

# 流行性乙型脑炎病毒的变异

## III. 通过地鼠肾细胞后对小白鼠及恆河猴的 毒力和免疫力\* \*\*

俞永新 敖坚 雷文绪 李河民

(卫生部药品生物制品检定所)

近年来,在国外对各种嗜神经性(脑炎)病毒变异的研究上有了新的进展,其中, Henry 氏<sup>[1]</sup>及 Berge 氏<sup>[2]</sup>分别对委内瑞拉马脑炎病毒及 Price 氏<sup>[3]</sup>对西尼罗脑炎病毒的研究取得较为满意的结果。我们<sup>[4,5]</sup>在以往对乙型脑炎病毒变异的研究中亦曾经获得三株对小白鼠神经外途径毒力完全丧失或降低的毒株,其中,嗜神经性较强的 SA<sub>4</sub> 株减弱了对小白鼠及恆河猴的脑内致病力,而该株的免疫原性亦随之显著地下降。从研究的结果来看,我们认为采用鸡胚组织块悬浮法不易获得适宜于制备活疫苗的毒力减弱而免疫力强的变异株。但是,经长期连续传代后,不同生物学特性的病毒株所发生的致病力变异有所不同。因此,为了进一步研究乙型脑炎病毒的变异,我们又选择了毒株并采用另外的传代培养方法,将乙型脑炎病毒 SA<sub>4</sub> 株通过地鼠肾单层上皮细胞,连续传代后,发现对小白鼠及猴子的致病力均有显著降低的变异,本文将报告其试验结果。

### 一、材料和方法

(一) 病毒 选择了西安<sub>14</sub> (代号 SA<sub>14</sub>) 毒株进行培养传代,该毒株系 1953 年由当时西北行政委员会卫生局卫生试验所在西安地区从蚊体分离所得。送交我所后,我们<sup>[6]</sup>曾与国内外 9 个毒株进行过比较试验,证明其抗原性较广,免疫性良好而嗜神经性较弱。另外,该株在地鼠肾单层上皮细胞内繁殖良好并具有显著的细胞致病变作用,因而便于连续传代培养。本试验开始时,病毒材料为经小白鼠脑内传递 11 代的脑悬液。以后则用地鼠肾细胞或鸡胚悬浮组织块培养液作为试验用的病毒。

(二) 单层细胞的制备及病毒传代 用金黄色地鼠 (Golden Hamster) 肾组织,按 Dulbecco 氏<sup>[7]</sup>胰酶消化法制备单层肾组织上皮细胞。用 10—20% 牛血清 199 综合培养基<sup>[8]</sup>为生长液,细胞长满后倾掉液体,加入 0.2 毫升病毒,再加入 0.8 毫升 2—5% 兔血清 199 培养基作为维持液。培养时分为二组,一组放于 27—29°C。另一组放 35—37°C 孵箱内培养,前者培养 4—6 天,后者培养 3—4 天后,用原液移种于新鲜细胞管内传至下一代。

(三) 毒力滴定 在小白鼠体内或地鼠肾单层细胞或鸡胚内进行病毒毒力滴定。滴

\* 本文 1962 年 6 月 25 日收到。

\*\* 本文中有关病理检查是由朱蔭耕大夫等协助进行,另外本室的方珍、武佩芬等同志也参加了操作,特此志谢。

定时所用病毒稀释液为 2% 兔血清 Hanks 氏液。小白鼠脑腔、皮下、肤腔的接种量分别为 0.03、0.25、0.3 毫升。

用地鼠肾单层细胞滴定毒力时，将长满的单层细胞管内的营养液倒掉，按每管加入不同稀释度病毒 0.2 毫升，每稀释度接种二管，再加入 0.8 毫升 2% 兔血清 199 培养基作为维持液。另备二管细胞，不加病毒，仅加 1 毫升维持液作为对照管。以各管放于 35—37°C 培养 7 天，每天检查细胞致病变效果。如病毒存在而繁殖时，肾细胞于培养第 3 天开始出现圆缩，形态不清，颗粒增多，细胞层成堆集聚，部分或全部脱落。每管内细胞病变达 25% 以上者判定为阳性结果。并计算 50% 细胞致病变的感染量 (TCID<sub>50</sub>)。

个别样品在鸡胚内滴定，即取 8 日龄鸡胚于卵黄囊内接种不同稀释度病毒 0.2 毫升。逐日观察鸡胚死亡情况，经 10 天后判定结果，计算 LD<sub>50</sub>。

#### (四) 免疫力试验

1. 免疫指数法：取 6—8 克小白鼠，腹腔注射 10<sup>-1</sup> 病毒材料，每只 0.25 毫升，二周后以肤腔毒力强的乙型脑炎 P<sub>3</sub> 株新鲜鼠脑病毒不同稀释度腹腔攻毒，攻击剂量为每只 0.3 毫升，同时以 Hanks 液作脑腔刺激。观察 21 天，按 Reed 和 Muench 氏法计算 LD<sub>50</sub> 及免疫指数。

2. 定量免疫、定量攻击法(计算死亡百分数)：免疫方法同上。攻击时仅以 P<sub>3</sub> 株的鼠脑悬液 10<sup>-4</sup> 及 10<sup>-5</sup> 二个稀释度腹腔攻毒。分别计算死亡百分数。

3. 变量免疫、定量攻击法(计算 ID<sub>50</sub>)：取 6—8 克小白鼠腹腔或脑腔注射不同稀释度病毒悬液，腹腔每只 0.25 或 0.3 毫升，脑腔为 0.03 毫升。免疫二周后以 P<sub>3</sub> 株新鲜鼠脑病毒材料稀释至 10<sup>-3</sup> 或 10<sup>-4</sup> 作为腹腔攻击病毒，每只注射 0.3 毫升，同时以 Hanks 液作脑腔刺激，观察 21 天，计算 50% 最少免疫量 (ID<sub>50</sub>)。

所有免疫力试验攻击毒均用 5—10% 家兔血清 Hanks 液稀释。

(五) 中和试验 小鼠免疫血清取自免疫力试验中攻击用的剩余小白鼠，并继续饲养二周后(即以稀释 10<sup>-1</sup> 的组织培养液病毒腹腔免疫后一个月)采血。豚鼠血清系用鸡胚悬浮组织块病毒材料 10<sup>-1</sup> 悬液，经脑腔、皮下、腹腔一次免疫体重 150—200 克豚鼠，获得的免疫量分别为每只 0.15、2、2 毫升，免疫后不同时间采血。猴血清为取自脑腔测毒后痊愈的猴子，经不同时间后采血所得。中和试验方法按病毒稀释、血清定量法，用 8—10 克小白鼠脑腔接种，观察 14 天后计算中和指数。

## 二、结 果

### (一) 对小白鼠不同途径感染的毒力变化

SA<sub>14</sub> 病毒经地鼠肾细胞分别在 35—37°C (该传代株以 SA<sub>14</sub>A 株表示) 和 27—29°C (该传代株以 SA<sub>14</sub>B 株表示) 连续传代。在前一温度下共传了 50 代，并在 27—28 代之间另通过鸡胚悬浮组织块培养了 4 代。后者仅通过地鼠肾细胞 21 代。为了解连续传代培养对病毒致病力的影响，将不同代数的病毒培养液在小白鼠体内以不同途径感染进行了毒力滴定。现将结果列于表 1。

从表 1 可见，在地鼠肾细胞 35—37°C 培养 20 代以后，病毒 (SA<sub>14</sub>A 株) 对小白鼠的脑腔毒力有明显的下降，一般波动在 10<sup>-0.8</sup>—10<sup>-2.0</sup> 之间。另外小白鼠自接种病毒至死亡

表 1 SA<sub>14</sub> 株在地鼠腎細胞及雞胚懸浮組織塊培養不同代数对小白鼠不同途徑感染的毒力

培养温度 (°C)	代 数	脑 腔 (0.03毫升)	皮 下 (0.25毫升)	肤 腔 (0.3 毫升)
35—37	HK <sub>1</sub> <sup>△</sup>	6.50	3.00	3.16
	HK <sub>16</sub>	4.50	—	—
	HK <sub>20</sub>	1.77	—	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>2</sub> <sup>*</sup>	0.83	<0.6	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>3</sub>	1.35	<0.6	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub>	1.68	—	<0.6
	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub>	2.00	—	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>5</sub>	<0.0	—	0
	HK <sub>27</sub> CE <sub>5</sub>	0.75	—	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>7</sub>	0	—	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>8</sub>	1.77	—	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>9</sub>	0.80	—	—
	HK <sub>27</sub> CE <sub>10</sub>	1.43	—	—
27—29	HK <sub>1</sub>	≥4.5	—	—
	HK <sub>24</sub> CE <sub>2</sub>	4.33	<0.6	—
	HK <sub>24</sub> CE <sub>3</sub>	3.50	<0.6	—
	HK <sub>24</sub> CE <sub>4</sub>	4.33	—	2.0

△ 地鼠腎单层細胞传递 1 代。

\* 地鼠腎单层細胞 27 代, 雞胚懸浮組織塊培养 2 代。

注: 表中数字为 LD<sub>50</sub> 的負倒数, “0”表示 10<sup>-9</sup> 以上的稀釋度組小鼠全未死亡; “<0.0”表示 10<sup>-9</sup> 組小鼠死亡半数以下; “<0.6”表示 10<sup>-1</sup> 以上的稀釋度組小鼠全未死亡, 而 10<sup>0</sup> 組試驗未作。“—”表示未作試驗。

時間及病程均有延長。自接種至死亡時間由原來的 4—5 天延長至 8—10 天, 而且有死亡不規律的現象; 即以低稀釋度病毒接種的小鼠組并不全死亡, 但高稀釋度組却有個別小鼠死亡。又經常發現個別小鼠出現松毛、戰慄、后肢輕度麻痺等神經症狀后逐漸恢復健康, 后肢麻痺情況恢復時間較長。但是在 27—29°C 培养 (SA<sub>14</sub>B 株) 的結果, 腦腔毒力无显著变化, 而且保持着較高的肤腔毒力。因此下面我們着重对在 35—37°C 培养的 SA<sub>14</sub>A 株进行研究, 并在个别試驗中用 27—29°C 培养的 SA<sub>14</sub>B 株进行研究。

为了进一步确定 SA<sub>14</sub>A 株在地鼠腎細胞以及由腎細胞轉入雞胚肌皮組織塊內培养后的病毒量与嗜神經性的关系, 我們將該毒株培养液于地鼠腎細胞及小白鼠腦內同时进行滴定, 并以 SA<sub>14</sub> 原株作为对照, 現將其結果列于表 2。

表 2 SA<sub>14</sub> 原毒株与变异株 SA<sub>14</sub>A 对小白鼠腦腔及地鼠腎細胞的毒力比較

毒 株	代 数	小 鼠 腦 腔 (MIC LD <sub>50</sub> /0.03 ml)	地 鼠 腎 細 胞 (HKT CID <sub>50</sub> /0.2 ml)
SA <sub>14</sub> A 株	HK <sub>27</sub> CE <sub>5</sub>	2.33	7.0
	HK <sub>27</sub> CE <sub>10</sub>	1.43	6.5
	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub> HK <sub>11</sub>	2.00	6.0
	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub> HK <sub>14</sub>	2.00	6.5
	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub> HK <sub>23</sub>	2.44	7.0
SA <sub>14</sub> 原株	CE <sub>1</sub>	6.33	5.0
	CE <sub>1</sub>	5.00	≥4.5

从表 2 可见，变异株在地鼠肾细胞内的毒力虽达  $10^{-6.0}—10^{-7.0}$  之高，但对小白鼠的脑内毒力仍然仅为  $10^{-1.43}—10^{-2.44}$ ，二者之对数差数为 4.00—5.07。与此相反，原毒株对地鼠肾细胞的 TCID<sub>50</sub> 比小白鼠脑内的毒力 (LD<sub>50</sub>) 稍低。由此可见，该病毒在地鼠肾细胞内繁殖后积累的病毒量并不低，其所以对小白鼠脑内毒力低的原因并非由于病毒量少，而是由于病毒发生变异后对小白鼠脑神经组织的亲和性减弱所致。

表 3 SA<sub>14</sub> 原毒株及 SA<sub>14</sub>A 株对恒河猴的脑腔致病性

编号	性别	感染毒株	感染材料			潜伏期 (天)	病程 (天)	临床 症 状	转归	死亡猴脑病毒分离	
			稀释度	小鼠脑腔毒力	鸡胚毒力					结果	小鼠脑腔毒力
5	♀	SA <sub>14</sub> A 株	10 <sup>0</sup>	0.75	4.0	14	17	感染后第 15 天体温上升至 40℃，第 20 天体温恢复至 37℃，头部及四肢震颤。  此 21—22 天为明显，尤以下肢为重，此时喜俯臥，头部着地，上肢抓力减退，自第 27 天开始恢复，随意站立，第 31 天食欲、行动已如常，但仍有轻微震颤现象	痊愈	-	-
6	♀	SA <sub>14</sub> A 株	10 <sup>0</sup>	0.75	4.0	10?	4	感染后第 11 天体温上升为 40.5℃，第 12 天 41.5℃，呼吸困难，食欲不佳，第 14 天体温恢复 (39.2℃) 食欲好转，呼吸正常	痊愈	-	-
7	♀	SA <sub>14</sub> A 株	10 <sup>-1</sup>	0.75	4.0	9	11	感染后第 10 天体温上升 39.8℃，第 12 天 41.4℃，呼吸急促，食欲减退，嗜睡，第 15 天体温 40.5℃，下午发现头部及上肢震颤，眼分泌物多，第 16 天扒臥于地，全身震颤，食欲尚好，体温 < 35℃，第 19 天濒死状态 (心跳摸不到，有微弱呼吸)，解剖	处死	+	≤ 10 <sup>-1.0</sup>
9	♀	SA <sub>14</sub> A 株	10 <sup>-1</sup>	0.75	4.0	0	0	感染后观察到 30 天，均未发现体温变化及临床病态表现	-	-	-
3	♀	SA <sub>14</sub> 原株	10 <sup>-1</sup>	5.67	5.0	3	5	感染后第 4 天体温上升 40.1℃，第 6 天 40.8℃，厌食，活动量减少，第 7 天出现上肢麻痹 (轻度)，下肢强直性痉挛，第 8 天早 7 时 30 分发现死亡	死	+	10 <sup>-3.0</sup>
13	♂	SA <sub>14</sub> 原株	10 <sup>-1</sup>	5.67	5.0	4	4	感染后第 5 天体温上升到 39.7℃，第 7 天 40.4℃，呼吸困难，眼分泌物多，上肢麻痹，下肢痉挛，于第 8 天上午 12 时死亡	死	+	10 <sup>-1.67</sup>
12	♀	SA <sub>14</sub> 原株	10 <sup>-3</sup>	5.67	5.0	7	4	感染后第 8 天体温上升 40.1℃，精神萎靡，第 9 天体温 40.1℃，全身震颤，第 10 天体温下降至 35.7℃，第 11 天早 8 时 30 分发现死亡	死	+	10 <sup>-2.5</sup>
14	♀	SA <sub>14</sub> 原株	10 <sup>-3</sup>	5.67	5.0	5	4	感染后第 6 天体温上升至 40.5℃，第 8 天体温 40℃，精神萎靡，右上肢麻痹，第 9 天体温降至 35℃ 以下，上肢麻痹，下肢痉挛，于下午死亡	死	+	10 <sup>-2.67</sup>
8	♀	SA <sub>14</sub> 原株	10 <sup>-3</sup>	5.67	5.0	6	4	感染后第 7 天体温上升 40.6℃，第 8 天呼吸困难，阵发性痉挛，第 9 天体温 37.1℃，上肢麻痹，眼分泌物多，呼吸短促，于第 10 天早发现死亡	死	+	10 <sup>-4.33</sup>
10	♂	SA <sub>14</sub> 原株	10 <sup>-3</sup>	5.67	5.0	8	5	感染后第 9 天体温 39.6℃，精神欠佳，第 12 天 40.5℃，全身震颤，下肢痉挛，口角周围唾液增多，第 13 天体温下降至 35℃ 以下，于夜間死亡	死	+	10 <sup>-2.0</sup>

注：1. SA<sub>14</sub>A 株感染的第 7 号猴子病理所见：脑和脊髓的蜘蛛膜、软脑膜轻度增厚，蜘蛛膜下腔中血管充血，水肿和炎性细胞浸潤，脑实质中神经细胞变性，神经胶质细胞弥散性增生，血管周围有不同程度的围管性浸潤。左侧脑膜复盖大片血液，间脑出现一个血肿区，切片审查边缘已处于吸收状态。  
 诊断：脑膜脑脊髓炎  
 左间脑灶迹损伤性出血。

2. SA<sub>14</sub> 原株感染的 6 只猴子病理组织学改变：  
 每只猴子之间未发现显著差异，其特点为脑蜘蛛膜、软脑膜轻度增厚，蜘蛛膜下腔血管充血，水肿淋巴球浸潤。脑实质中神经原细胞变性，神经胶质细胞弥散性增生，血管周围有不同程度围管性浸潤。

诊断：脑膜脑炎。

## (二) 对恆河猴的脑腔致病力

在肯定 SA<sub>14</sub>A 株对小白鼠脑内毒力减弱后,为了解该病毒对猴子的脑内致病力,我们取地鼠肾细胞 27 代转种鸡胚悬浮组织块第 5 代 (HK<sub>27</sub> CE<sub>5</sub>) 的病毒培养液原液 (10<sup>0</sup>) 及 10 倍稀释液各接种在二只恆河猴的脑内,并同时以 SA<sub>14</sub> 原毒株通过鸡胚悬浮组织块一代,稀释成 10<sup>-1</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-5</sup>,每稀释度接种恆河猴(脑内) 2 只,每只接种 0.2 毫升。两份病毒材料同时在小鼠脑内及鸡胚卵黄囊内进行毒力滴定。所有猴子于试验前均经血清中和抗体试验,证明对乙型脑炎阴性者(中和指数在 10 以下)。猴子被接种后,每天观察其健康情况,测定体温一个月。为了在原毒株 10<sup>-1</sup> 及 SA<sub>14</sub>A 株 10<sup>0</sup> 稀释度接种组的 4 只猴子体内检查毒血症,于一定时间内采血,凝固后将血块用组织研磨器研碎,并按 1:1 稀释作成悬液。将该液直接或通过鸡胚悬浮组织块或通过地鼠肾细胞一代后,脑腔注射小白鼠检查病毒的存否。死亡猴子于当天解剖,并取脑部材料进行细菌培养、病毒分离及病理检查,现将猴子试验结果列于表 3 和表 4。

从表 3 看来,以 SA<sub>14</sub> 原毒株 10<sup>-1</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-5</sup> 稀释度即相当于小鼠脑腔 300,000、3000、30 个 LD<sub>50</sub> 分别地接种 6 只猴子,能够使全部猴子发生脑炎病状而死亡,说明于脑内感染时,恆河猴对乙型脑炎病毒具有与小白鼠几乎相等的敏感性。SA<sub>14</sub>A 株 10<sup>0</sup> 及 10<sup>-1</sup> 感染猴子的病毒量以对鸡胚毒力计算为 1000—10000 个 LD<sub>50</sub>,最少与原毒株 10<sup>-1</sup> 及 10<sup>-2</sup> 相等。虽然以如此大量的病毒直接地脑腔感染猴子,但四只被感染的猴子中仅有一只发病死亡,发病的平均潜伏期为 11 天,比原株感染猴子的平均潜伏期延长约一倍;接种 SA<sub>14</sub>A 株而死亡的猴子的临床症状发展亦较缓慢,病程延长达 11 天,比原株长 2—3 倍。另外根据病理检查所见,虽然在該猴脑部的变化与接种原株的猴比较没有发现重要的差别,但脑组织内病毒毒力则较低。

所有这些结果证明,SA<sub>14</sub>A 株不但对小白鼠的脑腔毒力减弱而且对恆河猴的脑腔致病力亦有极显著的降低,以至几乎丧失致死能力。

病毒血症在接种原毒株的 2 只猴子均于注射后 24—48 小时出现,3—7 天内则未能发现,而在接种 SA<sub>14</sub>A 株的 2 只猴子则均于第 9 天时才出现,9 天前及 10—12 天内却未

表 4 SA<sub>14</sub> 原毒株与 SA<sub>14</sub>A 株脑腔注射猴子后不同时间的毒血症

毒株	猴号	注射后时间(天)及检查方法													
		1	2	3	4		5		7		9		12		
		全血	全血	全血	全血	CE-1	全血	CE-1	全血	CE-1	全血	HK-1	全血	HK-1	
SA <sub>14</sub> 原株	3	6/6	6/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5	0/6	0/5	-	-	-	-
	13	6/6	6/6	0/5	0/6	0/5	0/6	0/6	0/6	0/6	-	-	-	-	-
SA <sub>14</sub> A株	5	0/5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/6	0/5	0/5	0/6	2/6	0/4	0/6	
	6	0/5	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/4	0/6	4/6	0/6	0/6

注: CE-1 表示全血通过鸡胚悬浮组织块一代。

HK-1 全血通过地鼠肾单层细胞一代。

表中分母为注射鼠数,分子为患脑炎致死死亡小鼠数,“-”为试验未作。

检查出(表4)。SA<sub>14</sub>A株毒血症出现较迟的原因可能由于病毒本身在猴脑内繁殖力弱的结果。因此,有关SA<sub>14</sub>A株在机体内的繁殖、分布及其与病毒血症的关系问题尚需进一步探讨。

### (三) 对小白鼠、豚鼠及恒河猴的免疫力和血清抗体反应

为了解变异株在减弱了其敏感动物的脑内毒力后是否仍保持着原有的抗原性和一定的免疫力,我们按上述方法对小白鼠、豚鼠及猴子进行了免疫力试验或血清抗体反应观察,现将获得的结果列于表5,表6和表7。

表5 SA<sub>14</sub>A株对小白鼠的免疫力及血清抗体反应

甲、定量免疫、定量攻击法(计算死亡率)

毒株	代数	毒力* (小鼠脑腔0.03 ml)	10 <sup>-4</sup> 攻击		10 <sup>-5</sup> 攻击		血清中和指数
			死亡数	死亡率	死亡数	死亡率	
SA <sub>14</sub> A株	HK <sub>27</sub> CE <sub>2</sub>	0.83	0/10	0	0/10	0	676
SA <sub>14</sub> B株	HK <sub>24</sub> CE <sub>2</sub>	4.33	0/10	0	0/10	0	2138
对照	—	—	8/10	80	10/10	100	—

\* 免疫用病毒材料的毒力。

乙、定量免疫、变量攻击法(计算50%免疫量ID<sub>50</sub>)

毒株	代数	毒力 (小鼠脑腔0.03 ml)	腹腔免疫组		脑腔免疫组		血清中和指数
			攻击量 (MIPLD <sub>50</sub> )		攻击量 (MIPLD <sub>50</sub> )	ID <sub>50</sub>	
SA <sub>14</sub> A	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub>	<0.0	9030	0.00079	—	—	100
			90309	0.001197	—	—	
	HK <sub>27</sub> CE <sub>5</sub>	0.75	1000	0.0007	1000	0.0003	—

注: MIPLD<sub>50</sub> 示小鼠腹腔毒力。

丙、免疫指数法(计算免疫指数)

毒株	代数	毒力 (小鼠脑腔0.03 ml)	免疫力试验			血清中和指数
			免疫组毒力	对照组毒力	免疫指数	
SA <sub>14</sub> A株	HK <sub>27</sub> CE <sub>4</sub>	1.68	<0.6	7.77	>18,620,000	≥1,000
	HK <sub>27</sub> CE <sub>5</sub>	<0.0	2.36	6.80	27,540	100
SA <sub>14</sub> B株	HK <sub>24</sub> CE <sub>4</sub>	4.33	<0.6	7.77	>18,620,000	≥6,761

表6 SA<sub>14</sub>A株不同途径免疫豚鼠后的血清中和抗体反应

代数	毒力 (小鼠脑腔0.03 ml)	免疫途径	血清中和指数	
			1个月	3个月
HK <sub>27</sub> CE <sub>5</sub>	<0.0	脑腔	10	3,162
		皮下	100	10,000
		肤腔	68	148

表 7 恒河猴脑腔注射 SA<sub>14</sub>A 株后不同时间的血清抗体测定

猴 号	感染材料的毒力 (小鼠脑腔 0.03ml)	不同时间中和指数				
		感染前	感 染 后(月)			
			1/2	1	2	3
5	0.75	3	≥14	≥100	46	67
6	0.75	3	≥14	≥67	100	323
9	0.75	6	≥3	≥3	4	10

从表 5 可见,应用不同的免疫力测定方法对小白鼠免疫后均能产生显著的保护作用,即:免疫指数最高达 1000 万以上,50% 免疫量最少达 0.0003 毫升。一个月后采血,血清内抗体中和指数亦达 100—1000。

对豚鼠以脑内、皮下、肤腔免疫后一个月,血液内出现中和抗体。至 3 个月时,抗体上升达相当高的水平,其中以皮下免疫组最高(表 6)。

对脑内接种 SA<sub>14</sub>A 株后恢复健康的猴子进行血清抗体测定的结果表明(表 7),3 只猴子中的二只由一个月开始至 3 个月血清中均能查出一定的中和抗体,另一只则未显示抗体的产生。该猴子自注射至观察期完了,始终未出现脑炎症状,体温亦未升高。看来,变异株接种猴子脑腔后产生血清抗体不高,这种现象与毒血症出现时间较迟的结果相一致,其原因可能与病毒在脑组织内繁殖较差有关。

从表 5 及表 6 可看到,在 27—29°C 连续培养的毒株 SA<sub>14</sub>B,其毒力未引起显著的变异,其免疫力及血清抗体反应与在 35—37°C 培养的变异株 SA<sub>14</sub>A 比较未发现很大的差别。

### 三、讨 论

乙型脑炎病毒 SA<sub>14</sub> 毒株通过地鼠肾单层细胞连续传递 20 代后,对小白鼠的脑腔毒力开始下降,再继续传递 30 代以及将第 27 代地鼠肾细胞传代的病毒又通过鸡胚悬浮组织块 1—10 代,其毒力均稳定在  $10^{-1}$ — $10^{-2.5}$ /0.03ml 之间而未发现有显著的升高或进一步的下降。从猴子脑腔感染的试验结果来看,即猴子发病潜伏期、症状、病程及死亡猴子脑内病毒毒力等均证明变异株对猴子的脑腔毒力有显著下降。尤其重要的是对小白鼠、豚鼠、猴子进行免疫力或血清抗体观察的结果证明,其抗原性和免疫性仍然保持良好。

在我们前一报告中<sup>[5]</sup>指出,乙型脑炎病毒 SA<sub>4</sub> 株在鸡胚悬浮组织块中连续传代的结果,病毒的致病力有所减弱,其免疫力亦有明显的下降。因此,利用地鼠肾单层细胞培养法以减弱乙型脑炎病毒毒力而维持其免疫力具有特别的意义。

在进行该项工作时,我们看到了 Rosenberger 及 Shaw 二氏<sup>[8,9]</sup>关于以节足昆虫为传染媒介的病毒通过地鼠肾细胞若干代后能对小白鼠的脑腔毒力减弱的报告,其中乙型脑炎病毒经传递 12 代,小白鼠脑腔毒力下降至  $10^{-4.8}$ /0.03 ml。又从日本学者 Kanda 氏<sup>[9,10]</sup>等的报告中看到,作者将乙型脑炎病毒“中山”株通过地鼠肾细胞 40—56 代后,小白鼠的脑腔毒力仍然高达  $10^{-5.5}$ — $10^{-6.3}$ /ml (即  $10^{-4.0}$ — $10^{-4.8}$ /0.03 ml)。以上作者的试验结果均未达到我们所获得的毒力减弱程度。在本工作中同时表明了同一毒株 SA<sub>14</sub> 用不同条件

(培养温度、传代间隔时间),同样的细胞内连续传代,结果未能使毒力显著地下降。因此,我们认为乙型脑炎病毒毒力的变异程度不仅与所用病毒有关,同时与培养传代的条件和方法亦有一定的关系。

近年来,有一些学者在研究其他脑炎病毒的变异中亦采用单层细胞连续传代法或传代细胞慢性感染病毒传代法而获得了减弱程度不同的变异株。Murphy 氏<sup>[11]</sup>等将委内瑞拉马脑炎病毒通过 HeLa 细胞 65 代后,发现该病毒对小白鼠腹腔毒力有显著下降,但脑内毒力却无肯定的降低。Кравченко 氏<sup>[12]</sup>等将壁虱脑炎病毒分别在 HeLa 细胞及家兔脾脏单层细胞内各通过 36 代后,证明该病毒对小白鼠鼻腔及皮下毒力已有相当大程度的减弱,但对脑腔感染毒力并未下降。Henry 氏<sup>[11]</sup>将委内瑞拉马脑炎病毒通过 L 细胞慢性感染 8 个月后,再通过新鲜 L 细胞 7 代,而获得了对小白鼠腹腔、猕猴(*Macaca mulatta*)脑腔无致病力并保有强免疫力的变异株,但对小鼠脑腔感染则仍然有相当高的毒力。Berge 氏<sup>[2]</sup>等将委内瑞拉马脑炎病毒通过豚鼠心肌细胞 100 代,发现病毒自 45 代开始对小白鼠的脑内毒力减弱至几乎完全无毒,而以该减弱毒株免疫动物后能抵抗原毒株的脑腔攻击。以上这些作者所获得的结果在某些程度上与我们在乙型脑炎病毒的变异研究中获得的结果相似。由此可见,利用不同嗜神经病毒在不同细胞内连续培养的方法可获得减弱程度不同的毒株,并有可能获得对小白鼠或猴子脑内接种致病力减弱并保有抗原性和免疫原性的变异株。

但是根据我们对 SA<sub>14</sub> 变异株进一步在地鼠肾细胞内连续传代达 50 代的结果看,其对小白鼠的脑腔毒力并无继续下降的趋势而稳定在一定的滴度水平。似乎,病毒在一定条件下发生变异后开始保持一定的稳定性,这种现象,在我们前文<sup>[5]</sup>所叙述的 P<sub>3</sub> 株神经外毒力和 SA<sub>4</sub> 株脑腔毒力下降情况的结果中亦可看出;又从 Berge 氏<sup>[2]</sup>的结果分析亦可发现,委内瑞拉马脑炎病毒通过豚鼠心肌细胞 70—100 代后,其毒力并未进一步下降。可见,单用一种方法连续传代而使原来对小白鼠脑神经组织高度嗜性的病毒完全丧失对小鼠的脑腔毒力似乎不太容易或需要相当长时期的培养传代。

因此,为了进一步减弱病毒的嗜神经性,我们认为以下二种方法值得试验,即按照 Sabin 氏<sup>[13]</sup>选择脊髓灰白质炎活疫苗毒种的蚀斑法,从已发生深刻变异的病毒悬液中提取可能存在的对小白鼠及猴子脑腔感染毒力更弱的病毒颗粒。另一种方法则应用两种以上的有效的减毒培养方法交换使用,使全部病毒颗粒发生更深刻或更完整的变异。

为使我们已经获得的弱毒变异株对小白鼠及猴子的脑内致病力进一步地减弱,我们已经按上述二种方法正在进行试验中,详细结果将待今后继续报导。

#### 四、摘 要

1. 乙型脑炎病毒 SA<sub>14</sub> 毒株通过地鼠肾单层细胞连续传递 20 代后,对小白鼠的脑内毒力发生显著变异,由原来的  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  下降至  $10^{-1}$ — $10^{-2.5}$ /0.03ml 之间,与地鼠肾细胞的细胞致病毒力(TCID<sub>50</sub>)比较,二者相差 4.00—5.07 log,而皮下,腹腔毒力则已丧失。

2. 变异株对恒河猴的脑腔致病力亦有明显的减弱,以大量病毒脑腔感染猴子后,虽有脑炎症状出现,但发病潜伏期和病程均有延长,而感染的 4 只猴子中仅有一只死亡。



3. 变异株对小白鼠具有較強的免疫力作用,在豚鼠、猴子及小白鼠体内均能产生一定的特异性中和抗体。

### 参 考 文 献

- [1] Henry, J. Hearn, *J. Immunol.* **84**(6):626, 1960.
- [2] Berge, T. O., Banks, I. S. and Tigertt, W. D., *Amer. J. Hyg.*, **73**:209, 1961.
- [3] Price, W. H. and Lee, R. W., *Amer. J. Trop. Med and Hyg.*, **10**(3):403, 1961.
- [4] 李河民、俞永新:微生物学报, **7**(4):327, 1959.
- [5] 李河民、俞永新、季淑善、武佩芬:微生物学报, **8**(3): 251—259, 1962 年。
- [6] 李河民、俞永新、张挺秀:1945—1956 年在国内各地分离的流行性乙型脑炎病毒的生物学特性, 全国急性传染病学术会议资料选编, 下册, 317 页, 1959 年。
- [7] Dulbecco, R. and Vogt, M., *J. Exp. Med.*, **99**:167, 1954.
- [8] Morgan, J. F., Morton, H. J. and Parker, R. C., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **73**:1, 1950.
- [9] Rosenberger, C. R. and Shaw, C. W., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **106**(1):223, 1961.
- [10] Inoue Kanda, Y., Iwasaki, T. and Kato, H., *J. Immunol.*, **87**(3):337, 1961.
- [11] Murphy, L. C., Blackford, V. L., Gleiser, C. A., *Amer. J. Vet. Res.*, **16**(61):521, 1955.
- [12] Кравченко, А. Т. и Васильев, В. Н., *Вопросы Вирусологии*, № 1:10, 1961.
- [13] Sabin, A. B.: *J.A.M.A.* **162**:1589, 1956.

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

### III. ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ВИРУСА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА ДЛЯ БЕЛЫХ МЫШЕЙ И МАКАК РЕЗУСОВ ПОСЛЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ПАССИРОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ ПОЧЕЧНЫХ КЛЕТОК ЗЛОТИСТЫХ ХОМЯКОВ

Юй Юнь-синь, Ао Цянь, Лей Вэнь-си и Ли Хэ-минь

(Контрольный Институт медикаментов и биопрепаратов Минздрава КНР)

При дальнейшем изучении изменчивости вируса японского энцефалита для получения аттенуированных высокоиммуногенных вариантов в настоящей работе выбрали штамм SA<sub>14</sub>, обладающий сравнительно слабым нейротропизмом, и его продолжительно пассировали в культуре однослойных клеток почки хомяка.

Эксперименты показали, что вирулентность полученного варианта SA<sub>14</sub>-А для белых мышей и макак резусов значительно снижалась с сохранением его иммуногенности.

Главные результаты опытов кратко сообщаем в следующем:

#### 1. Последовательное пассирование исходного штамма

Проводилось в вышеуказанной культуре по 2 линиям: при T 37°C и 27°C. Первый вариант вируса был обозначен штаммом SA<sub>14</sub>-А, последний-штаммом SA<sub>14</sub>-В.

Оказалось, что вирулентность SA<sub>14</sub>-А для мышей при внутримозговом заражении постепенно снижалась от исходного титра (LD<sub>50</sub>) 10<sup>-5,34</sup> до титра 10<sup>-1</sup>—10<sup>-2,5</sup> после 20 пассажей. При сравнении титров вируса с помощью методов определения в культуре клеток почки хомяка (TCID<sub>50</sub>) и внутримозгового введения мышам (LD<sub>50</sub>) наблюдалось, что разница между ними (TCID<sub>50</sub>-LD<sub>50</sub>) увеличивалась от исходного логарифма -0,5 ~ -1,33 до +4,00 ~ +4,56 после продолжительного пассирования. Штамм SA<sub>14</sub>-А был авирулентным для мышей при подкожном или внутрибрюшном заражении, но вирулентность штамма SA<sub>14</sub>-В оставалась практически без изменения.

2. Вирулентность SA<sub>14</sub>-А для макак резусов также заметно ослаблялась: при внутримозговом введении вируса данного варианта в большой дозе из 4-х зараженных обезьян 3 заболели энцефалитом с значительным удлиненным инкубационным периодом и затянутым течением болезни. Из 3-х заболевших обезьян лишь одна закончилась смертью, но все 6 обезьян в контрольной группе, зараженных исходным штаммом SA<sub>14</sub>, погибали из-за типичного энцефалита.

3. Вариант SA<sub>14</sub>-А сохранял хорошую иммуногенность, после однократного внутрибрюшного введения создал у мышей интенсивную резистентность к заражению высоковирулентным штаммом. Также наблюдалось, что данный вариант способен вызывать образование специфических антител в организме белых мышей, морских свинок и обезьян.