

实验室条件下流感病毒的毒力变异

郝成章 朱既明 岩波

何观仪 童葵塘 王鸿飞

(长春生物制品研究所, 长春)

在实验室条件下使流感病毒的毒力发生变异, 从而获得失去致病性而保存其在人体鼻咽喉部的繁殖力(生存性)及刺激抗体产生的能力(免疫原性)的减毒疫苗株, 是研究活疫苗的根本问题。由于流感病毒的抗原结构经常发生变异, 在新的亚型或有显著抗原性差别的变种发生并引起流行时, 用原来的毒种所制成的疫苗就部分地或完全丧失了保护作用, 而必须从流行的变种中另选新的疫苗株。因此, 为此目的, 在实验室条件下掌握毒力变异的规律与获得疫苗株的可靠方法是很重要的课题。苏联学者曾在这方面进行了大量工作, 并提出了3个方法: 即人胎肺组织培养传代法^[1-3], 志愿者传代法^[4], 鸡胚传代法^[5]。这些方法还没有经过广泛的考验与证实, 对它们的评价也有不同意见。因而确定这些方法的价值不仅是当前活疫苗研究中的关键, 而且对阐明流感病毒的毒力变异规律也有一定的理论意义。近年来我们曾在这方面进行了一些工作, 现将部分结果于本文中作扼要的报告。

材 料 和 方 法

(一) 病毒

长生 57-2: 亚洲甲型 II 相病毒, 系 1957 年大流行时在长春分离。

京科 58-26 株: 乙型病毒, 系 1958 年中国医学科学院在北京分离。

苏 96 株: 亚洲甲型 I 相病毒, 系苏联医学科学院赠给, 在鸡胚中分离并在志愿者中传递 3 代。

上述病毒在鸡胚中传代者以“E”表示, 如 E₉ 表示鸡胚 9 代。

(二) 志愿者接种及反应原性观察 生存性试验与免疫原性测定的方法详见另文^[6]。以体温在 37.6—38.5°C 的中反应与 38.6°C 以上的强反应合计的百分率表示病毒的反应原性; 以病毒分离的阳性率表示生存性; 以接种后抗体增长 4 倍以上的百分率表示免疫原性。

(三) 鸡胚传代 将病毒用普通肉汤作成 10⁻³ 稀释接种鸡胚尿囊腔, 每胚 0.1 毫升, 在 35°C 继续孵育, 甲型 36—48 小时, 乙型 60—72 小时, 冷却后收获其尿囊液。

(四) 志愿者传代 将生存性试验中阳性鸡胚的尿囊液病毒, 再接种志愿者, 如此交替传递, 以“E₁₁”表示之, 例如长生 57-2 E₉EH₅ 即表示鸡胚 9 代, 再经志愿者与鸡胚交替 5 代的病毒。

(五) 人胎肺组织培养传代 按 Фадеева 法^[7]在人胎肺组织块培养中传代, 以“H₁₁”表示之, 如长生 57-2 E₉H₁₁ 即表示鸡胚 9 代, 人胎肺组织培养 10 代。

结 果

(一) 鸡胚传代

为了确定鸡胚传代后病毒毒力的变异及应用本法来获得活疫苗毒种的可能，我們选择了亚洲甲型长生 57-2 株及乙型京科 58-26 株于鸡胚中传递不同代数的病毒在 志 愿 者 中进行試驗，其結果见表 1。

表 1 鸡胚传递代数与病毒的反应原性、生存性与免疫原性

毒 种	鸡 胚 代 数	试 验 次 数	反应原性(中强反应)			生存性(病毒分离)			免疫原性 (抗体增长 4 倍以上)		
			试验人数	反应人数	%	试验人数	阳性人数	%	试验人数	增长人数	%
长生 57-2	4	1	10	4	40	10	9	90	9	7	78
长生 57-2	6	1	8	4	50	8	6	75	8	4	50
长生 57-2	9	10	142	5	4	89	34	38	108	61	57
长生 57-2	12	1	6	0	0	6	2	33	6	0	0
长生 57-2	20	2	14	0	0	14	1	7	14	4	29
京科 58-26	8	2	21	9	43	16	13	81	10	2	20
京科 58-26	12—13	2	13	3	23	13	7	54	8	2	25
京科 58-26	18	3	51	7	14	30	19	63	30	12	40

从表 1 可見长生 57-2 株病毒在鸡胚 4 代至 6 代时接种低抗体的志愿者后反应很强，中强反应率 4 代为 40%，6 代为 50%；生存性良好，病毒分离阳性率分别为 90% 及 75%；免疫原性也很好，抗体增长率各为 78% 及 50%。同一毒株传至 9 代时反应显著减低，中强反应在 10 次試驗共 142 例中仅有 5 例，占 4%；仍有一定的生存性，10 次試驗合計为 38%，較之 4—6 代有明显降低；抗体增长率仍然較高，为 57%。在 12 代以后不再引起中强反应；生存性也大大降低，12 代为 33%，20 代为 7%；同时免疫原性也有明显的降低。乙型京科 58-26 株經鸡胚传代后的反应性，8 代中强反应为 43%，12—13 代为 23%，18 代为 14%，也有逐步降低的趨勢，生存性及免疫原性則基本保持稳定。由上述結果可以认为流感病毒随着鸡胚传递代数的增加，其对人体的反应原性逐渐降低，同时病毒在人体中的生存性及免疫原性也有降低趨勢；后二者在亚洲甲型病毒較為明显，而乙型病毒則不显著。但是三者并不完全平行，而是反应性最先下降，其次为生存性，再其次为免疫原性。同时也可見到亚洲甲型与乙型病毒在鸡胚传代中減毒的速度是不同的，长生 57-2 株病毒在鸡胚 9 代即已基本丧失其反应原性，而京科 58-26 株則在 12—13 代时仍引起明显的反应。

(二) 低抗体的志愿者传代

将长生 57-2 鸡胚 9 代病毒在志愿者中传了 5 代观察其反应原性、生存性及免疫原性的改变。另外从 Смородинцев 处获得了苏 96 株病毒，該株病毒原来曾經在志愿者中传递 3 代，我們又在志愿者中繼續传 3 代。病毒的传代过程及其性状改变如表 2。

由表 2 可見，长生 57-2E₉ 株在志愿者传代过程中反应并未增強，但生存性及免疫原性也未見改进。該株病毒原为 II 相，經志愿者传一代即变为 I 相，以后即一直为 I 相。苏 96 株传代的結果也与此相似。后来曾将长生 57-2 株在志愿者传递 5 代的毒种在鸡胚中

表 2 病毒在志愿者传不同代数后的反应原性、生存性及免疫原性

毒 种	传代情况	反应原性(中强反应)		生存性(病毒分离)		免疫原性 (抗体增长 4 倍以上)	
		试验人数	反应人数	试验人数	阳性人数	试验人数	增长人数
长生 57-2	E ₉	3	0	8	6	5	3
长生 57-2	E ₉ EH ₁	8	0	8	3	6	5
长生 57-2	E ₉ FH ₉	5	0	8	1	5	2
长生 57-2	F ₉ EH ₉	4	0	7	4	5	4
长生 57-2	F ₉ EH ₄	4	0	4	3	—	—
苏 96	EH ₈ E ₈	5	0	7	3	8	5
苏 96	EH ₈ E ₈ EH ₁	10	0	10	2	10	4
苏 96	EH ₈ E ₈ EH ₂	5	0	5	1	4	3

注：“—”表示未测。

又传 2 代,制成冻干疫苗,并与长生 57-2 E₉ 原株制备的冻干疫苗同时接种志愿者进行比较,结果二者均无反应,生存性及免疫原性也相差不多。

（三）人胎肺组织培养传代

将长生 57-2E₉ 株基本上按 Фадеева 的方法在人胎肺组织培养中传代,每代取其上清液在鸡胚中进行滴定,其结果如图 1。

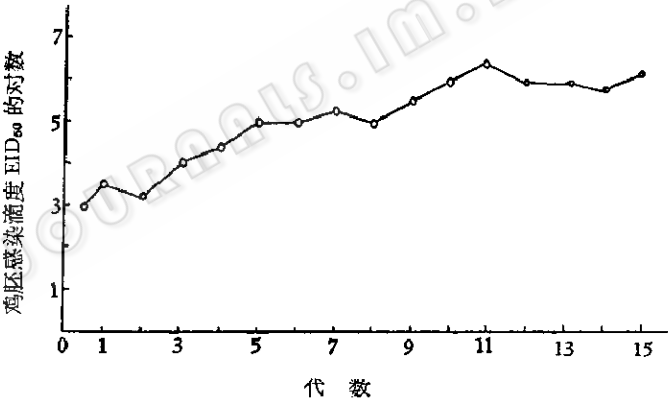


图 1 长生 57-2 E₉ 株在人胎肺组织培养中传不同代数的滴度。

在培养过程中病毒对鸡胚的感染滴度逐渐增高,如 1—4 代 EID₅₀ 在 3.3—4.0 之间,4—6 代在 4.2—5.0 之间,7—10 代在 5.2—6.0 之间,11—15 代则波动于 6.2—6.7 之间,不再有明显上升。这些结果与 Фадеева^[7] 所报告的基本符合,病毒经检定仍为 II 相。我们选择人胎肺 10 代及 18 代的病毒又在鸡胚中传递 2 代后,接种志愿者,其结果如表 3。

表 3 长生 57-2 病毒在人胎肺传递 10 代及 18 代后的反应原性、生存性及免疫原性

毒 种	反应原性 (中强反应)		生 存 性 (病毒分离)		免疫原性 (抗体增长 4 倍以上)	
	试验人数	反应人数	试验人数	阳性人数	试验人数	增长人数
长生 57-2E ₉ HL ₁₀ E ₂	10	0	10	0	18	9
长生 57-2E ₉ HL ₁₈ E ₂	10	0	10	0	3	2

上述人胎肺 10 代及 18 代毒种接种人体后未发现中强反应, 而从人体均未分离出病毒, 虽抗体反应尚好, 但较原毒株也未见改进。

根据试验结果, 似乎在人胎肺组织培养中传代并未提高长生 57-2 株的免疫原性, 相反其生存性似乎有些降低。

讨 论

流感病毒在鸡胚中传代后毒力下降, 已经是公认的事实。但对减毒鸡胚毒株是否仍有足够的生存性与免疫原性, 在苏联学者们之间有不同看法。Чалкина^[4] 及 Закстельская 与 Фадеева 等^[2,3] 认为在鸡胚传代后对人的反应原性, 生存性与免疫原性均有明显的降低; 而 Соколов^[5] 则认为鸡胚传代对病毒的生存性与免疫原性没有显著影响。我们的试验表明, 亚洲甲型长生 57-2 株及乙型京科 58-26 株病毒在鸡胚传代过程中, 对人的反应原性逐渐降低, 病毒在人体的生存性及免疫原性也随之下降。但反应原性、生存性和免疫原性的下降并不是完全平行的, 反应原性下降最快, 其次为生存性, 最后为免疫原性。

因此, 我们一方面肯定了鸡胚传代作为减弱流感病毒毒力的有效方法, 另一方面认为只有将鸡胚传递控制在一定的代数, 才有可能获得对人的反应原性很弱而具有较好的生存性和免疫原性的毒种。

根据几年来志愿者试验的经验, 我们体会到人体的条件复杂, 影响因素很多^[6], 必须综合较多次试验的资料才能作出判断。此外, 不同毒株的减毒速度也是不一致的。苏联学者们获得相互矛盾的结果的原因, 可能是由于所作的试验次数较少, 与所用的毒株不同之故。

在我们的试验条件下, 应用 Смородинцев 等^[4] 所推荐的低抗体志愿者传代方法, 两株亚洲甲型病毒的反应原性、生存性与免疫原性未见明显改变。我们选择的志愿者, 实际上仍可能有极低的抗体水平, 用中和试验可以测出。是否由于这一因素而影响了结果, 尚待证明。应当指出, 由于流感感染的普遍性, 求得完全没有抗体的志愿者, 事实上是难以做到的。

按照 Фадеева 等^[1] 倡议的人胎肺组织培养传代法, 我们用长生 57-2 株传了 10 代及 18 代, 结果表明毒种的生存性反而降低了。卫生部生物制品研究所也曾将同一株病毒在人胎肾及肺组织培养中交替传代后也并未见到生存性与免疫原性有何改进。Соколов 等^[5] 也获得了大致相似的结果。看来应用此法并不能有规律地取得满意的结果。

用鸡胚传代减毒获得疫苗毒种的方法, 虽然简单易行, 但是由于消除反应性与保存生存性、免疫原性之间的病毒传代代数界限很狭窄, 加以人群免疫状态不同的影响^[6,8], 在实际工作中不是反应原性偏强, 就可能免疫效果不好。所以流感活疫苗选种问题并未彻底解决, 有必要寻找更理想的减毒方法。

摘 要

(一) 亚洲甲型长生 57-2 株病毒在鸡胚传递 4 代和 6 代时反应原性很强, 生存性及免疫原性也良好; 在鸡胚 9 代时, 反应轻微, 仍有一定的生存性与较好的免疫原性; 而在鸡胚 12 代及 20 代则基本无反应原性, 生存性及免疫原性也显著降低。乙型京科 58-26 株

也有类似结果,但其减毒速度出现较慢。

(二) 将亚洲甲型长生 57-2 株及苏 96 株在低抗体的志愿者中传 3—5 代,未发现毒种的性状有何显著改变。

(三) 长生 57-2 鸡胚 9 代病毒在人胎肺组织培养中传递 10 代及 18 代,病毒的免疫原性未见提高,生存性反而降低。

(四) 根据我们的试验结果,鸡胚传代是目前获得减毒疫苗株的较为可靠的方法,但仍不够理想,因而有必要进一步研究流感病毒减毒的方法。

参 考 文 献

- [1] Фадеева, Л. Л.: Ж. М. Э. И., (2): 47, 1953.
- [2] Закстельская, Л. Я. и Ритова, В. В.: Ж. М. Э. И., (8): 54, 1953.
- [3] Фадеева, Л. Л., Закстельская, Л. Я. и Ритова, В. В.: *Вопр. Мед. Вирол.*, (4): 393, 1954.
- [4] Чалкина, О. М.: *Вопросы Патогенеза и Иммунологии Вирусных Инфекций* (А. А. Смородинцев), Медгиз, Ленинград, 346, 1955.
- [5] Соколов, М. И. и Куликова, К. С.: Ж. М. Э. И., (11): 28, 1959.
- [6] 朱既明、郝成章、童葵塘、岩 波、王鸿飞: *中华医学杂志*, **48**: 730, 1962.
- [7] 引自 Жданов, В. М.: *Учение о Гриппе*, Медгиз, Москва, 50, 1958.
- [8] 童葵塘、郝成章、岩 波、朱既明: *中华医学杂志*, **48**: 662, 1962.

VARIATION IN VIRULENCE OF INFLUENZA VIRUS UNDER LABORATORY CONDITIONS

HAO CHENG-CHANG, CHU CHI-MING, YEN PO, HO GUAN-I, TUNG GUEI-TANG
AND WANG HONG-FEI

(Changchun Vaccine and Serum Institute, Changchun)

This paper deals with the results of experiments designed to obtain attenuated strains of influenza virus suitable for use as live vaccine.

The first procedure tried was passage in chick embryos. Influenza A2 strain Changchun 57-2, at its 4th and 6th passage levels in chick embryos, was found to cause a high rate of febrile reaction (denoting reactogenicity) in inoculated volunteers. At the same time, it gave a high rate of virus isolation (denoting capacity of multiplication in human nasopharynx) and good antibody response (denoting immunogenicity). After 9 passages, its reactogenicity was considerably reduced, while the virus still retained some capacity of multiplication and fairly good immunogenicity. After 12 or 20 passages, this strain became essentially areactogenic, but also suffered marked loss in its capacity of multiplication and immunogenicity. Influenza B virus strain, Peking 58-26, showed a similar tendency during chick embryo passages, but its course of attenuation appeared to be more gradual.

The second procedure tried was serial passage in human volunteers with low antibody level. Two influenza A2 strains, Changchun 57-2 and Soviet 96, were carried through 3-5 human passages. No significant change in reactogenicity, capacity of multiplication or immunogenicity was noted.

The third procedure tried was passage in human embryonic lung tissue culture. The A2 strain, Changchun 57-2, after 10 or 18 passages in tissue culture showed reduced capacity of multiplication, while no change in immunogenicity was observed.

It is concluded that, at present, chick embryo passage is the only reliable method of obtaining attenuated strains of influenza virus for vaccination purpose. However, owing to the narrow margin between the loss of reactogenicity and the retention of immunogenicity, this procedure often yields irregular results in practice. Further investigations are necessary in order to find a better method for the attenuation of influenza virus.