

一株對小白鼠皮下感染有高度致死力的 流行性乙型腦炎病毒京衛研₁ 株與中山株感染力的比較

黃禎祥 周明先

(中國醫學科學院病毒學系)

過去多數學者認為在各地分離的流行性乙型腦炎病毒的抗原性是相同的。Hale 氏等^[1]最近研究在馬來亞分離的病毒抗原性的結果，發現這些病毒株之間在抗原性上是有差別的；至於病毒的其他性質有無差別，文獻上少有系統的報導。關於病毒對小白鼠腦外途徑的致死力，一般認為是很低。1936 年 Kasahara 氏等^[2]發現新分離的病毒株 (Nakamura, Nakayama)，用 Ringer 液稀釋時對 7—8 克的小白鼠腦內感染效價為 $10^{-5.5}$ 而腦外途徑致死力很低——腹腔為 10^{-1} 、皮下為 $< 10^{-1}$ 。1953 年 Дробышевская 氏等^[3]研究在蘇聯不同地區、不同年代分離的十幾株病毒，發現除了 Па—4 株對 10—12 克的小白鼠皮下致死力效價為 10^{-1} 外，其餘毒株皮下感染都不引起小白鼠死亡；腹腔的致死力效價也不高，均在 10^{-1} 至 10^{-3} 之間。腦內感染的致死力效價為 $10^{-4.3}$ 至 $10^{-6.8}$ 。我們近來在研究流行性乙型腦炎病毒的生物學性質和發病的機制的工作中，發現京衛研₁ 株具有高度的皮下感染的致死力。本文報告此株病毒對不同鼠齡的小白鼠通過不同途徑接種時的感染的致死力與中山株比較的結果。

材 料 與 方 法

(一)病毒株：

1. 京衛研₁ 株：本院 1949 年分離^[4]，經鼠腦傳代乾燥保存。每次試驗均用連續傳兩代的新鮮病毒，在鼠腦傳代次數由文中說明。

2. 中山株：是美國 Hammon 氏供給，已往傳代歷史不詳，在本室鼠腦傳代乾燥保存，每次試驗均用連續傳兩代的新鮮病毒，在本室傳代次數於文中說明。

(二)稀釋劑：10% 脫脂牛乳生理鹽水。

(三)實驗動物：小白鼠係本院正常動物房飼養，體重選擇時各組之間體重相差 2—3 克；鼠齡為 10 天乳鼠（體重 4—5 克），3 週齡的鼠（體重 7—9 克），5 週齡的鼠（體重 18—20 克），6 週齡的鼠（體重 20—22 克），7 週齡的鼠（體重 26—29 克），9 週齡的鼠（體重 33—35 克），在比較兩株病毒的致死力試驗中，所用的動物體重範圍是一致的。

(四)實驗方法：分別將京衛研₁ 株與中山株病毒用 10% 脫脂牛乳生理鹽水分別稀釋

1957 年 6 月 1 日收到。

成不同濃度，然後通過不同途徑，腦內、腹腔、皮下接種各組不同鼠齡的小白鼠。注射量均為 0.03 毫升，觀察三週並記錄小白鼠死亡結果，LD₅₀ 終點按照 (Reed, Muench) 氏^[5] 方法計算。

實 驗 結 果

(一) 京衛研₁株與中山株病毒腦內和皮下感染的致死力的比較。

我們用京衛研₁株 31—35 代病毒和中山株 68—73 代病毒作了十多次腦內和皮下感染的致死力的試驗。腦內接種用 3 週的小白鼠；皮下接種用體重 7—9 克的 3 週小白鼠，將試驗結果列於下表。

京衛研₁株與中山株病毒腦內及皮下感染的致死力的比較

京 衛 研 ₁ 株			中 山 株		
病 毒 代 數	LD ₅₀ 滴 度 (對 數)		病 毒 代 數	LD ₅₀ 滴 度 (對 數)	
	腦 內	皮 下		腦 內	皮 下
31	9.1	6.9	68	8.0	<1.0
31	8.2	7.4	69	8.6	1.2
31	9.3	8.3	69	8.9	1.7
32	7.7	7.3	70	8.6	1.7
33	8.1	6.5	70	8.4	2.0
33	8.6	8.0	70	7.7	<1.0
34	8.0	8.1	70	7.5	1.5
34	8.6	7.9	70	9.5	2.4
34	9.4	8.3	70	7.8	1.5
35	8.5	7.8	71	8.1	1.3
35	8.5	8.4	73	8.1	1.0
35	8.6	6.5	73	7.4	1.1
平均滴度	8.6	7.6	平均滴度	8.2	<1.3

從表中結果可以看出，京衛研₁株腦內感染平均滴度為對數 8.6；中山株腦內感染平均滴度為 8.2，並無顯著差別。但京衛研₁株皮下感染滴度最低為 6.5，最高到 8.4，平均滴度為 7.6；而中山株皮下感染最高滴度為 2.4，多數 < 1.5，平均的滴度為 < 1.3，與京衛研₁株比較則表現出顯著的差別。

小白鼠皮下接種京衛研₁株病毒後，病毒量較少的各組，小白鼠死亡時間較晚，大多數在 8—12 天內死亡，但也有少數小白鼠在 14—18 天間死亡，一般死亡都很規律。

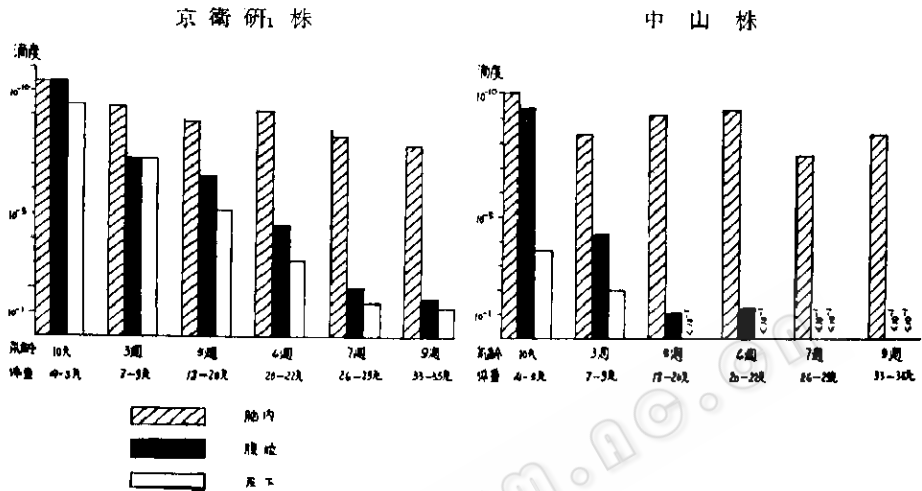
(二) 兩株病毒對小白鼠的不同鼠齡及接種途徑感染的致死力的比較。

為了進一步比較京衛研₁株病毒與中山株病毒腦外感染的致死力的差異，我們觀察了不同鼠齡與腦外途徑感染致死力的關係。使用 10 天乳鼠、3 週、5、6、7、9 週的小白鼠接種腦內、腹腔和皮下作了一系列的比較試驗，結果見圖。

從圖中可以看出，這兩株病毒通過腦內感染小白鼠時其 LD₅₀ 滴度沒有明顯的差別，鼠齡增加時，腦內感染的 LD₅₀ 滴度稍有下降，但差別不大。如通過腦外途徑感染兩者的 LD₅₀ 滴度就有很大差別：用 10 天的乳鼠試驗時京衛研₁株腹腔感染的 LD₅₀ 滴度為對數

10.4, 皮下感染的LD₅₀滴度為9.5; 中山株腹腔為9.4, 皮下為3.6。用3週的小白鼠時京衛研₁株腹腔與皮下均為8.3; 而中山株在鼠齡相同、體重相同的情況下, 腹腔為4.0、皮下為2.0。用5週的小白鼠差異更顯著, 京衛研₁株腹腔為6.5, 皮下為5.1, 而中山株腹腔、皮下均<1。以後京衛研₁株隨着鼠齡的增加腦外感染的滴度也有下降。9週的鼠京衛研₁腹腔為1.5、皮下為1.2, 而中山株均<1。重覆試驗的結果也表現了同樣的關係。

兩株病毒對不同鼠齡及接種途徑感染的比較



總的來說兩株病毒對不同鼠齡的小白鼠腦內感染均具有幾乎相同的致死力。隨着鼠齡的增加兩株病毒對小白鼠腦外途徑感染的致死力均有下降, 但在各個相同的鼠齡的試驗中, 京衛研₁株無論腹腔或皮下感染的致死力均比中山株高。

討 論

根據實驗結果, 流行性乙型腦炎中山株病毒與京衛研₁株病毒對小白鼠腦外途徑的感染具有不同的致死力。京衛研₁株病毒無論由皮下或腹腔感染均較中山株有顯著高度的致死力。這種腦外途徑致死力的不同, 一方面可能由於中山株病毒在鼠腦中經過長期傳代後對腦組織有了適應, 發生了對其他途徑感染力的改變, 即失去了皮下感染的致死力; 另一方面也可能是自然界本來就存在着不同毒力的病毒株。為了查明自然界是否流行着不同毒力的流行性乙型腦炎病毒, 我們用腦外途徑感染方法, 檢查了近年來在我國各地新分離的一部分毒株, 已經證明在自然界是存在着不同毒力的病毒株^[8]。至於中山株病毒是否與長期傳代變異有關, 我們正在進行這方面的研究。

本試驗的結果指出腦外途徑感染的致死力隨着鼠齡的增加而下降, 這證實了 Sabin 氏^[7-8]所指出隨着動物年齡的增加與血腦屏障作用也增強的觀點。因此, 血腦屏障的結構對於由血液傳播的嗜神經性病毒感染小白鼠的後果是很重要的。流行性乙型腦炎在人羣的發病率是隨着年齡的增加而下降^[9], 這可以由人羣的特異性免疫力隨着年齡的增加而上升^[10]來解釋, 但並不一定是唯一的原因。我們考慮到人類血腦屏障的情況對腦炎發病率是有很大的關係, 從臧胡二氏^[11]在流行性乙型腦炎患者的屍體解剖中發現患者腦內有豚囊蟲, 其陽性率比死於其它疾病患者 (僅為 0.014—1.24%) 顯然為高。我們認為這種現

象可能是破壞了血腦屏障的原故。由此可見人類的血腦屏障亦可能阻止此病毒進入腦內,因而引起不顯性感染。

腦外途徑感染力高的毒株的發現對實際應用也有一定的意義。我們曾應用皮下感染致死力高的毒株作皮下感染中和試驗,提高了中和試驗的敏感度並應用於流行病學的調查工作^[12],實際經驗說明皮下中和試驗比腦內中和試驗具有較高的敏感性。再者,流行性乙型腦炎是由昆蟲刺傷皮膚而傳染的,我們認為使用皮下感染力高的病毒株作疫苗效力試驗的攻擊毒株是比較合理的。

摘 要

以流行性乙型腦炎病毒京衛研₁株與中山株在各種途徑感染的致死力進行了比較試驗,結果表明:

(一)兩株病毒對不同鼠齡的小白鼠腦內接種感染致死力沒有明顯差別,但在腦外途徑(皮下和腹腔)接種感染的致死力則隨鼠齡的增加而下降。

(二)京衛研₁株病毒對小白鼠具有高度的皮下感染的致死力,而中山株則很低。

本文討論了人類血腦屏障對於流行性乙型腦炎發病的關係,並指出了發現具有高度皮下感染致死力毒株在實際應用上的意義。

參 考 文 獻

- [1] Hale, J. H. & Lee, L. H.: *Brit. J. Exp. Path.*, **35**: 426, 1954.
- [2] Kasahara, S., Ueda, M., Okamoto, Y., Yoshida, S., Hamano, R., & Yamada, R.: *Kitasato Arch. Exp. Med.*, **13**: 48, 1936.
- [3] Дробышевская, А. И. и Неустроев, В. Д.: Нейровирусные инфекции 199, 1954, Медгиз.
- [4] 黃禎祥、王逸民: 中華醫學雜誌, **37**: 280, 1951.
- [5] Reed, L. J. Muench, H.: *Amer. Jour. Hyg.*, **27**: 493—497, 1938.
- [6] 黃禎祥、戴榮: 從人、猪及蚊體內分離的流行性乙型腦炎病毒株的致死力, 微生物學報, **6** (1): 42—46, 1958.
- [7] Sabin, A. B.: *Jour. Ped.* **19**: 596, 1941.
- [8] Lennette, E. H. & Koprowski, H.: *Jour. Immunol.*, **49**: 175, 1944.
- [9] 黃禎祥、宋幹、田鳳調: 中華醫學雜誌, **37**: 253, 1951.
- [10] 宋幹、林毓純、周明先、鄭雲凱: 中國醫學科學院, 科學論文摘要, **2**: 81, 1956.
- [11] 臧旭、胡正祥: 中華病理學雜誌, **1**: 53—59, 1955.
- [12] 周明先、宋幹、林毓純: 中國醫學科學院, 科學論文摘要, **2**: 75, 1956.

A HIGHLY PERIPHERAL PATHOGENIC STRAIN OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS (PEKING STRAIN) AND ITS COMPARISON WITH THE PATHOGENICITY OF THE NAKAYAMA STRAIN

HUANG, C. H. and CHOW, M. S.

Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences

The pathogenicity of Peking and Nakayama strains on mice of different ages was compared. Results show that there was a great difference of peripheral pathogenicity between these 2 strains although no remarkable difference is noted when the virus was inoculated intracerebrally. The 50% mortality endpoint titer of Peking strain when given by intraperitoneal and subcutaneous route to 3-weeks-old mice was $10^{-3.3}$ but for the Nakayama strain the LD_{50} was 10^{-4} intraperitoneally and 10^{-2} subcutaneously. There was a further increase in resistance with advancing age of mice to the peripheral infection when either strain of virus was given, but a greater difference in the development of resistance of mice to the peripheral route of infection with increase in age by the Nakayama strains is observed. With the increase in age, mice lost their susceptibility to peripheral infection with the Nakayama strain of virus much earlier than with the Peking strain. In 5-weeks-old mice the LD_{50} of Peking strain was $10^{-3.5}$ i.p. and $10^{-5.1}$ subcutaneously, while that of Nakayama strain was only 10^{-1} i.p. and less than 10^{-1} subc.; in 9-weeks-old mice the LD_{50} of Peking strain was $10^{-1.5}$ i.p. and $10^{-1.2}$ subc.

The above findings suggest either that there exists in nature strains of Japanese B encephalitis virus with different pathogenicity or the difference is merely due to the variation of the Nakayama strain after prolonged mouse passages or due to both.

Our results confirm the studies of Sabin and Olitsky and others on other viruses that there exists in the animal a certain constitutional barrier to the progression of the virus from periphery to the central nervous system and thus prevents the development of clinically apparent disease of the nervous system. This constitutional barrier is further developed or perfected during the development after birth.

The practical value on the finding of a highly peripheral pathogenic strain is pointed out.