

# 流行性乙型脑炎病毒的变异

## II. 不同毒株通过鸡胚組織培养后的毒力变异\*

李河民 俞永新 季淑蓉 武佩芬

(卫生部药品生物制品检定所)

在前一报告<sup>[1]</sup>中,我們叙述了 P<sub>3</sub> 毒株通过鸡胚悬浮組織块长期培养后对小白鼠神經外途径感染力有显著的降低,但对小白鼠的脑腔毒力則未減弱。由于乙型脑炎病毒不同毒株之間生物学特性有显著差异,如 P<sub>3</sub> 株的神經外感染力較 SA<sub>4</sub>、Lm 株高;而 SA<sub>4</sub> 株对小白鼠的发病潛伏期及病程較 P<sub>3</sub> 及 Lm 株短;因此,在測定疫苗交叉保护力試驗时 SA<sub>4</sub> 株較 P<sub>3</sub> 及 Lm 株难于被保护<sup>[2]</sup>。另外,不同毒株在实验室内經小白鼠脑腔传递代数亦各不相同,如 P<sub>3</sub> 及 SA<sub>4</sub> 株传代次数較多,而 Lm 株仅于小白鼠脑內传 4 代。因此,为了观察不同特性及不同传递代数的毒株在鸡胚組織培养传代中所发生的毒力变异,以便寻找該病毒变异的某一些規律,我們除繼續对 P<sub>3</sub> 株进行传代外,又对 SA<sub>4</sub> 及 Lm 株进行了研究比較,現将研究結果报告如下。

### 一、材料和方法

(一) 病毒 用 P<sub>3</sub>、西安<sub>4</sub>(SA<sub>4</sub>)、李博明(Lm)三个毒种进行传代,該三株的分离及其性質已經有文章发表,本試驗开始时, P<sub>3</sub> 株已經小白鼠脑內传递 66 代, SA<sub>4</sub> 株 57 代, Lm 株 4 代。

(二) 組織培养及病毒传代 鸡胚悬浮組織块培养法传代病毒制备方法已于前文述及。不同之处为在后期的传代中,营养液內兔血清及鸡胚浸出液量減半, Tyrode 氏液用 Hanks 氏液代替。培养温度分为二組,即 36—37℃ 及 40—41℃,前者培养 3—5 天,后者培养 2—3 天。培养后将培养液及組織块吸出研碎后,以原液(10<sup>-6</sup>)传代。

(三) 毒力測定 在培养过程中取不同代数病毒材料分別用不同途径在不同体重小白鼠及乳鼠(12—15 天)进行毒力測定。10—12 克小白鼠脑腔及皮下注射量为 0.03 毫升;乳鼠脑腔注射 0.02 毫升,皮下 0.03 毫升;7—9 克小白鼠皮下,腹腔注射量均为 0.3 毫升。病毒稀释液为含 2% 兔血清的 Tyrode 氏或 Hanks 氏液。脑腔及乳鼠皮下組观察 14 天,其余均观察 21 天,按 Reed 和 Muench 氏法計算毒力(LD<sub>50</sub>)。

个别試驗用鸡胚单层細胞測定病毒量。細胞的制备方法取 9—10 天鸡胚按 Dmlbecco 氏<sup>[3]</sup>胰酶消化法制成每毫升含 60 万細胞的悬液。將該悬液分装于鏈霉素小瓶中,每瓶 1 毫升,放于 37℃ 培养 48 小时,細胞成单层后即可用于測定。毒力滴定时,先傾掉生长液,按每管加入不同稀释度病毒 0.5 毫升,每稀释度接种 2 管,接触一小时后,吸去 0.4 毫升,

\* 本文 1962 年 6 月 25 日收到。

存留 0.1 毫升,再加入 199 綜合培养基<sup>[4]</sup> 0.9 毫升,作为細胞維持液。将培养管放于 37℃ 培养 2 天后吸出液体部分,按每稀释度脑腔接种 4 只小白鼠。观察其存亡結果。

## 二、結 果

### (一) 不同毒种不同培养代数对小白鼠不同途径感染的毒力变化

将 P<sub>3</sub> 株在 37℃ 內連續培养 237 代,另一組自 138 代后放于 41℃ 培养 119 代共計 257 代; Lm 株在 37℃ 內連續培养 210 代; SA<sub>4</sub> 株在 37℃ 培养 138 代,另一組自 29 代开始放于 41℃ 培养 239 代,从开始起經組織培养传代,共計 267 代。在滴定毒力时为使病毒材料的培养条件一致,原在 41℃ 传代者均經 37℃ 培养 1 代后方进行滴定。

现将以上三个毒株不同培养代数在小白鼠体内不同途径感染的毒力結果,分別列于表 1、2、3。

表 1 P<sub>3</sub> 株在雞胚組織培养傳代后不同代数对小白鼠的毒力比較

培养温度 (°C)	代 数	不同年齡小白鼠,不同途径的毒力 (LD <sub>50</sub> )					
		10—12 克的小白鼠		7—9 克的小白鼠		12—15 天乳齡的小白鼠	
		脑 腔	皮 下	腹 腔	皮 下	脑 腔	皮 下
37	1*	5.17(5.5)	1.23	(5.00)	(4.35)	5.0	4.5
	50	5.5	2.8	—	—	5.5	4.33
	100	5.0	<0.62	—	—	5.5	1.2
	102	4.67	—	2.48	0.70	—	—
	170	5.0	<0.6	—	—	5.0	2.23
	230	6.5	—	2.65	1.42	6.0	3.29
41	169	6.00	<0.6	—	—	6.33	2.67
	201	5.33	<0.6	—	<0.6	4.5	2.34
	220	6.17	—	2.52	1.44	5.67	3.58

\* 对第一代培养进行了二次毒力滴定。

注:表中数字为 LD<sub>50</sub> 的負倒数,“<0.6”表示 10<sup>-1</sup> 以上的稀释度組小鼠全未死亡,而 10<sup>0</sup> 組試驗未作,“—”表示未作試驗。

表 2 Lm 株在雞胚組織培养傳代后不同代数对小白鼠的毒力比較

培养温度 (°C)	代 数	不同年齡小白鼠,不同途径的毒力 (LD <sub>50</sub> )					
		10—12 克的小白鼠		7—9 克的小白鼠		12—15 天乳齡的小白鼠	
		脑 腔	皮 下	腹 腔	皮 下	脑 腔	皮 下
37	1	5.17(4.67)	2.0	(2.7)	(3.37)	5.17	4.37
	10	5.5	1.68	—	—	5.5	2.65
	30	4.75	2.17	—	—	5.23	2.62
	40	6.0	1.45	—	—	5.67	—
	59	6.0	0.81	—	—	5.5	1.86
	79	5.67	0.63	—	—	—	2.58
	156	5.5	—	1.14	0.14	—	1.50
	189	5.0	<0.0	1.62	0.12	—	—

注:同表 1。

表 3 SA<sub>4</sub> 株在鸡胚组织培养传代后不同代数对小白鼠的毒力比较

培养温度 (°C)	代 数	不同年龄的小白鼠,不同途径的毒力(LD <sub>50</sub> )					
		10—12 克的小白鼠		7—9 克的小白鼠		12—15 天乳龄的小白鼠	
		脑 腔	皮 下	腹 腔	皮 下	脑 腔	皮 下
37	1	5.23(5.5)	(1.60)	2.54	1.29	—	2.87
	10	5.5	1.29	—	—	5.00	3.00
	39	4.67	≤0.88	—	—	5.5	2.7
	99	5.33	—	—	—	5.5	1.22
	138	6.5	—	1.35	<0.6	6.5	≤0.57
41	72	5.33	≤0.60	—	—	—	—
	143	5.5	—	0.75	≤0.57	5.5	≤0.57
	158	5.77	—	1.31	0.0	—	0
	181	3.67	—	<0.0	0	—	0
	194	3.77	—	—	—	—	—
	200	2.50	—	0	0	—	0
	214	4.33	—	0	0	—	—
	254	4.17	—	0	0	—	—

注：同表 1。

从表 1、2、3 可看出,三个毒株无论在 37℃ 或 41℃ 长期培养达 50—100 代以后,对小白鼠的神经外毒力均有显著下降,如以神经内与神经外(腹腔、皮下)毒力的差距来看(表 4),则第一代的差距显然较传代后毒株的差距小。三个毒株之间原来差距大的 SA<sub>4</sub> 株即原神经外毒力低的毒株,经连续传代后仍然比神经外毒力高的 P<sub>3</sub> 和 Lm 株的差距大,

表 4 第一代与通过鸡胚组织培养长期传代后病毒神经内与神经外毒力差距总表

毒株	传代温度 (°C)	代 数	毒 力 差 距			
			10—12克的小白 鼠脑腔与10—12 克的小白鼠皮下 (0.03ml)	10—12克的小白 鼠脑腔与7—9 克的小白鼠腹腔 (0.03ml)	10—12克的小白 鼠脑腔与7—9 克的小白鼠皮下 (0.03ml)	10—12克的小白 鼠脑腔与乳鼠皮 下(0.03ml)
P <sub>3</sub>	37	1	3.94	0.5	1.15	0.67
		230(170)	(>4.4)	3.87	5.08	3.21
		差距之差	>0.46	3.37	3.93	2.54
	41	220(201)	(>4.63)	3.65	4.73	2.59
		差距之差	0.69	3.15	3.58	1.92
Lm	37	1	3.17	1.97	1.30	0.83
		189(156)	5.00	3.38	3.88	—(4.00)
		差距之差	1.83	1.41	2.58	3.17
SA <sub>4</sub>	37	1	3.90	2.69	3.94	2.36
		138	—	5.15	>5.9	>5.83
		差距之差	—	2.46	>1.96	3.47
	41	254(158)	—	4.17	4.17	(5.77)
		差距之差	—	1.48	0.23	3.41

注：( )内 Log LD<sub>50</sub> 为同一行前( )内代数的毒力。

表明前者易丧失其皮下和腹腔毒力。如表 3 所示, SA<sub>4</sub> 株自 158 代开始对乳鼠皮下已无致病力, 自 181 代开始对 7—9 克的小白鼠的腹腔毒力下降至 0—0.20, 即以未稀释的病毒神经外注射小鼠时仅有个别小鼠死亡或全部不死亡。但其他株在 150 代以后, 对乳鼠皮下毒力仍然保持较高。

嗜神经性病毒的变异中, 神经内致病性的改变具有更重要的意义, 从表 1 和表 2 可看出, P<sub>3</sub> 株和 Lm 株的脑腔毒力始终保持一定的高滴度。但表 3 列举的结果表明, SA<sub>4</sub> 株通过鸡胚悬浮组织培养后对小白鼠的脑腔毒力有所下降。在传代 158 代前对小白鼠的脑腔毒力未发生变化, 一般在 5.5 左右; 但是自 181 代以后发现病毒对小白鼠的脑腔毒力有明显的下降, 一般均波动在 2.50—4.5 之间。并伴有生存时间的显著延长 (表 5)。在个别

表 5 “SA<sub>4</sub>” 株在鸡胚组织传代后不同代数对小白鼠脑腔感染自接种至死亡时间比较

病毒稀释度	不同培养温度, 不同代数小白鼠自接种至死亡时间(天)											
	37℃					41℃						
	1	10	54	99	138	143	158	181	214	249	253	254
10 <sup>-2</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—	8—10	—	8—9	8—16
10 <sup>-3</sup>	—	4—7	5—7	6—8	6—7	6—10	6—7	6—10	8—11	9—14	8—11	10—12
10 <sup>-4</sup>	—	6—7	6—7	7—11	6—7	6—8	7—8	12	10	8—11	10	10—11
10 <sup>-5</sup>	6—7	6—7	7—8	6—8	6—14	6—9	8—9	无发病	无发病	8—10	无发病	无发病
10 <sup>-6</sup>	无发病	无发病	无发病	无发病	7—10	无发病	8	无发病	—	—	—	—
毒力 (LD <sub>50</sub> )	5.5	5.5	5.0	5.33	6.5	5.5	5.77	3.67	4.33	5.0	3.77	4.17

代数中, 虽然脑腔毒力无甚下降, 但小白鼠的生存时间却仍有所延长, 如以第 249 代与第 10 代滴定结果比较, 脑腔毒力水准虽然均很接近 (5.0—5.5), 但死亡时间则前者比后者在 10<sup>-3</sup> 组内延长 5—7 天, 10<sup>-4</sup> 组内延长 2—4 天。10<sup>-5</sup> 组内延长 2—3 天。在 P<sub>3</sub> 及 Lm 株的后期传代培养中则未发现注射病毒后引起小白鼠生存时间的延长。

分析 P<sub>3</sub> 株及 SA<sub>4</sub> 株 138 代前的培养温度与神经内和神经外毒力的变化, 看不出有一定的关系。SA<sub>4</sub> 株 158 代后 41℃ 组内脑腔毒力发生变化, 但是由于缺乏 37℃ 组的材料, 因此该株病毒对小白鼠脑腔毒力的下降与培养温度是否有关, 尚难于肯定。

为了在滴定 SA<sub>4</sub> 传代株毒力时, 排除培养条件影响病毒毒力的因素, 我们另以 SA<sub>4</sub> 原毒株为对照, 用同一批组织培养基在同一试验条件下培养 SA<sub>4</sub> 传代株并同时滴定, 以比较二者之间的毒力。试验反复 6 次, 现将结果列表于 6。

表 6 SA<sub>4</sub> 原株与传代株在鸡胚组织培养后对小白鼠的脑腔毒力

次 别	原 株		传 代 株		二者之差 (对数差数)
	代 数	毒 力	代 数	毒 力	
1	1	5.33	194	3.77	1.56
2	1	5.0	214	3.0	2.00
3	1	6.5	252	3.50	3.00
4	2	5.23	253	3.50	1.73
5	1	6.0	254	4.75	1.25
6	1	6.4	255	4.75	1.65

从表 6 的结果可见, SA<sub>4</sub> 原毒种与传代株在同一组织培养条件下培养后, 后者对小白鼠的脑腔毒力较前者低 1—3 个 LD<sub>50</sub>。

在使小白鼠脑腔毒力降低后, 为了进一步比较该传代株和原株在鸡胚悬浮组织内繁殖后的病毒量, 我们又采用了另一滴定方法, 即在小白鼠脑腔滴定同时, 将每一稀释度病毒接种于鸡胚单层细胞内, 经培养 2—3 天, 使病毒增殖后, 再分别地注射小白鼠脑腔, 根据小白鼠生死数计算 LD<sub>50</sub> (以 CE<sub>1</sub> LD<sub>50</sub> 表示), 现将结果列于表 7。

表 7 SA<sub>4</sub> 原株与传代株组织培养后新鲜病毒与经鸡胚单层细胞增殖一代后病毒对小白鼠脑腔毒力比较

病毒稀释度	传代株 (200 代)		原株 (1 代)		传代株 (212 代)		原株 (1 代)	
	当时毒力	CE <sub>1</sub> LD <sub>50</sub>	当时毒力	CE <sub>1</sub> LD <sub>50</sub>	当时毒力	CE <sub>1</sub> LD <sub>50</sub>	当时毒力	CE <sub>1</sub> LD <sub>50</sub>
10 <sup>-1</sup>	—	—	—	—	6/6	4/4	6/6	4/4
10 <sup>-2</sup>	4/4	—	4/4	—	6/6	4/4	6/6	4/4
10 <sup>-3</sup>	0/4	4/4	4/4	4/4	2/5	4/4	6/6	4/4
10 <sup>-4</sup>	0/4	4/4	4/4	4/4	1/6	4/4	6/6	4/4
10 <sup>-5</sup>	0/4	0/4	2/4	4/4	0/6	4/4	2/6	4/4
10 <sup>-6</sup>	0/4	0/4	1/4	0/4	0/6	4/4	0/5	1/4
10 <sup>-7</sup>	—	0/4	—	0/4	—	—	—	0/4
脑腔毒力 LD <sub>50</sub>	2.5	4.5	5.23	5.5	3.0	6.5	4.75	5.67
二次毒力之 对数差数	2.0		0.27		3.5		0.92	

注: 分母示接种鼠数;  
分子示死亡鼠数。

从表 7 的结果可见, SA<sub>4</sub> 传代株对小白鼠的脑腔毒力 (LD<sub>50</sub>) 经鸡胚单层细胞增殖后, 前后相差 2—3.5 log, 而原株仅差 0.27—0.92 log, 说明弱毒株病毒经稀释一定倍数后, 虽然仍有大量病毒存在, 但已不引起小白鼠发病和死亡。因此, 进一步证明 SA<sub>4</sub> 传代株的毒力降低并非因病毒量减少所致, 而由于病毒本身的嗜神经性减弱所引起的。

## (二) SA<sub>4</sub> 传代株对恒河猴的脑腔感染力

从上述对 P<sub>3</sub>、Lm、SA<sub>4</sub> 三个毒株的变异性比较结果中已经发现, 三个毒株中虽均经长期传代达 200 代以上, 对小白鼠的脑腔毒力有所下降的毒株仅有一个 SA<sub>4</sub> 株。为了探究该变异株对高级动物的致病力, 我们将 SA<sub>4</sub> 的 194 代组织培养病毒原液 (10<sup>0</sup>) 脑腔感染四只恒河猴, 其中二只注射量为 0.4 毫升, 另二只为 0.2 毫升, 并将 SA<sub>4</sub> 原鼠脑株病毒在同样条件下通过组织培养一代后, 同时按同法感染四只猴子作为对照。所有猴子于试验前均经血清中和抗体试验, 证明对乙型脑炎病毒阴性者。试验时并以同份材料对小白鼠进行脑内毒力滴定, 猴子接种后, 每天观察健康情况, 测定体温, 猴子死亡立即解剖取脑作细菌培养和病毒毒力滴定, 现将试验结果列于表 8。

猴子经脑腔感染后, 对照组于 4—5 天, 试验组于 4—7 天开始体温升高, 全身轻度战慄, 继而站立不稳, 前肢抓物无力, 对刺激敏感, 最后则四肢无力, 下肢麻痺, 大小便失禁, 牙关紧闭, 不食而死亡; 对照组病程发展急剧, 死亡迅速, 于发病后 2—3 天死亡; 试验组则病程发展缓慢, 持续时间较长, 于发病后 7—8 天死亡, 比对照组延长一倍。

猴脑的病理检查所见, 说明原株与传代株引起的组织学改变之间没有显然的差别, 但从脑内病毒毒力滴定的结果可以看出, SA<sub>4</sub> 原株在猴子脑内的繁殖力相当强, 毒力均在

表 8 SA<sub>4</sub> 原株与傳代株对猴脑腔的致病力比較

方 法			組織培养 傳递代数	第 一 代 (对照組)	第 194 代 (試驗組)	第 267 代 (試驗組)
小白鼠脑腔毒力(LD <sub>50</sub> )				10 <sup>-5.88</sup>	10 <sup>-8.77</sup>	10 <sup>-2.88</sup>
对 猴 子 的 試 驗	0.4 毫升 注射量	自接种至死亡時間(天)		6, 7	13, 14	—
		猴脑的病毒毒力(LD <sub>50</sub> )		10 <sup>-5.88</sup> , 10 <sup>-4.5</sup>	10 <sup>-4.0</sup> , ≤ 10 <sup>-2.0</sup>	—
	0.2 毫升 注射量	自接种至死亡時間(天)		7, 8	11, 13	12
		猴脑的病毒毒力(LD <sub>50</sub> )		10 <sup>-4.88</sup> , 10 <sup>-4.77</sup>	10 <sup>-1.25</sup> , 10 <sup>-2.0</sup> ●	10 <sup>-1.88</sup>
	自接种至死亡時間(平均天数)			7	12.8	12

10<sup>-1.50</sup> 以上, 最高达 10<sup>-5.23</sup>, 而变异株的繁殖力則有显著减弱, 毒力一般仅为 10<sup>-1</sup>—10<sup>-2.0</sup> 之間, 因此可以认为, 以 SA<sub>4</sub> 变异株最高浓度病毒 10<sup>-0</sup> 注射恆河猴脑腔, 虽然猴子全部死亡, 但从病程經過、发病至死亡持續時間。及猴脑內病毒毒力来看, 均可証明該变异株对猴子脑腔的致病力有一定的减弱。

当將該株病毒繼續傳代至 267 代时, 我們又按上述方法进行一次对猴子脑腔毒力检查, 由于猴子来源缺乏, 仅用一只猴子, 脑腔注射病毒原液 0.2 毫升。試驗結果与 194 代时結果相似 (見表 10), 这一方面証明了上次的結果, 另一方面說明, 虽繼續傳代达 73 次之多, 对猴子脑腔毒力却未能进一步地减弱。

(三) 变异后不同毒株的免疫性

为了解各株病毒在对小白鼠神經外或中枢神經內毒力减弱后其免疫性的改变情况, 我們进行了以下的免疫力試驗和血清中和試驗。

1. 定量免疫、定量攻击法: 將各株新鮮傳代的組織培养病毒材料稀释为 10<sup>-2</sup> 悬液, 腹腔免疫 6—8 克的小白鼠, 每只 0.25 毫升, 二周后以 P<sub>3</sub> 株新鮮鼠脑 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> 二个稀释度病毒腹腔攻击, 每只 0.3 毫升, 同时以 Hanks 液脑腔刺激, 計算死亡百分数。未进行攻击的剩余小鼠于二周后采血, 分离血清作中和試驗, 中和試驗按恆量血清—变量病毒的小鼠脑腔注射法进行, 現將結果列于表 9。

表 9 P<sub>3</sub>、Lm、SA<sub>4</sub> 組織培养傳代株的免疫力与血清中和抗体反应

毒 株	传 代 温 度 (°C)	代 数	毒 力*	結 果				中和指数
				10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-6</sup>		
				死亡数	%	死亡数	%	
P <sub>3</sub>	37	236	5.5	0/8	0	0/8	0	213
P <sub>3</sub>	41	257	5.5	0/9	0	0/10	0	363
Lm	37	209	5.77	0/10	0	0/9	0	6
SA <sub>4</sub>	41	267	3.77	2/10	20	1/9	11.1	6
对照	—	—	—	5/10	50	7/10	70	—

\* 免疫用病毒材料的毒力。

2. 免疫指数法免疫力試驗: 按上述方法以 10<sup>-2</sup> 病毒进行免疫, 14 天后以 P<sub>3</sub> 株不同稀释度病毒腹腔攻击, 观察 21 天, 按 Reed 和 Muench 氏法計算 LD<sub>50</sub> 及免疫指数。同时在

7—10 克的小白鼠脑腔和腹腔进行毒力滴定,以便进一步观察脑腔、腹腔毒力与免疫力的关系,此試驗进行了二次,前后結果相似,現将其中的一个結果列于表 10。

表 10  $P_3$ 、 $Lm$ 、 $SA_4$  組織培养傳代株的毒力与免疫力关系

毒 株	傳代溫度 (°C)	代 数	毒 力		免 疫 力		
			脑 腔	腹 腔	免 疫 組 $LD_{50}$	对 照 組 $LD_{50}$	免疫指数
$P_3$	37	237	5.5	0.75	<1.0	7.0	>1,000,000
$P_3$	41	257	5.33	0.83	2.63	7.0	23440
$Lm$	37	210	5.00	0.75	3.32	7.0	4786
$SA_4$	41	267	3.50	0	5.78	7.0	16

表 9 和表 10 的結果,一方面再次証实了  $SA_4$  傳代株对小白鼠的脑腔和腹腔毒力确实較其余 2 株为低, 另一方面表明了免疫力与毒力有一定的关系, 如  $SA_4$  株的脑腔毒力較低, 腹腔毒力完全丧失, 則显然地減弱了对小白鼠的免疫力作用, 而其他 2 株的腹腔毒力虽有所下降, 但仍然保持一定的致病力, 因而亦表現一定的免疫力。

最后, 为了了解  $SA_4$  变异株是否确系乙型脑炎病毒, 我們將  $SA_4$  鸡胚悬浮組織培养 271 代病毒經小白鼠脑腔传递一代后, 取脑作为新鮮病毒材料与已知乙型脑炎病毒 47 株免疫血清进行中和試驗。試驗結果, 中和指数为 100,000。因此說明, 經长期傳代后毒力发生变异的  $SA_4$  株仍然是流行性乙型脑炎病毒。

### 三、討 論

流行性乙型脑炎病毒通过不包含头部及脊髓的鸡胚悬浮組織块連續傳代培养后, 对小白鼠的神經外毒力逐漸下降。不同特性的毒株表現不完全一致。一般培养至 50—100 代之間毒力下降比較显著。繼續培养至 200 代左右,  $P_3$  及  $Lm$  株却无明显的进一步改变, 而  $SA_4$  株則無論对 7—9 克的小鼠或乳鼠皮下毒力均繼續減弱至完全丧失。脑腔毒力的变化在不同毒株之間的差异更为明显。  $P_3$  及  $Lm$  株經培养 200 代左右毒力始終保持恆定。  $SA_4$  株的毒力則自 181 代以后开始下降 1—2 个  $\log LD_{50}$ , 感染的小白鼠自接种至死亡的时间亦有显著延长。 因此脑腔毒力的下降也就是嗜神經性減弱的表現, 但是再繼續传递 70 代, 却未見更进一步的降低。看来毒力的变化似乎有一定的阶段性。

嗜神經性的变化表现在不同毒株之間有显著差异。这一点与培养黄热病病毒不同毒株时所获得的結果相类似。 該病毒主要为嗜脏器性并具有嗜神經性, 又是以昆虫为传染媒介的主要病毒之一。在研究其变异过程中, Theiler<sup>[5]</sup> 氏成功地从強毒的 Asibi 株培养出对猴子皮下感染无致病力而对猴子和小白鼠脑腔感染毒力显著減弱的 17D 株, 并且广泛地用于活疫苗的制造。 但是同一作者們<sup>[6]</sup> 又按同法培养黄热病 French 嗜神經株和 French 嗜脏器株及 J. J. S. 株时, 虽均发现致病力的下降, 但嗜神經性毒力未能減弱至 17D 株的程度。由此可見, 在以本文所述的方法研究病毒的变异工作中, 对不同特性的毒种选择具有极其重要的意义。

同时應該指出, 利用鸡胚悬浮組織块培养法在研究以昆虫为传染媒介的其他嗜神經性病毒的变异中, 也还未能找到理想的減弱毒株。 如 Koprowski 及 Lennette 二氏<sup>[7,8]</sup> 曾

經按上述方法培养西尼罗病毒及委内瑞拉馬脑炎病毒达 70 多代,并且証明了前者对小白鼠及地鼠,后者对小白鼠、家兔和豚鼠的神經外毒力有显著的下降,但是对小白鼠的脑腔毒力却未发生变化。西尼罗传代株病毒經 Price 氏<sup>[9]</sup>在 4 个肿瘤病人体内, Parks 氏<sup>[10]</sup>在鸡及猴体上試驗,証明其毒力确实較強毒株低,但其引起病毒血症及产生中和抗体的能力却有明显的降低。此外, Pinter 氏<sup>[11]</sup>在培养壁蝨脑炎病毒試驗中未能获得对小白鼠脑腔毒力減弱的毒株。Molnär<sup>[12]</sup>氏虽然成功地培养出对小白鼠脑腔感染完全无致病性而对鸡胚毒力却高达  $10^{-9}$  的变异株,但是用該病毒腹腔免疫家兔四次后,仅能产生較低的中和抗体(中和指数为 100—160)。关于該变异株对小鼠脑腔感染的进一步試驗和对猴子的致病力如何,以及是否可以用于活疫苗的制造等問題,尚未見到比較肯定的結果的报告。在本文中,我們所获得的 SA<sub>4</sub> 变异株虽然对小鼠神經外毒力已經喪失,脑腔毒力有所下降,对猴子的脑腔致病力从病程及猴脑內病毒毒力来看亦有一定的減弱,但是尚不能达到 17D 黄热病弱毒株在脑腔感染后能使多数猴子不致于死亡的程度,而且其免疫原性亦有很大程度的降低,因此該結果亦不能令人滿意。

綜上所述,应用鸡胚組織按 Maitland 氏悬浮培养法研究嗜神經性病毒的变异而达到象黄热病 17D 株的減弱程度是比較困难的。可以說在培养一定阶段后病毒的神經外毒力虽然容易下降,但是神經內毒力却相当稳定,而且在神經外或神經內毒力減弱后,其免疫原性亦比較难于保持。因此,为了获得免疫性好的乙型脑炎減弱毒株,我們认为需要寻找其他方法进行研究。在这一方面我們已作了一些工作,并已获得一定的結果,有待下文报导。

## 四、摘 要

1. 流行性乙型脑炎不同毒株通过鸡胚悬浮組織块連續传代 50—100 代后对小白鼠的神經外毒力逐漸下降,但其表現程度不完全一致,原来神經外毒力較低的 SA<sub>4</sub> 毒株則下降比較多,直至完全喪失。脑腔毒力的变化在不同毒株之間的差异更为明显; P<sub>3</sub> 及 Lm 株經培养 200 代左右其毒力始終保持恆定,而 SA<sub>4</sub> 株毒力 (LD<sub>50</sub>) 則自 181 代以后开始下降 1—2 log。

2. 对小白鼠脑腔毒力下降的 SA<sub>4</sub> 株对恆河猴脑腔致病力亦有一定的減弱,主要表现在猴子于感染病毒后的发病潛伏期及病程比原毒株延長約一倍。

3. 通过鸡胚組織块連續传代后的病毒对小白鼠的致病力和免疫力之間有一定的关系, SA<sub>4</sub> 株当其脑腔毒力开始下降,腹腔毒力完全喪失后,則几乎完全喪失了对小白鼠的免疫性,而 P<sub>3</sub> 及 Lm 株的神經外毒力虽有下降,但仍然保持一定的致病力,因而仍然具有一定的免疫力。

## 参 考 文 献

- [1] 李河民、俞永新: 微生物学报, 7(4):327, 1959。
- [2] 李河民、俞永新、張挺秀: 全国急性傳染病学术会識資料选編, 下册, 317 頁, 1959 年。
- [3] Dulbecco, R. and Vogt, M. J. *Exp. Med.* 99:167, 1954.
- [4] Morgan, J. F., Morton, H. J. and Parker, R. C., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73:1, 1950.
- [5] Theiler, M. and Smith, H. H., *J. Exp. Med.*, 65:767, 1937.
- [6] Theiler, M., *Yellow Fever. The Virus* 1st. Ed. N. Y. P. 97, 1951.

- [7] Koprowski, H. and Lennette, E. H., *J. Exp. Med.*, **84**:181, 1946.
- [8] Koprowski, H. and Lennette, E. H., *J. Exp. Med.*, **84**:205, 1946.
- [9] Prico, W. H., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **43**: 115, 1957.
- [10] Parks, J. J., Ganaway, J. R. and Price, W. H., *Amer. J. Hyg.* **68**:106, 1958.
- [11] Pinter, M. and Biladi, I., *Acta Micro. Hung.*, **1**:243, 1953.
- [12] Molnár, E., *Acta Micro. Aca. Sci. Hung.* **6**(1):23, 1959.

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

### II. ИЗМЕНЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ РАЗНЫХ ШТАММОВ ПОСЛЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ПАССИРОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

Ли Хэ-минь, Юй Юйнь-синь, Ти Шу-жон, У Пей-фэнь

(Контрольный Институт медикаментов и биопрепаратов Минздрава КНР)

В наших предварительных работах выясняли, что штаммы японского энцефалита отличаются некоторыми биологическими свойствами: штаммы  $P_3$  и  $L_m$  обладают сравнительно слабым нейротропизмом и высокой периферической вирулентностью, а штамм  $SA_4$ —более сильным нейротропизмом и низкой периферической вирулентностью.

Кроме того, штамм  $L_m$  пассировался в мозгу мышей только на 4 пассажа после выделения, а другие штаммы уже адаптировались к мозгу мышей в течение длительного времени.

С целью вскрытия некоторых законов изменчивости вируса японского энцефалита, мы проводили сравнительное изучение основных свойств вышеуказанных 3-х штаммов при последовательном пассировании в культуре переживающей ткани и получили следующие результаты:

1. Каждый штамм пассировался в культуре ткани при  $T$   $37^{\circ}\text{C}$  или  $41^{\circ}\text{C}$  на более 200 пассажей. Периферическая вирулентность всех штаммов значительно снижалась. Особенно, штамм  $SA_4$  полностью потерял вирулентность для белых мышей весом 7—9 гр. и сосунков при периферическом заражении.

2. Среди 3-х штаммов только у штамма  $SA_4$  наблюдалось заметное снижение титра вирулентности при внутримозговом заражении на  $1-2 \log$  по сравнению с исходным. При этом инкубационный период и течение болезни у зараженных данным штаммом мышей значительно удлинялись. Титр внутримозговой вирулентности  $P_3$  и  $L_m$  в течение пассирования практически не изменялся и поддерживался на высоком уровне.

3. Патогенность пассированного штамма  $SA_4$  для обезьян заметно снижалась: хотя при внутримозговом заражении все пять обезьян погибли из-за энцефалита, но течение развития их болезни затягивалось и титр вируса в мозгу погибших обезьян был ниже титра исходного штамма.

4. После продолжительного пассирования штаммы  $P_3$  и  $L_m$  сохраняли иммуногенность, несмотря на снижение периферической вирулентности, но исчезновение периферической вирулентности штамма  $SA_4$  для мышей сопровождалось почти полной потерей его иммуногенности.