

## 乙型腦炎病毒分離方法的研究

吳 皎 如      吳 樹 吟

(福建省流行病研究所)

乙型腦炎病毒的分離方法,普通皆將病理材料注射小白鼠腦內,使病毒直接感染腦組織,然後使小白鼠發病。病理材料中,死亡病例的腦組織感染率較高<sup>[1]</sup>,其他材料如血液、脊髓液<sup>[2]</sup>和昆蟲材料感染率俱不高。小白鼠的年齡和感染率亦有極大關係;乳鼠較高,而三、四週齡的小白鼠用在分離病毒的實驗時,陽性率更低。當作大量媒介昆蟲材料和動物宿主血液材料病毒分離時,我們更感覺陽性率非常低。因此,我們認為用小白鼠腦組織接種作為分離病毒的方法,不是理想方法,必須改進分離方法才能提高陽性率。日本病毒學家鈴木成美、管沼惇、影山成章等<sup>[3]</sup>曾謂應用感染促進因子如 Cortisone 等物質,可以使乙型腦炎病毒的分離更容易,而且迅速;即用皮下注射方法亦可分離出病毒。此外應用組織培養法亦比直接注射小白鼠腦內分離病毒的結果佳良。務台茂氏曾謂以粘液素注射腦內能非常顯明地促進感染。上舉各學者們由實驗證明許多化學物質注入小白鼠體內,可以增加動物對乙型腦炎病毒的感受性,使動物容易感染乙型腦炎病毒。這是一種分離方法。另一種方法,乃增加病毒的量,因而使病毒的致病力增強。我們即根據上述理論,將乙型腦炎病毒分離方法分為三種:

- (1) 將材料直接接種小白鼠乳鼠腦內。
- (2) 將材料和一定數量的粘液素混合後注射小白鼠腦內。
- (3) 將材料先接種雞胚胎卵黃囊內增殖培養後,使乙型腦炎病毒繁殖至一定濃度後,再將雞胚胎懸液注射小白鼠腦內,即可以增加陽性率。

1957 我們在一個重點縣作乙型腦炎病毒傳播媒介昆蟲研究和乙型腦炎病毒動物宿主研究時,將三種方法所得結果作一比較。證明增加動物感染性和病毒在雞胚胎內先繁殖,然後將材料再接種小白鼠,俱比直接接種小白鼠腦內的陽性率高。茲將實驗經過報告如下:

### 實驗方法和材料

此次實驗的材料係用台灣蟻蠊、白紋伊蚊並用三批牛血液作乙型腦炎病毒的分離。在 7 月 1 日至 7 月 10 日,根據過去經驗,此時期是昆蟲帶毒密度最高的季節,共計捕集台灣蟻蠊 2,649 隻,白紋伊蚊 164 隻,分為 51 批;24 批材料加入感染促進因子,27 批材料僅用普通牛肉湯研磨,51 批材料俱用牛肉湯和粘液素牛肉湯研磨後,接種雞胚胎卵黃囊內。牛血液三批接種小白鼠腦內,第一代發病後,將鼠腦分二半,一半用牛肉湯研磨,另一半用粘液素研磨,再接種小白鼠。

1957 年 10 月 4 日收到。

第一種實驗方法乃以牛肉湯稀釋材料接種乳鼠腦內法。將捕集的台灣蠓蠓和白紋伊蚊檢查有無已死的成蟲和帶血未消化的成蟲。台灣蠓蠓非常容易死亡，捕集後不出 4 小時即相繼死亡，故由野外捕集後即須帶回實驗室立即研磨接種。白紋伊蚊係由幼蟲孵化，所有昆蟲先放於低溫冰箱內冰凍，然後取出放於平皿內，平皿放於冰塊盤上，將乙醚傾入平皿內浸洗昆蟲作體外消毒。經 5 分鐘取出昆蟲，以冷凍消毒生理食鹽水，再洗兩次。傾去生理食鹽水，將台灣蠓蠓和白紋伊蚊分批研磨，台灣蠓蠓每 40—80 隻為一批，加牛肉湯 1.5—2 毫升；白紋伊蚊每 20—40 隻為一批，每隻成蚊加牛肉湯 0.05 毫升。研磨成懸液後，每毫升加青霉素 1,000 單位鏈霉素 500 微克，在低溫冰箱內放置 4 小時，以後接種於血液瓊脂斜面及普通瓊脂斜面在 37°C 內孵育 72 小時。同時懸液以每分鐘 1,000 轉離心 10 分鐘，吸出上清液。以 0.02—0.03 毫升懸液注射 4—10 天乳鼠腦內每批注射 3 隻，觀察 21 天。如發現神經症狀和其他病態，立即解剖傳代。

第二種方法乃以 4% 粘液素——牛肉湯稀釋材料接種乳鼠腦內。粘液素因牌號不同，毒力亦不同，因此影響用量的大小。我們係用英國 L. Light 牌。先將粘液素 10 克放於電磨器中，加 50 毫升 pH 8.0 的牛肉湯，研磨 3 分鐘（每分鐘 12,000 轉）。研磨停止後，將電磨器連同粘液素——牛肉湯溶液，放於低溫冰箱內冰凍 5 分鐘，再取出研磨一次，時間速度相同。最後將粘液素——牛肉湯放於 4°C 冰箱中 24 小時，再取出用電磨研磨 3 分鐘即停止，放於低溫冰箱冷凍 5 分鐘，然後再磨。如此反覆 10 次至溶液完全均勻，始分裝玻璃瓶中，每瓶 5 毫升，以 15 磅蒸氣消毒 20 分鐘，保存於低溫冰箱中待用。測定毒性時將粘液素稀釋為 2%、3%、4%、5%，四種，每種稀釋度接種乳鼠 10 隻，接種徑路為腦內接種，劑量為 0.03 毫升。檢查是否會引起中毒，觀察三星期。如小白鼠活潑正常，體重無減輕，該稀釋度即為安全稀釋度。我們所用安全稀釋度為 4%。分離病毒的材料按照上述牛肉湯稀釋法研磨、細菌培養和接種乳鼠腦內，並觀察 21 天。

第三種方法乃將材料通過雞胚胎卵黃囊增毒。將材料按照牛肉湯稀釋法稀釋、研磨，加入抗生素，細菌培養並離心後吸出上清液，以 0.8—1.0 毫升接種 8 日的雞胚胎卵黃囊內，在 37°C 孵育 72 小時。要時時觀察雞胚發育情況，最少每天觀察二、三次。如發現血管暗赤或血管蒼白，即須立即收取雞胚胎，如雞胚胎死亡即不適用。雞胚胎取出後，即以牛肉湯研磨成 10% 懸液，然後放於低溫冰箱中冷凍 4 小時，再取出在 15°C 水箱中融解，融解後再放於低溫冰箱中冷凍。如此反復 3 次，以低速度離心 15 分鐘，吸出上清液，以 0.02—0.03 毫升接種乳鼠腦內，每批接種 3—4 乳鼠，觀察 21 天。

## 實 驗 結 果

應用上述三種方法從事昆蟲病毒分離，和牛血液病毒分離，結果見表 1。

結果我們分離出 5 株乙型腦炎病毒；其中用粘液素——牛肉湯為稀釋液分出 3 株病毒，用雞胚胎卵黃囊接種增毒法分離出 4 株病毒，但用牛肉湯為稀釋液直接接種乳鼠腦的各批沒有一批陽性。

7 月 10 日台灣蠓蠓一批和白紋伊蚊一批，各用牛肉湯為稀釋液，並同時接種雞胚胎卵黃囊，結果以牛肉湯稀釋液接種小白鼠腦內不發病，但通過雞胚胎卵黃囊增毒後，再接種小白鼠腦內經 5 日發病，這很明顯地證明材料內確有乙型腦炎病毒存在，但因數量過少不

能使小白鼠生病,經雞胚胎增毒後病毒數量增加,故小白鼠生病。

表1 不同方法分離病毒的結果

實驗材料	日期	數量	批數	實驗結果 (陽性數)			
				粘 液 素 處 理		肉 湯 處 理	
				直接乳鼠腦	經雞胚卵黃囊	直接乳鼠腦	經雞胚卵黃囊
台灣蠟蟻	7—1	174	3	1	1		
	7—2	1360	19	1	1		
	7—5	435	9			0	0
	7—8	190	4			0	0
	7—9	270	6			0	0
	7—10	220	4			0	1
白紋伊蚊	7—1	64	2	0	0		
	7—5	22	1			0	0
	7—8	56	2			0	0
	7—10	22	1			0	1
牛血液在小白鼠腦內傳第一代腦組織			3	1		0	

牛血液接種小白鼠後第一代發病三批鼠腦,每隻腦組織各分為兩半,同時再用牛肉湯稀釋液和粘液素牛肉湯稀釋液處理後,各接種小白鼠;結果粘液素處理有一批發病,牛肉湯處理的各批沒有一批發病,這也說明粘液素有些作用。

## 討 論

根據實驗結果,用粘液素為促進感染因子的24批台灣蠟蟻和白紋伊蚊,分離出2株病毒,而用牛肉湯處理的27批全部陰性,這說明粘液素確有促進感染的作用;牛肉湯處理接種小白鼠的方法不是很好的方法,在牛肉湯處理的24批中,不是沒有帶毒的昆蟲,通過接種雞胚胎後即有二批為陽性,分離出病毒,這也很明顯地說明有的昆蟲帶毒的數量太少,致病力不强,用普通處理方法接種小白鼠不能使小白鼠發病,因此昆蟲材料及動物宿主的血液,作病毒分離,必須採用各種方法,始能分離出病毒,直接用牛肉湯研磨後接種小白鼠腦內,不能得到最高陽性率。

應用雞胚胎,使材料中微量的病毒發育增加至一定濃度,無論在理論上及實踐上俱為極可靠而且簡易的方法,以雞胚胎培養病毒有幾點優點:

甲、沒有穩性感染的危險,因此敏感度高,病毒容易在雞胚胎組織內生長,我們採取胚胎的血液作中和反應未發現有抗體;不若小白鼠那樣,飼養不當,即產生穩性感染,引起血液中有抗體,減低動物對病毒的感染力。<sup>1</sup>

乙、能大量注射材料,每次注射0.8—1.0毫升,等於注射小白鼠乳鼠腦內的劑量的40—50倍,注射量大,無形提高病毒濃度,增強繁殖機會和致病力。

丙、雞胚胎組織對乙型腦炎病毒,亦為良好的培養材料,病毒的發育既甚旺盛,而又

能在胚胎各種組織內生長，不僅雞胚胎內的腦組織有病毒，而其他組織如肝、腎、肌肉等，俱有大量病毒，72 小時達到最高濃度。小白鼠體內各臟器雖一時有病毒存在，但很快消失，不若雞胚胎體內能長期存在，這對分離病毒亦極有利。因此用雞胚胎的接種來分離乙型腦炎病毒為分離病毒的良好方法。

動物血液分離病毒經常發現第一代小白鼠有些病態，傳至第二代時小白鼠即不發病，可能病毒一時不能適應動物腦組織生活，致病力亦不强，因此小白鼠在第二次傳代即不能發病，所以利用促進感染的因子使小白鼠對乙型腦炎病毒的感受性增加，即能容易發病。必須改進分離方法，才能使第二代小白鼠發病，亦為一種必要的處理，這些促進感染的因子太多，粘液素比較簡便，適合實驗的採用。

## 總 結

1. 分離乙型腦炎病毒必須採用多樣性的方法，才能提高陽性率，在材料中增加感染促進因子和接種雞胚胎內使病毒大量增殖，然後才接種小白鼠腦內，據實驗可以增加陽性率。本年度台灣蠅蠓分離出 3 株病毒即應用上述兩種方法，才能成功，如以普通的昆蟲材料用牛肉湯研磨，然後接種小白鼠腦內，即不能分離成功。

2. 粘液素可以用為促進感染因子，混和在接種材料內，接種小白鼠腦內，既簡便又有良好效果，適合作為野外分離昆蟲及動物宿主的乙型腦炎病毒的實驗。

3. 應用雞胚胎使材料中微量的病毒得以繁殖，然後再接種小白鼠，亦可增加陽性率，最主要的優點即接種劑量能比小白鼠腦內的劑量大 40—50 倍。

## 參 考 文 獻

- [1] 吳皎如、吳樹吟：乙型腦炎病毒研究，微生物學報，4(1)：85。
- [2] 王用楫、朱聯英：從腦脊髓液分離流行性乙型腦炎病毒研究，微生物學報，4(1)：97。
- [3] 鈴木成美、菅沼淳影、山成章、岸田綱太郎等：日本腦炎病毒研究補遺特別關於病毒分離培養並干涉能力等，病毒學雜誌，7(2)：1957。
- [4] 藤田信男、中谷光、水野英治：昭和二十六年度，日本腦炎流行的研究，京都府醫科大學雜誌，57(3)：345。

## STUDY ON THE METHODS FOR RECOVERY OF THE AGENT OF B TYPE ENCEPHALITIS

WU CHIAO-JU & WU SU-LING

(*Fukien Research Institute for Epidemic Diseases, Foochow*)

This report is concerned with study of the efficiency of different methods for recovery of the virus of B type encephalitis. Attempt was made to isolate this virus from insects and specimens of animal blood by the following methods:

1. The materials received were ground or mixed with 4% mucin in broth inoculation into suckling mice.
2. Before inoculating into mice, the materials were first inoculated into 8 days chick embryo for the multiplication of the virus.
3. The materials were treated with meat infusion broth for inoculation.

The specimens for study comprised of 2694 *Lasiohelea taiwana*, 164 *Aedes albopictus* and three pieces of brain tissue of mice primarily inoculated with cow blood. Analysis of the results obtained indicated that the first two methods are better than the last one, for two strains of B type encephalitis virus were isolated by the first method, and 4 strains by the second method, but none by the third method.

The results of this study give evidence to the fact that various methods must be adopted for isolating B type encephalitis virus from specimens of insects and animal blood. Mucin seemed to have an enhancing effect on the development of the virus in the mice and yielded higher percentage of positive results.