

# 用組織培養中干擾現象來檢出 流乙腦炎病毒\*

朱 關 福

(中國醫學科學院細菌免疫學系)

## 一. 前 言

早在 1942 年黃氏<sup>[1]</sup>利用雞胚組織塊懸浮培養來培養西方馬腦脊髓炎病毒時,發現該病毒有抑制組織細胞生長的作用。利用這種病毒致細胞病變作用來直接判別組織培養中病毒生長繁殖雖很簡便,但還不能適用於一切病毒的檢查。流乙腦炎病毒在文獻上雖已有對組織細胞引起破壞的報導<sup>[2-4]</sup>,但所得結果難以令人滿意。因之,要判別流乙腦炎病毒在組織培養中生長繁殖,有必要尋找新的識別指標。1943 年黃氏<sup>[5]</sup>報導在鼠腦組織塊培養中聖路易士腦炎病毒或 Jungeblut—Sander 鼠病毒能干擾西方馬腦脊髓炎病毒,其結果使後者破壞組織生長的作用消失;黃氏的實驗給我們指出了一個新的工作方向。最近 Duffy 氏<sup>[6]</sup>又發現了流乙腦炎病毒在大白鼠經鼻腔滴種可以干擾西方馬腦脊髓炎病毒。考慮到聖路易士腦炎病毒與流乙腦炎病毒的相似性及西方馬腦脊髓炎病毒能引起雞胚組織嚴重的破壞作用,決定在本實驗中利用雞胚心肌塊培養以試驗流乙腦炎病毒的干擾作用,從而企圖利用這種干擾現象來間接地證明組織培養中流乙腦炎病毒的生長繁殖。

## 二. 實 驗 器 材

1. 用具的處理:作為懸浮培養,採用 50 毫升三角瓶;而旋轉培養,利用容積約 15 毫升的抗生素小瓶(選擇玻璃質料均勻,可用於顯微鏡下觀察者)。所用玻璃器具皆經清潔液浸泡處理,用清水徹底洗淨,最後並用雙蒸餾水沖洗。新的橡皮用具皆先後地經酸及鹼液處理<sup>[7]</sup>後應用。金屬器具為防止生銹採取乾烤滅菌。

2. 培养基:所用培养基由 85% Hanks 液<sup>[7,8]</sup>、10% 雞胚浸出液(CEE<sub>50</sub>)及 5% 滅活兔血清組成。培养基中含有青黴素 100 單位/毫升及雙氫鏈黴素 200 微克/毫升;培养基的 pH 調整至 7.6—7.8。培养基配出後儲存於 10°C 冷室中(瓶口加翻口橡皮塞),一般在 2 週內用完。雞胚浸出液的製法大體上與 Robbins 氏等所報導的相同<sup>[9]</sup>,但製出的雞胚浸出液加用高速離心沉澱處理,並經冰凍保存 1 星期後再以低速離心沉澱 1 次,才用於實驗,其目的在於盡量除去雞胚浸出液中存在及可能於儲存過程中形成的沉澱物。

\* 指導:張乃初教授。

本實驗中大部分病毒液的製備及其 LD<sub>50</sub> 的測定係由王美芳同志協助,謹誌謝忱。

1957 年 11 月 21 日收到。

3. 鷄血漿及血漿凝固液：血漿由空腹萊亨種鷄心血分得，所用的抗凝劑是 0.05% 肝素溶液，每 17.5 毫升鷄血中加入該溶液 1 毫升。血漿凝固液由 Hanks 液 (pH 7.6 左右) 1 份、鷄胚浸出液 2 份及滅活兔血清 4 份組成。血漿及凝固液皆儲存在冰箱中 ( $2-6^{\circ}\text{C}$ )，應用期為 2—4 週。血漿中加入等量凝固液可在 2 分鐘左右發生凝結。

4. 組織塊：實驗中所用組織塊皆在臨用時由 9—11 天鷄胚 (以 10 天鷄胚為主) 心肌剪出，組織塊的大小約為直徑 1—1.5 毫米，剪成的組織塊應用 Hanks 液洗滌 2—3 次後加入少量培养基 (防止組織塊發生乾燥) 待用。

5. 腦炎病毒：腦炎病毒製自初生 1—2 天感染 (腦內接種) 後瀕死的乳鼠鼠腦，應用培养基配成的鼠腦液皆經高速寒冷離心沉澱後用於實驗 (10,000 轉/分, 60 分鐘)。各株病毒皆作成真空冰凍乾燥材料儲存於低溫冰箱中 ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) 備用，每支乾燥毒種經乳鼠腦內接種傳代 1 次後才用於實驗。

### (一) 流乙腦炎病毒：

(1) 京衛研 A<sub>2</sub> 株——本株病毒由中國醫學科學院在病人腦組織中分得 (1949)。應用時已經鼠腦傳代 33 次；在本實驗中該株病毒的小白鼠 LD<sub>50</sub> 介乎  $10^{-7.33}$ — $10^{-8.33}$ 。

(2) 5607 株——此株病毒由本系在病人腦組織中分得 (1956)。應用時已在小白鼠腦內傳代 4 次；該病毒的小白鼠 LD<sub>50</sub> 介乎  $10^{-6.22}$ — $10^{-7.23}$ 。

(3) 中山株——該株病毒來自美國，傳代次數不詳；在本實驗中小白鼠 LD<sub>50</sub> 介乎  $10^{-7.87}$ — $10^{-9.33}$ 。

(二) 西方馬腦脊髓炎病毒 (WEE) (California 株)——該株病毒亦得自美國，傳代次數不詳。在本實驗中其小白鼠 LD<sub>50</sub> 介乎  $10^{-7.33}$ — $10^{-8.83}$ ；能引起鷄胚心肌成纖維母細胞破壞的最高稀釋度一般為  $10^{-7}$ 。病毒液製出後置於酒精冷槽中迅速凍結，保存於低溫冰箱中，至少在 26 天內病毒滴度無顯著改變。

6. 流乙腦炎病毒免疫血清：免疫血清基本上按 Hammon 氏方法<sup>[10]</sup>製出，其補體結合效價為 1:64。為了除去血清中可能含有某些不耐熱性的抑制物質，使避免發生中和作用的波動；在本實驗中所用免疫血清皆經加熱 ( $56^{\circ}\text{C}$  水箱, 30 分鐘) 處理後應用。

## 三. 基本操作方法

1. 懸浮培養：在斜置的 50 毫升三角瓶中置以鷄胚心肌塊 10—20 塊。加入實驗材料 (如病毒液、免疫血清等) 並置於  $35^{\circ}\text{C}$  水箱中使與組織塊接觸適當時間，然後加入培养基至總量 4 毫升。培養瓶口用翻口橡皮塞塞緊，置於  $35^{\circ}\text{C}$  孵箱中孵育。為了盡量避免組織塊固貼瓶底發生生長，每天用手將瓶振搖幾次。懸浮培養物在培養過程中換取培养基時，先將組織塊用 Hanks 液洗 1 次 (3 毫升)，然後加入新培养基。由懸浮培養移作旋轉培養時亦將組織塊先用 Hanks 液洗 2 次，每瓶懸浮培養物移作二瓶旋轉培養，每瓶懸浮培養物祇用作一次檢查。

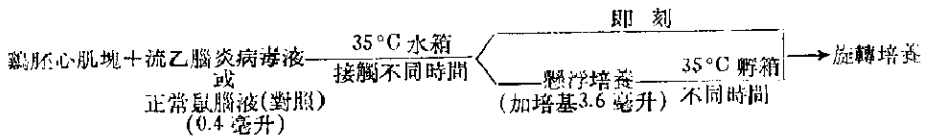
2. 旋轉培養：在斜置的小瓶中，於瓶底一側加入鷄血漿 1 滴，用彎頭滴管放置組織 4 塊於瓶壁上端 1/3 處。在加有血漿處再加以凝固液 1 滴，用扁平圓頭細玻棒迅速將血漿及凝固液混勻後塗佈於瓶壁一側的下端 1/2 處，隨即將組織塊用細玻棒推下至血漿層，並排成一定位置 (見圖 1)。使瓶傾側呈近乎水平狀態，讓血漿及凝固液混合材料流至瓶壁，

迅速旋轉培養瓶，使混合液在帖附組織塊處經過 1 次。隨即將瓶口向上斜置，在室溫中待 10—20 分鐘後加入培养基 1 毫升，塞上翻口橡皮塞，就可置於旋轉鼓上進行培養。旋轉鼓置於 35°C 孵箱中，每小時旋轉速度平均是 10 轉。培養物每天用低倍擴大顯微鏡 (60 ×) 檢查 1 次，前後連續觀察 3 天；檢查內容包括用測微器粗略地測量長出的成纖維母細胞範圍大小及觀察所長出的細胞有無破壞現象。

## 四. 實 驗

### 1. 流乙腦炎病毒對雞胚心肌塊的致細胞病變作用試驗

(一)方法：爲了簡單明瞭，本實驗所用的各項操作步驟，皆採用公式法表示。

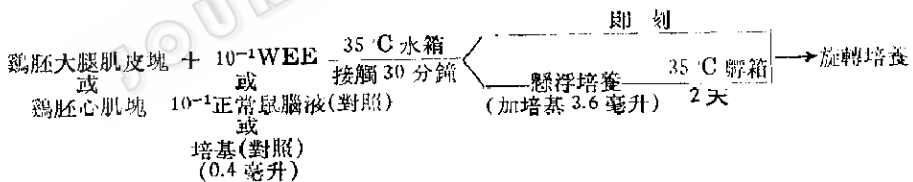


(二)結果：雞胚心肌塊經 3 株流乙腦炎病毒(京衛研 A<sub>2</sub> 株、5607 株、及中山株)以各種方式感染：不同的病毒濃度 ( $3 \times 10^{-2} - 2 \times 10^7$  LD<sub>50</sub>)；不同的接觸時間 (30—100 分鐘)；不同的懸浮培養時間 (0—14 天)；在懸浮培養過程中採取不同方式的置換培养基 (2—4 天換培养基 1 次，有時同時加入相應濃度凍存的病毒液)。以後進行旋轉培養，其結果和對照培養物(組織塊經正常乳鼠腦液作用者)相比較，基本上沒有顯著的區別(見圖 2)。

### 2. 西方馬腦脊髓炎病毒(WEE)對雞胚心肌塊的致細胞病變作用試驗

(一)WEE 病毒對雞胚組織塊破壞作用的試驗：

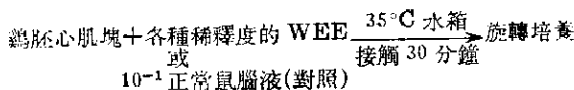
(1) 方法：



(2) 結果：雞胚組織不論僅與  $10^{-1}$  西方馬腦脊髓炎病毒接觸 30 分鐘，或在感染後經過 2 天的懸浮培養，皆不再有生長能力。具體表現在旋轉培養瓶中的感染組織塊四周不再有成纖維母細胞長出(見圖 5)；但感染的心肌塊於旋轉培養初期，仍可能有搏動現象出現。

(二)組織塊對 WEE 病毒破壞作用的敏感性試驗：

(1) 方法：



(2) 結果：實驗共進行 13 次，所得結果基本上是一致的。現舉出一次實驗結果作爲代表示例(表 1)。從表 1 可以看到西方馬腦脊髓炎病毒與組織塊僅需作短時間接觸 (35°C, 30 分鐘)，就可表現出影響生長作用。濃的病毒 ( $>10^{-3}$ ) 能完全抑制組織塊的生

表 1 各種濃度 WEE 病毒對鵝胚心肌塊的作用

WEE濃度 (LD <sub>50</sub> = 10 <sup>-7.5</sup> )	旋 轉 培 養 鏡 檢 所 得		
	第 一 天	第 二 天	第 三 天
10 <sup>-1</sup>	組織塊四周無細胞生長，有搏動	組織塊四周無細胞生長， <sup>††</sup> 無搏動	組織塊四周無細胞生長，無搏動
10 <sup>-3</sup>	組織塊四周無細胞生長，有搏動	組織塊四周無細胞生長， <sup>††</sup> 無搏動	組織塊四周無細胞生長，無搏動
10 <sup>-5</sup>	有少量細胞生長，有搏動	長出細胞全破壞**，無搏動	長出的細胞全破壞，無搏動
10 <sup>-6</sup>	有少量細胞生長，有搏動	大部分長出細胞破壞，無搏動	長出的細胞全破壞，無搏動
10 <sup>-7</sup>	有細胞生長，無搏動	細胞仍少量生長，但出現破壞*；無搏動	細胞不再生長，大部分破壞；無搏動
10 <sup>-9</sup>	有細胞生長，無搏動	細胞繼續生長，有緩慢搏動	細胞繼續生長，無搏動
10 <sup>-11</sup>	有細胞生長，有搏動	細胞繼續生長，有搏動	細胞繼續生長，無搏動
10 <sup>-1</sup> 鼠腦液	有細胞生長，有搏動	細胞繼續生長，有搏動	細胞繼續生長，無搏動

\* 參見圖 3.    \*\* 參見圖 4.    †† 參見圖 5.

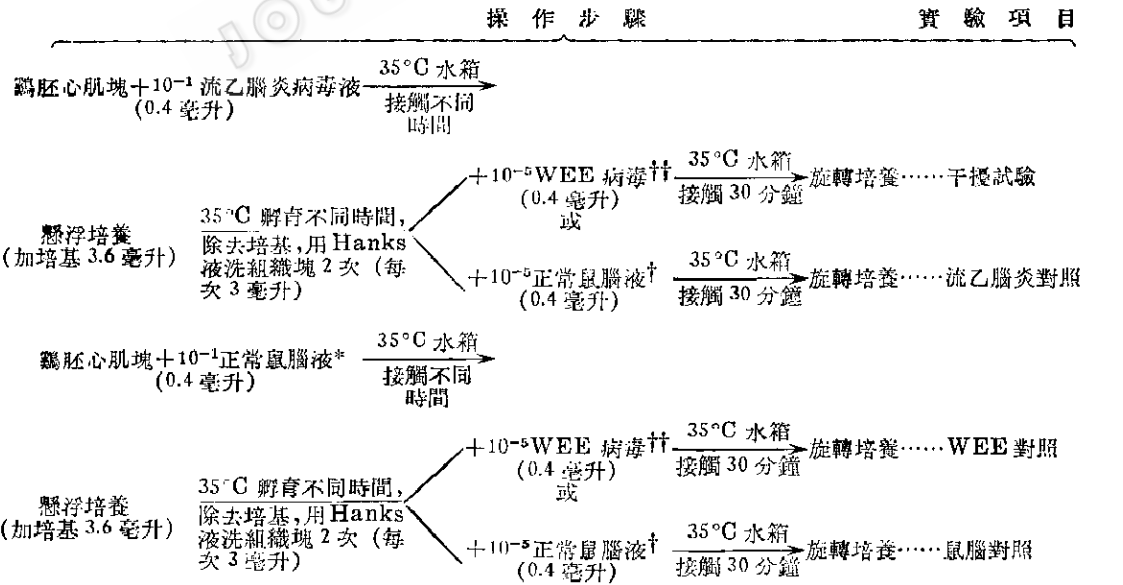
† 此五瓶培養物連續觀察 6 天；10<sup>-1</sup> 及 10<sup>-3</sup> 二瓶中始終未見有細胞長出；另三瓶中破壞的細胞沒有恢復現象，亦無新細胞再度長出。

長(見圖 5)，但組織塊仍可能在培養初期出現搏動；濃度較稀時(10<sup>-5</sup> — 10<sup>-7</sup>) 開始尚允許組織塊有少量細胞長出，但隨着就不再生長，而發生細胞的繼續破壞(全部的或大部分的)(見圖 3、4)；濃度更稀時(<10<sup>-9</sup>) 不能對組織塊生長有明顯的影響作用(見圖 2)。

3. 在組織培養中流乙腦炎病毒對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾作用

在上二個實驗中已證明流乙腦炎病毒不能引起鵝胚心肌塊顯著的破壞作用；而西方馬腦脊髓炎病毒能對該組織引起嚴重的破壞生長現象。本實驗就在這基礎上進行試驗流乙腦炎病毒在組織培養中對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾作用。

(一)方法：



\* 和感染流乙腦炎病毒者屬於同窩乳鼠。  
† 和感染 WEE 病毒者屬於同窩乳鼠。  
†† 採用 10<sup>-5</sup> 濃度是使感染組織塊在旋轉培養 1 天時仍有少量細胞長出，待第二天就發生破壞，如此可以證明所用的組織塊是活的。

(二)結果：三株流乙腦炎病毒(京衛研 A<sub>2</sub> 株、中山株、5607 株)經過適當時間的懸浮培養後，皆有干擾西方馬腦脊髓炎病毒的作用。實驗結果見表 2：

表 2 三株流乙腦炎病毒在組織培養中對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾結果

實驗 次數	流乙腦炎病毒的感染方式				用作被干擾株 病毒 (WEE) 的濃度	干擾試驗 結果
	流乙腦炎病毒株 (濃度 10 <sup>-1</sup> )	病毒的小白鼠 LD <sub>50</sub>	病毒與組織塊 接觸時間	懸浮培養天數		
I	京衛研 A <sub>2</sub> 株		30 分鐘	2, 4, 6	10 <sup>-5</sup>	+
II	京衛研 A <sub>2</sub> 株	10 <sup>-7.33</sup>	40 分鐘	0	10 <sup>-4</sup>	-
					10 <sup>-5</sup>	±
				2	10 <sup>-4</sup>	+
					10 <sup>-5</sup>	+
III	5607 株	10 <sup>-6.5</sup>	60 分鐘	0	10 <sup>-5</sup>	-
				2	10 <sup>-5</sup>	+
IV	5607 株		100 分鐘	0	10 <sup>-5</sup>	-
					10 <sup>-5</sup>	-
				1	10 <sup>-4</sup>	±
				2	10 <sup>-5</sup>	+
V	中山株	10 <sup>-9.33</sup>	30 分鐘	1	10 <sup>-5</sup>	±
				4	10 <sup>-5</sup>	+

註：“+”組織細胞生長無顯著變化(見圖 2)，表示有干擾作用。

“-”組織細胞完全破壞(見圖 4)，表示無干擾作用。

“±”組織塊長出的細胞發生部分破壞(見圖 3)，或部分組織塊長出的細胞發生破壞；表示部分干擾作用。

由表 2 可見干擾現象的出現與否和該二種病毒的量有直接關係：流乙腦炎病毒需經適當時間的懸浮培養才能出現陽性干擾作用；在實驗 II、IV 中可見到，當流乙腦炎病毒量固定時，應用少量的西方馬腦脊髓炎病毒有利於干擾現象的出現。在實驗中所有的對照培養物皆無異常結果發生。

#### 4. 在組織培養中京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒干擾西方馬腦脊髓炎病毒的敏感性

上一實驗的結果說明所用的流乙腦炎病毒皆能對西方馬腦脊髓炎病毒引起干擾作用。本實驗將進一步來觀察這種干擾現象出現的敏感性。

(一)方法：實驗的操作方法基本上和實驗 3 相同，所不同的是：(1)初次接觸組織塊的正常鼠腦液濃度有時採用 10<sup>-2</sup>；(2)採取各種不同濃度的京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒感染組織塊；(3)在懸浮培養過程中每 3—4 天換取培養基 1 次，在換培養基時有時加入相應濃度凍存的病毒液(或正常鼠腦液)，但在少數實驗中不再加入；(4)在一組實驗中鼠腦對照及京衛研株腦炎病毒對照並不在每個實驗中皆做。

(二)結果：實驗共進行了 9 次，茲將 5 次結果列於表 3：

表 3 在組織培養中流乙腦炎病毒京衛研 A<sub>2</sub> 株干擾西方馬腦脊髓炎病毒的敏感性試驗結果

實驗組次	西方馬腦脊髓炎病毒的用量 (MCD)*	京衛研 A <sub>2</sub> 株病毒的用量 (LD <sub>50</sub> )†	京衛研 A <sub>2</sub> 株病毒經過不同天數懸浮培養後 對 WEE 病毒的干擾作用**														
			僅接觸 60分鐘	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
I	10	3×10 <sup>0</sup>			-	±	+	+	+								
		3×10 <sup>1</sup>		-	+	+	+	+	+								
II	10	3×10 <sup>-2</sup>							-	-	-		+				
		3×10 <sup>-1</sup>							-	-	-	+	-	-			
		3×10 <sup>0</sup>						+			+	+	+				
III	100	2×10 <sup>0</sup>				-	±	±	-								
		2×10 <sup>1</sup>				-	+	+									
		2×10 <sup>2</sup>		±	+	+											
		2×10 <sup>3</sup>		±	+												
		2×10 <sup>4</sup>		+	+												
		2×10 <sup>5</sup>	-	+													
IV	100	3×10 <sup>-2</sup>							-	-	-	-	-	-	-	-	
		3×10 <sup>-1</sup>							-	-	-	-	-	-	-	-	-
V††	100	2×10 <sup>0</sup>						-	-	+	+	+	-	+	+		
		2×10 <sup>1</sup>				±	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		2×10 <sup>4</sup>		-	+	+	+	+	+	★	+	★	+	+	+	+	

\* 能引起雞胚心肌成纖維母細胞發生破壞的最高稀釋度。

† 腦內接種小白鼠 (3 週大小, 接種量 0.03 毫升), 觀察 14 天的結果。

★ 移種至旋轉培養的組織塊未生長 (見圖 5)。

†† 本組實驗在懸浮培養過程中每 4 天換培养基 1 次, 換培养基時不再加入病毒液; 其它 4 組實驗皆採取每 3 天換培养基 1 次, 同時加入相應濃度凍存的病毒液。

\*\* 符號的表示同表 2。

在實驗 3 中已提到過干擾的出現與二種有顯抗性的病毒量有着密切關係; 亦就是說, 干擾株病毒量愈大或被干擾株量愈小, 則愈易形成干擾現象。在表 3 中更可以清楚地看到這一點。接種的京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒量愈大, 則所需懸浮培養時間就可縮短; 當病毒接種量達 200 LD<sub>50</sub> 以上, 有時祇需經過 1 天懸浮培養就能部分地干擾 100 MCD 的西方馬腦脊髓炎病毒。0.3 及 0.03 LD<sub>50</sub> 的京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒相應地經過 11 及 14 天的懸浮培養並不能對 100 MCD 的西方馬腦脊髓炎病毒發生干擾作用; 但對 10 MCD 的病毒却能相應地經過 8 及 10 天的培養就出現了陽性干擾作用。

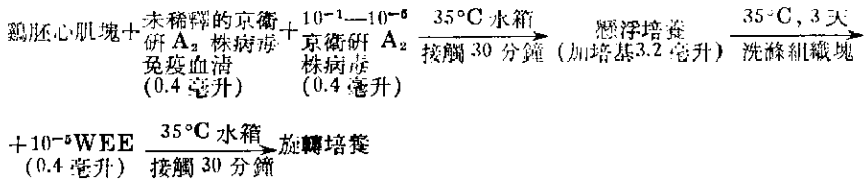
在實驗組 V 可見到即使接種少量流乙腦炎病毒 (2 LD<sub>50</sub>), 且在培養第 9 天時已經 2 次調換培养基及 4 次洗滌組織塊, 但仍能出現干擾西方馬腦脊髓炎病毒現象, 這可以說明干擾作用的發生主要依賴於組織塊中的病毒量。

0.03 LD<sub>50</sub> 的京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒能干擾 10 MCD 的西方馬腦脊髓炎病毒的初步實驗結果，又給我們提供了一項材料，說明組織培養要較動物接種來得敏感些。

### 5. 在組織培養中京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒干擾西方馬腦脊髓炎病毒的特異性

本實驗(干擾抑制試驗，亦即是一種組織培養中的中和試驗)在於要證明組織培養中流乙腦炎病毒對西方馬腦脊髓炎病毒(WEE)的干擾作用是一種特異性現象。

#### (一)方法：



(二)結果：實驗共進行 5 次，所得結果基本上是一致的。京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒免疫血清能抑制京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒的干擾西方馬腦脊髓炎病毒作用，其結果在旋轉培養中出現組織細胞的破壞現象(見圖 4)。為了避免實驗發生假陽性或假陰性結果，在實驗中曾加入了各種必要的對照培養物：免疫血清(正常鼠腦的、病毒的)及正常鼠腦液沒有破壞組織細胞的作用；正常鼠腦免疫血清不能抑制干擾現象；所用流乙腦炎病毒無破壞細胞作用，但能引起干擾現象(以上排除了可能出現的假陽性結果)；免疫血清沒有抑制西方馬腦脊髓炎病毒破壞組織細胞的作用；所用的西方馬腦脊髓炎病毒能够引起細胞的破壞(以上排除了可能出現的假陰性結果)。實驗結果說明了干擾現象是特異性的，相應的免疫血清能抑制病毒的干擾作用。

## 五. 討 論

本實驗中應用低倍鏡檢，未能發現流乙腦炎病毒對雞胚心肌塊長出的成纖維母細胞有恆定的、顯著的破壞作用。雖然在實驗過程中曾出現 5607 株及中山株病毒有偶而引起細胞破壞的現象，不過未能得到重複結果，難以作為可靠的陽性材料。由於影響病毒致細胞病變作用的因素相當複雜<sup>[4, 11-22]</sup>，因之本實驗的結果祇能說明在我們的實驗條件下，3 株流乙腦炎病毒不能對雞胚心肌成纖維母細胞有破壞作用；但不能否定一切流乙腦炎病毒株皆不能破壞雞胚心肌成纖維母細胞；亦不能否定流乙腦炎病毒對其它細胞引起病變的可能性。如要進一步來探究流乙腦炎病毒的致細胞病變作用，採取更多株的病毒、不同種的組織細胞及各種培養條件來繼續進行試驗是必要的。

利用流乙腦炎病毒對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾作用，不僅可以間接地測量前者在組織培養中生長繁殖，且似較應用動物接種來得敏感性。1950 年 Henle 氏已提出反複接種干擾株病毒易於引起干擾現象<sup>[23]</sup>；1952 年 Duffy 氏<sup>[6]</sup>用實驗證明大白鼠經反複感染流乙腦炎病毒易於對西方馬腦脊髓炎病毒發生抵抗作用。在本實驗中為了希望能夠增加實驗的敏感性，主要採用反複感染組織塊的方式。考慮到可能用於檢查臨床標本時難以取得連續數次的新鮮檢材；因之在本實驗中，重複感染時是應用凍存的材料進行。在實驗結果中不能發現反複感染有優於一次感染的現象。

，Ledinko 氏等在實驗中發現即使用很高量的脊髓灰白質炎病毒 WS 株及很小劑量

的 Y-SK 株病毒,如二者同時接種僅能引起部分干擾現象<sup>[24]</sup>。在本實驗中應用高至  $2 \times 10^5$  LD<sub>50</sub> 的流乙腦炎病毒,如僅與組織塊接觸 60 分鐘,仍不能引起對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾作用。這說明干擾作用不單決定於病毒量,要使干擾現象出現還需有一定長的時間隔期以待組織細胞發生抵抗性。

在本實驗中可以看到,當接種的干擾株病毒量微少時(接近於一個 LD<sub>50</sub>),干擾現象的出現並不穩定;因之要得到敏感而又可靠的結果,在實驗方法上還需加以改進。

利用西方馬腦脊髓炎病毒作為被干擾株有它一定的優點。該病毒能嚴重地引起組織細胞的破壞,易於明顯地判別結果。但因西方馬腦脊髓炎病毒對人畜皆可引起嚴重疾病,在國內還未肯定地發現過該病毒,要在實驗室中廣泛應用是存在着一定程度的危險性。為了能達到普遍使用,就必需繼續選擇危害不大或最好是對人沒有致病性的,但對細胞有顯著破壞作用的病毒來作為被干擾株。

流乙腦炎病毒除了對西方馬腦脊髓炎病毒有干擾作用外,還發現有抑制流感病毒<sup>[25, 26]</sup>、腮腺炎病毒<sup>[27]</sup>、新城雞瘟病毒<sup>[28]</sup>及脊髓灰白質炎病毒<sup>[31]</sup>的作用。在這四個病毒中值得最先注意的是新城雞瘟病毒及脊髓灰白質炎病毒。前者對人祇有輕微的致病力<sup>[29]</sup>,而在組織培養中已發現對雞胚組織有破壞作用<sup>[16, 30-32]</sup>;但其破壞程度略差於西方馬腦脊髓炎病毒。脊髓灰白質炎病毒已有無毒株可供應用,而該病毒仍具有致細胞病變的作用<sup>[33]</sup>;不過這項實驗,目前還不能在雞胚組織培養中進行。[附註]

我們認為,利用組織培養中干擾現象以間接地識別病毒存在或繁殖的方法,來測定在組織培養中還缺乏合適的直接識別指標的病毒是一種值得試用的有利工具。此外,從理論方面來看,利用組織培養,可能更有利於闡明干擾作用的機制問題。因為動物機體具有各種防禦反應會對干擾現象發生混淆。目前公認為較合理的酵素阻斷或競爭學說<sup>[23]</sup>,如能應用較易控制實驗條件的組織培養來進行研究,就更有希望較順利地得到最後證實或否定。

## 六. 總 結

1. 雞胚心肌塊經 3 株流乙腦炎病毒(京衛研 A<sub>2</sub> 株, 5607 株及中山株)以各種方式感染(不同的病毒濃度、不同的接觸時間及不同的懸浮培養時間)後,在移種於旋轉培養中,連續 3 天應用 60 倍擴大鏡檢,不能發現有細胞破壞現象。

2. 西方馬腦脊髓炎病毒對雞胚心肌塊有嚴重破壞作用。濃的病毒能完全抑制組織塊的生長;濃度較低時,開始仍能讓組織塊長出細胞,但隨即發生不可恢復性的破壞現象。

3. 適量的 3 株流乙腦炎病毒皆能在雞胚心肌塊組織培養中干擾西方馬腦脊髓炎病毒破壞細胞作用。干擾現象出現與所用的二種韻抗性病毒量有關:干擾株病毒量愈大或被干擾株病毒量愈小,則愈易形成干擾現象。初步實驗結果證明利用干擾現象以檢查流乙腦炎病毒似較應用小白鼠腦內接種來得敏感些(0.03 LD<sub>50</sub> 的京衛研 A<sub>2</sub> 株病毒仍能對 10 MCD 的西方馬腦脊髓炎病毒發生干擾作用)。應用組織培養的中和試驗說明干擾現象

[附註] 本文寫就後不久;Dunham 氏等報導了三型脊髓灰白質炎病毒皆能在雞胚絨毛尿囊膜細胞培養中繁殖,且引起細胞病變。(Dunham W. B. et al.: Propagation of Poliovirus in Chick embryo cell cultures; *Proc. Soc. exp. Biol. & Med.* **95**: 637, 1957.)



是特異性的。

4. 討論了利用流乙腦炎病毒對西方馬腦脊髓炎病毒的干擾作用來判定前者在組織培養中生長繁殖的價值，指出它是有希望改進診斷工作的。利用組織培養來研究干擾現象的機制問題，亦值得引起注意。

### 參 考 文 獻

- [1] Huang C. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **51**: 396, 1942.
- [2] Scherer W. F. et al.: *Amer. J. Pathol.*, **30**: 1057, 1954.
- [3] Mason H. C.: *Growth of Jap. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, **15**: 602, 1956.
- [4] McCollum R. W. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**: 556, 1957.
- [5] Huang C. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **54**: 158, 1943.
- [6] Duffy C. E. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**: 154, 1952.
- [7] Weller T. H. et al.: *J. Immunol.*, **69**: 645, 1952.
- [8] Hanks J. H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**: 196, 1949.
- [9] Robbins F. C. et al.: *J. Immunol.*, **69**: 673, 1952.
- [10] Hammon W. McD. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **66**: 113, 1947.
- [11] Enders J. F.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **8**: 473, 1954.
- [12] Takemoto K. K. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**: 179, 1957.
- [13] Lynn J. W. et al.: *Arch. Path.*, **57**: 301, 1954.
- [14] Ivanovics G.: *Acta Microbiol. Acad. Science, Hung.*, **3**: 159, 1955.
- [15] Wenner H. A.: *Ann. N. Y. Acad. Soc.*, **61**: 840, 1955.
- [16] Bang F. B.: *J. Bact. Path.*, **73**: 321, 1957.
- [17] Weller T. H. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**: 124, 1948.
- [18] Taylor C. E.: *J. Immunol.*, **71**: 125, 1953.
- [19] Chambers V. C.: *Virology* **3**: 62, 1957.
- [20] Rowe W. P. et al.: *Amer. J. Hyg.*, **61**: 197, 1955.
- [21] Enders J. F. et al.: *Amer. J. publ. Hlth.*, **47**: 275, 1957.
- [22] Monaci V. et al.: *Boll. Ist. Sieroter., Milan.*, **35**: 294, 1956.
- [23] Henle W.: *J. Immunol.*, **64**: 203, 1950.
- [24] Ledinko N. et al.: *J. Exp. Med.*, **100**: 247, 1954.
- [25] Nagaki D. et al.: *Kitasato Arch. Exp. Med.*, **27**: 9, 1954.
- [26] Tusjimoto N.: *Virus*, **3**: 51, 1953.
- [27] Tusjimoto N.: *Virus*, **4**: 53, 1954.
- [28] Tusjimoto N.: *Virus*, **4**: 49, 1954.
- [29] Thompson Jr. C. H.: *Milit. Surg.*, **106**: 276, 1950.
- [30] Dulbecco R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **38**: 747, 1952.
- [31] Goldwasser R. et al.: *Amer. J. Vet. Res.*, **18**: 390, 1957.
- [32] Fastier L. B.: *J. Immunol.*, **72**: 341, 1954.
- [33] Sabin A. B.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **33**: 17, 1957.

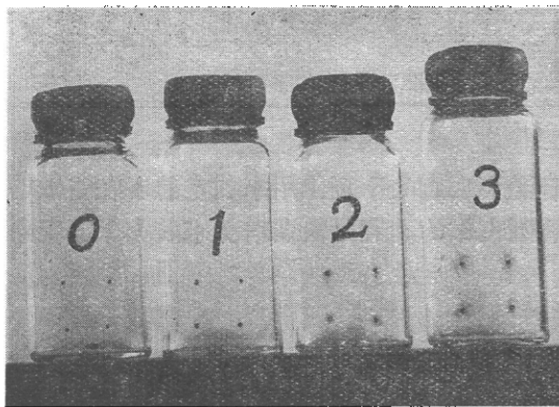


圖 1. 正常雞胚心肌塊的旋轉培養物  
(龍胆紫—複紅染色)

瓶中深色小點是接種的雞胚心肌塊，在右側二瓶的小點四周可見到由纖維母細胞所組成的淡色圈(圈上缺陷處是染色時所致的人工損壞)。

0—培養前(無細胞生長)

1—培養 1 天(長出的細胞圈平均寬度約  $300\mu$ )

2—培養 2 天(長出的細胞圈平均寬度約  $800\mu$ )

3—培養 3 天(長出的細胞圈平均寬度約  $1800\mu$ )

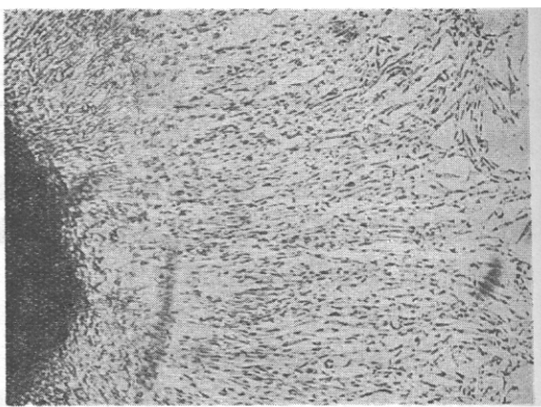


圖 2. 雞胚心肌塊旋轉培養 2 天的鏡檢  
結果—正常生長  $60\times$

可見於：正常的組織塊，經正常鼠腦液處理的組織塊，經流乙腦炎病毒感染組織塊，陽性的干擾試驗結果，陰性的干擾抑制試驗結果，感染濃度很稀的西方馬腦脊髓炎病毒的組織塊。



圖 3. 雞胚心肌塊旋轉培養 2 天的鏡檢結果——部分細胞破壞  $60\times$

可見於：干擾試驗或干擾抑制試驗的可疑結果，感染濃度較稀的西方馬腦脊髓炎病毒的組織塊。

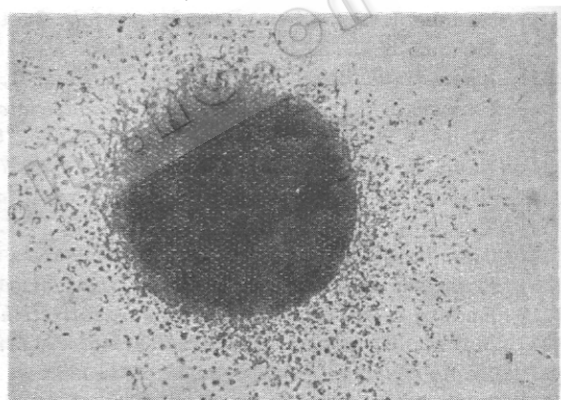


圖 4. 雞胚心肌塊旋轉培養 2 天的鏡檢結果——全部細胞破壞  $60\times$

可見於：感染較濃西方馬腦脊髓炎病毒的組織塊，陰性干擾試驗結果，陽性干擾抑制試驗結果。

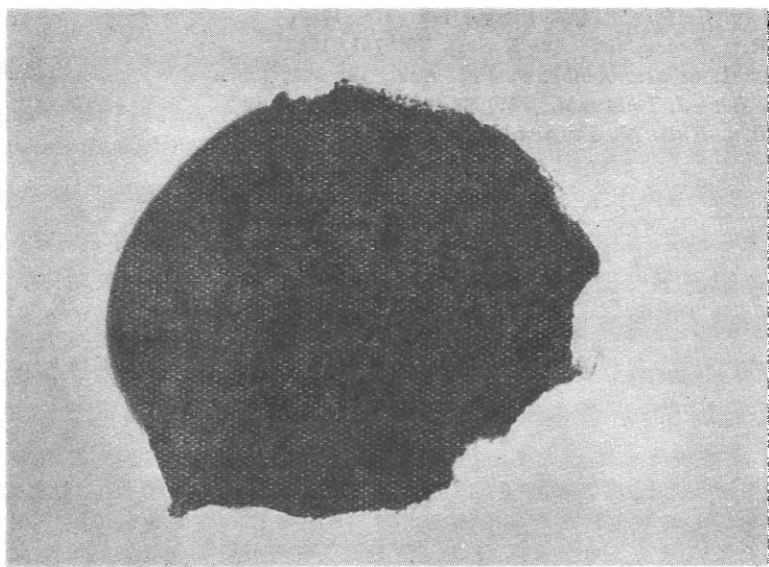


圖 5. 雞胚心肌塊旋轉培養 2 天的鏡檢結果 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

# THE APPLICATION OF THE INTERFERENCE PHENOMENON IN THE TISSUE CULTURE FOR THE DETECTION OF THE JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

CHU GUAN-FU

*(Department of the Bacteriology & Immunology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)*

1. The heart muscle fragments of the chick embryo were infected by 3 different strains of the Japanese B encephalitis virus (PA2 strain, 5607 strain, and Nakayama strain) in the following manners: different dilutions of the viruses; different duration of contact between the virus and the tissue fragments; and different duration of the suspended culture. Then the infected tissues were transplanted to the roller culture and examined for 3 successive days with low-power microscopy ( $60\times$ ). No obvious cell destruction has been observed.

2. The western equine encephalomyelitis virus showed highly destructive activity against the heart muscle of the chick embryo. The concentrated virus suspension thoroughly inhibited the growth of the tissue fragments. While diluted to less than  $10^{-3}$ , the fibroblasts seen at the beginning, were destroyed after 24 hours.

3. With appropriate dilution the 3 strains of the Japanese B encephalitis virus used were all able to interfere with the cell destruction of the western equine encephalomyelitis virus. The appearance of the interference phenomenon depends on the quantity of the kinds of the viruses: The more the inoculum of interfering virus, or the less the interfered virus, the more frequently the interference phenomenon occurs. Our preliminary results seemed to indicate that the interference phenomenon in the tissue culture used for detection of the Japanese B encephalitis virus was more sensitive than that of the mouse brain inoculation. The neutralization test in the tissue cultures proved the specificity of the interference phenomenon.

4. The practical application of this method to recognize the multiplication of the virus and to study its mechanism were briefly discussed.