

# 流行性乙型脑炎病毒的变异

## VI. 毒力和免疫力通过乳小白鼠皮下游代后的变化

俞永新 方 珍 武佩芬 李河民

(北京药品生物制品检定所, 北京)

本文报告了诱导流行性乙型脑炎病毒变异的一种方法。以通过鸡胚悬浮组织培养长期多次传代后的 SA<sub>4</sub>CEC 株, 它的脑内毒力略降低, 但丧失了免疫力。再通过乳小白鼠皮下连续传代, 得到毒力进一步减弱, 而免疫力显著提高, 名为 SA<sub>4</sub>SM 株。然后以蚀斑法对该变异株进行多次纯化时, 则获得了对小白鼠脑内无致病力而免疫力较好的毒株。

本实验告诉我们, 病毒致病力的强弱和免疫性的高低, 是事物内部矛盾着的两个方面, 因为一定的条件而各向着和自己相反的方面转化了去, 向着它的对立方面所处的地位转化了去。这种诱导变异的方法, 就是为这种转化创造条件。它对研究乙型脑炎病毒变异规律和减毒活疫苗具有一定意义。

在流行性乙型脑炎(以下简称乙脑)病毒的变异工作上, 我们曾经以乙脑病毒 SA<sub>4</sub>株通过地鼠肾细胞连续传代和蚀斑纯化, 获得了对小白鼠脑内无毒力而免疫力较好的 5-3 株<sup>[1-3]</sup>, 该弱毒株已用于试制乙脑活疫苗。此外, 以另一株乙脑病毒 SA<sub>4</sub>株通过鸡胚悬浮组织培养连续传代, 而获得了对小白鼠神经外无毒力, 脑内毒力略降低的另一弱毒株 SA<sub>4</sub>CEC 株<sup>[4]</sup>, 但该弱毒株对小白鼠的免疫力几乎完全丧失。为了研究既降低毒力又提高免疫力的方法, 我们开展了这项工作。

### 材料和方法

#### 一、病毒

用流行性乙型脑炎病毒 SA<sub>4</sub>鸡胚细胞传代株<sup>[4]</sup> SA<sub>4</sub>CEC 株。

#### 二、乳鼠皮下游代方法

选 1—3 日龄乳小白鼠, 于鼠蹊部皮下每只注射 0.03 毫升病毒原液, 注射后 4 天解剖局部皮肤和皮下组织及淋巴结, 经研磨后稀释为 10<sup>-1</sup>

悬液, 接种鸡胚悬浮组织培养<sup>[1]</sup>增殖一代后, 再经乳鼠皮下游代。

#### 三、毒力滴定和病毒量测定

以 7—9 克小白鼠脑内接种, 按其发病(毛松、痉挛、麻痹等神经症状)或死亡计算病毒的 50% 小鼠感染剂量 (MID<sub>50</sub>) 和 50% 小鼠致死量 (LD<sub>50</sub>), 病毒量以蚀斑法测定 PFU/毫升值。蚀斑法按我们另一报告<sup>[2]</sup>中所述方法进行。

### 试验结果

#### 一、SA<sub>4</sub>CEC 株通过乳小白鼠皮下连续传代后的毒力和免疫力的变化

过去我们观察到 SA<sub>4</sub>株通过鸡胚悬浮组织培养 180 多代后, 丧失了对小白鼠的皮下感染力和免疫力。为了提高该株的免疫力, 我们以该鸡胚细胞传代株第 203 代病毒在乳小白鼠皮下接种传代。在传代初期由于病毒在皮下的繁殖力较差而难于连

本文 1975 年 1 月 4 日收到。

表 1 SA<sub>4</sub>CEC 株和 SA<sub>4</sub>SM 株对小白鼠的脑内毒力

毒株	代数	PFU/毫升	MID <sub>50</sub> /0.03毫升	LD <sub>50</sub> /0.03/毫升	差距 PFU-LD <sub>50</sub>
SA <sub>4</sub> 强毒株	CEC <sub>1</sub>	6.04	5.67	5.67	0.37
	CEC <sub>1</sub>	6.51	5.50	5.50	1.01
SA <sub>4</sub> CEC 株	CEC <sub>272</sub>	4.90	2.77	2.77	2.13
	CEC <sub>276</sub>	4.69	3.00	3.00	1.69
	CEC <sub>277</sub>	4.77	≥3.50	≥3.50	≤1.27
	CEC <sub>278</sub>	4.50	3.50	3.50	1.00
	CEC <sub>279</sub>	4.69	3.45	3.45	1.24
	CEC <sub>280</sub>	5.82	4.50	4.50	1.32
SA <sub>4</sub> SM 株	CEC <sub>203</sub> SM <sub>15</sub> CEC <sub>6</sub>	4.33	2.16	1.75	2.58
	CEC <sub>203</sub> SM <sub>15</sub> CEC <sub>8</sub>	4.25	2.16	1.75	2.50
	CEC <sub>203</sub> SM <sub>15</sub> CEC <sub>9</sub>	4.17	3.00	0.55	3.62
	CEC <sub>203</sub> SM <sub>15</sub> CEC <sub>13</sub>	4.04	2.23	0.00	4.04
	CEC <sub>203</sub> SM <sub>15</sub> CEC <sub>14</sub>	4.84	1.60	0.44	4.40

1. CEC 为经鸡胚组织悬浮培养传代, SM 为经乳小白鼠皮下接种传代;  
2. 表中 PFU, MID<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub> 的数值均为对数值 (Log)。以下各表均相同。

续传代, 因此以鸡胚悬浮组织培养和乳小白鼠皮下接种交替培养传代的方法, 将病毒在乳鼠皮下传至 12 代, 然后顺利地单在乳鼠皮下连传 3 代, 而获得 SA<sub>4</sub>SM 变异株。试验前病毒又在鸡胚悬浮组织培养增殖数代, 现将该株病毒对小白鼠的脑内毒力滴定结果列于表 1。

结果表明, 通过上述乳鼠皮下传代后, 该病毒对小白鼠脑内毒力有进一步减弱, PFU 和 LD<sub>50</sub> 之间的差距由原有的 1—2 对数增大至 2—4 对数。SA<sub>4</sub>强毒株的差距则一般在 1 个对数以下。而且有些已发病的小鼠往往恢复了健康, 用低稀释度病毒接种的小鼠不发病, 用高稀释度病毒接种者反而发病甚至死亡等, 出现不规则现象。这个特点与鸡胚细胞传代株和原强毒株比较都有明显的区别。

为了进一步了解 SA<sub>4</sub>CEC 株与 SA<sub>4</sub>SM 株病毒内不同病毒颗粒的毒力, 我们以蚀斑法从该二株病毒中挑选出不同蚀斑病毒进行小鼠脑内毒力测定, 结果列于表 2。

表 2 结果表明, SA<sub>4</sub>SM 株内不同病毒颗粒的毒力较 SA<sub>4</sub>CEC 株低, 与表 1 结果

表 2 SA<sub>4</sub>CEC 株与 SA<sub>4</sub>SM 株不同蚀斑病毒的毒力

毒株	代数	蚀斑号	病毒量 PFU/毫升	小鼠脑内毒力 LD <sub>50</sub>	差距 PFU-LD <sub>50</sub>
SA <sub>4</sub> CEC 株	276	2	4.69	4.0	0.69
		3	3.47	2.0	1.47
		4	5.17	4.0	1.17
		8	4.34	3.5	0.84
		10	5.0	3.23	1.77
SA <sub>4</sub> SM 株	SM <sub>15</sub> CEC <sub>6</sub>	16	4.0	2.0	2.0
		19	4.85	<0.0	<4.85
		20	4.07	<0.0	>4.07
		23	5.17	<0.0	<5.17
		24	4.30	0.0	4.30

一致。它证明通过乳鼠皮下连续传代对小白鼠的脑内毒力确实发生了进一步减弱的变化。

为了证明这一方法的可重复性, 我们又以 SA<sub>4</sub>鸡胚细胞传代株 (SA<sub>4</sub>CEC 株) 第 279 代病毒按上述交替传代法通过乳鼠皮下传 6 代, 每代测定一次毒力, 现将结果列于表 3。

表 3 结果表明通过乳鼠皮下传 1—6 代后, 对小白鼠的脑内毒力已开始有所下

表 3 SA<sub>4</sub>CEC<sub>279</sub> 代病毒通过乳鼠皮下  
1—6 代病毒毒力

代 数	PFU/ 毫 升	MID <sub>50</sub> / 0.03毫升	LD <sub>50</sub> / 0.03毫升	差距PFU— LD <sub>50</sub>
SM <sub>1</sub> CEC <sub>1</sub>	4.77	2.83	2.00	2.77
SM <sub>2</sub> CEC <sub>1</sub>	4.60	2.50	2.50	2.10
SM <sub>3</sub> CEC <sub>1</sub>	5.38	3.33	3.00	2.38
SM <sub>4</sub> CEC <sub>1</sub>	5.64	3.78	3.44	2.20
SM <sub>5</sub> CEC <sub>1</sub>	5.25	3.00	2.50	2.75

降,而且同样表现出与原株不同特性,即发病后有的恢复健康和接种稀释度与死亡率不平行的不规则现象,说明该方法的可重复性。当以乳鼠皮下 1 代和 6 代的病毒材料分别以蚀斑法进行病毒纯化时,各蚀斑病毒间的毒力有所不同,而皮下 6 代的各蚀斑病毒毒力较皮下 1 代者更为低。如表 4 所示,前者的各蚀斑 PFU 和 LD<sub>50</sub> 的差距大多数为 3 个对数以上,而后者则一般在 1—2 个对数。由此说明,适当地连续通过乳鼠皮下多次传代,有进一步减弱病毒嗜神经性的作用。

为了观察 SA<sub>4</sub>SM 株的免疫力,采用小白鼠免疫力试验方法对该株和 SA<sub>4</sub>CEC 株进行比较,现将试验方法和结果列于表 5。

表 5 结果表明, SA<sub>4</sub>CEC 株虽然对小白鼠的脑内毒力较高(LogLD<sub>50</sub>3.50—4.00),

表 4 SA<sub>4</sub>CEC 株 279 代通过乳鼠皮下  
1 代和 6 代不同蚀斑的病毒毒力

乳鼠皮下 传代	蚀斑号	PFU/ 毫升	MID <sub>50</sub> / 0.03毫升	LD <sub>50</sub> / 0.03毫升	差 距 PFU — LD <sub>50</sub>
第 一 代	1	4.69	2.67	2.67	2.02
	2	≥4.50	2.67	2.67	≥1.83
	3	5.11	≥3.50	3.37	1.74
	4	≥4.50	≥3.50	3.37	≥1.13
	5	≥4.50	3.33	3.33	≥1.17
	6	5.00	2.75	2.25	2.75
	7	≥4.50	≥2.50	2.00	≥2.50
第 六 代	1	≥4.50	2.23	1.36	≥3.14
	2	3.84	1.67	1.40	2.44
	3	≥4.50	2.33	1.78	≥2.71
	4	≥4.50	1.68	1.15	≥3.35
	5	≥4.50	1.50	1.50	≥3.00
	6	≥4.50	1.00	0.61	≥3.89
	7	4.43	1.34	1.00	3.43
	8	3.84	1.50	1.33	2.51
	9	≥4.50	1.50	1.34	≥3.16

但是一次免疫小白鼠后却不能保护神经外毒力强的乙型脑炎“A<sub>2</sub>”及“P<sub>3</sub>”毒株的腹腔或皮下攻击,其保护指数仅为 10 以下。有趣的是该丧失了免疫力的病毒通过乳小白鼠皮下传递 10 多代后,不但对小白鼠的脑内毒力较前者显著降低,而其免疫力却明显地提高,保护指数均达数千以上。

表 5 SA<sub>4</sub>CEC 株与 SA<sub>4</sub>SM 株的免疫力比较

毒株	代 数	免 疫 材 料		免 疫 力 试 验						保 护 指 数
		PFU/ 毫升	LD <sub>50</sub> / 0.03毫升	免 疫 方 法			攻 击 方 法			
				病 毒 浓 度	免 疫 途 径	免 疫 剂 量 (毫升)	毒 种	途 径	间 隔 天 数	
SA <sub>4</sub> CEC 株	CEC <sub>279</sub>	≥4.50	4.00	10 <sup>-1</sup>	皮下	0.1	A <sub>2</sub>	腹腔	21	3
				10 <sup>-1</sup>	”	”	P <sub>3</sub>	皮下	21	0
	CEC <sub>279</sub>	5.00	4.00	10 <sup>-1</sup>	”	”	A <sub>2</sub>	腹腔	14	1
	CEC <sub>281</sub>	≥4.50	3.50	10 <sup>-1</sup>	”	”	P <sub>3</sub>	”	21	0
				10 <sup>-1</sup>	”	”	A <sub>2</sub>	”	21	10
SA <sub>4</sub> SM 株	SM <sub>1</sub> ,CEC <sub>4</sub>	—	0.33	10 <sup>-1</sup>	腹腔	0.25	P <sub>3</sub>	”	14	13,490,000
	SM <sub>1</sub> ,CEC <sub>5</sub>	4.32	2.00	10 <sup>-1</sup>	皮下	0.1	P <sub>3</sub>	”	21	10,000
	SM <sub>1</sub> ,CEC <sub>8</sub>	—	1.37	10 <sup>-1</sup>	腹腔	0.25	P <sub>3</sub>	”	14	51,290
					皮下	0.25	P <sub>3</sub>	”	14	3,467

二、继续蚀斑纯化后不同蚀斑病毒的毒力和免疫力

为了获得进一步减弱的毒株，我们又将 SA<sub>4</sub>SM 株进行纯化，每次选毒力最低的蚀斑病毒作为代表株进行下一代纯化，如此连选 6 次，现将前 5 次纯化过程中选出的代表株和第 6 代纯化所分离的蚀斑病毒的毒力结果分别列于表 6 和表 7。

表 6 SA<sub>4</sub>SM 株蚀斑纯化各代表株的毒力

蚀斑代数	代表株蚀斑号	PFU/1 毫升	MID <sub>50</sub> /0.03 毫升	LD <sub>50</sub> /0.03 毫升	差距 PFU—LD <sub>50</sub>
纯化前原株	—	4.17	3.0	0.55	3.62
1	20	4.07	0.55	<0.0	4.07
2	20-5	4.70	1.77	0.0	4.70
3	20-5-3	5.60	0.17	<0.0	5.60
4	20-5-3-3	4.95	2.36	0.80	4.15
5	20-5-3-3-1	5.80	0.88	<0.0	5.80

表 6 和表 7 的结果表明，通过蚀斑多次纯化，可以获得对小白鼠脑内基本上不致病的弱毒株。在前 5 次纯化过程中，选出的蚀斑病毒虽然对小白鼠脑内致死力 (LD<sub>50</sub>) 已经很弱，但是引起小鼠致病的毒力 (MID<sub>50</sub>) 仍然较高，而且死亡和发病仍

表 7 SA<sub>4</sub>SM 株蚀斑纯化第 6 代病毒内各蚀斑病毒毒力

蚀斑号	代数	PFU/毫升	MID <sub>50</sub> /0.03 毫升	LD <sub>50</sub> /0.03 毫升	差距 PFU—LD <sub>50</sub>
1	CEC <sub>3</sub>	5.69	0	0	5.69
2	CEC <sub>2</sub>	≥4.50	1.36	<0.0	≥4.50
3	CEC <sub>2</sub>	≥4.50	1.22	<0.0	≥4.50
4	CEC <sub>3</sub>	5.20	0	0	5.20
5	CEC <sub>2</sub>	≥4.00	0	0	≥4.00
6	CEC <sub>2</sub>	≥4.00	0	0	≥4.00
7	CEC <sub>3</sub>	5.90	0	0	5.90
8	CEC <sub>3</sub>	5.77	0	0	5.77

然有不规则的现象(表 6)。第 6 代蚀斑纯化后所获得的蚀斑病毒大多数已几乎不具有致死力和致病力(表 7)。

为了解这些蚀斑病毒株的毒力稳定性，将第 6 次纯化的 8 个蚀斑病毒全部经小白鼠脑内回传 1 至 5 代，结果第 2, 3 号蚀斑回传 1 代毒力立即回升，LD<sub>50</sub> 的 Log 值大于 2.5; 第 1, 4, 7, 8 号蚀斑传至 2 代未见毒力回升，第 5, 6 号蚀斑继续传至 5 代，其中第 5 号蚀斑传至第 4 代时毒力方开始升高，第 6 号蚀斑至第 5 代毒力 (logLD<sub>50</sub>) 仅为 1.0 (表 8)。这些说明 5、6 号蚀斑病毒的致病力是比较稳定的。

表 8 SA<sub>4</sub>SM 株蚀斑纯化病毒小鼠脑内回传结果

蚀斑号	细胞代数	鼠 脑 回 传 代 数											
		0		1		2		3		4		5	
		PFU*	LD <sub>50</sub> **	PFU	LD <sub>50</sub>	PFU	LD <sub>50</sub>	PFU	LD <sub>50</sub>	PFU	LD <sub>50</sub>	PFU	LD <sub>50</sub>
5	CEC <sub>1</sub>	≥4.0	0	≥4.0	0	—	0	—	0	5.2	≥2.5	—	—
6	CEC <sub>1</sub>	≥4.0	0	≥4.0	0	—	0	—	0	—	0	5.69	1.0

\* PFU/毫升; \*\* LD<sub>50</sub>/0.03 毫升。

对蚀斑纯化过程中各代蚀斑病毒的免疫性，用上述小白鼠免疫力试验方法进行了测定。试验表明，经过纯化后的蚀斑病毒，其免疫力与其原株 SA<sub>4</sub>SM 相似，同样较 SA<sub>4</sub>CEC 株有显著提高(表 9)。

以上我们选取第 2 代蚀斑及第 5 代蚀

斑与已知的 P<sub>3</sub> 株乙脑病毒免疫血清作中和试验，以鸡胚细胞组织培养蚀斑抑制法进行，结果 P<sub>3</sub> 株血清对以上 2 个蚀斑病毒株均有明显的中和抑制作用，中和指数在 100 以上，说明经乳鼠皮下传代后，再经蚀斑纯化的病毒仍然为流行性乙型脑

表 9 SA<sub>4</sub>SM 株纯化蚀斑病毒的免疫力

纯化 代数	蚀 斑 号	免疫材料*		保 护 指 数	备 注
		PFU/ 1 毫升	LD <sub>50</sub> / 0.03 毫升		
一	20	—	0.0	33,110	免疫后第21天 皮下攻击
二	5	3.30	0.75	22,390	免疫后第21天 腹腔攻击
五	1	3.30	<0.0	134,900	免疫后第14天 腹腔攻击
六	6	4.07	0	134,900	免疫后第14天 腹腔攻击

\* 以 10<sup>-1</sup> 病毒皮下免疫 0.1 毫升。

炎病毒。

## 讨 论

嗜神经病毒的变异往往在毒力减弱的同时免疫力也随着下降或丧失<sup>[5-7]</sup>, 因此给制备预防各种疾病活疫苗带来一定的困难。以前<sup>[6]</sup>我们也发现过这一现象, 即 SA<sub>4</sub>乙脑强毒株通过鸡胚悬浮组织培养长期多次传代后, 毒力具有显著减弱, 但丧失了免疫力。本文报告的方法, 即 SA<sub>4</sub>CEC 株通过乳小白鼠皮下连续传代, 其变异株不但毒力降低, 而且免疫力也进一步提高, 这说明, 乙脑病毒的免疫力并非与脑内致病力有绝对平行关系。

我们曾经将 SA<sub>4</sub>SM 株再通过乳鼠皮下传递 10 代, 却未能达到脑内毒力继续减弱的目的。但小白鼠发病和死亡不规则的现象表明, 通过乳鼠皮下传代培养的病毒材料内含有不同致病力的病毒颗粒。不同的矛盾, 只有用不同的方法才能解决, 以蚀斑法经过反复多次蚀斑纯化, 获得了对小白鼠脑内基本上无致病力而免疫力提高的弱毒株。该纯化后的弱毒株在小鼠脑内毒力测定时, 未出现发病和死亡不规则现象, 再经小鼠脑内连续传递 4—5 代, 其毒力没有明显地回升。这些特点说明, 通过纯化后, 该病毒株是比较纯的, 其遗传性比较稳

定。

通过乳鼠皮下传代后, 毒力降低而免疫力提高, 可能是由于长期在体外鸡胚组织培养繁殖的病毒, 当突然改变培养环境后(乳鼠体内培养)引起突变, 产生对皮下组织亲和力(即繁殖能力)增强并对神经组织毒力减弱的病毒颗粒, 这是在继续传代过程中进一步被选择而逐步占优势的结果。病毒本身在繁殖发展过程中都有其新旧两个方面的矛盾, 形成一系列的曲折的斗争, “斗争的结果, 新的方面由小变大, 上升为支配的东西; 旧的方面则由大变小, 变成逐步归于灭亡的东西。而一当新的方面对于旧的方面取得支配地位的时候, 旧事物的性质就变化为新事物的性质”(《毛泽东选集》第一卷, 1964 第 311 页)。免疫力提高而毒力降低的这一变异现象, 在其他嗜神经病毒的变异研究中亦曾发现过, 如卫克脱氏 (Wiktor)<sup>[8,9]</sup> 等将毒力减弱而免疫性差的狂犬病病毒 Flury HEP 株, 通过人胚肺二倍体细胞 (WI-38 株) 连续传代后, 发现该毒株对猴子的脑内致病力进一步减弱而对小白鼠及猴子的免疫性显著提高。通过实践我们体会到, 一切矛盾着的方面的转化是在一定条件下方能实现, 因此为了获得新的变异株, 不仅要挑选弱病毒株作为培育的对象, 而且要采取适合变异方向的培养方法。另外, 对毒力已经减弱但免疫性差的毒株, 为了进一步提高其免疫性, 亦可采用与本试验类似的方法, 即通过其他动物神经外途径传代再以蚀斑法适当选择。这一工作为选育安全而有较好免疫性的弱毒株提供了一种新的有效方法。我国有关单位<sup>[10]</sup>采用这个方法的实践证明, 其对提高乙型脑炎病毒减弱毒株的免疫力确实有效。因此我们认为该方法不仅对获得乙脑病毒活疫苗毒种, 也可能对其他虫媒病毒活疫苗毒种的培育具

有一定的实际意义。

SA<sub>4</sub>SM 蚀斑纯化病毒株的某些生物学特性与已经用作试制乙脑活疫苗的“5-3”株有所不同。前者系在鸡胚细胞系统减毒的毒株，而“5-3”株为在地鼠肾细胞系统减毒者。SA<sub>4</sub>SM 株在地鼠肾原代细胞内虽能繁殖，滴度可达  $10^5$ ，但不引起明显的细胞病变。其他生物学特性目前尚研究得不够，因此本毒株是否适用于制备乙脑活疫苗，尚待进一步试验研究。

### 参 考 资 料

[1] 俞永新、敖坚、雷文绪、李河民：微生物学报，8：260—269，1962。

- [2] 李河民、俞永新、敖坚、方珍：微生物学报，12：41—49，1966。
- [3] 俞永新、敖坚、朱荫耕、方珍、黄念君、刘丽华、武佩芬、李河民：微生物学报，13：16—24，1973。
- [4] 李河民、俞永新、季淑蓉、武佩芬：微生物学报，8：251—259，1962。
- [5] Fox, J. P. et al.: *Bull. Wld. Hlth. org.*, 17: 869—904, 1957.
- [6] Schwab, M. P. et al.: *Bull. Wld. Hlth. org.*, 10: 823—835, 1954.
- [7] Hammon, W. MCD. et al.: *J. Immunol.*, 96(3): 518—524, 1966.
- [8] Wiktor, T. J. et al.: *J. Immunol.*, 93: 353 1964.
- [9] Wiktor, T. J. & Koprowski, H. H.: *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118: 1069, 1965.
- [10] 中国医学科学院流行病防治研究所脑炎组：微生物学报，14 (2): 176—184, 1974。

## STUDIES ON THE VARIATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

### VI. THE CHANGES IN VIRULENCE AND IMMUNITY AFTER PASSAGING SUBCUTANEOUSLY IN SUCKLING MICE

YU YUNG-SING FANG CHENG WU PEI-FENG LI HO-MING

(Peking Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Peking)

In this paper, an additional method for inducing the variation of JBE virus has been reported.

Through using a JBE virus strain SA<sub>4</sub>CEC, which had been shown to be slightly attenuated and lost its immunogenicity by subjecting it to a series of subpassages in suspended cell cultures of chick embryo fibroblast, it was demonstrated that its virulence could be further reduced and its immunogenicity could be enhanced after it was subpassaged continuously in the subcutaneous tissues of

suckling mice.

Employing the procedure previously reported, the virus has then been repeatedly purified by plaque-selection on monolayer cell cultures of chick embryo fibroblast. Eventually a new mutant, intracerebrally avirulent to mice and possessing certain degree of immunogenicity, has been obtained.

It is assumed that the adoption of this technique could be of some significance for investigating the ruler of the variation of JBE virus.