

丙型流行性感胃病毒在雞胚 尿囊腔中的適應

聞仲權 馮慧英 湯飛凡

(衛生部生物製品研究所, 北京)

自從 Taylor 氏^[1-2]在 1947 年分離出丙型流行性感胃病毒(以下簡稱丙型流感)1233 株後, 很多文獻^[3-9]報告了有關丙型流感的生物學性狀的研究。它與流感甲、乙二型的抗原性有所不同, 在血凝反應上只能在 4°C 情況下才使雞血球出現凝集現象。感染動物範圍也有區別, 一般試驗室動物都不敏感, 在雞胚羊膜腔中發育很好, 而在尿囊腔中則很難適應。由於羊膜腔的接種技術比較複雜, 且所取得羊水材料不多, 只適於實驗室內用來研究其生物學性狀, 但製造疫苗或診斷用抗原時所需之大量羊水則不易獲得。至於丙型流感在我國的流行情況, 曾有王潛淵等人^[10]報告過, 認為北京有丙型流感流行的可能。張青等人^[11]在上海分離了丙型流感病毒, 而我們試驗室在正常人血清流感抗體測定試驗中^[12], 也發現在成人或兒童中間丙型流感抗體分佈相當廣泛, 且抗體水平相當高。據現有材料看, 丙型流感的流行範圍可能很廣, 因此對於丙型流感的診斷和預防在目前是值得注意的。為此目的, 我們企圖將丙型流感病毒 1233 株適應在雞胚尿囊腔中。從 1955 年開始於雞胚尿囊腔中, 連續傳遞了 84 代, 結果感染雞胚尿囊滴度 (ID₅₀) 可保持在 10⁻⁸—10⁻⁷ 之間, 血球凝集滴度可達 1:40—1:640。本文即報告一些實驗結果。

材 料 和 方 法

毒種: 雞胚羊膜腔中保存的未經尿囊腔適應的 Taylor 氏 1233 病毒株^[1]。

雞胚: 9—11 日胚齡白色來克亨雞胚, 試驗中大部分使用 9 日胚。

接種、收穫與傳代: 種子液用蛋白陳肉水 (pH 7.2—7.4) 稀釋成所需之濃度。38°C 孵育的 9 日齡雞胚經照視標出氣室, 在雞胚側血管發育良好上方氣室內, 距氣室邊緣 1—2 毫米處鋸一小口, 消毒後, 用 26 號針頭 (1/2 吋長) 和結核菌素注射器接種, 每胚接種量 0.1 或 0.2 毫升, 後用無菌熱臘封口, 放在 35—36°C 孵箱中培育, 96 小時後, 放 4°C 冰箱中過夜或在 -40°C 低溫冰箱中 30 分鐘。用電烙器^[13]在氣室中央烙開直徑一厘米的圓孔, 然後用碘酒消毒, 以刀揭去卵殼, 收取尿囊液, 吸時防止出血。收穫的尿囊液作血球凝集試驗, 挑選效價高而無菌的雞胚尿囊液留作傳代及保存。

雞血球凝集試驗: 尿囊液用生理鹽水由 1:2 或 1:5 起倍比稀釋, 每管 0.25 毫升, 分別加入 0.5% 澳洲黑雞血球 0.25 毫升, 充分混勻, 靜放 4°C 冰箱內 45 分鐘讀取結果, 以 ++ 凝集的稀釋度為終點。

1957 年 12 月 11 日收到。

雞血球凝集抑制試驗：雞免疫血清“1233—46”為於尿囊腔中傳遞46代的病毒，在 -40°C 保存9個月後又經尿囊腔傳遞一代的尿囊液，用雞血球濃縮，最終效價稀釋到1:320。“1233—77”免疫血清為適應77代的病毒，乾燥保存近半年，經雞胚尿囊腔傳遞一代後，用雞血球濃縮後進行免疫。1233免疫血清為雞胚羊水免疫而得。雞的免疫方法根據本試驗室常用方法^[14]，血清保存於 -40°C ，用前 56°C 30分鐘滅能。

試驗抗原與製造免疫血清用抗原同一代的尿囊液，保存在 -40°C 。

試驗方法^[14] 血清用倍比稀釋，每管0.25毫升，加入4單位抗原0.25毫升，後再加入0.5%澳洲黑雞血球0.25毫升，搖勻放 4°C 冰箱45—50分鐘讀取結果。血清效價以完全抑制一管為終點。

中和試驗：血清與病毒同雞血球凝集抑制試驗材料。血清用前 56°C 30分鐘滅能，後用蛋白陳肉水1:10稀釋。病毒用蛋白陳肉水作10倍遞增法稀釋，所用蛋白陳肉水每毫升含青霉素及鏈霉素各1,000單位。血清與各稀釋度的病毒等量混合。病毒對照組用蛋白陳肉水代替血清，全部操作在 $2-5^{\circ}\text{C}$ 冰浴中進行，混合後半小時，每個稀釋度尿囊腔接種9日雞胚4個，每胚接種0.2毫升，放 $35-36^{\circ}\text{C}$ 培育。5天後分別取出各胚之尿液作直接血凝試驗，結果用Reed和Muench氏法計算 ID_{50} 及中和指數。

病毒繁殖最適時間測定：採用同一雞胚不同培育時間法。每個試驗用12個胚，病毒 10^{-6} 稀釋尿囊腔接種，培育2天後，逐日用多孔針頭^[15]結核菌素注射器吸取尿液0.1—0.2毫升，然後雞胚繼續培養，尿液測定血凝效價，如此作到第7天為止。

試驗結果

1233株在尿囊腔中適應結果見圖1。開始適應時，用未稀釋的感染雞胚羊水接種，繼之用未稀釋的感染雞胚尿囊液接種。從血球凝集試驗來看，第1代每個雞胚都被感染，最高效價1:32；第3代後效價降低，僅能出現直接血凝，部分雞胚未見血凝；到第13代全部雞胚沒有出現血凝現象。再用12代材料重複接種，則又出現血凝，但仍有部分雞胚沒有血凝現象。又經過一個階段的適應後，病毒繁殖能力漸漸增強，效價也有所增高，最高可達1:40。在第18代時開始用 $10^{-1}-10^{-3}$ 稀釋的病毒來接種傳代。經稀釋後傳代的比濃

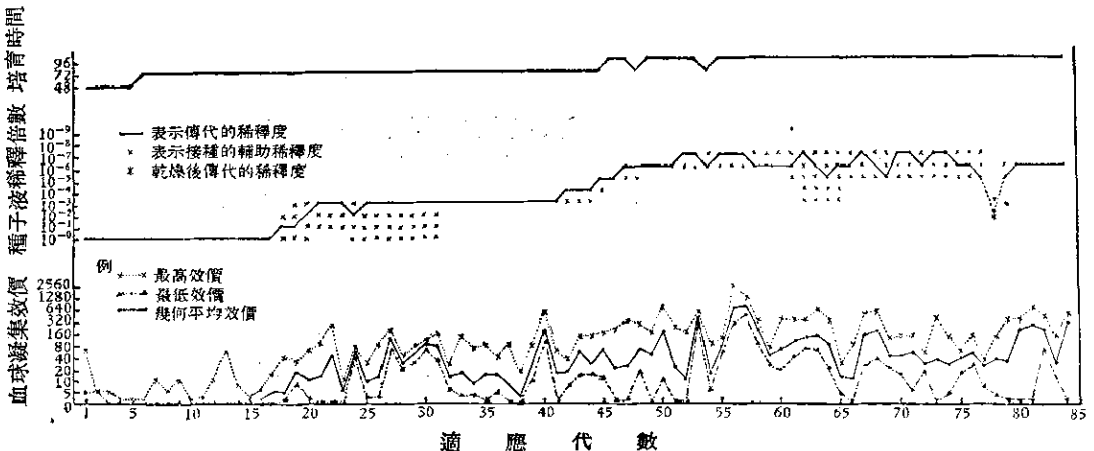


圖1 丙型流感1233株在雞胚尿囊腔中的適應情況

的為佳。傳到 47 代已將病毒稀釋度遞增到 10^{-6} 。在此段適應過程中，病毒繁殖能力繼續提高，只有部分代數個別雞胚不能出現血凝。從血凝試驗上觀察，效價也較穩定，平均在 1:10—1:160 之間，但個別代數也有低於 1:10 的。後一階段多用 10^{-6} 稀釋度傳代，有的用 10^{-5} 或 10^{-7} 。血凝平均效價在 1:20—1:320，多數在 1:40—1:160 之間。血凝效價達到或超過 1:320 的雞胚和代數顯著增多，最高效價有達到 1:2560 的，然而仍有個別雞胚效價很低，有的仍沒有血凝。我們共傳遞 84 代，病毒對雞胚的感染滴度可保持在 10^{-6} — 10^{-8} 之間，最高可達 10^{-9} ，感染滴度較為穩定。血凝效價則動盪在 1:40—640 之間，常呈波浪式交替，連續幾代效價相當高，忽一代降下，繼又回升很高。據血凝結果看還是不夠滿意的。

在培育時間上，開始幾代是 48 小時，後用 72 小時。在後階段因接種病毒稀釋度增高，用同一雞胚不同時間法，抽取尿囊液測定血凝效價觀察病毒繁殖結果見圖 2。

從培育溫度來看（表 1），在適應病毒 34 代時，曾用 37—37.5°C、35—36°C 和 34°C 三個溫度分組培養，結果以 35—36°C 為佳，血凝效價高。在 37—37.5°C 時全部雞胚沒有出血凝。在 34°C 時效價較低。由試驗結果，培育溫度以 35—36°C 為宜。

適應病毒的生物學性狀：血凝條件與原株情況相同^[2,5,6]，在室溫 10—15°C 凝集不好，在 4°C 條件下凝集較佳。Minuse 等氏^[6]曾報告過關於丙型流感 JJ 株病毒吸附和洗離的性能，認為 JJ 株病毒不能被雞血球吸附。我們也將適應病毒 1233 株及原株進行了吸附和洗離試驗，結果認為可以進行吸附和洗離來濃縮病毒，而且其特性很明顯。但與甲、乙二型相比，洗離出來的病毒百分比比較低（表 2）。

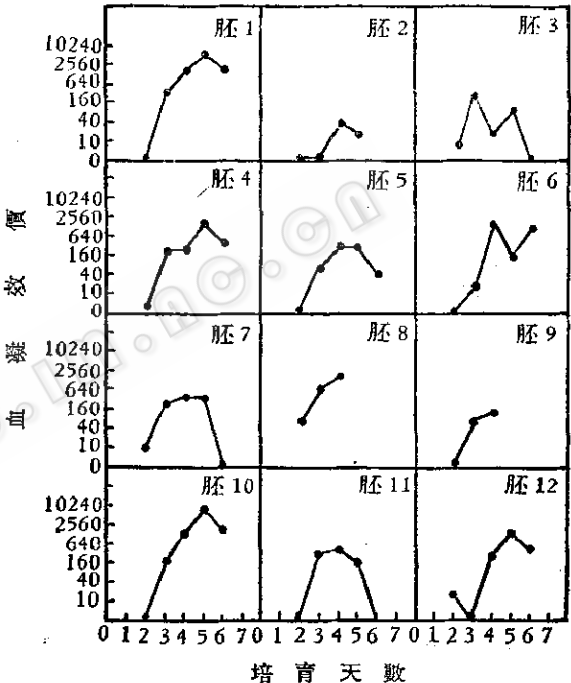


圖 2 傳遞 56 代病毒在雞胚尿囊腔中繁殖情況

表 1 不同溫度培育血凝效價比較

溫度 \ 血凝效價	胚 1	胚 2	胚 3	胚 4
34°C	1:30	1:10	1:5	1:10
35—36°C	1:40	1:30	1:10	1:35
37—37.5°C	—	—	—	—

註：— 原尿液仍未出現血凝。

表 2 尿囊腔適應前後 1233 株病毒的雞球吸附和洗離試驗結果

試 驗 \ 病 毒	1233—85 血凝效價	1233 血凝效價
原尿囊液（吸附前）	1:1120	1:960
吸附後上清液 （2% 雞血球 4°C 30 分）	1:280	1:240
洗離後上清液 （凝量的 1/10，37°C 4 小時）	1:5120	1:3840

用適應的丙型流感 1233 株的尿囊液免疫雞,所得的免疫血清效價相當高。從試驗室的經驗,丙型流感病毒免疫雞所產生的抗體效價較之甲、乙二型為高。

我們曾經做過病毒保存的試驗,適應病毒 50 代之尿囊液放在 4°C 冰箱中。每 1、2、4 和 6 周,各接種尿囊腔測定感染滴度,雞胚感染滴度維持在 $10^{-7.5}$ — 10^{-8} 之間,未看出滴度下降現象。在 -40°C 低溫冰箱中保存九個月後取出。進行雞免疫時,發現感染滴度仍在 10^{-6} 以上。乾燥後保存近半年,活存良好。

將適應病毒株 84 代回種羊膜腔,結果證明該株對羊膜腔的感染能力仍與適應前相同。

流感病毒經過不同宿主或組織傳代,可能發生抗原性的變異^[16,17]。為了瞭解丙型流感 1233 株在雞胚尿囊腔中傳遞了 84 代後,是否發生變異,因此挑選出 46 代 (-40°C 保存九個月) 77 代 (乾燥後六個月) 又傳一代後用來製備雞免疫血清,和原始羊膜腔病毒標準血清進行交互血凝抑制試驗,結果見表 3。

表 3 1233 株尿囊適應的和原株的交互血凝抑制試驗結果

病 毒 血 清	1233—46	1233—77	1233—84	1233	PR ₈	FM ₁	Lee
1233—46	1920	1920	—	1280	—	—	—
1233—77	1600	1920	1120	1600	<10	<10	<10
1233	1280	1600	1600	1920	<10	<10	<10
PR ₈	—	—	<10	<10	320	—	—
FM ₁	—	—	<10	<10	—	960	—
Lee	—	—	<10	<10	—	—	160

註: — 表示未作。

由表 3 說明丙型流感病毒 1233 株雖然在尿囊腔中連續傳遞了 84 代,但它的抗原性還是和原始毒株不能區別的。同時也證明與其他型流感病毒沒有抗原性關係。

為了進一步證實血凝抑制試驗的結果,我們又用 1233—77 病毒和同代血清以及 1233 標準血清分別作中和試驗,結果見表 4。

表 4 1233 適應株的雞胚中和試驗結果

病 毒 血 清	病 毒 稀 釋								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1233—77	0/4	0/4	0/4	0/4					
1233	0/4	0/4	0/4	0/4					
對 照					4/4	4/4	3/3	1/4	0/4

註: 分母為接種胚數;分子為受感染胚數。

結果也證明經過 77 代傳遞的病毒,病毒感染滴度為 $10^{-7.67}$,仍可完全被二個血清所中和。

討 論

根據試驗結果，我們提出幾點討論：

一、培育溫度：1233 株在本試驗室雞胚羊膜腔中傳代是用 $35-36^{\circ}\text{C}$ 培育的，接種雞胚尿囊腔後仍沿用 $35-36^{\circ}\text{C}$ 的孵育箱，直到傳遞 34 代後，在感染效價提高到一定程度時，我們才做了 3 次關於最適培育溫度的試驗。結果仍以 $35-36^{\circ}\text{C}$ 為最適宜。這是否由於病毒經過一個長時期的適應後，習慣在上述溫度下生長繁殖，或者我們的試驗恰巧碰到最適宜的溫度，還不確知。

二、種子液稀釋度：在改變稀釋度時是依據病毒量、感染能力和病毒在雞胚尿囊腔中能大量繁殖為原則，以及參考干擾現象的理論來進行逐代遞加的。常常用數個稀釋度同時接種以作比較，結果往往是高稀釋度比低稀釋度為佳，這可能是由於大量不適應於尿囊腔中生長的病毒存在，產生自家干擾現象。但是稀釋到 10^{-7} 時則大多數沒有 10^{-6} 效價高，這可能因為 10^{-7} 的病毒量過少的緣故，由此，我們認為以 10^{-6} 稀釋為佳，見圖 1。

三、培育時間：適應病毒株 1233 株的最適培育時間，比甲、乙二型以及 1233 原株病毒的時間都要長，這可能和接種病毒的稀釋度有關，因為一般接種雞胚時都採用 10^{-3} 或 10^{-4} ，而在適應病毒 1233 株用 10^{-6} 的稀釋度。但即使如此，1233 適應株病毒繁殖速度還是較甲、乙二型為慢，以 96 小時為適宜。至於雞胚的胚齡問題，9—11 胚都繁殖得很好，由於雞胚在 12—13 日齡尿液最多而且比較清澈，適於試驗材料，因此我們多採用 9 日胚，偶而也用過 10 日的雞胚。

四、尿囊腔適應過程中，血凝效價表現幾乎規律性的曲綫變化，即前一代高後一代低，或者連續 2—3 代高後隨之又有下降趨勢。根據 Taylor 氏 1949 年的報告，1233 株病毒對雞血球的凝集現象是不規則的，我們的試驗結果是否在他報告範疇內，或者和他有所不同地方，目前無法作比較。雖然我們也曾經固定了用一雞的血球作過觀察，也曾同時用 6 隻不同種類的雞的血球作血球凝集試驗，也沒有看出與雞血球有關的情況來。此外繁殖好壞似乎與接種病毒濃度無關，因為在效價低的一代中，所有的幾個接種病毒稀釋度，都表現出效價低的情況。我們也考慮到適應過程中的技術不一致，而使血凝效價表現出曲綫的變化，但我們也曾經嚴格控制技術和條件，甚至還調換試驗人員，但所得到的結果仍舊相同。對這個問題仍應作進一步的探討。

總 結

從我們試驗的結果看出，丙型流感 1233 株是可以在雞胚尿囊腔適應的，但即使適應後由血凝效價來看，不如其他型流感病毒的血凝高或穩定。可能適應還不完全，有進一步研究的必要。

經 84 代適應後能在雞胚尿囊腔中繁殖，病毒對雞胚的感染效價在 $10^{-6}-10^{-8}$ 之間，雞血球凝集效價動盪在 1:40—1:640 之間。

尿液在 4°C 保存 6 周，感染滴度沒有降低，乾燥保存六個月和尿液在 -40°C 保存九個月仍活存良好。

尿囊腔中傳遞了 77 代後檢查一般生物學性狀與抗原性仍與原株病毒無差異。

尿囊腔適應的 1233 株病毒, 用 10^{-6} 稀釋接種傳代, 以 $35-36^{\circ}\text{C}$ 培育 96 小時為宜, 雞胚以 9 日齡為佳。

參 考 文 獻

- [1] Taylor, R. M.: *Amer. J. Publ. Hlth*, **39**: 171, 1949.
- [2] Taylor, R. M.: *Arch. ges. Virusforsch.*, **4**: 485, 1951.
- [3] Francis, T. Jr.: Quilligan, J. J. Jr. & Minuse, E.: *Science*, **112**: 495, 1950.
- [4] Quilligan, J. J. Jr., Minuse, E. & Francis, T. Jr.: *Fed. Proc.*, **10**: 416, 1951.
- [5] Minuse, E. & Davenport, F. M.: *J. Lab. Clin. Med.*, **38**: 747, 1951.
- [6] Minuse, E., Quilligan, J. J. Jr., Francis, T. Jr. and Mich, A. A.: *J. Lab. & Clin. Med.*, **43**: 31, 1954.
- [7] Demeio, J. L., Woolridge, R. L., Whiteside, J. E. & Seal, J. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **88**: 436, 1955.
- [8] Jordan, W. S., Jr. and Oseasohu, P. O.: *J. Immunol.*, **72**: 297, 1954.
- [9] Стык, Б.: *Ж. М. Э. и И.*, **6**: 68, 1955.
- [10] 王濟淵、王植嵩、薛鳳舉: *中華醫學雜誌*, **41**: 324, 1955.
- [11] 張菁、陳玉雲、許健音: *生物製品通訊*, **2**: 80, 1957.
- [12] 閻仲權、朱既明: *中華衛生雜誌*, **2**: 101, 1956.
- [13] 黃元桐、閻仲權、崔慶霜、汪富增: *微生物學報*, **2**: 101, 1954.
- [14] 朱既明、梁榮根、閻仲權: *微生物學報*, **4**: 33, 1956.
- [15] Green, R. H. and Freymann, M. W., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **71**: 476, 1949.
- [16] 尼古勞, 斯, 病毒學(專題講演集), 科學出版社, 53—78, 1956.
- [17] 朱既明, *微生物學譯報*, **3**: 7, 1956.

ADAPTATION OF STRAIN 1233 OF TYPE C INFLUENZA VIRUS TO THE ALLANTOIC CAVITY OF CHICK EMBRYOS

WEN CHUNG-CHUAN, FONG HOEI-ING & TANG FEI-FAN

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

Strain 1233 of type C influenza virus can be adapted to propagate in the allantoic cavity of chick embryos, nevertheless its titre of haemagglutination is low and growth slow and irregular. Further studies are obviously needed to obtain a better adapted strain for purpose of biological preparation.

It could be maintained allantoically in eggs for 84 passages. The titre of infectivity was between 10^{-6} — 10^{-8} , while the haemagglutination titre against chick red cells attained 1:40 to 1:640. The allantoic fluid virus can be kept at 4°C for six weeks, without decrease of infectivity. Allantoic fluid virus survived in lyophilized state for as long as six months, and after storage at -40°C for 9 months.

The adapted strain did not differ from the initial strain in biological and antigenic characteristics after 77 passages in the allantoic cavity.

With strain 1233 adapted to the allantoic cavity of chick embryos, passage can best be carried out by using a dilution of 10^{-6} , incubating at $35-36^{\circ}\text{C}$ for 96 hours. It is preferable to use 9-day embryos.