

沙眼病原研究

IV. 接种鷄胚, 分离病毒*

湯飛凡 張曉樓 黃元桐 王克乾

(衛生部生物制品研究所及*北京市同仁醫院)

一. 前 言

关于沙眼的病原問題, 迄今还没有弄清楚。自第一次世界大战开始, 当野口氏^[1]的顆粒性杆菌假說被推翻之后, 沙眼病原問題, 經 Thygeson 氏^[2]、Julianelle 氏^[3]、Bland 氏^[2,3]和其他的學者^[4-6]煞費苦心的研究, 結果均認為沙眼是一种病毒病。我們自己在这方面的工作^[7], 也有相同的結論。但病毒學說之所以不能穩固地建立起来, 主要原因是因为沙眼病毒还不能从宿主細胞組織中分离出来, 因此許多重要工作如鑒定、分型、致病性和免疫性等研究, 都不能进行, 就是沙眼病毒的一般生物学性質, 我們的認識迄今也还是十分模糊的。

沙眼在我国的散布, 目前还很广泛。根据中华眼科杂志沙眼專号社論^[8]概括的估計, 我国人口約有 50% 以上患沙眼, 边远农村地区患病率有高达 80—90% 的, 所以民間有“十眼九沙”的俗語。沙眼不但破坏視力, 而且造成失明。据各地調查,^[8]沙眼致盲的盲人占盲人总数的 23—37%。因此沙眼目前在我国是一种相当严重, 危害人民健康而广泛傳播的疾病, 对我們的社会主义經濟建設、国防建設, 都有一定的影响的。在农村發展綱要中党和政府号召我們在 7—12 年內積極防治沙眼, 充分地說明对这一問題的重視。

关于接种鷄胚, 分离沙眼病毒的嘗試, Pandit^[9]和 Wright^[9]等氏早有报导。Macciavello^[10]、Arakawa 和 Kitamura^[11]、Stewart^[12], 以及 Коган-Абезгыз^[22]氏等最近的工作, 更引起了人們的注意, 但到目前为止, 此項工作还欠实証。我們^[13]自从应用小白鼠和乳鼠分离病毒失败以后, 即改用鷄胚为試驗动物, 繼續此項工作。茲將过去一年

* 1956年8月10日收到。

研究的結果，分別報告于后。

二. 病毒的分離和鑑定

(一) 病毒分離試驗

接種雞胚分離病毒的關鍵是病例的選擇和標本內細菌的控制。關於第一點，如從前一樣，我們的注意力自然集中在臨床方面，先選擇活動性無併發症且未經用藥的第二期 (MacCallan 氏) 典型沙眼病例然後進行標本的採取。關於第二點，我們曾利用了青霉素、鏈霉素、乙醚、硫柳汞和磺胺醋醯鈉等化學品的制菌作用，將標本加以處理，然後注射雞胚從事研究，經過一個相當長時期的摸索後才有些結果。

1. 標本的採取：先將患者眼瞼反轉，每眼剖取細胞做一張塗片，供檢查包涵體之用，然後兩眼各用消毒棉棒一個在乳頭或濾泡的表部輕輕的磨擦，勿使出血。磨擦後將棉棒投入含有 0.5 毫升肉浸液-鹽水 (等量) 的小試管內，存置冰壺中帶回實驗室。因為採取標本前做塗片常常引起流淚和出血，對標本或有不利，所以後來不採用作塗片的方法。

2. 標本處理：將棉棒取出，取下棉花放置於無菌雙碟內，加入少量 (約 0.5 毫升) 肉浸液-鹽水。用消毒鑷子將棉花反復擠壓，把棉花內的液體完全擠出，與原來小管內的液體合併，加入抗生素或化學劑，將標本加以處理。在用抗生素處理時，標本液不先沉淀，直接加入抗生素，接種雞胚；在應用乙醚、硫柳汞等化學品處理時，將標本放於瑪瑙乳鉢中加玻璃粉研磨，再經 1,500 轉沉淀 3 分鐘；吸取上清液，加入化學品，進行工作。每標本在處理前一律抽取 0.1 毫升，接種于血液平板上，作細菌檢查。用乙醚、硫柳汞處理的標本，處理後復作培養一次，以觀察細菌是否完全被消滅。

3. 抗生素處理：所用的青霉素系青霉素 G，結晶鈉鹽，德國赫司脫 (Hoechst) 化工厂制。鏈霉素系法國 Specia 厂出品的雙氫鏈霉素 (Didromycine)。先將青霉素或鏈霉素用肉浸液-鹽水稀釋成每毫升含 10,000 單位的原液，保存于 -50°C 低溫冰箱中備用。處理標本時，按 0.2 毫升標本液 (即每雞胚的接種量) 加入青霉素 50—250 單位和鏈霉素 250 單位或只單獨加入鏈霉素 500 單位。混合後立刻進行雞胚注射。每標本注射 4—6 個 6—9 日的雞胚，每雞胚接種 0.2 毫升于卵黃囊內。

4. 乙醚處理：乙醚系北京化學試劑研究所制。將乙醚加入標本液中使最後濃度為 3%，在冰箱內放置 18—24 小時，除夜間外，每 2 小時搖蕩一次，處理畢用抽氣法將乙醚排出 (約 30 分鐘)，然後接種 6—8 個 6—7 日的雞胚。每雞胚接種 0.2 毫升于卵黃囊內。

5. 硫柳汞：硫柳汞系美國 Lilly 公司出品。以 1:2000 稀釋加入于等量的標本內，

故最後濃度為 1:4000。混合後，置 4°C 冰箱中 18—24 小時，然後接種 6—8 個 6—7 日的雞胚，每雞胚接種 0.2 毫升於卵黃囊內。

6. 磺胺醋醯：磺胺醋醯鈉鹽，為雪狀晶體，系上海光明藥廠出品。按每雞胚 1 毫克的磺胺醋醯鈉計算，將此化學品加入於標本內，混合後注射 6 個 6—7 日的雞胚的卵黃囊內。

7. 雞胚接種：標本處理後即行雞胚接種。卵黃囊接種基本上是參照 Cox^[13] 的方法。取 6—8 日齡雞胚，將氣室和胚位划出，在氣室中點壳上鋸一小縫，但不鋸破壳膜。接種時將雞胚斜置，鈍端略高，胚位朝上，用 20 號及長 1 $\frac{1}{4}$ 吋針頭，向卵的中軸綫稍微向下的方向刺入約 1 $\frac{1}{4}$ 吋，然後注射。注射量一般為 0.2 毫升。注射完後，滴一滴融化了的石蠟，將壳上針孔封閉，將雞胚放回溫暖箱中繼續培育，惟溫度則改用 35°C。箱內須保持適當的濕度。每日檢查雞胚一次。接種後 48 小時內死亡的雞胚廢棄。在 6—8 天取 3 個傳代，其餘的則留作繼續觀察。各代傳代材料，均同時作培養，以檢查是否染菌。檢查時除觀察雞胚各部分是否有病變外，特別注意卵黃膜是否有不正常之處，肉眼檢查後，復取卵黃膜組織作塗片，用姬氏 (Giemsa) 或馬氏 (Macchiavello) 染色，進行鏡檢。

傳代時取雞胚 3 個，先浸入福馬林酒精 (70% 酒精加 1% 福馬林) 中片刻，取出，用電烙器去壳法^[16] 除去氣室上之卵壳。撕開尿囊膜，用鑷子把雞胎鉗脫，然後再用鑷子拉出卵黃膜一大塊，將各胚的卵黃囊塊一起放入於一個含有玻璃珠的小廣口瓶內，加入肉浸液—鹽水 10 毫升，塞以橡皮塞，震搖 3 分鐘，即製成大約 10% 左右的卵黃膜懸液。立即以懸液接種下一代雞胚，每胚接種 0.2 毫升於卵黃囊內。有時為避免混入個別的染菌雞胚，將分別收取各雞胚的卵黃膜，先作細菌培養，暫時將卵黃膜放置 4°C 冰箱中過一夜，次日再選擇各無菌卵黃膜混合製成懸液，再作傳代接種。

8. 病毒分離試驗結果：在病毒分離試驗中，每一標本如雞胚在直接注射及傳代過程中，不死亡也無病變，塗片上也沒有查出病毒原體時，一般傳至 5 代即終止傳替，作為陰性。

自 1955 年 6 月至 1956 年 7 月共作分離試驗 68 次，結果見表 1。

由表 1 可以看到在 68 次試驗中，除抗生素外，其他的處理方法如乙醚、硫柳汞、磺胺醋醯等均因不能控制細菌以至引起雞胚的死亡，因而病毒不能分離出來。從青霉素和鏈霉素混合處理的 29 次分離試驗中，染菌的只有 4 次，而 25 次完全無菌，其中我們獲得了 TE8 和 TE55 病毒 2 株。僅用鏈霉素處理的 5 次分離試驗中，2 次染菌，3 次無菌，其中我們也獲得了 TE66 病毒一株*。

* 8 月初本文脫稿時又獲得了第四株—TE76 病毒 1 株。

表1 病毒分离试验

处理方法	分离试验	接种鸡胚		病毒分离阳性
		染菌	无菌	
未加任何处理	6	6	0	0
青霉素 250单位 链霉素 250单位	29	4	25	2
链霉素 500单位	5	2	3	1
乙醚 3% 4°C 18—24小时	7	7	0	0
硫磺 1:4,000 4°C 18—24小时	20	20	0	0
磺胺醋酰 1毫克	1	1	0	0
共 计	68	40	28	3

9. TE8 病毒株分离的经过: 1955年8月10日在冰壶内由同仁医院带回病例 420987 (女, 19岁, 双眼滤泡性沙眼, 包涵体检查阴性) 和病例 426243 (女, 10岁, 双眼乳头滤泡性沙眼, 包涵体检查阳性) 的标本各一, 随即将每标本接种 8 日的鸡胚各 4 个, 每个注射 0.2 毫升于卵黄囊内。每 0.2 毫升标本液中含有青霉素和链霉素各 250 单位。接种后将鸡胚置 35°C 培育 9 天。在第 9 天作第一次盲目传代, 二标本分别收取卵黄膜制成 10% 悬液, 立即分别接种第二代鸡胚各 6 个。收割第 1 代鸡胚时, 鸡胚发育良好, 无病变, 卵黄膜悬液细菌培养阴性, 卵黄膜涂片检查未发现病毒原体, 第二代鸡胚培育 7 天, 收取二标本第二代的鸡胚各 3 只, 各取卵黄膜一小块, 合并制成 10% 悬液, 继续接种 8 日的鸡胚 6 个, 每胚 0.2 毫升于卵黄囊内。第二代鸡胚剖视时也未发现任何病变, 卵黄膜涂片上也未发现病毒原体。第三代鸡胚 6 个, 其中 4 个于接种后第 4 日死亡, 卵黄悬液细菌培养阴性, 鸡胚及卵黄膜上充血, 且卵黄膜有易与卵黄脱离的现象。卵黄膜涂片经马氏染色后镜检时发现许多的病毒原体。本病毒嗣后会连续传代至 20 余代, 每代鸡胚均表现规则的死亡, 相同的病变和经常能查见病毒原体。

10. TE55 病毒株分离的经过: 1956年4月11日自同仁医院带回病例 458198 (女, 36岁, 双目乳头性沙眼, 未检查包涵体) 和病例 458256 (男, 18岁, 二期乳头滤泡性沙眼, 未检查包涵体) 的标本各一, 即分别接种 8 日的鸡胚各 6 个, 卵黄囊内种入, 接种量为 0.2 毫升, 每 0.2 毫升标本液中含有青霉素 50 单位和链霉素 250 单位。接种后的鸡胚放 35°C 培育 6 天, 无死亡。在第 6 天每标本各取 3 个鸡胚的卵黄囊分别制成 10% 悬液, 各接种 7 日胚 6 个, 作第一次盲目传代(第二代)。第二代培育 7 天, 鸡胚无死亡, 第 7 天从两标本各取鸡胚 3 个, 收取卵黄膜合并制成 10% 悬液, 接种第三代, (第二次盲目

傳代)。第二次和第一代一樣，雞胚發育正常，卵黃膜塗片未發現病毒原體。第 3 代雞胚 6 個于接種后 5—9 天全部死亡，卵黃膜塗片鏡檢時發現許多病毒原體。將第 3 代卵黃膜懸液作細菌培養時發現有一種厭氣性革蘭氏陽性桿菌同時存在。1956 年 5 月 12 日用第五代的雞胚卵黃膜制成 2% 懸液，以平均孔度 (A. P. D.) 590 毫微米的火棉膠濾膜進行過濾除菌，將濾液接種雞胚 8 個，并作連續傳代，此后各代雞胚均表現規則的死亡，雞胎和卵黃膜充血，細菌培養陰性，在卵黃膜塗片中經常可以查見大量的病毒原體。

11. TE66 病毒株分離的經過：1956 年 6 月 14 日自同仁醫院帶回病例 469873 (男，20 岁，双眼乳头濾泡性沙眼，未檢查包涵體) 的標本，因當日無適齡的雞胚，乃將標本管保存于 -50°C 低温冰箱中。1956 年 6 月 28 日將標本取出接種 7 日齡雞胚 6 個，卵黃囊內種入，每胚接種 0.2 毫升。每 0.2 毫升標本液中含有鏈霉菌 500 單位。第一代雞胚在 35°C 中培育 7 天，雞胚無死亡。第 7 日收取 3 個雞胚的卵黃膜制成 10% 懸液接種第二代 6 日雞胚 6 個，每胚接種 0.2 毫升。第 2 代雞胚有 2 個在接種后 8—9 日間死亡，但未查見有大量的病毒原體。第 8 日收取 2 個雞胚的卵黃膜制成 10% 懸液傳種第 3 代。第三代雞胚 6 個均于接種后 7—11 日間全部死亡，卵黃膜懸液作需氣菌及厭氣菌培養均為陰性，在雞胚卵黃膜塗片中可以看見大量的病毒原體。

(二) 病毒的動物致病性

1. 猴體傳染試驗：由 Stewart 氏^[12]，最近的研究和我們自己的試驗結果^[20]，我們知道恒河猴對沙眼病毒有相當高的敏感性，因此我們用 TE8 及 TE55 病毒株做了恒河猴的傳染試驗。方法是先檢查猴子結膜的正常情況，然后用一個小棉棒沾上 10% 或 20% 的病毒材料在左眼上下穹窿部及臉結膜上塗擦多次。復用毛吸管滴 1—2 滴病毒液于眼內，揉擦后用棉球擦去多餘的液體。將猴子放回原籠，以后每周觀察一次。結果見表 2。

表 2 指出，接種 TE8 和 TE55 兩株病毒的 7 只猴子，經過 7—16 日的潛伏期后均發生了典型的病變。濾泡出現之前及以后，結膜有輕度充血和炎腫現象 (圖版 I, 1, 2)。濾泡呈圓形或半圓形，大小不一，似沿血管而散佈着 (圖版 II, 1—6)。猴安靜時，濾泡呈灰白色；但如猴急燥，則從中心起整個濾泡立即變為血紅色。接種 227 和 218 號猴的接種物 TE8Y11，曾被酵母菌及一種革蘭氏陰性桿菌污染，但以此兩種細菌經過純培養并傳代三次后的混合懸液復接種于 223 號猴，觀察 3 個月，却未發現濾泡，因此 227 和 218 號猴濾泡的形成可認為是由病毒所引起而與所污染的細菌無關。雖然如此，為慎重起見，我們復將另一傳代系統的無菌病毒標本 (TE8Y11—a) 接種猴子二只 (228, 229)，結果

表2 猴体傳染試驗

猴号	接种日期	接种物	接种结果	附 录	
92	55—9—8	TE8*Y4	10日發生瀰泡, 45日开始消退, 66日恢复正常	接种材料中汚染酵母菌与革蘭氏陰性杆菌	
227	55—10—24	TE8Y11	12日發生瀰泡, 123日开始消退, 164日恢复正常		
218	"	"	12日發生瀰泡, 46日开始消退, 82日恢复正常		
228	55—12—10	TE8Y11—a	7天發生瀰泡, 77天开始消退, 117天恢复正常		
229	"	"	14天發生瀰泡, 77天开始消退, 87天恢复正常		
217	56—5—28	TE55Y7	10天發生瀰泡, 54天开始消退, 73天仍有瀰泡, 100天恢复正常		
220	"	"	16天發生瀰泡, 82天有消退現象但108天仍有瀰泡		繼續观察中
223	56—1—28	酵母菌, 革蘭氏陰性杆菌	陰 性		
19	55—12—10	正常卵黃囊組織	"		
226	"	"	"		
222	56—7—12	正常卵黃囊組織	"		
230	"	"	"		
219	55—10—27	乳鼠腦組織	"		
221	"	"	"		
224	56—1—6	"	"		
225	"	"	"		

• TE8Y4=TE8 病毒株卵黃囊傳代第4代, 余类推。

都發生典型的病變, 这無疑的可以說明此病毒的活动性。病毒株 TE66 因分离日迟, 尚未进行猴体感染試驗。

猴 223 号可視为对照。除 223 号猴外, 还有 226、19、222、230 等 4 只猴子接种正常卵黃膜悬液, 結果均为陰性。另外, 我們在前一阶段应用乳鼠作病毒分离試驗时曾將盲目傳代 5—6 代的 10% 鼠腦組織悬液接种于猴 219、221、224、225 等 4 只猴, 也从未見有引起瀰泡者, 因此接种 TE8 和 TE55 株病毒所产生的病變, 可認為是特异性的。

接种后 90 及 104 天, 在 227 号猴的眼結膜刮片中, 我們曾兩次發現包涵体(圖版 1, 3, 4), 这更进一步說明接种后的病變与沙眼的关系。

2. 鷄胚傳染: TE8 病毒接种于鷄胚卵黃囊內, 能引起鷄胚規則的死亡。剖視时, 胚体及卵黃膜上有充血現象, 卵黃膜变薄与卵黃脫离等現象, 前面已經提及。除卵黃囊外, 我們也試过其他的感染途徑:

尿囊腔——將 TE8Y12 卵黃膜磨成 10% 懸液, 接種 8—10 日雞胚 4 個, 每尿囊腔內種入 0.2 毫升, 置 35°C 培育箱培育, 以後每 5—6 日收取尿囊液, 作尿囊腔傳代接種, 至第三代, 取尿液再接種卵黃囊, 以測定病毒之是否存在。試驗結果: 第一、二代尿囊腔接種的雞胚并無死亡, 也無病變, 但第三代尿液種入卵黃囊後仍能于 8—11 日引起雞胚的死亡, 在卵黃膜塗片上觀察到大量的病毒原體, 這便無疑地証明了病毒之能在尿囊腔內適應繁殖。

羊膜腔——將 10% TE8Y21 卵黃膜懸液接種 13 日雞胚羊膜腔 8 個, 每羊膜腔接種量為 0.1 毫升, 培育 35°C, 以後每 5—7 日收取羊水傳代一次, 至第三代, 將羊水復接種于卵黃囊內, 結果發現雞胚在第 7 日全部死亡, 并在卵黃膜組織塗片上, 找到大量的病毒原體。這說明病毒在羊膜腔內也能够適應繁殖。

絨毛尿囊膜——將 TE8Y18 卵黃膜制成 10% 的懸液, 經過人工氣室, 接種于 4 個 10 日的雞胚絨毛尿囊膜上, 每個接種 0.1 毫升, 用透明膠紙封口, 放置 35°C 培育, 人工氣室向上。以後在 6—7 天收取接種部位的絨毛尿囊膜制成 10% 懸液, 連續傳代, 每代用 12 日胚 5—7 個, 傳至第 4 代時收取尿囊膜仍復制成 10% 懸液, 接種于雞胚卵黃囊內, 培育 8 天, 再傳代(卵黃囊)一次。結果証明 TE8 病毒不能在絨毛尿囊膜上生長, 因接種卵黃囊的全部雞胚, 在觀察的 10 天期內均無死亡, 表示病毒已完全消失。

3. 小白鼠: 將具有滴定度 $10^{5.0}$ 的 TE8Y20 卵黃囊懸液(10%)接種于 6 只體重 7 克的小白鼠腦內, 每只注射 0.03 毫升, 接種后 5 天取 3 只傳代, 其余 3 只觀察 14 日。腦內傳代繼續 5 次, 并將第 3 次和第 5 次傳代的 10% 的鼠腦懸液接種雞胚卵黃囊并傳代一次, 測驗病毒之存在與否。結果全部雞胚健存, 証明病毒不能在鼠腦中生長。

以 TE8Y15 病毒, 用 1—2 日齡的乳鼠, 如上法重復試驗一次, 每乳鼠腦內種入 0.02 毫升, 每 5 天傳代一次, 共傳 5 次。最后將第 5 代的 10% 鼠腦懸液注射卵黃囊, 結果也完全為陰性, 說明 TE8 病毒也不能在乳鼠腦內適應繁殖。

以 TE8Y20 10% 卵黃膜懸液作滴鼻感染試驗。將體重 10—12 克的小白鼠 6 只, 輕度麻醉后, 每只滴入 3 滴(約 0.05 毫升)。接種后第 5 天取鼠 3 只將其肺組織研成 10% 懸液作滴鼻傳代一次, 連續傳代 5 次。觀察各代未杀死之小鼠 3 只計 14 天, 然后解剖檢查肺部, 結果証明全部小鼠均無症狀發生, 肺部均正常。

以 10% TE8Y18 卵黃囊懸液, 注射體重 18—20 克的小白鼠 7 只, 每只皮下注入 0.2 毫升, 觀察 21 日, 小鼠健存, 無任何症狀。又以同樣病毒懸液, 注射體重 22—25 克小白鼠 6 只, 每只注射 0.2 毫升于腹腔內, 觀察 21 日, 動物健存, 無任何病變。

4. 家兔和豚鼠: 以 20% TE8Y17 的卵黃膜懸液注射體重 3000 克的家兔 2 只及豚

重 320—380 克的豚鼠 2 只，各接种于左辜丸內，接种量家兔为 0.2 毫升，豚鼠为 0.1 毫升。各动物观察 2 周，注射部位無紅腫發炎現象。第 14 日將各注射的辜丸取出，制成 10% 懸液，分別接种鷄胚 4 只，每只注射 0.2 毫升于卵黃囊內，观察 10 天，鷄胚全部健存，再經一次傳代，鷄胚也不發生病变或死亡，說明家兔与豚鼠辜丸組織对此病毒無敏感性。

复取家兔和豚鼠各 8 只，以 10% 的 TE8Y18 病毒懸液分別由腦內、腹腔、皮內和皮下接种动物各 2 只，观察 3 星期，結果除皮內和皮下在注射后 48 小时內微有局部紅暈反应，旋即消散外，其他除豚鼠 11500 号外动物均健康無病。豚鼠 11500 号腹腔注射病毒后的第二日有脫肛現象，食欲不振，于第 4 日死亡，解剖發現腸胃有脹气現象，其他肝、脾、腎等內臟均正常。以后曾用 TE8Y20 病毒懸液，腹腔注射豚鼠 3 只进行重試，观察 14 日，全部健存。

5. 鸽子：以 10% TE8Y16 懸液，靜脉注射鸽子 2 只，每只 0.5 毫升，观察 2 周，健存無病。腹腔注射 2 只，每只 1 毫升，观察 2 周，結果也健存無病。

6. 大小来亨鷄：以 10% TE8Y19 病毒懸液靜脉注射大鷄 2 只，各注射 1 毫升，同时又由腹腔內注射 5.0 毫升，观察 2 周，健存無病。另又用 24—48 小时內孵出的雛鷄 7 只，以 TE8Y20 病毒懸液作腹腔及腦內注射，除一只腦內注射(0.03 毫升)的雛鷄在注射后第 4 日死亡外，其余观察 14 日均健存無病，發育正常。

(三) 病毒的鑒定

TE8、TE55 和 TE66 三株病毒，因分离日期的迟早不同，故研究有多少之別，以 TE8 研究为最多，TE55 次之，而 TE66 更次，但以它們的来源，对鷄胚的致病性和卵黃膜塗片中病毒形态和染色等方面来看，我們認这三株病毒是完全相同的。这結論一方面固有待于补充試驗的結果来証实，另一方面我們現在可以來考虑一下新病毒的鑒定問題。

1. 是否病毒的問題：此三株病毒，特別是 TE8 株，經過許多次的需氧和厭氧培养均未培养出細菌來，而它們对于鷄胚的致病性是肯定的。过濾試驗証明 TE8 病毒可以通过 400 毫微米的火棉膠濾膜。这些事实可以肯定說它們不是細菌而是病毒。

2. 新病毒是否来自鷄胚？来自鷄胚的可能性不大，据作者所知，到目前为止，除新城鷄瘟外，鷄胚帶病毒之例，尙未有报告者。

3. 与其它病毒的鑒別的問題：

(1) 新城鷄瘟，腮腺炎和流行性感冒病毒：这一群病毒均較所分离的新病毒为小，普通显微鏡下观察不到，对抗生素無敏感性，且能凝集鷄血球。新病毒对鷄血球似無凝

集作用，對青霉素等抗生素則有顯著的敏感性。

(2) 牛痘、鼠痘、鷄痘病毒：新病毒在鷄胚絨毛尿囊膜上不能生長繁殖，不引起病變，對家兔皮膚無反應，對小鼠和小鷄均不致病，在甘油內不能保存。

(3) 嗜神經性病毒：我們試驗室中雖貯有流行性乙型腦炎病毒、黃熱病毒、狂犬病毒等嗜神經性病毒，但新病毒形態較大，對抗生素有敏感性，注射小白鼠和乳鼠並不引起神經症狀或死亡。

(4) 鸚鵡病毒、淋巴肉芽腫病毒、鼠肺炎病毒：新病毒對鴿子、鷄或小白鼠均無致病性，小白鼠鼻腔接種也不引起肺炎病變，充分說明與上述的病毒無關。

(5) 流行性角膜結合膜炎病毒：流行性角膜結膜炎病毒形態很小(25—50毫微米)，普通顯微鏡觀察不到，且能感染小白鼠。

根據上面所提，新分離的三株病毒不同於上面所列举的病毒。它們具有自己獨特的生物學性質及病理、生理特徵。根據它們的特性以及來源，我們認為我們有足夠的理由來稱呼這三株新病毒為沙眼病毒。

三. 病毒的生物學性狀

(一) 形態和染色

卵黃膜塗片經姬氏染色，病毒顆粒呈紫紅色，但與塗片上其他的顆粒物質不易區別。用馬氏染色，病毒顆粒染成鮮紅色，其他細胞等物質均染成淺藍色，故很容易識別。病毒顆粒散在於細胞內外，呈圓形或橢圓形，大小均勻，有的作雙球菌形，有的為短鏈形，每顆粒之外似有空隙地帶包圍，如細菌的莢膜狀(圖版 I, 5, 6)。此種顆粒，在一年來百余次的試驗中，只有在感染病毒的卵黃膜塗片中可以觀察到，而在正常卵黃膜組織和其他病毒分離陰性的卵黃膜塗片中，則從未遇見類似的情形。因此我們充分相信，我們所見的顆粒即為病毒的本身。在少數細胞的細胞漿內，有時可以看見有組織的，成群的顆粒存在，但卻從未見有典型的包涵體。在此必須指出，上述的塗片檢查均系鷄胚死亡後所作，因此病毒在細胞內外的分布及形態自不免受細胞消化酶所影響，而不能代表其真實情況。今後若在鷄胚未死前作組織切片檢查或者可以了解到更確切的形態學。TE8、TE55 和 TE66 三病毒株在形態和染色性方面均相同，但 TE66 分離日遲，了解較少。

(二) 病毒的活動性

從第十次傳代起，我們曾將 TE8 病毒株在不同的傳代時期，測定其對鷄胚的致病情況。先取卵黃膜磨碎加肉浸液-鹽水制成 10% 的懸液，再以肉浸液-鹽水將 10% 的懸

液稀釋成 10^{-2} 、 10^{-3} 至 10^{-6} 一系列的稀釋度, 然后注射鷄胚, 結果見表 3。

表 3 病毒的活动性(病毒滴定)

病毒代数	胚 龄	病毒稀釋度										LD ₅₀
		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		
		死亡数 接种数	死亡日期*	死亡数 接种数	死亡日期	死亡数 接种数	死亡日期	死亡数 接种数	死亡日期	死亡数 接种数	死亡日期	
TE8Y10	7	4/4	7, 8, 10 11	3/4	9, 11, 11	1/4	11	0/5				10 ^{-3.50}
TE8Y15	7	6/6	7, 7, 7, 7, 8, 8	5/5	7, 8, 8, 8, 9	6/6	8, 8, 9, 9, 9, 10	2/5	7, 11			10 ^{-4.83}
TE8Y20	7	4/4	7, 7, 7, 13	4/4	8, 8, 9, 10	4/5	9, 9, 9, 10	1/5	10			10 ^{-4.50}
TE8Y22	7	5/5	5, 5, 7, 7, 8	5/5	7, 7, 7, 7, 12	3/5	8, 9, 12	2/5	8, 11			10 ^{-4.48}
TE8Y25	6	6/6	8, 8, 8, 8, 8, 9	5/6	8, 8, 9, 9, 9	4/6	9, 10, 10, 11	1/5	11	0/5		10 ^{-4.24}

* 每一数字代表一个鷄胚。

由上所述, 在第一代和第二代傳代中, 病毒对鷄胚無任何影响, 鷄胚照常發育, 但自第三代起, 病毒即引起鷄胚規則的死亡。可惜自第三代至第十代之間我們未曾測定病毒活动的轉变情形。表 4 指示, 第四代病毒的活动性比較弱。10⁻² 稀釋度虽然杀死所注射的全部鷄胚, 但死亡日期較迟, 用10⁻³ 的稀釋度所注射的鷄胚 4 个, 只有 3 个死亡, 死亡日期更延緩, 10⁻⁴, 4 个中只有一个死亡, 日期也迟緩, 10⁻⁵ 則無死亡。按 Reed 和 Muench^[21] 的計算, LD₅₀ 为 10^{-3.50}。第 15 次傳代时病毒的毒力即有明显的增加, 用 10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴ 稀釋度的病毒液所注射的鷄胚, 均全部死亡, 死亡日期也相应的提早, 10⁻⁵ 注射 5 个鷄胚中只有 2 个死亡。LD₅₀ 已增至 10^{-4.83}。傳代 20、22 和 25 次后所滴定的結果与傳代 15 次所得者頗相仿佛, 因此病毒的毒力漸趋固定。TE 55 和 TE 66 的活动性尚待試驗。

(三) 過濾性

病毒最主要的物理性質之一即其過濾性。我們曾用 TE8 号病毒株做过兩次試驗。先从 TE8 第十四代和十七代鷄胚中各选出病毒顆粒最多的卵黃膜磨碎, 用肉浸液鹽水各半的混合液 (pH7.2—7.4) 制成 2% 的悬液。1500 轉沉淀 5 分鐘, 把上清液先通过紙漿及玻璃沙濾器, 最后將清晰透明的粗濾液, 在 20—50 水銀柱的負压下及 10 分鐘的时間内通过 Elford 氏火棉膠濾膜濾过, 結果見表 4。

由表 4 的結果指出, TE8 病毒可以通过 400 毫微米平均孔度的濾膜, 但却为 264 毫微米平均孔度的濾膜所阻止, 因此按 Elford 氏法^[16] 計算, TE8 病毒的大小, 当在 130—200 毫微米或 0.13—0.2 微米之間, 此結果与 Thygeson^[26] 所計算的 (0.25 微米) 相距不远。

表4 病毒過濾試驗

濾膜平均孔度 毫微米 (A. P. D. μ)	第一次試驗 (TE8Y14)			第二次試驗 (TE8Y17)			
	濾液接種 雞 胚	雞胚傳代	病 毒	濾液接種雞胚	雞胚傳代	第 二 次 傳 代	病 毒
590	5/5		+	4/4			+
400	0/4	4/6①	+	4/4			+
284	0/3	0/5	-	1/3	2/4②	0/4	-

5/5 死亡雞胚/接種雞胚。

① 死胚塗片查見大量病毒原體。

② 取死胚作第二次傳代試驗。

(四) 物理因素對病毒的影響

1. 溫度對病毒的影響: 取 10% TE8Y20 卵黃膜懸液, 低速沉淀, 取上清液分盛于 7 支試管中, 每支 5 毫升。以 1 支作對照, 其餘的放入于不同溫度的水浴中, 加溫半小時, 然後分別接種雞胚卵黃囊, 測定病毒的活動性, 結果見表 5。

表5 溫度對病毒的影響

溫 度 及 時 間	接 種 雞 胚	
	死亡數/接種數	死 亡 日 期
0	5/5	5, 5, 5, 5, 6
40°C 30 分鐘	4/4	5, 6, 6, 7
45°C 30 分鐘	5/5	7, 8, 8, 8, 8
50°C 30 分鐘	0/6	
55°C 30 分鐘	1/6	6
60°C 30 分鐘	1/6	5
70°C 30 分鐘	1/6	6

由表 5 可以看出, 病毒經 50°C 加溫 30 分鐘後即已不能引起雞胚的死亡, 故此病毒的致死溫度即為 50°C。55°C 及以上各組中有個別死亡, 可認為系非特異性的死亡。

另一試驗, 以 10% TE8Y16 卵黃膜組織懸液分裝于三小瓶, 每瓶 10 毫升, 塞以橡皮塞, 分別放置于 4°C 冰箱, 18.5—20°C 室溫及 37°C 溫箱中, 經過一定的時期後再注射卵黃囊測驗病毒的活動性。結果證明, 在 4°C 病毒的活動性可保持 9 天, 在 23 天測驗時則已完全消失; 18.5—20°C 的室溫可保持 3 天, 7 天時病毒已失去活動力; 在 37°C

只可保持 1 天, 而且雞胚死亡日期已有明显的延長, 表示大部分病毒已經死去。

2. pH 对病毒的影响: 取 TE8Y15 卵黄膜, 用 pH7.2 肉浸液-鹽水磨成 10% 的悬液, 低速沉淀一次, 取上清液。用各种不同 pH 的肉浸液-鹽水或 M/50 磷酸鹽緩冲液, 將病毒再稀釋 10 倍, 分別盛裝于帶橡皮塞小瓶中, 置 4°C 冰箱中, 在不同的时期測驗其病毒的活动性, 結果見表 6。

表 6 pH 对病毒的影响

病毒稀釋液 (10 ⁻²)			4°C 放置時間				
			6 小时	1 天	3 天	7 天	21 天
肉 水	pH 6.00	6/6	5/6	5/6	1/6	0/5	
肉 水	pH 7.20	6/6	6/6	6/6	5/6		
肉 水	pH 8.40	6/6	6/6	3/6	0/6		
M/50磷酸緩冲液	pH 6.10	6/6	6/6	5/6	5/6	2/5	
M/50磷酸緩冲液	pH 7.25	6/6	6/6	6/6	5/6		
M/50磷酸緩冲液	pH 7.80	6/6	5/6	6/6	5/6		
病毒对照			LD ₅₀ 10 ⁻⁵ (各試驗中病毒实际用量为 1,000 个 LD ₅₀)				

表 6 指出, 無論在肉浸液-鹽水或緩冲液內, 在 4°C 保存的条件下, 本病毒在 pH 6.0—8.4 之間均可保存至 3 天以上, 7 天后則开始下降, 最适宜的 pH 值为 pH 7.2。緩冲液比較肉浸液-鹽水似較好, 但差別不大。

3. 普通干燥对病毒的影响: 取 10% TE8Y20 卵黄囊悬液, 低速沉淀后取上清液分盛于几个广口、平底的小瓶中, 每瓶盛 0.2 毫升, 松松地塞以棉塞, 將小瓶置盛有氯化鈣的干燥缸內, 在室温 (24°C) 中抽气 6 小时, 使之干燥。在干燥后 2 小时及 48 小时注射雞胚測定病毒的活动力, 結果見表 7。

表 7 干燥对病毒的影响

病毒稀釋度	干燥前病毒測定	干后 2 小时病毒測定	干后 48 小时病毒測定
	死亡数/接种数	死亡数/接种数	死亡数/接种数
10 ⁻²	4/4	1/4*	1/4*
10 ⁻³	4/4	0/6	1/6
10 ⁻⁴	4/5	0/6	1/6
10 ⁻⁵	1/5		
LD ₅₀	10 ^{-4.50}		

* 傳代証明無病毒存在, 雞胚均健存。

表 7 指明, TE8 病毒在普通室温中干燥后迅速失去活动力, 即使在干燥后 2 小时这

样短的时间,已不能查出生活的病毒,足見此病毒对普通干燥的敏感性。

4. 低温对病毒的影响: 1955年11月26日取10%的TE8Y9卵黄膜悬液分裝于帶有橡皮塞的小瓶中,置 -50°C 低温冰箱內保存。1956年5月30日取出,于冷水中融化,接种8日的鷄胚5个,每胚卵黄囊內注射0.3毫升,培育7天,取卵黄膜制成悬液作傳代一次,傳代的鷄胚在5—7日間全部死亡,說明TE8病毒經 -50°C 低温下保存6个月后虽大部死亡,但傳代一次,其活动力即完全恢复。

5. 冷冻干燥对病毒的影响: 1955年12月19日取TE8Y12卵黄囊,用無菌新鮮脫脂牛乳研磨成20%悬液(V/V),在1,500轉沉淀2次,每次5分鐘,以除去脂肪及殘渣。將牛乳病毒液分裝于小球管中,每管盛0.15毫升。放于 -40°C 低温冰箱中迅速冷冻2小时,然后将球管按裝于化学剂冷冻机(cryochem)上,在25—50微米真空度下抽气干燥6小时。干燥畢,在真空条件下封口。最后用真空通电法測驗每球瓶的真空情况,真空不好的廢弃。保存于 4°C 冰箱內。因为干燥标本不多,故未进行水份測定。以后在一定时期,取球管一支,啓开,把内容物融化于1.5毫升肉浸液-鹽水內,接种鷄胚,每胚注射0.3毫升于卵黄囊內。接种后第7天鷄胚不死时,則傳代1次,結果見表8。

表8 冷冻干燥对病毒的影响

試驗日期	干燥后 天数	鷄胚接种				病 毒
		原始接种		傳代		
		死亡数/接种数	死亡日期	死亡数/接种数	死亡日期	
1955年12月20日	1	4/5	6,7,7,7			+
1956年3月23日	95	5/5	6,9,9,10,11			+
1956年6月26日	190	1/5	10	6/6	4,4,5,6,6,6	+

表8指出,在上述条件下,根据一次試驗的結果,冷冻干燥后可以很好的保存3个月。用干燥保存3个月的材料直接接种鷄胚,死亡日期虽有延長,但能引起全部鷄胚死亡。190天时接种5只鷄胚中只有一只在第10天死亡,其余可用傳代証明病毒仍然生存。今后如能将病毒滴度增高,改进干燥方法,保存的日期或者可以更加延長。

6. 冻化对病毒的影响: 將10%的TE8Y16卵黄膜悬液在2,000轉沉淀5分鐘,取上清液,裝盛于兩管,一管置 4°C 冰箱中作为对照,另一管放入于 -50°C 低温中的酒精槽內,迅速使之冻结,半小时后取出置 20°C 的水杯中5分鐘,使其速即融化。如此反复

冻化3次,然后与对照标本同时进行鸡胚注射,以测验病毒的死活,结果见表9。

表9 冻化对病毒的影响

病毒稀释度	冻化前		3次冻化后	
	死亡数/接种数	死亡日期	死亡数/接种数	死亡日期
10^{-2}	6/6	7, 8, 8, 9, 9	6/6	7, 8, 8, 8, 10, 12
10^{-3}	6/6	8, 8, 9, 9, 10, 10,	5/6	9, 9, 10, 10, 12
10^{-4}	4/5	8, 9, 9, 10	3/6	4, 8, 12
10^{-5}	4/5	9, 9, 10, 10	0/6	
LD ₅₀	$>10^{-5.0}$		$10^{-3.84}$	

表9指出,3次反复冻化,对病毒稍有影响,LD₅₀从 $>10^{-5.0}$ 下降至 $10^{-3.84}$ 。

(五) 化学剂对病毒的影响

1. 甘油: 如众所周知,30%至50%中性甘油系为病毒研究者所常用作保存病毒的良好保存剂。脊髓前角灰白质炎病毒可以保存于甘油中6—8年之久。甘油的主要作用是提取组织中的水份及防腐,因此能延长病毒的生存时日。我们把含病毒的卵黄膜(TE8Y16)剪成一平方厘米大小的小块,置一、二块于盛有15毫升50%甘油、带螺旋盖的25毫升小瓶内,擦紧螺旋盖以防止二氧化碳的侵入,置冰箱内保存。以后在4、14、22天各测验1次,观察病毒的活动力,结果见表10。

表10 甘油对病毒的影响

病毒组织	甘油	保存温度及时间	鸡胚接种	
			死亡数/接种数	死亡日期
TE8Y16 卵黄膜	50%水溶液	4°C, 4天	5/5	4, 8, 8, 8, 8
TE8Y16 卵黄膜	50%水溶液	4°C, 14天	0/5	
TE8Y16 卵黄膜	50%水溶液	4°C, 22天	1/6	6

表10说明在50%的中性甘油中,病毒只能保存4天,在14天测验时,发现其已完全失去活动力,这与一般病毒极不相同,而却与鹦鹉热和淋巴肉芽腺病毒相类似。

2. 乙醚: 取含病毒的卵黄膜制成10%的悬液,低速沉淀后取其上清液加入一定量的乙醚,置4°C冰箱中1小时,每10分钟振荡一次。把乙醚病毒混合液放入干燥器内抽气半小时,除去乙醚,然后注射鸡胚,每胚0.2毫升于卵黄囊内。两次试验的结果均证明3%—10%乙醚对病毒的活力无甚影响,这也借可说明,此病毒的化学组成,大部份为非脂肪物质。

3. 硫柳汞: 取 TE8Y21 卵黃膜制成 20% 懸液, 低速沉淀除去粗塊, 吸取上清液作 10 倍稀釋, 于每稀釋度中加入等量的硫柳汞溶液, 使成所需要的濃度, 混合后放 4°C 冰箱中 1 小时, 然后与对照組同时接種雞胚卵黃囊, 比較兩組的 LD₅₀ 效价。共做試驗兩次結果見表 11。

表 11 硫柳汞对病毒的影响

病 毒	第一次試驗(TE8Y21 病毒)				第二次試驗(TE8Y22 病毒)			
	病 毒 对 照		硫柳汞 1:10,000		病 毒 对 照		硫柳汞 1:5000	
	死亡数 / 接种数	死亡时期	死亡数 / 接种数	死亡日期	死亡数 / 接种数	死亡日期	死亡数 / 接种数	死亡日期
10 ⁻²	4/4	7, 8, 8, 8	3/3	7, 7, 8	5/5	5, 5, 7, 7, 8	4/4	6, 7, 7, 8
10 ⁻³	2/3	7, 9	3/4	9, 9, 10	5/5	7, 7, 7, 7, 12	3/4	8, 9, 9
10 ⁻⁴	2/4	10, 10	0/4		3/5	8, 9, 12	2/4	10, 11
10 ⁻⁵					2/5	8, 11	3/5	11, 12, 11
LD ₅₀	10 ^{-3.75}		10 ^{-3.34}		10 ^{-4.49}		10 ^{-4.52}	

表 11 指出, 兩次試驗的結果, 对照組与試驗組在 LD₅₀ 效价上和在雞胚的死亡日期上均極相近, 說明硫柳汞对病毒沒有明显的損害作用。

4. 硝酸汞苯: 取 TE8Y23 卵黃膜制成 20% 病毒懸液, 作 10 倍稀釋, 每稀釋液一半留作对照, 一半加入等量的硝酸汞苯溶液, 使最后濃度成为 1:10,000, 混合后放 4°C 冰箱中作用 1 小时, 然后种入雞胚, 試驗結果見表 12。

表 12 硝酸汞苯对病毒的影响

病 毒 稀 釋 度	病 毒 对 照		硝酸汞苯 1:10,000	
	死亡数/接种数	死 亡 日 期	死亡数/接种数	傳 代
10 ⁻²	5/5	6, 7, 7, 8, 8	0/6	0/5
10 ⁻³	3/4	8, 8, 10	0/5	
10 ⁻⁴	2/5	8, 9	0/5	
LD ₅₀	10 ^{-3.66}		<10 ⁻²	

表 12 指出, 1:10,000 硝酸汞苯具有强烈的灭毒作用。

5. 其他化学剂: 为了了解几种常用的消毒剂对病毒的消毒作用, 我們曾試驗了福馬林、石炭酸、甲酚、升汞、乙醇、哥罗芳、高錳酸鉀和二氧化氯等八种化学品。試驗結果說明, 0.1% 福馬林在 4°C 温度中 24 小时内能杀灭病毒; 1% 石炭酸, 1% 甲酚, 0.01% 升

汞、40%乙醇及0.5%哥罗芳均能在10分鐘內把病毒完全消灭；而0.1%高锰酸钾和50%二氧化氯在10分鐘內則沒有显著的灭毒作用。此外，我們曾做了对位安息香酸对病毒影响的試驗，結果証明对位安息香酸对TE8病毒既無促进也無抑制生長的作用。

四. 抗生素和磺胺制剂对病毒的作用

有几种抗生素和磺胺制剂在临床上对沙眼有很好的疗效是大家所知道的。我們在分离出第一株病毒之后即进行了一系列的試驗，以便确切地了解抗生素和磺胺制剂对于此病毒的作用。

1. 抗生素和磺胺制剂对TE8病毒的影响：取TE8Y20卵黄膜研磨成漿，加肉浸液-鹽水制成20%悬液，低速沉淀5分鐘。上清液与予先溶化好的各种抗生素或磺胺溶液等量混合，(抗生素，磺胺溶液也用肉浸液-鹽水制成)使0.2毫升混合液中含予定量的

表 13 抗生素和磺胺制剂对 TE8 病毒的影响

抗生素或磺胺剂		接种鸡胚			傳代		影响*
名称	每胚剂量	死亡数/接种数	死亡日期	平均死亡日期	死亡数/接种数	死亡日期	
金霉素	0.25毫克	1/5	4		6/6	6,6,6,6,6,6	+
	0.1毫克	6/6	8,9,11,11,11,12	10.3			±
氯霉素	0.25毫克	6/6	8,9,9,9,9,11	9.1			±
	0.1毫克	6/6	6,7,7,8,8,9	7.1			-
地霉素	0.2毫克	1/6	9		0/6		+
	0.05毫克	3/6	4,5,11				+
青霉素	200单位	0/6			1/6	11	+
	50单位	1/5	9		6/6	7,7,7,7,7,8	+
链霉素	200单位	6/6	6,6,8,8,8,8	7.3			-
	50单位	6/6	4,6,6,6,7,8	6.1			-
磺胺醋酰钠	100毫克	4/6	11,11,12,12		6/6	7,7,7,7,7,8	+
	10毫克	1/6	12		5/5	6,6,7,7,8	+
病毒对照	10 ⁻¹	5/5	6,6,6,6,8	6.4			
	LD ₅₀						10 ^{-5.0}

- * + = 对病毒有显著影响，抗生素杀灭病毒，故鸡胚不死亡或仅个别死亡。
- ± = 对病毒部份影响，鸡胚死亡日期延長。
- = 对病毒無影响，鸡胚死亡。

抗生素或磺胺劑。放置 4°C 冰箱內 1 小時, 然後接種雞胚, 每胚接種 0.2 毫升于卵黃囊內, 觀察 12 天, 第 12 天將各活存的雞胚傳代 1 次, 以查明有無病毒殘存, 結果見表 13。

按對照病毒的活动力 ($LD_{50} 10^{-5.0}$) 計算, 本試驗中所加入的病毒量为 100,000 LD_{50} 單位。如此大量的病毒, 如表 13 所示, 能被 0.25 毫克的金霉素, 0.2 毫克的地霉素, 200 單位的青霉素或 10 毫克的磺胺醋醯鈉所抑制。氯霉素仅有延長雞胚死亡日期的輕微影响, 鏈霉素則完全無作用。

2. 抗生素和磺胺劑對病毒的抑制指數: 為了進一步了解和比較各種抗生素和磺胺劑對於 TE8 病毒的抑制效力, 我們做了測定抑制指數試驗。試驗方法除將病毒稀釋成各個不同稀釋度以代替一個病毒劑量外其餘完全與上一試驗相同。結果見表 14。

表 14 抗生素磺胺劑對於 TE8 病毒的抑制指數

抗生素、磺胺劑 (每胚劑量)	抗生素 對照 死亡數 接種數	抗生素 病毒混 合液 pH	病 毒 稀 釋 度				LD_{50}	抑 制 指 數	
			10^{-1}		10^{-2}	10^{-3}			10^{-4}
			死亡數 接種數	傳代	死亡數 接種數	死亡數 接種數			死亡數 接種數
金霉素 0.25 毫克	0/5	6.95	1/4	0/6	0/5	0/5	$<10^{-1}$	$>1,000$	
氯霉素 0.25 毫克	0/5	7.15	4/4		3/5	4/5	$>10^{-3}$	<10	
地霉素 0.25 毫克	2/5	6.85	1/4	0/6	0/5	1/5	$<10^{-1}$	$>1,000$	
青霉素 250 單位	1/5	7.15	1/5	1/6	0/5	1/4	$<10^{-1}$	$>1,000$	
鏈霉素 500 單位	0/5	7.05	5/5		4/4	4/5	$>10^{-3}$	<10	
磺胺醋醯鈉 10 毫克	2/5	7.35	2/5	6/6	0/5	0/4	$<10^{-1}$	$>1,000$	
病 毒 對 照		7.20	4/4		5/5	3/5	3/4	$10^{-4.0}$	

表 14 說明金霉素、地霉素、青霉素和磺胺醋醯鈉的抑制指數均 >1000 表現有強烈的抑制作用。其中金霉素、地霉素和青霉素能完全殺滅 10^{-1} 中的病毒, 傳代中已無病毒殘留, 表示出特別優越的滅毒作用。氯霉素和鏈霉素在本試驗中抑制指數均 >10 , 對病毒沒有明顯的影響。

3. 抗生素、磺胺劑對已受病毒感染的雞胚之作用: 上述 2 試驗均系抗生素或磺胺劑與病毒混合後注射雞胚的結果。為了模仿臨床治療的情況, 在本試驗中我們先使雞胚感染病毒, 感染後 24 小時再注射藥物于卵黃囊內, 結果見表 15。

表 15 表示, 不僅金霉素、地霉素、青霉素和磺胺醋醯鈉試驗的結果與前 2 試驗相同, 對病毒表現了強烈的抑制作用, 即氯霉素亦表現了同樣的功能。一般的說抗生素作

表 15 抗生素、磺胺剂对已受感染的鷄胚之作用

抗生素、磺胺剂		抗生素 对 照	接 种 鷄 胚			傳 代	影 响。
名 称	剂 量		死亡数/接种数	死 亡 日 期	平均死亡 日 期		
金 霉 素	0.25 克	1/6	3/14	10,11,11		1/6	+
氯 霉 素	0.25 毫 克	0/5	0/12			5/5	+
地 霉 素	0.25 毫 克	0/6	3/17	10,11,12		1/5	+
青 霉 素	250 單 位	0/6	0/16			0/3	+
鏈 霉 素	500 單 位	0/6	15/15	8,8,8,8,8,8,8,8, 8,8,8,9,9,10,10	8.4 天		-
磺 胺 醋 酸 鈉	10 毫 克	1/6	1/14	6		4/4	+
病 鷄 对 照			16/16	7,7,8,8,8,8,8,8, 8,8,10,10,10,10,10	8.5 天		

用于繁殖中的病毒比作用于静止时的病毒結果显著些，这事实在本試驗中充分地表现出来。鏈霉素在本試驗中的結果仍为陰性。

五. 討 論

病毒分离为解决沙眼病原的重要步骤，这我们在前面已经指出，而病毒分离的最主要关键，除选择病例，应用敏感动物以外，则在于如何处理标本中的細菌問題。关于早期病例的选择，系完全临床問題，比较容易掌握。至于寻找敏感动物则自 1907 年以来，公认猿猴对沙眼为唯一有敏感性的动物，但应用灵長类动物，昂贵而不方便，且接种后病毒仍不能脱离猴体，故严格地说这不能算作病毒分离。鷄胚在病毒学上的应用在本世紀 30 年代已经开始^[17]。自 1949 年 Enders 氏^[18]等显示了脊髓灰白質炎病毒能在組織培养中培养，我们对沙眼病毒的适应寄望更殷，但标本染菌終为阻擋进步的頑石。Macchiavello 氏^[19]1944 年的成功，照我們看来，似仍建立在机会之上，因为 Macchiavello 所接种的 7 个鷄胚中只有一个未染菌，而由这个唯一的鷄胚中分离出他的病毒，并引起了世人的注意。此項工作虽为 Stewart 氏^[20]所証实，但 Stewart 氏采用的方法，系將沙眼标本先接种于猴，再由猴采取标本注射鷄胚，如此，按 Stewart 氏的意見，可以控制細菌。但此法在我們手中并不奏效，因猴眼內的細菌仍然極多，足以引起鷄胚死亡，影响研究工作的进展。

标本中的細菌既然首先阻碍了病毒分离工作的發展，我們的全部力量便集中在如何控制細菌这一点。經過一段相当長时期的摸索，試驗了各种可能控制細菌而不影响病毒的物理方法和化学制剂，最后我們的視綫乃集中在抗生素上。青霉素对沙眼的影

响，臨床意見各有不同，在人體及在試驗管中它的作用又可能大有區別，因此這問題曾花費了我們許多時光。結果我們知道應用少量的青霉素和鏈霉素或單獨用較大量的鏈霉素可以控制細菌把沙眼病毒分離出來。Bietti氏^[12]認為Furacin、Neomycin、Viomycin和Tyrothricin的作用與鏈霉素相同，故這方面的工作值得進一步在試驗管中研究。至於是否專在試驗管中處理標本，抑或在臨床上先行滴藥將病人眼內細菌清除後再取標本，亦應作進一步的試驗。

病毒分離意義大。首先它可以把幾十年來飄搖未完的沙眼病原堅固的建立起來，由學說變成事實。其次，有了病毒株我們便即可以從新研究沙眼的傳染、診斷、預防、治療及免疫等等。在預防中沙眼病毒疫苗的製備，不是不可能的事情。研究病毒株之是否可以分型，對整個病的流行病毒，會有很多的收穫。

TE8、TE55和TE66病毒株與Macchiavello分離的病毒不同之處為我們的病毒在卵黃膜塗片上均一致為散在型的原體，而Macchiavello的病毒則具有各種包涵體形式。在無數的塗片中我們卻從未發現過包涵體。在此必需重複指出，我們的塗片檢查，無例外地均系雞胚死亡之後所作，因此細胞酶自身消化作用，可能影響病毒實際的形態學，故今後應當在這方面作補充研究。我們的病毒與Macchiavello的病毒另一不同之處，為Macchiavello的病毒對雞胚無致病性，他的雞胚在23天可以孵出小雞，而我們的病毒在第一、二代接種對雞胚雖無影響，但自三代起，接種後4—8天雞胚即發生規則的死亡，雞胎和卵黃膜充血，卵黃膜變薄，易與卵黃脫離等現象。這些病變我們認為是有助於研究工作的發展的，因為它們提供了一些病毒活動所致的可見的特徵。單憑塗片檢查或猴子接種來進行研究，困難會多得多，實驗結果的準確性也會低些。關於Enders的組織培養工作，上已有所述及，也為今後研究沙眼病毒的一個具有燦爛前途的方向。

我們所分離的TE8病毒株對小白鼠和小白乳鼠均無致病性，腦內注射後，每5日傳代1次，傳遞5次後，病毒即完全消失，病毒在鼠腦內絲毫不能適應，這與Arakawa和Kitamura^[11]的報告不同，但與李一飛氏等^[13]的結果相合。關於睪丸組織對沙眼病毒的感受性我們亦曾作試驗。將TE8病毒注射於家兔和豚鼠睪丸內，14日後用雞胚測驗，發現病毒亦完全消失，這與Julianelle和Harrison氏^[16]的工作結果，亦不一致。按我們的研究結果，此病毒不能在家兔和豚鼠的睪丸內生存。

甘油對新病毒的不良影響為新病毒與一般病毒鑒別的要點，同時也增加了我們對前人將沙眼病毒與鸚鵡熱和淋巴肉芽腫病毒列為一類的認識。我們知道一般病毒都可以用甘油來保存，而鸚鵡熱及淋巴肉芽腫病毒則恰恰相反，對甘油不特不能借以保存反而表現敏感。新病毒株對甘油的作用也如此，故增加了與鸚鵡熱淋巴肉芽腫同類的一

个证据。

六. 总 结

以鷄胚为試驗动物, 来研究沙眼病毒的分离問題, 从寻找控制眼內細菌方法下手, 經过一个相当長时期的摸索, 結果获得了以抗生素为制菌剂的分离方法, 而抗生素中以鏈霉素最为适宜。自 1955 年 6 月至 1956 年 7 月, 在 68 次病毒分离試驗中, 从二期典型沙眼病例分离出 TE8、TE55 和 TE66 三株病毒。除 TE66 因最近剛始获得未及研究外, 其他二株接种猴子眼結膜, 經过 7—16 天的潜伏期后均能引起輕度結合膜炎和濾泡的形成。由 227 号猴的濾泡塗片中曾兩次找到了包涵体。关于 TE8 病毒的濾过性、形态大小、动物感染范围、对抗生素的敏感性以及其他生物学性狀作了一系列的研究。新病毒对干燥和甘油的作用很敏感, 但能用冷冻干燥方法保存半年以上。在 -50°C 低温中也能保存到最少 6 个月。根据新病毒的来源、濾过性、形态大小、能够使猴体感染并發生典型病变, 以及其他生物学特性, 我們的結論是, 所分离的三株病毒是沙眼病毒。关于与鷄鵝热淋巴肉芽腫病毒的关系以及今后研究沙眼病毒的方針, 文中有所討論。

参 考 文 献

- [1] Noguchi, H., Monograph on Trachoma, *J. exp. Med.*, 48 No. (2), Suppl. No. 2.
- [2] Thygeson, P., (a). *Am. J. Opth.*, 17: 787, 1934; *Am. J. Path.*, 14: 455, 1938; Rivers Viral and Rickettsial Infections of Man, Lippincott, p. 467, 1952. (b). *Am. J. Opth.*, 18: 811, 1935.
- [3] Julianelle, L. A., The Etiology of Trachoma, Commonwealth Fund, New York, 1938.
- [4] Mitsui, Y., *Am. J. Opth.*, 32: 1189, 1949.
- [5] Poleff, L., *Res internat. du Trachome*, 26: 175, 1949.
- [6] Чиковский, В. В., Трахома, 1953, MeDFNZ, p. 106-114.
- [7] 湯飞凡等, 微生物学报, 4 (1): 1-14, 1956.
- [8] Pandit, C. G., *Indian J. Med. Res.*, 23: 475, 1935.
- [9] Wright, R. E., *Brit. J. Opth.*, 21: 198, 1937.
- [10] Macchiavello, A., *Res. ecuator Hig. Med. trop.*, 1: 211, 1944; English translation, *Trop. Dis. Bull. Dec.*, 1948.
- [11] Arakawa, S., and Kitamura, O., *Yokohama Med. Bull.* 2: 205, 1951; *Arch. f-die gesamte Virosoforschung*, 5: 208, 1953.
- [12] Stewart, F. H. and Badir, G., *J. Path. Bact.*, 62: 457, 1950.
- [13] 李一飛等, 微生物学报, 4 (1): 25-32, 1956.
- [14] Cox, H. R., Pub. Hlth. Rep., Wash., 53, 2241, 1938.
- [15] 黃元桐等, 微生物学报, 2 (1): 101, 1954.
- [16] Elford, W. J., *Brit. J. exp. Path.*, 10: 126, 1929.
- [17] Woodruff, A. M., and Goodpasture, E. W.; *Am J. Path.*, 7: 209, 1931.

- [18] Enders, J. F., Weller, T. H., and Robbins, F. C.; *Science*, **109**: 85, 1949.
- [19] Bietti, G.; *Am. J. Ophthalm.*, **39**: 112, 1955.
- [20] 湯飛凡等; *微生物学报*, **4** (1): 15-24, 1956.
- [21] Reed L. J. and Muench, H., *Am. J. Hyg.*, **27**: 493, 1938.
- [22] Koran-Aesgryz, P. M., *Вестник Офтальмологии*, **34** (2): 7-11, 1955.
- [23] Bland, J. O. W., *Brit. J. Ophthalm.*, **29**: 407, 1945.
- [24] *中华眼科杂志*, **2**: 81, 1954.
- [25] *中华眼科杂志*, **1**: 31, 1950; **2**: 279, 1952; **2**: 372, 1952; **5**: 345, 1953.
- [26] Julianelle, L. A. and Harrison, R. W., *Am. J. Ophthalm.* **20**: 353, 1937.

STUDIES ON THE ETIOLOGY OF TRACHOMA IV. ATTEMPT TO ISOLATE THE VIRUS IN THE EMBRYONATED HENS EGGS

TANG FEI-FAN, *CHANG HSIAO-LOU, HUANG YUAN-TUNG AND WONG KAI-CHIEN

*National Vaccine and Serum Institute, and *Municipal Tung Jen Hospital, Peking*

Failing to isolate the virus of trachoma in the white mice, attention of the authors was turned to the employment of the embryonated hens eggs as the experimental animal in their further attempt to recover the causal agent of the disease. From June 1955 to July 1956, 68 specimens, either single or combined (2 specimens pooled), of conjunctival scrapings of untreated, early (type 2, MacCallan) and typical cases of trachoma were studied. After a long period of time of experimentation aiming to overcome the contamination of the bacterial flora of the eyes of trachoma patients by preliminary treatment with ether, merthiolate, penicillin-streptomycin and streptomycin alone before inoculating the chick embryos per yolk-sac, 3 strains of a virus were finally isolated. These virus strains were only recovered by blind passage for 3 generations. During the first two passages there was no apparent pathology but beginning from the third generation of continuous passaging, these virus strains caused wide-spread congestion, thinning down of the yolk-sac membrane, detachment of the yolk granules from the affected tissues and death of the embryo on the 4th to 9th day after inoculation. Smears prepared from the infected yolk-sac wall presented numerous elementary bodies after Macchiavello's method of staining.

The action of 2 of the 3 strains of the virus had been tested on rhesus monkeys. When rubbed onto the conjunctival surface of the animal, they induced inflammation, thickening of the lids and finally formation of follicles after an incubation period of 7-16 days. The follicles persisted for various length of time ranging from a month and half to 4 months. They varied in size and were

greyish in color when the monkey was kept quiet, but became blood red when the animal was agitated. Capping form of initial body inclusions were found on smears prepared from Monkey No. 227, 90 and 104 days after infection.

One of the strains was thoroughly studied regarding its pathogenicity on animals other than monkeys. Its biological properties were investigated and its susceptibility or resistance to several chemicals tested. It was found susceptible to 50% glycerine, sulfacetamide, penicillin, aureomycin, terramycin but resistant towards the action of streptomycin, ether and merthiolate. By collodion membrane filtration, the size of the virus particles was found to be 200 millimicron. Its thermo-death point was found to be 50°C for 30 minutes. It could be freeze-dried and such dried cultures were found viable after keeping for 6 months at 4°C. Low temperature (-50°C) only possessed slightly lower keeping influence. Ordinary slow drying inactivated the virus strain rapidly

Because of the freedom of bacterial contamination, the source of their isolation, pathological changes that they induced on the rhesus monkeys including the finding of the epithelial cell-inclusions and other biological properties, these virus strains have been regarded as strains of the long-sought virus of trachoma tentatively. Difference of these virus strains from that obtained by Macchiavello has been pointed out and similarities between them and the viruses of psittacosis and lymphogranuloma venereum have been stressed upon.