

沙眼病原研究

III. 病毒分離試驗

李一飛 盧寶蘭 張曉樓 湯飛凡

(中央生物制品研究所及北京市同仁醫院)

病原微生物之分離與傳染病病原的關係久為學者所注意，故郭霍氏^[1]曾擬制訂定律以強調其重要性，但沙眼病毒之分離前人諸多失敗，因此病毒學說仍停留於學說之階段，致病原問題不能解決。Weiss 氏^[2]及 Julianelle 氏^[3a]曾以沙眼材料注射小白鼠腦內，但不能把病毒分離出來。Julianelle 氏^[3b]把沙眼標本接種於雞胚絨毛尿囊膜和卵黃囊內，結果亦為陰性。Pandit 氏等^[4]及 Wright 氏^[5]對雞胚工作雖有比較滿意的初步報告，但旋又收回。近年來則以 Macchiavello 氏^[6]及 Arakawa 和 Kitamura 氏^[7]在日本橫濱發表關於病毒分離的報告，最能引人注意。1944 年 Macchiavello 氏在墨西哥發表了他用雞胚分離沙眼病毒成功的消息，但原用文字至 1948 年才譯成英文在熱帶病學公報上披露。

1951 年日本 Arakawa 氏及 Kitamura 氏發表了關於沙眼的研究報告。他們取急性及慢性沙眼的濾泡及乳頭上皮細胞刮取物，注射於體重 7 克的小白鼠腦內，或滴種於雞胚絨毛尿囊膜上。由 5 例急性和 14 例慢性沙眼，分離了 18 株沙眼病毒。此外在三例嬰兒膿漏性包涵體結膜炎病例中，也獲得了 3 株膿漏性包涵體結膜炎病毒或稱副沙眼病毒。19 例病例中僅 1 例結果為陰性。據作者自稱，此例是因為小鼠供給不足而停止。所注射的小鼠大半在注射後數天內發生病狀；對環境刺激格外敏感，如以手觸則呈神經緊張狀態而跳走，眼睛流淚，四肢有時有麻痺現象。如直接注射不引起病症時，則可用傳代方法促成之。普通接連接種 3、4 代即可成功。依傳代次數的增加，四肢之麻痺現象亦隨之而變劇，且病毒的活動力亦常可由 10^{-3} 增加至 10^{-6} 或 10^{-7} 。在感染了的小鼠中，肉眼病變有腦充血、肺炎及肝呈灰白色等病變。由急性沙眼，病毒分離尤其容易，在鼠腦內普通傳遞二三次即可將病毒固定，慢性例子傳代 5、6 代亦可以達到目的。最短的潛伏期為 4 天。雞胚絨毛尿囊膜接種後並無肉眼病變，但由雞胚傳種至鼠腦中，則可使鼠發病，卵黃囊內注射後在卵黃囊細胞塗片上姬姆薩染色后 Arakawa 氏及 Ki-

tamura氏也發現了沙眼病毒的始體。由所分離的毒種他們進行了冷凍干燥、補體結合、血清中和等鑒別試驗^[8]，也做了人體接種工作^[9]。在免疫試驗中用他們的鼠腦抗原，在病人的血清內找到特殊抗體。新分離的病毒在人體試驗中雖不引起包涵體的產生，但卻發現了輕度的沙眼臨床症候。根據這些事實，Arakawa氏及Kitamura氏認為他們所分離的病毒是真正的沙眼病毒。

Macchiavello氏的工作已為Stewart氏^[10]所証實，但Stewart氏很強調的說，他的結論系僅憑一次試驗的結果，須再証實。關於Arakawa氏及Kitamura氏的報告，據我們所知，尚無附議者。墨西哥及日本學者的研究，如能証實，則對沙眼的病原及其他有關問題必能得到最後的解決，意義之重大自不言而喻，因此我們盡目前條件之可能，照他們所說明的情況，布置了一系列的試驗。茲將應用小白鼠企圖分離沙眼病毒之實際工作情形，及獲得的結果先行報告如下。

材料及方法

試驗所用的小白鼠是由本所小動物飼養場供給的，體重約7克。普通先一天送到，第二天或至遲第三日即使用。乳鼠亦由飼養場供給，隨母鼠整窩送來，用時多半在生後3—5日。

臨床標本包括濾泡摩擦、濾泡切除及濾泡壓擠，均取自北京市同仁醫院沙眼門診。所選擇活動性無并發症且未曾用藥典型沙眼的病例，均具有角膜血管翳。由門診大夫挑選經作者之一（張）檢查証實後，即進行標本的採取。先將患者的眼瞼翻轉，如前報告^[1]做塗片后用柄包紙套的消毒小棉棒在翻轉的上下瞼結膜病患處普遍輕輕的摩擦，借以擦取含病毒的上皮細胞，此即所謂“濾泡摩擦”的標本。將滿載摩擦物的棉棒用消毒鑷子除去紙套，置入于一含0.15毫升pH 7.0的秦洛氏液的小管中，並立即把管放回于冰盒內。如有濾泡切除或濾泡壓擠，則在手術後將標本附加于上述之棉棒上，帶回試驗室後將切除或壓擠物就管內用消毒鑷子的鑷齒挾碎，再以1毫升的結核菌素注射器，將管內秦洛氏液經過棉花，反復抽射幾次以混合沙眼標本，然後把棉棒挾干拿出。如標本量足而黏厚，則可在瑪瑙乳鉢內研磨並加等量的每毫升含1000或更多單位的盤尼西林，使每毫升混合液內含500—1000單位的青霉素，否則不加，以免把標本稀釋。常發現于北京沙眼患者眼內的幾種普通細菌，如類白喉桿菌、結膜干燥桿菌、流行性感胃桿菌及枯草桿菌等對小白鼠並無嚴重的危害。接種途徑為腦內，接種量小白鼠為0.03毫升，乳鼠則為0.02毫升。注射後每日觀察，普通最久不過4星期，如無病症發生即廢棄之。如發病或有死亡，則解剖，培養或傳代。凡注射後三日內死亡者廢棄不予檢查。

茲將 1954 年 6 月初至 1955 年 6 月底 1 年中的小鼠接種分離工作總結於表 1。

表 1 小鼠接種分離試驗

| 標 本 | 標 本 數 目 | 接 種 小 鼠 數 | 接 種 乳 鼠 數 | 結 果 |
|------------|---------|-----------|-----------|-----|
| 單 獨 標 本 | 58 | 167 | 204 | 陰 性 |
| 二 病 例 混 合 | 2 | 6 | | " " |
| 三 病 例 混 合 | 2 | 16 | | " " |
| 四 病 例 混 合 | 1 | 5 | | " " |
| 五 病 例 混 合 | 1 | 6 | | " " |
| 六 病 例 混 合 | 2 | 11 | | " " |
| 八 病 例 混 合 | 1 | 7 | | " " |
| 十一 病 例 混 合 | 1 | 4 | | " " |
| 合 計 | 68 | 222 | 204 | |

由表 1 可以看到 58 個單獨的及 10 個混合沙眼標本，注射在體重 7 克左右的小白鼠 222 只，又 3—5 天的乳鼠 204 只但結果一律為陰性。除一例外，我們從未觀察到日本作者所敘述的那種病症。注射後少數動物有毛松，背彎，尾巴現節或神經緊張等現象，但殺死傳代結果均為陰性。有一次由 131 號標本所注射小鼠 8 只中有一只在注射後第 29 天死亡，解剖取腦傳代注射小鼠 6 只，2 只在 24 小時內死亡，余在第四天同時發病，毛松背彎，四肢麻痺不能行動，我們以為分離了病毒，隨即將病鼠殺死，做培養，再接種，每只病鼠傳 6 只，但觀察一月半後，那 24 只新接種的小鼠却若無其事，其中一部分經盲目傳代，亦無所得，故那次發病之產生僅屬偶然之事，原因不明。

表 1 包括了在同仁醫院內接種的 14 個單獨標本。這是為了縮短採標本至注射的時間。時間太長，可能影響結果，因此我們將小鼠或乳鼠攜帶至醫院門診，取得標本後立即研磨注射。在 14 例中，從採標本至注射小鼠完畢，為時不超過一刻鐘，但結果亦為陰性。

盲目傳代

直接注射失敗後，我們採用了盲目傳代方法繼續試驗，因為盲目傳代，是病毒學中常用以引導病毒發展其適應性的方法，使其可以在新環境中生長繁殖。用單獨的或混合的標本照常注射幼鼠或乳鼠，注射後 5—7 日之間，不論其發病與否將鼠殺死 3、4 只，取其腦，混合研磨成 10—20% 的懸液，以 1500 轉沉淀 5 分鐘，取上層液又注射小鼠一批，是為第二代，如此繼續直至相當代數。試驗簡要見表 2。

表 2 說明我們共作試驗 16 次，總共注射小鼠 249 只但結果均為陰性，盲目傳代亦未能分離出沙眼病毒。

表2 盲 目 傳 代

| 傳、代 次 数 | 試 驗 次 数 | 注 射 小 鼠 数 目 | 注 射 乳 鼠 数 目 | 結 果 |
|---------|---------|-------------|-------------|-----|
| 2 次 | 11 | 105 | 10 | 陰 性 |
| 3 次 | 2 | 33 | | 陰 性 |
| 4 次 | 1 | 25 | | 陰 性 |
| 6 次 | 1 | 37 | | 陰 性 |
| 8 次 | 1 | 49 | | 陰 性 |
| 合 計 | 16 | 249 | 10 | |

額外刺激試驗

企圖減低小鼠的抵抗力, 借以增加病毒的適應性, 我們曾以 2% 的澱粉于注射沙眼标本前或与标本混合, 同时注射于小鼠腦內, 此外又或注射四联菌苗于腹腔內, 給动物以額外的刺激。利用这方法我們做了一系列的試驗, 結果见表 3。

表3 額外刺激試驗

| 病例标本号 | 注射小鼠数 | 額 外 刺 激 情 形 | 結 果 |
|-------|-------|-----------------------------|-------------------------|
| 77 | 小鼠 4 | 沙眼材料加 2% 淀粉, 等量混合, 注射腦內 | 第 6 天似病, 傳代活存 |
| 79 | 6 | 同上, 但外加腹腔注射四联菌苗 | 24 小时內死 4 只, 余活存 |
| 84 | 6 | 沙眼材料加 2% 淀粉, 等量混合, 注射腦內 | 17 天死 1, 余活存 |
| 86 | 6 | 同 上 | 活存 |
| 11例混合 | 3 | 沙眼材料, 注射腦內, 腹腔內注射四联 | 3, 5, 6 天各死 1, 傳代活存 |
| 11例混合 | 4 | 沙眼材料及淀粉等量混合, 注射腦內 | 24 小时內死 2, 余活存 |
| 116 | 乳鼠 7 | 沙眼材料注射前三天, 每天腦內注射淀粉 0.02 毫升 | 24 小时死 2, 第 5 天死 1, 余活存 |
| 117 | 4 | 同 上 | 全部第 7 天傳代, 活存 |
| | 小鼠 3 | 沙眼材料注射前一天腹腔注射四联 0.02 毫升 | 全活存 |

額外刺激引起相当大的死亡数, 这是可以預料得到的, 但除注射后 48 小时死的逕即廢弃外, 其他死亡的在繼續傳代时, 不能再致死亡, 活存的在觀察一月內未見有任何症狀發生。因此, 就有限的試驗中觀察, 額外刺激亦未能因減低了动物的抵抗力而促進病毒的適應性使我們能把病毒分离出來。

反复注射傳代試驗

由上述試驗, 我們体会到乳鼠对腦內注射, 耐受性非常的高, 因此我們將沙眼标本准备后儲存于冰箱中, 在 14—16 小时間采取連續注射, 每只 3 次, 每次注射 0.02 毫升于腦內。注射后 5—7 天, 無論乳鼠得病与否, 牺牲 2—3 只, 取腦混合, 制成 20% 的懸

液，在 1500 轉沉淀 5 分鐘，用上層液如上次一樣的在 14—16 小時內又注射乳鼠一批，每只照舊連接注射 3 次，如此繼續傳代，到目前為止，有的已達第 7 代。茲將反復注射傳代的結果列於表 4。

表 4 反復注射傳代試驗

| 試驗次數 | 盲目傳代次數 | 發現可疑病後傳代次數 | 注射鼠數 | 結果 |
|------|--------|------------|------|-----|
| 1 | 6 | 7 | 71 | 陰性 |
| 2 | 6 | 2 | 54 | “ ” |
| 3 | 6 | 4 | 70 | “ ” |
| 4 | 6 | 4 | 60 | “ ” |
| 5 | 4 | | 38 | “ ” |
| 合計 | | | 293 | |

表 4 說明，在 5 次試驗中我們進行了許多次數的盲目或發現疑似病症後的傳代試驗，用乳鼠 293 只但結果完全為陰性。雖然用重複注射法，增加了乳鼠腦內的注射量至通普的三倍（0.06 毫升），但亦無濟於事。有的動物在注射後 11—19 日雖然發生毛松，背彎，行動遲鈍或四肢麻痺等似腦炎症狀，但經傳代後却不能發現病症的再次產生，因此分離病毒的結果仍為陰性。

討 論

病毒分離，是我們整個沙眼病原研究工作中的中心工作，因為病毒如果分離不出來則病原問題將永遠停留於學理階段而得不到解決。因此自 1954 年 6 月至 1955 年 7 月一年中，我們的主要精力，即化費在此問題上。關於 Arakawa 及 Kitamura 和 Macchiavello 諸氏在這方面的研究，在本報告開始時我們已經作了很詳盡的介紹。關於 Macchiavello 氏的工作，我們作了一些試驗，但認為做的不夠多，故暫緩報告。在重複日本工作者的工作中，我們共研究了 201 例典型沙眼病例，注射了 2500 多只小白鼠，但結果完全為陰性，沒有分離到任何病毒。而 Arakawa 和 Kitamura 自 15 例沙眼即獲得了 14 株病毒，他們的結果，可算是百發百中。我們研究的病例比他們要多的多，但毫無所得，分析原因，不知是何道理。日本的沙眼在臨床上可能與我們的沙眼有些不同，日本的小白鼠對病毒的敏感性與我們的亦或有差異，加上其他技術上的關係，可能造成一些結果上的區別，但無論如何，距離似不應有如此之遠。Arakawa 及 Kitamura 二氏強調指出，他們工作的成功，主要在於他們能利用很小的，體重 7 克左右的小白鼠及很黏厚的（10—20%）沙眼臨床標本，這兩點在我們的工作開始時即受到了重視。我們所用的小鼠與他們所用的在體重上沒有什麼差異，而且我們添用了 3—5 天的乳鼠，故在小鼠年齡上的照顧

只有过而無不及。关于臨床标本黏厚問題，我們普通所用的大概是 10% 左右。除非标本是濾泡压挤，普通由一个病人所得的濾泡摩擦或濾泡切除标本的容量是有限的，但我們曾以病例合并和反复注射的方法來克服此种困难。腦內注射 3 次，总量可以达到 0.06 毫升，以 0.02 毫升 20% 的濃度計算亦有过而無不及。虽然如此，我們所得的病毒分离的結果仍然是陰性。

据日本作者，無論用鷄胚或用小鼠，臨床沙眼是慢性或急性，沙眼病毒的分离是没有什么困难的。在鷄胚絨毛尿囊膜上虽然看不出有何病变，但用絨毛尿囊膜組織懸液注射小鼠腦內，即可產生病症或死亡。以沙眼材料注射小鼠數日內即發生病狀，如無病症發生，則傳代三四次，即可把病毒分出。它們的病毒滴定度常是 10^{-3} 或高至 10^{-6} 或 10^{-7} 。在我們的工作中，直接注射失敗后，我們即用盲目傳代。盲目傳代一般至 6 次，有的試驗，已至 7、8 次但亦無結果。盲目傳代失敗后我們又繼以額外刺激注射及反复注射，但始終得不到結果。

根据我們上次的報告^[11] 201 病例中含包涵体者僅占 23.8%，如以包涵体代表病毒，則含病毒的标本似乎很少，因此分离工作自然困难。但据另一報告^[12] 在 3 个接种陽性的标本中(猴 21, 27, 28)有二个不含包涵体，这說明包涵体虽不存在，标本仍有病毒。自然在这些标本內，包涵体可能沒有找到，但無論如何，我們相信，II 期沙眼材料中大半含有病毒，而最低限度亦应有 23.8%，故陰性分离的結果，不是有沒有病毒的問題。

失敗为成功之母。我們知道登革热及白蛉热二个病毒病的病原是最近几年才确定的。在 1944 年以前登革热的病原亦停留于病毒学理之上。那时除人外，别的动物如沙眼一样的，均不能感染，但在最近十年內，人們的智慧終於把它征服了。据 Sabin 氏^[13]，用盲目傳代，人們終究把它適應起來了，所以我們現在有壇香山登革病毒株，有印度登革病毒株及日本登革病毒株等。白蛉热的征服史比較更新近。在第二次世界大战时在远东及意大利等地据 Sabin 氏^[14]，人們对此病的情形及其重要性虽然有些認識，但也是因为除人外，別的試驗室动物均不敏感，故研究工作無法進行，僅將含病毒的患者血液干燥保存起來。1952 年血病毒保存了 9 年之后，才利用乳鼠盲目傳代法把病毒从干燥情况中分离出來。如登革有 I、II 抗原相同，免疫性互异的两种病毒株一样，現在白蛉热病毒也有雷普尔 (Naples) 及西西利 (Sicily) 或其他中东型兩样的病毒株。登革及白蛉热病毒也有特殊性的血凝及补体結合抗原，可为診斷的工具，此处 Sabin 氏正在努力發展無毒或弱毒登革及白蛉热活毒疫苗。脊髓灰質炎病毒也是一样，十年前一般只能在猴体上做試驗，但人們卒能把它適應于組織培养內，用組織培养法，分离了許多病毒株，建立了三个不同的型类，最近且已制造了疫苗^[15]，供应实际需要。这些智慧劳动的成

功,都是沙眼研究的远景。

隨環境而變遷,是生物的特性,病毒是微生物中之善變者。變遷又可稱為適應。在試驗室中我們有三點原則促使適應。第一是盲目傳代,由淺入深,從近至遠,慢慢的使目的物適應於新環境;第二是利用化學或物理方法,降低動物或宿主細胞的抵抗力;第三是應用藥劑,擾亂宿主細胞的正常生理,而增加對傳染的機能。第一第二項原則,在本研究中我們已經用到過,但盲目傳代的次數可能不夠,最多的我們只傳至第8代,據 Braley^[6]在膜漏性包涵體結膜炎病毒分離工作來看盲目傳10代,並不為多,過少則可能不能完成其適應性。第三項原則,則仍待應用。近年來關於促腎上腺皮質激素(ATCH)及腎皮質激素(Cortisone)對病毒的活動試驗,已有不少的報告^[17,18,19],因此引起了我們的注意,想在這方面做些工作。

總 結

病毒分離,是我們沙眼病原研究中的中心工作,在重複 Arakawa 和 Kitamura 二氏的試驗,在過去一年中,我們共研究了201例典型II期沙眼病例,注射了2500余只幼鼠及乳鼠,但無論是用直接接種、盲目傳代、額外刺激、或反復注射的方法,我們的試驗結果是完全陰性的,沒有分離出任何病毒,可是我們的乳鼠或幼鼠傳代的次數,可能不夠。而與登革熱、白蛉熱及脊髓灰質炎等病原近年來驚人的發展工作相聯系,暫時的失敗,却給予了我們前進的決心。

參 考 文 獻

- [1] Koch, R., Smith & Martin Zinsser textbook of bacteriology, 1948, P. 9.
- [2] Weiss, C., *J. Immunology* 25: 247, 1933.
- [3] Julianelle, L. A., The etiology of trachoma, 1938, The commonwealth fund, New York, (a) P. 161, (b) P. 168.
- [4] Pandit, C. G., *Ind. J. Med. Res.* 23: 475, 1935.
- [5] Wright, R. E., *Brit. J. Ophth.*, 21:198, 1937.
- [6] Macchiavello, A., English translation *Trop. Dis. Bull. Dec.*, 1948.
- [7] Arakawa, S., Kitamura, O., *Yokohama Med. Bull.* 2:205, 1951.
- [8] —————, *Arch. f-die gesamte Virosforschung* 5:208, 1953.
- [9] Kitamura, O., Arakawa, A., *Yokohama Med. Bull.* 2:223, 1951.
- [10] Stewart, F. H., *J. Path. & Bact.*, 62:457, 1950.
- [11] 湯飛凡、張曉樓、李一飛、黃元桐:沙眼病原研究 I. 沙眼包涵體的研究, *微生物學報* 4 (1): 1—14, 1956.
- [12] 湯飛凡、張曉樓、李一飛、路蘇容:沙眼病原研究 II. 猴體傳染試驗, *微生物學報* 4 (1): 15—23, 1956.
- [13] Sabin, A. B., *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 4:198, 1955.
- [14] Sabin, A. B., Philip, C. B. & Poul, J. R., *J. Am. Med. Asso.* 125:60-606; 693-699, 1914.

- [15] Salk, J. E. et al, *A. J. P. H.* **44**: 994, 1954.
- [16] Braley, A. E., *Arch. Opth.*, **41**: 151, 1949.
- [17] Schertznon & Fischer, *J. Exp. Med.* **95**: 347, 1952.
- [18] Kilbourne & Horsfall, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **76**: 116, 1951.
- [19] Landgren & Finland, *J. Lab. & Clin. Med.* **37**: 380, 1951.

STUDIES ON THE ETIOLOGY OF TRACHOMA

III. ATTEMPT TO ISOLATE THE VIRUS IN THE WHITE MICE

LI YI-FEI, LO PAO-LAN, CHANG HSIAO-LOU AND TANG FEI-FAN
National Vaccine and Serum Institute and Municipal Tung Jen Hospital, Peking

Although numerous attempts were previously made at isolating the virus of trachoma, only few successful reports have appeared in literature. In the course of the past year, the present authors tried to repeat the experimental works of Arakawa and Kitamura, who claimed that by the intracerebral inoculation of scrapings from conjunctiva of trachoma patients into young mice 18 strains of virus had been obtained from 19 patients. The work has hitherto not been confirmed, and the present communication deals with such an attempt. Besides young white mice, nursling mice were also included in the present study. Altogether more than 2,500 mice were inoculated with materials from 201 cases clinically diagnosed as trachoma, the inoculation covering such procedures as blind passages through several generations of animals, and the use of additional stimuli in the form of starch and TAB vaccine inoculations, as well as repeated inoculation of the same materials in the same group of animals. All these attempts resulted in complete failure to recover the virus.

This report is not intended to discredit the worth of the Japanese investigators, but merely details the difficulties involved in this type of research. This failure will only spur the present workers in further attempt to solve this important problem.