直接方法檢查出來, 但用作免疫抗原时, 其免疫血清必然会产生相应的抗体。

試驗結果見表 4。

表 4 各株变性株与再分离的病毒間的交互血球凝集抑制試驗

病 毒 血 清	Lee-2MV	Lee-2MV③	PR ₈ -15MV	PR ₈ -15MV⑨	FM ₁ -3MV	PR ₈ -1E	Lee-2E	FM ₁ -3E
Lee-2MV	70	10	<5	20	9	<5	140	<5
Lee-2MV③	<5	160	<5	240	80	<5	<5	<5
PR ₈ -15MV	<5	80	>320	240	40	>320	<5	<5
PR ₈ -15MV⑨	<5	100	<5	240	70	<5	<5	<5
FM ₁ -3MV	<5	160	<5	>320	70	<5	<5	<5
PR ₈ -1E	<5	<5	10/100+	<5	<5	>1280	<5	9
Lee-2E	100	<5	<5	<5	<5	<5	200	<5
FM ₁ -3E	<5	<5	30	<5	<5	20	<5	>640

注: 10/100+ 表示自 1/10—1/100 各个稀釋度的管中均出現部分抑制現象。

表 4 結果說明用 Lee-2MV③, PR₈-15MV⑨ 及 FM₁-3MV 三个变性株作抗原时, 各个血清对它們的抑制能力是相等的, 一方面此三株血清对三株病毒有同等的交互抑制效价, 而对其他未变性的流感毒株則不能抑制, 另一方面, 它們都不能被未变的流感病毒的血清所抑制, 因此可以肯定 Lee-2MV③, PR₈-15MV⑨ 及 FM₁-3MV 是抗原性一致的純粹的未知病毒。

試驗結果又進一步說明 Lee-2MV 是 Lee 与未知病毒的混合物。用 Lee-2MV 作抗

原时只有本株 (Lee-2MV) 及 Lee-2E 的血清对它有抑制能力, Lee-2MV 血清则对本株抗原及 Lee-2E 都有较大的抑制效价, 对 Lee-2MV③, PR₈-15MV⑨及 FM₁-3M 亦稍有抑制, 但对 PR₈-1E, FM₁-3E 没有抑制能力。这样就进一步肯定 Lee-2MV 是 Lee 及未知病毒的混合物, 而且 Lee 的成分占优势。PR₈-15MV 的结果与前述者相仿, 同样证明 PR₈-15MV 是 PR₈ 及未知病毒的混合物, 同时可以看出此次试验的混雜株中, PR₈ 的成分也是很高的, 这一点表面看来与前面中和试验的结果是矛盾的, 其实不然, 由于此变性株是个混合体, 在鸡胚传代过程中各代尿液所含有的两个成分的比例是可能很不相同的。

初步结论: 根据上述几个试验结果, 一致证实五个变性株实际上是部分或全部混雜了一种未知病毒。以上试验结果说明 FM₁-3MV, 53-4MV 全部为未知病毒所代替, 而 PR₈-15MV 则为 PR₈ 与未知病毒的混合物, Lee-2MV 则为 Lee 及未知病毒的混合物, FM₁-17MV 無疑是含有未知病毒, 其混雜情况尚待进一步证明。

(四) 证实性中和试验

为了进一步证实血凝抑制试验的结果, 并说明 FM₁-17MV 的混雜问题, 因此将 Lee-2MV, PR₈-15MV, FM₁-17MV 及 FM₁-3MV 四个毒株, 用 Lee-2MV③ 的免疫血清代表未知病毒的血清, 与 PR₈, Lee 及 FM₁ 三个标准血清单独或混合使用, 进行中和试验, 结果见表 5。

表 5 证实性中和试验

病 毒	血 清	ID ₅₀		最高稀释度阳性 鸡胚的病毒型别
		对 照 组	试 验 组	
PR ₈ -15MV	Lee-2MV③	10 ^{7.5}	10 ^{7.7}	PR ₈
"	Lee-2MV③ + PR ₈	10 ^{7.5}	10 ^{2.2}	未 知
Lee-2MV	Lee-2MV③	10 ^{8.2}	10 ^{6.2}	Lee
"	Lee-2MV③ + Lee	10 ^{8.2}	10 ^{2.2}	未 知
Lee-2MV③	Lee-2MV③	10 ^{8.2}	10 ^{3.2}	未 知
PR ₈ -15MV⑨	Lee-2MV③	10 ^{9.2}	10 ^{2.7}	未 知
FM ₁ -17MV	Lee-2MV③	10 ^{7.5}	10 ^{6.0}	FM ₁
"	Lee-2MV③ + PR ₈	10 ^{7.5}	10 ^{4.0}	FM ₁
"	Lee-2MV③ + FM ₁	10 ^{7.5}	<10 ^{1.0}	—
"	Lee-2MV③ + PR ₈ + FM ₁	10 ^{7.5}	<10 ^{1.0}	—
FM ₁ -3MV	Lee-2MV③	10 ^{8.5}	<10 ^{1.0}	—

注: 本试验中所用的 Lee-2MV③血清的效价较低, 故 1/10 稀释后不能完全中和其相应的未知病毒。

试验结果充分证实前面的试验结果及推论是正确的, 即 PR₈-15MV 为 PR₈ 及另一未知病毒之混合体; Lee-2MV 为 Lee 及另一未知病毒之混合体; FM₁-17MV 为 FM₁

及另一未知病毒的混合體。此外更進一步証實 Lee-2MV^③, PR₈-15MV^⑨ 及 FM₁-3MV 是純粹的同一種的未知病毒。

試驗結果更清楚的表示混雜種中某一病毒量的多寡。在 PR₈-15MV 方面 PR₈ 的量與對照一致，說明 PR₈ 的量占絕大比例；Lee-2MV 中的 Lee 則僅占小部分。

(五) 正常小白鼠的連續盲目傳代

前面的全部結果指出此種未知病毒是經常的廣泛的存在，而且對小白鼠的致病力很強，但是它又不可能是由於實驗室污染的結果，因此考慮到可能是小白鼠本身所攜帶的病毒。為了充分証實此一推論，乃用本所的正常 2 號種小鼠作連續的盲目傳代。傳代方法乃用 7—9 克小鼠 20 只，鼻腔滴入無菌肉湯 0.05 毫升，3—6 天后剖殺半數小白鼠，取出鼠肺做成 20% 懸液，再由鼻腔接種另外 20 只正常小白鼠，同時加入適量之青霉素及鏈霉素接種雞胚三個，以探測病毒之存在。其餘半數小白鼠留作觀察。如是盲目遞傳四代。

本試驗工作均在遠離原來試驗室的單獨的動物室進行，試驗前室內用福馬林燻蒸及乳酸噴霧消毒，一切用具均經高壓蒸汽滅菌或用來沙兒抹拭，一切用物，包括玻璃儀器，大衣、口罩等均嚴格隔離，單獨使用，進行傳代人員於本試驗進行時期中不從事流感病毒的工作。

試驗結果發現第三代起用肺懸液接種雞胚後其尿液有血凝現象，且血凝滴度高達 2560，自第一代至第三代肺部均沒有明顯的病變，至第四代時開始有明顯病變，在接種後四天解剖時，發現 9 只小鼠中 6 只之鼠肺有病變，余存 9 只於接種 8 天后解剖發現鼠肺全部有嚴重病變。

取第四代之尿液對 PR₈-1E, Lee-2E, FM₁-3E, 53-7E, 及 Lee-2MV^③ 血清作血凝抑制試驗，結果只有 Lee-2MV^③ 之血清有抑制能力，證明此次從 2 號小鼠種分離出之小鼠本身之病毒就是前面所稱的未知病毒。

另外以同樣方法於 1 號小白鼠傳代，結果於第二代小鼠鼠肺中發現灰紅色的散在的小點，第三代小鼠於接種後三天發病，其中 6 只死亡，解剖後發現肺組織均有嚴重的深紅色的實變，各代鼠肺懸液接種雞胚後，尿液的直接血凝反應陰性。將第三代死亡的肺組織壓片，用 Macchiavello 氏法染色，看見鮮紅色的原始小體，初步證明乃由 Nigg 氏一類肺炎病毒引起的，因而中止傳代。

摘 要

于流行性感冒病毒在小白鼠中傳代的適應過程中，五株流感病毒均發生了抗原性

的改变,經試驗証明該五株流感病毒均為一種未知病毒所污染,其中二株完全為該病毒所替代,另三株則為原流感病毒與該病毒的混合物。由於該病毒於鼻腔接種小鼠後能使發生肺炎致死,接種雞胚尿囊腔中後能大量發育並呈現血球凝集現象,故表面上與流感病毒很難區別。本文敘述發現該病毒的經過,並用中和試驗將流感病毒與該病毒分開的方法。最後在正常小白鼠中,用盲目傳代的方法分離了一株性狀完全相同的病毒,由此証明該病毒為正常小鼠所攜帶。由於在某些性狀方面與流感病毒相類似,且與文獻上已經報告的小鼠病毒不同,故暫稱之為“小鼠類流感病毒”。

参 考 文 献

- [1] Horsfall, F. L. & Hahn, R. G., *J. Exp. Med.*, **71**, 391, 1940.
- [2] Nigg, C. & Eaton, M., *J. Exp. Med.*, **79**, 497, 1944.
- [3] Hirst, G. K., *J. Exp. Med.*, **86**, 357, 1947.
- [4] Sugg, J. Y., *J. Bact.*, **58**, 399, 1949.
- [5] 蕭俊、朱既明: 一種新的小白鼠病毒的研究II. 病毒的生物學性狀, 微生物學報4(1): 47—65, 1956.
- [6] Chu, C. M., Andrews, C. H. & Gledhill, A. W., *Bull. World Hlth. Org.*, **3**, 187, 1950.
- [7] Reed, L. J. & Muench, H., *Am. J. Hyg.*, **27**, 493, 1938.
- [8] Blaskovich, D. & Salk, J. E., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **65**, 352, 1947.

A STUDY ON A NEW MOUSE VIRUS I. DISCOVERY OF THE VIRUS

CHU CHI-MING, LIANG JUNG-KEN AND WEN CHUNG-CHUAN

National Vaccine and Serum Institute, Peking

In the course of attempting to adapt human influenza virus to the white mice, 5 strains of virus which seem to show evidence of antigenic change were observed. By a careful serological study and antigenic analysis, including hemagglutination inhibition and neutralization tests, it was eventually proven that two of these strains were really not related to the inoculated strain, being entirely replaced by a new mouse virus, while three others were mixture of the original with the new virus. All the five were found to be identical in antigenicity, and proven to be normal inhabitants of the local stock white mice, by the inoculation of materials from normal mice into series of white mice, and by the recovery of the same virus by blind passage in series. The virus was found to be different from all the known virus of the white mice and at the same time to possess certain characteristics simulating those of human influenza virus. Thus, the virus was given a temporary designation as "Influenza-like virus of white mice".