

流行性乙型腦炎病毒皮下感染的致死力與病毒血症的時間及其對溫度穩定性之間的關係

黃禎祥 周明先 汪 瑾 戴 瑩

(中國醫學科學院病毒學系)

1949 年曾在北京分離到一株流行性乙型腦炎病毒(京衛研₁株)注射於三週的小白鼠皮下時具有高度的致死力^[1],這是與其它各國文獻報告有所不同^[2-3]。最近幾年來,對我國各地由人、豬及蚊體內新分離的病毒株進行了比較全面的檢查,發現這些病毒株的皮下感染致死力是不同的^[4]。這說明在自然界中的確存在有不同毒力的毒株,這種不同毒力的毒株可能解釋人類受感染後不同表現的一個原因。進一步研究這種不同毒力毒株的原因,對於闡明本病的發病機制是很重要的。考慮到病毒株不同皮下感染的致死力是與很多因素有關,而本文僅報告二個問題:(一)皮下感染的致死力與病毒血症時間的關係。(二)病毒皮下感染的致死力與其對溫度穩定性之間的關係。

材 料 及 方 法

(一)病毒株:採用了在我國各地(北京、成都、上海、安徽、熱河及石家莊)最近幾年來自人體內新分離的不同代數的 13 株病毒及日本中山株以及蘇聯 M₄₇ 株病毒。各株的歷史見文獻^[4]。所有這些病毒株皆經冰凍乾燥保存。每次實驗前,將冰凍乾燥保存的病毒通過三週的小白鼠腦內傳 2 代。表中所列各株的代數除中山株及 M₄₇ 株外均為實驗時的代數。

(二)動物:採用三週及 4—5 個月以上的小白鼠,皆系本院動物房自行繁殖者。

(三)病毒的滴定及動物接種:腦內及皮下滴定皆採用 3 週的小白鼠(體重為 7—9 克),接種量均為 0.03 毫升。在進行病毒的滴定過程中除了離心沉澱外,病毒一直保存在冰水槽內。所有接種的動物皆觀察 3 星期。

(四)稀釋劑:採用 10% 脫脂牛奶生理鹽水。

(五)病毒滴度的計算:按 Reed 和 Muench 二氏的方法計算病毒的 50% 致死度。

試 驗 及 結 果

(一)皮下感染的致死力與病毒血症時間的關係

1. 大量病毒皮下感染小白鼠後,測定其病毒血症的時間

採用了不同代數的 15 株病毒作研究。將這些病毒分別用三週的小白鼠作腦內及皮下

滴定。同時用 10% 鼠腦懸液皮下注射到一批體重相等的三週小白鼠(7—9 克),每鼠注射 0.03 毫升,然後分別在不同時間(4 小時,1—7 天)各殺死 1—4 隻小白鼠,自頸動脈處取其血液與少量肝素混合後,腦內注射 4—5 隻小白鼠,觀察病毒存在於血液中的時間。結果列在表 1,當同一病毒株的腦內及皮下滴度相差小於 2.4 對數時,則其病毒血症的時間能維持 5—6 天,如相差在 2.5—4.9 對數之間則為 4 天,大於 5 對數則僅為 2 天。由此可知,皮下感染致死力高的病毒株,其病毒血症的時間較長,而皮下感染致死力低的病毒株,則較短。

表 1 不同毒株的流行性乙型腦炎病毒對小白鼠皮下感染的致死力與病毒血症時間的關係

病 毒 株	病毒代數	病毒滴度(對數)		腦內滴度 皮下滴度	病 毒 血 症 的 時 間 (天 數)						
		腦 內	皮 下		1	2	3	4	5	6	7
京衛研 ₁ 株	34	9.1	8.1	1.0	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	0/5
京衛研 ₁ 株	15	8.3	7.2	1.1	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	—
安 徽 株	9	8.2	6.3	1.9	4/4	4/4	2/4	1/4	2/4	0/4	—
熱 河 ₁ 株	15	8.1	6.1	2.0	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5
熱 河 ₂ 株	11	>8.5	>6.5	2.0	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/4	0/5
成 都 ₁ 株	11	7.7	>5.5	<2.2	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5
成 都 ₅ 株	10	8.5	6.1	2.4	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	2/5	0/5
成 都 ₇ 株	10	7.3	4.7	2.6	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	0/5
成 都 ₂ 株	9	8.3	4.7	3.6	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	1/5	0/5
石 家 莊 株	15	9.5	5.5	4.0	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5	1/5	0/5
成 都 ₃ 株	9	8.3	4.1	4.2	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5
成 都 ₄ 株	10	8.5	3.7	4.8	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5
成 都 ₆ 株	9	>8.5	3.7	>4.8	5/5	5/5	4/5	5/5	0/5	1/5	1/5
滬 株	15	8.3	2.9	5.4	5/5	3/5	0/4	1/5	0/4	0/5	0/5
蘇聯 M ₄₇ 株	7*	9.1	3.5	5.6	5/5	3/5	0/4	0/5	0/4	0/5	—
蘇聯 M ₄₇ 株	7*	7.9	1.5	6.4	4/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
中 山 株	70*	7.6	0.8	6.8	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	—
中 山 株	67*	8.5	1.1	7.4	3/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	—

* 過去的傳代歷史不詳。

2. 在腦內非特異性刺激條件下觀察病毒皮下感染的致死力與病毒血症時間的關係

以前有若干學者^[5-9]在研究泛嗜性病毒及其它嗜神經病毒時,曾發現將病毒由腦外途徑注射年齡大的小白鼠後並不引起死亡,但當腦內注射無菌生理鹽水後,在血液循環中的病毒易侵入受損的腦組織內進行繁殖並導至死亡。因此我們進行了以下的試驗以了解病毒皮下感染小白鼠後,在不同時間腦內注射無菌生理鹽水,破壞血腦屏障,使血液中病毒可侵入腦組織內,致使動物發病死亡,來間接測知病毒血症的時間。採用不同稀釋度的中山株 68 代及京衛研₁ 株 34 代病毒分別皮下注射到 4—5 個月以上的小白鼠,分成二組。一組為對照組(不進行腦內非特異性刺激),觀察動物死亡的情況。另一組為試驗組,又分別在 1、2、3、4 天腦內注射 0.03 毫升無菌生理鹽水,以便了解病毒在血液內存在的時間。同時這二株病毒皆分別在 3 週的小白鼠作腦內滴定。結果見表 2。京衛研₁ 株病毒皮下感染無論是用大劑量或小劑量,在 1、2、3 天通過腦內非特異性刺激皆引起全部或部分動物的死亡。在第 4 天注射 $10^{8.6} LD_{50}$ 及 $10^{4.6} LD_{50}$ 病毒量的試驗組中也有個別的動物死亡。

表 2 京衛研₁株與中山株病毒對小白鼠皮下感染的致死力與病毒血症時間的關係
(在腦內非特異性刺激條件下)

病 毒 株	腦 內 滴 度 (對 數)	稀 釋 度	對 照 組	試 驗 組			
				24 小 時	48 小 時	72 小 時	96 小 時
中 山 株	8.5	10^{-1}	0/6	1/6	2/6	0/6	0/6
		10^{-2}	0/6	0/6	2/6	1/6	0/6
		10^{-5}	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
		10^{-7}	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
京 衛 研 ₁ 株	8.6	10^{-1}	2/6	6/6	6/6	1/4	2/6
		10^{-3}	2/6	5/6	3/6	3/5	0/6
		10^{-5}	0/6	4/6	5/6	6/6	1/4
		10^{-7}	0/6	2/6	1/6	2/6	0/6

分子——動物死亡數； 分母——接種動物數。

中山株病毒則不然，在大量病毒 ($10^{8.5}$ 及 $10^{6.5}$ LD₅₀) 皮下感染後 24、48 及 72 小時對小白鼠進行腦內非特異性損傷，只有個別動物死亡。用較小量病毒 ($10^{4.5}$ 及 $10^{2.5}$ LD₅₀) 時，除了在 $10^{4.5}$ LD₅₀ 24 小時組有一個動物死亡外，其餘全部生存。對照組除了京衛研₁株的 $10^{3.6}$ 及 $10^{6.6}$ LD₅₀ 組在 6 個動物中有 2 個死亡外，其餘全部生存。由此可知，中山株病毒的病

統 計 學 方 法 計 算 的 結 果

病 毒 株	迴 歸 係 數 (b)	迴 歸 方 程 式	t_b	P	顯 著 性
京 衛 研 ₁ 株	-0.0988	$Y_e = -0.0988X + 8.42$	6.519	<0.01	有非常顯著之差異
中 山 株	-0.1679	$Y_e = -0.1679X + 9.40$			

毒血症的時間約 1—2 天，而京衛研₁株病毒約 4 天。因此，這個試驗與以上的方法所得出的結果大致是相符合的。

(二)病毒對溫度的穩定性

病毒血症時間長短的原因一方面可能與病毒在神經外組織繁殖的能力有關，而另一方面也可能是與體內溫度對病毒的影響有關。因此，爲了進一步闡明病毒血症時間長短的原因，我們比較了京衛研₁株 (35 代) 及中山株病毒 (70 代) 對 37°C 溫度的穩定性。因 37°C 溫度比較符合於動物體內的正常體溫。實驗時將兩株病毒的 10% 鼠腦懸液一部分在 3 週的小白鼠作腦內及皮下滴定。另一部分放在 37°C 的水浴內，然後分別在不同的時間 (8、24、32、48、56、72、80、96 及 120 小時) 取出一部分懸液稀釋成不同的稀釋度，各注射到 5 隻小白鼠腦內觀察病毒對溫度的穩定性。結果發現 (圖 1)，中山株病毒在 37°C 水浴內放置 56 小時不能測出有致死力的病毒，而京衛研₁株病毒放置 72 小時以後，仍可測知有病毒 (滴度爲 $10^{-1.02}$)。根據統計學迴歸係數方法計算的結果，此二者有非常顯著之差異。

根據以上的試驗，可以看出中山株與京衛研₁株病毒有以下的關係：皮下感染的致死力高的病毒株，其病毒血症的時間較長，而且對體外溫度穩定性亦較高。相反，皮下感染

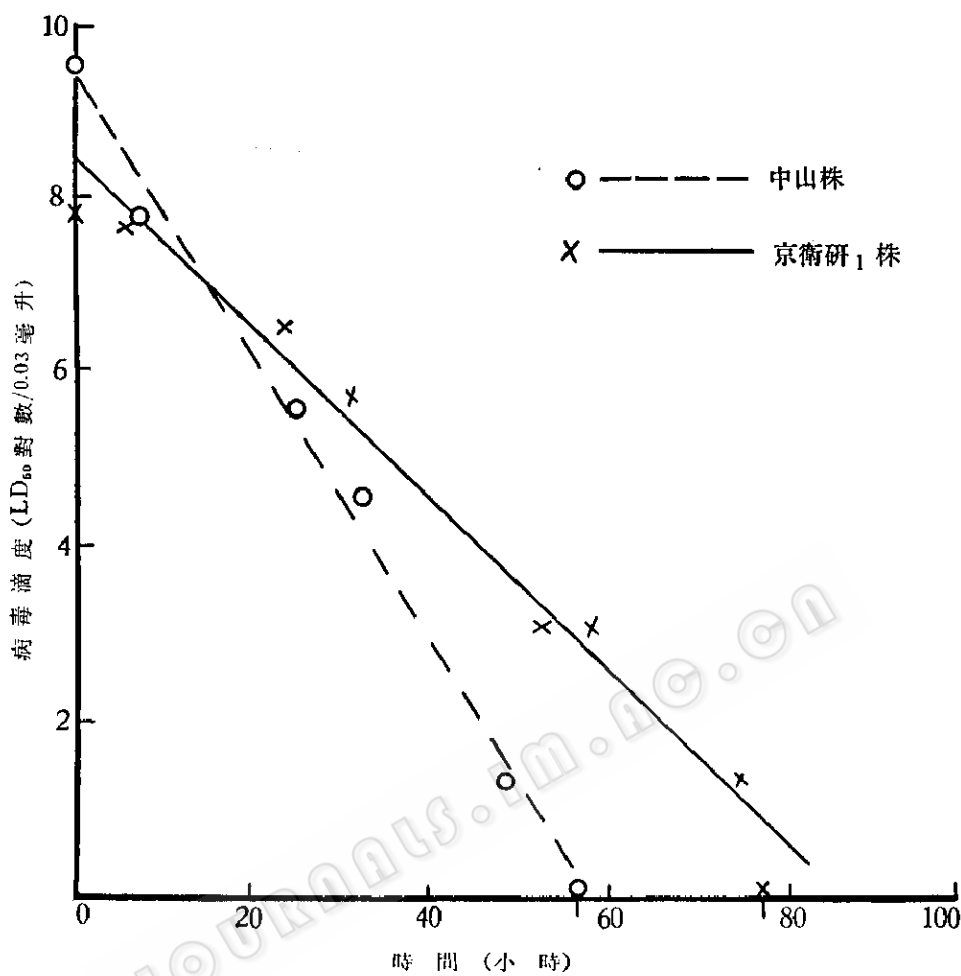


圖 1 京衛研₁ 株與中山株病毒對溫度的穩定性

的致死力低的病毒株,其病毒血症的時間較短,對體外溫度的穩定性亦較低(表 3)。

表 3 京衛研₁ 株與中山株病毒對小白鼠皮下感染的致死力與病毒血症時間及其對溫度穩定性之間的相互關係

病毒株	病毒代數	病毒滴度 (對數)		腦滴度 與皮下 差異	病毒血症的時間(天數)							體 外 溫 度 (37°C) 的 時 間 (小 時)										
		腦內	皮下		1	2	3	4	5	6	7	0	8	24	32	48	56	72	80	96	120	
京衛研株	35	7.83	7.61	0.22	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	1/5	7.83	7.54	6.75	5.65	3.48	3.45	1.62	0	0	/	
中山株	70	>9.5	2.41	>7.09	5/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	/	>9.5	7.625	5.61	4.49	1.0	0	0	0	0	0	

討 論

在我們所研究的病毒株中可明顯的看出皮下感染的致死力與機體內病毒血症的時間存在着正比的關係。中山株及京衛研₁ 株病毒皮下感染的致死力不僅與機體內病毒血症的時間存在着正比的關係,而且與病毒對溫度穩定性之間亦有明顯的正比關係。這對闡

明本病的發病機制是有一定意義的。對這些方面的研究，文獻上僅有片斷的記載。Casals 及 Webster 二氏^[7]在研究蘇聯春夏型腦炎病毒時發現了它的皮下感染致死力是很高的，而且小白鼠年齡的增加對它的影響很小。Шубладзе 氏^[8]曾指出蘇聯春夏型腦炎病毒是比較耐熱，在 37°C 溫度下生存時間為 2 天。1953 年 Петров 氏^[9]指出噬菌體對體外溫度的穩定性和它在動物機體中生存時間之間有一定的關係。耐熱的大腸桿菌噬菌體 JII 株，在孵箱中能生存 70 天，於小白鼠機體中可生存 55 天。而不耐熱的蕈狀桿菌噬菌體在孵箱中 6 天完全滅活，於動物體內經 4—5 天已經消滅。

根據學者們片斷的報導及我們實驗的結果，我們認為皮下感染致死力高的病毒株在血液中存在較長的時間，其可能的原因之一是由於這種病毒對溫度有較高的穩定性。今後研究更多的病毒種類（皮下感染致死力高的病毒，如蘇聯春夏型腦炎病毒及委內瑞拉馬腦脊髓炎病毒；皮下感染致死力低的病毒，如聖路易型腦炎病毒）和流行性乙型腦炎病毒的其它毒株對於溫度的穩定性與其皮下感染致死力及病毒血症時間的關係很可能有助於了解決定腦外途徑感染力的因素。

這些試驗的結果亦可考慮到人類，由於在自然界中存在有不同毒力的毒株，因此當皮下感染致死力高的病毒株經蚊叮咬感染人體後，因其對體溫抵抗力較高，故在血液中維持時間較長，這就有利於病毒通過血腦屏障而侵入腦內致使發病。相反，皮下感染致死力低的病毒株就可能引起不顯性感染。但需指出，在決定皮下感染致死力的因素時也應注意到其它方面的原因。可能與病毒在神經外組織繁殖的能力有關，亦可能與病毒自皮下進入血液的擴散能力有關。這些問題都值得進一步的研究。

總 結

1. 作者採用了 15 株不同流行性乙型腦炎病毒皮下感染小白鼠後，測定其病毒血症的時間，結果發現當同一病毒株的腦內及皮下感染的滴度相差小於 2.4 對數時，則其病毒血症的時間能維持 5—6 天，如相差在 2.5—4.9 對數之間，則為 4 天，大於 5 對數則為 2 天。在另一試驗中，將病毒皮下注射到年齡大的小白鼠體內，然而在不同的時間進行腦內非特异性刺激，亦能間接測知皮下感染的致死力與病毒血症的時間存在着正比的關係，這與上述試驗的結果相符合。

2. 從病毒對溫度穩定性的試驗中，可以看出中山株及京衛研₁株病毒的皮下感染致死力，與病毒血症的時間及對溫度穩定性之間存在着正比的關係。並討論了這些關係對闡明本病的發病機制的意義。

參 考 文 獻

- [1] 黃禎祥、周明先：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，微生物學報，6 (1)：32—36，1958。
- [2] Kasahara, S., Ueda, M., Okamoto, Y., Yashide, S., Hamano, R., & Yamada, R.: *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 13: 48, 1936.
- [3] Дробышевская, А. И. и Неустров, В. Д.: Нейровирусные инфекции, Медгиз, стр. 199, 1954.
- [4] 黃禎祥、戴瑩：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。
- [5] Sawyer, W. A. & Wray Lloyd: *J. Exp. Med.*, 54: 533, 1931,
- [6] Webster, L. T. & Anna D. Clow: *J. Exp. Med.*, 63: 433, 1936.

- [7] Casals, J. & Webster, L. T.: *J. Exp. Med.*, **79**: 45, 1944.
[8] Шубладзе, А. К. и Гайдамович, С. Я.: Краткий курс практической вирусологии, Медгиз, стр. 221, 1954.
[9] Петров, Ю. К.: *Новости медицины*, **38**: 82, 1953.

RELATIONSHIP BETWEEN THE PERIPHERAL PATHOGENICITY, DURATION OF VIREMIA AND STABILITY OF THE JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS TO HEAT

HUANG, C. H., CHOW, M. S., WANG, C. and TAI, Y.

Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences

In order to find out the cause of the difference of peripheral pathogenicity among different strains of the Japanese B encephalitis virus, the relationship between the peripheral pathogenicity and the duration of viremia among 15 strains was studied. The results showed that the duration of viremia caused by strains with higher subcutaneous pathogenicity was longer than those with lower subcutaneous pathogenicity. When the difference between the intracerebral and subcutaneous titer of the same virus strain was less than 2.4 log units, the duration of viremia was about 5—6 days; when the difference was between 2.5—4.9 log units, it was about 4 days; and when the difference was greater than 5 log units, then the duration of viremia was only 2 days.

To elucidate further the cause of variation of the duration of viremia, the stability of the Peking strain (high peripheral pathogenic strain) and the Nakayama strain (low peripheral pathogenic strain) to heat was compared. The results showed that the Nakayama strain when kept at 37°C in a water bath for 56 hours, no infective virus could be detected by the intracerebral mouse test, while with the Peking strain kept in the same condition a viral titer of $10^{-1.62}$ could still be demonstrated at the end of 72 hours.

From the results of the above experiments it is suggested that the difference in the stability to heat and the duration of viremia among the virus strains may partially account for the difference in manifestation after natural infection in man.