

亚洲甲型流行性感胃病毒的 生物学性状研究

III. 毒性反应及发热反应

王植崙 任貴方 焦永真 朱旣明*

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

关于流感病毒的毒性作用, Henle 等^[3-5]已报告过原甲型、猪型及乙型流感病毒脑内注射均可引起小白鼠抽搐死亡。Evans^[6]报告甲、乙型流感病毒可引起家兔角膜混浊反应。上述作者們证实引起这些反应的物质和病毒颗粒不能分离开, 并认为流感病毒的毒性大小在引起流感的临床症状的轻重程度上有重要的意义。

Bennett 等^[7-10]仔细观察过流感病毒引起的家兔发热反应, 并证实引起发热反应的性质是与病毒颗粒相结合的, 加温 62°C 30 分钟或先用霍乱弧菌滤液注射家兔, 然后注射病毒时均可使发热反应消失, 但未注意不同型别、不同代数的毒种间的差异。

关于亚洲甲型流感病毒的某些生物学性状的研究国内已有报告^[1,2], 本文系报告此型病毒的毒性作用及引起家兔的发热反应的研究结果。

一、材料与方方法

(一) 病毒 亚洲甲型 I 相张 57-4 株鸡胚 6 代尿液病毒(以下简称张 57-4 E₆), 亚洲甲型 II 相长生 57-2 株鸡胚 6 代或 5 代尿液病毒(长生 57-2 E₆ 或 E₅)、鸡胚 20 代尿液病毒(长生 57-2E₂₀) 以及亚甲型京科 56-1 鸡胚 7 代尿液病毒(京科 56-1 E₇)。一次大量接种鸡胚, 收获后分装保存于 -30°C 冰箱内备用。每次用前滴定血凝效价。

(二) 动物及接种方法 取三周龄小白鼠(包括本院动物房饲养的瑞士种, 卫生部生物制品研究所、流行病学与微生物学研究所及原协和医学院等动物房繁殖的昆明种), 脑内接种 0.03 毫升病毒原液, 静脉接种 1 毫升病毒原液。成年家兔, 体重约 2 公斤, 为本院动物房繁殖的大耳白及青紫蓝种, 眼前房接种 0.2 毫升, 静脉接种 5 毫升, 接种材料均用病毒原液。

(三) 测定毒性及发热反应的指征 小白鼠接种后连续 10 天观察其外表、活动力及死亡。家兔眼前房注射后连续 10 天观察其角膜混浊反应的程度。家兔静脉接种后测量体温的升降, 一般在接种前 1-2 天内连续测体温 2 次, 接种病毒前 40 分钟再测体温 1 次, 接种后每小时测体温 1 次, 连续 12-17 小时, 至 23 或 24 小时再测 1 次。

二、实验结果

(一) 亚洲甲型流感 I、II 相病毒对小白鼠的毒性作用 用 I 相张 57-4 E₆ 及 II 相长

* 长春生物制品研究所。
本文 1962 年 11 月 13 日收到。

生 57-2 E₆ 病毒 (血凝滴度均为 1:160) 經腦內及尾靜脈注射不同品种的小白鼠, 每个試驗重复 2 次, 每次每种小白鼠不同途径接种 5—10 只, 并用生理盐水注射 5—10 只小白鼠作对照。小白鼠經腦內注射流感病毒后 24—72 小时均有松毛、不嗜动的病态, 大部分均逐渐复原, 只发现 II 相长生 57-2 E₆ 病毒腦內注射本院种小白鼠后第 2 日有 1 只死亡, 腦內注射原协和种小白鼠后 48 小时发现有震顫, 提尾旋轉后有抽搐, 但均复原活存。靜脈注射后于 24—48 小时发现有毛粗松、不好动等病态, 但均复原无死亡。对照组无异常表现。

(二) 亞洲甲型 I、II 相流感病毒对家兔角膜的毒性反应 家兔以乙醚輕度麻醉, 用注射器抽取眼前房水 0.2 毫升后注入 I 相张 57-4 E₆ 尿液病毒 (血凝滴度 1:160) 0.2 毫升。共接种 4 只家兔。接种后 20 小时出現結膜巩膜充血、角膜混浊, 48 小时角膜混浊加重, 第 3—4 日开始消退, 第 5—8 日混浊全部消退, 角膜恢复透明。結膜巩膜充血一般多延迟 2—3 日始行全部消退。在观察期間家兔无明显体温升高。注射正常尿液的 2 只家兔无反应。接种后 3 周取实验家兔的血清作抗体检查, 发现有 1:80—1:320 的血凝抑制抗体。接种后第 4 周在实验家兔同側角膜同法再次注射同株病毒, 反应不規律, 有的无反应, 有的仅有輕度混浊反应, 于 3—6 日間即全部消退 (表 1)。

用 II 相长生 57-2 E₆ 尿液病毒 (血凝滴度 1:160), 同上法注射 5 只家兔, 角膜反应与 I 相病毒所引起的相同。恢复期血清有 1:40 的血凝抑制抗体。取上述实验家兔于第 1

表 1 不同株亞洲甲型与亞甲型流感病毒家兔角膜反应結果

病 毒		家兔号	角膜混浊程度	角膜混浊出現時間	角膜混浊消退時間	血清中血凝抑制抗体		重复注射的結果
株 別	血凝滴度					測定的時間 (接种后)	滴度	
张 57-4 E ₆ (I 相)	1:160	1	++++	20 小时	5—8 日	21 日	1:80— 1:320	第 1 次注射后第 4 周 在同側以同株病毒注射, 反应不規律, 3—6 日消退
		2	++++					
		3	++++					
		4	++++					
长生 57-2 E ₆ (II 相)	1:160	5	++++	20 小时	5—8 日	14 日	1:40	第 1 次注射后第 2 周 以同株病毒注射同 側, 反应不規律
		6	++++					
		7	++++					
		8	++++					
		9	+					
长生 57-2 E ₆₀ (II 相)	1:640	10	+	24—48 小时	2—4 日	未 試	未 試	
		11	+					
		12	+					
	1:320	13	++++	24 小时	9 日	未 試	未 試	
		14	++++					
15	-							
京科 56-1 E ₇	1:80	16	++++	24 小时	6—12 日	未 試	未 試	
		17	++++					
		18	++++					

“++++” 表示整个角膜发生混浊; “+++” 表示大約 3/4 角膜发生混浊;

“+” 表示大約 1/4 角膜发生混浊; “-” 表示无混浊出現。

次注射后14日同侧角膜同法再次注射同株及异株(I相张 57-4 E₆)病毒各1只,角膜反应亦有减轻和混浊消退时间提早的现象。

用II相长生 57-2 E₂₀ 尿液病毒,分两次同上法注射家兔眼前房。第一次尿液病毒血凝滴度 1:640,注射3只家兔,24—48小时均出现轻度角膜混浊反应,48—96小时全部消退。第二次尿液病毒血凝滴度 1:320,注射3只家兔,1只无反应,其余2只均于24小时出现全部角膜重度混浊反应,持续5—6日不变,至第9日才消退。与前述长生 57-2 E₂₀ 病毒所引起的反应比较,长生 57-2 E₂₀ 病毒引起角膜混浊反应的作用显然是不规律的。

用亚甲型京科 56-1 E₇ 流感尿液病毒(血凝滴度 1:80),同法注射2只家兔。24小时均出现角膜混浊,48小时加重且延及全部角膜,6—12日开始消退,8—14日才全部消退。

(三) 亚洲甲型 I、II 相病毒引起家兔发热反应的试验 用 I 相张 57-4 E₆ 尿液病毒(血凝滴度 1:160),经家兔耳静脉注入 5 毫升,接种 4 只家兔。注射后 2 小时体温开始上升,4 小时体温升至最高,平均超过正常体温 1.11°C (0.1°—1.95°C),5 小时开始下降,6 小时迅速下降,24 小时完全恢复正常(第 7—23 小时未测体温)。另一次试验用 3 只家兔,同法注射病毒,连续观察 12 小时,反应基本同前,但发现在注射后第 9 小时体温又开始上升,于 12 小时体温回升到几乎和第 1 次相同,出现双峰热波。至 24 小时接近正常(图 1)。

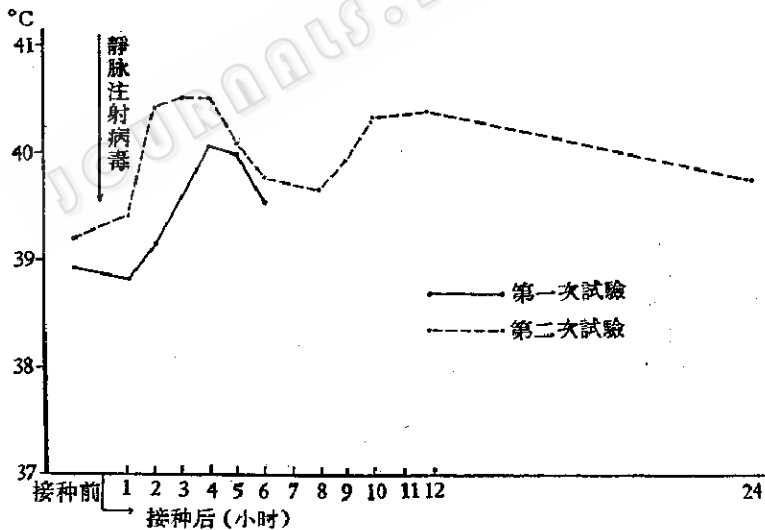


图 1 亚洲甲型张 57-4 株鸡胚尿液病毒家兔静脉注射后的发热反应

用上述实验的家兔,在第 1 次注射后 6 日或 28 日重复注射:用同株病毒注射 3 只家兔,用异株(长生 57-2 E₆)病毒注射 1 只家兔,发热反应大致与第 1 次注射的结果相同,即仍出现双峰热波,体温上升的时间及幅度基本相仿。

用 II 相长生 57-2 E₆ 尿液病毒(血凝滴度 1:160),同法接种 5 只家兔,连续观察 12 小时。第 1 热峰亦出现在第 4 小时,平均体温超出正常 1.93°C (1.3°—2.6°C),第 2 热峰出现在第 12 小时,平均体温超出正常 2.13°C,24 小时后体温恢复正常。另一次试验用 4 只家兔,结果基本相同(图 2)。

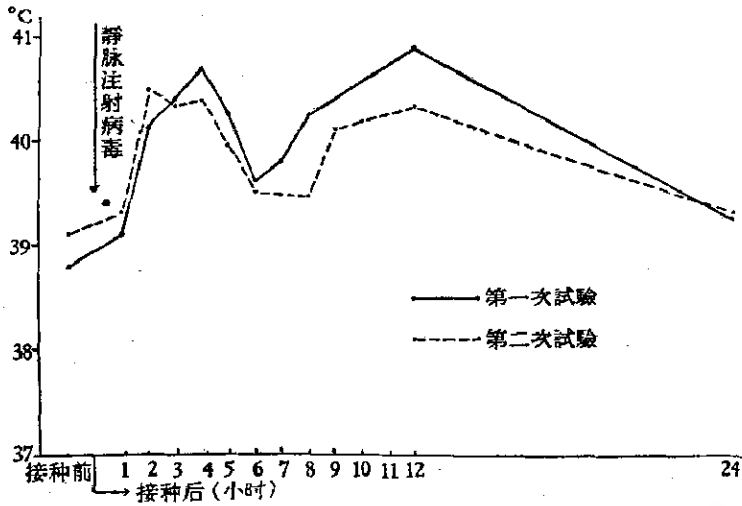


图2 亚洲甲型长生 57-2 株鸡胚 6 代尿液病毒家兔静脉注射后的发热反应

用上述实验的家兔，在第一次注射后 7 日或 14 日用同株病毒同法注射 4 只家兔，用异株病毒（张 57-4 E₆）注射 1 只家兔，观察结果与第一次注射的反应结果相似。

同法用正常尿液接种 3 只家兔，没有观察到发热反应。

用 II 相长生 57-2 E₂₀ 尿液（血凝滴度 1:640），同法接种 4 只家兔，注射后第 4 小时体温升至最高，平均高出正常体温 1.4°C（1.2°—1.5°C），第 8 小时降至正常，此后仅有 0.3°C 的升高，至第 24 小时完全恢复正常。这一结果与同株 E₆ 引起的反应不同，没有明显的双峰热波出现，且升高的程度亦低于同株 E₆ 所引起者（图 3）。

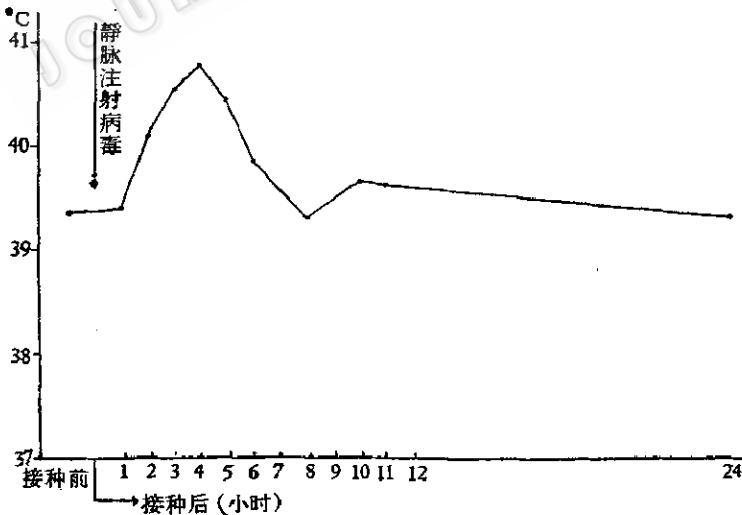


图3 亚洲甲型长生 57-2 株鸡胚 20 代尿液病毒家兔静脉注射后的发热反应

为了重复证明同株不同代数的病毒在静脉注射家兔后所引起的发热反应确有不同的表现，我们又用长生 57-2 E₆ 尿液病毒（血凝滴度 1:160）和长生 57-2 E₂₀ 尿液病毒（血凝滴度 1:160），在同一条件下分别接种家兔各 5 只，同时以正常鸡胚尿液接种 4 只家兔作为对照。在试验中所使用的家兔均于接种前连续测量体温 3 天，每天 2—3 次。从图 4 可

以看見鸡胚传代次数少的病毒(长生 57-2 E₅), 在靜脉注射家兔后, 的确引致双峯热波, 而在鸡胚传代次数較多的病毒(长生 57-2 E₂₀) 則否。

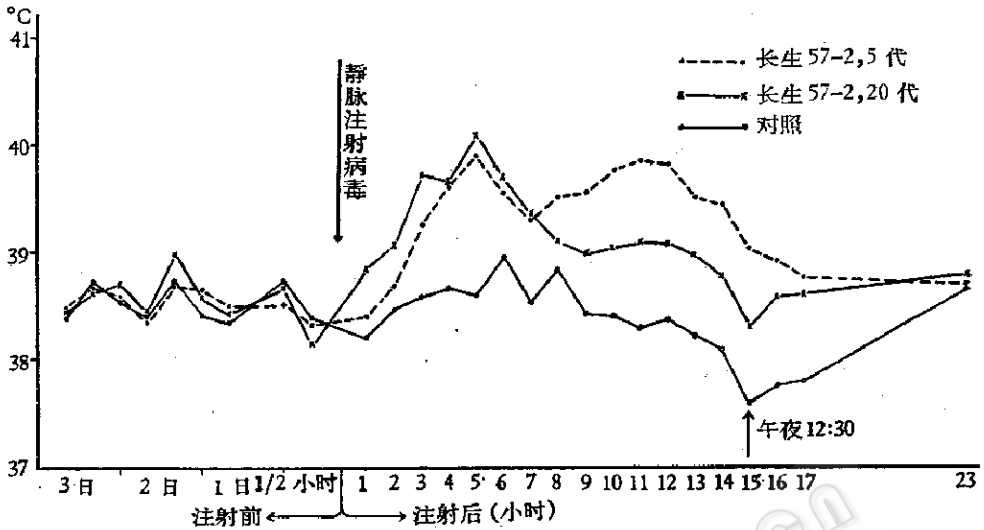


图 4 亚洲甲型长生 57-2 株不同代数鸡胚尿液病毒引致家兔发热反应的比較

用亚甲型京科 56-1 E₇ 尿液病毒(血凝滴度 1:160), 同法接种 3 只家兔。結果与长生 57-2 E₂₀ 的結果相仿, 并无双峯热波的出现(图 5)。

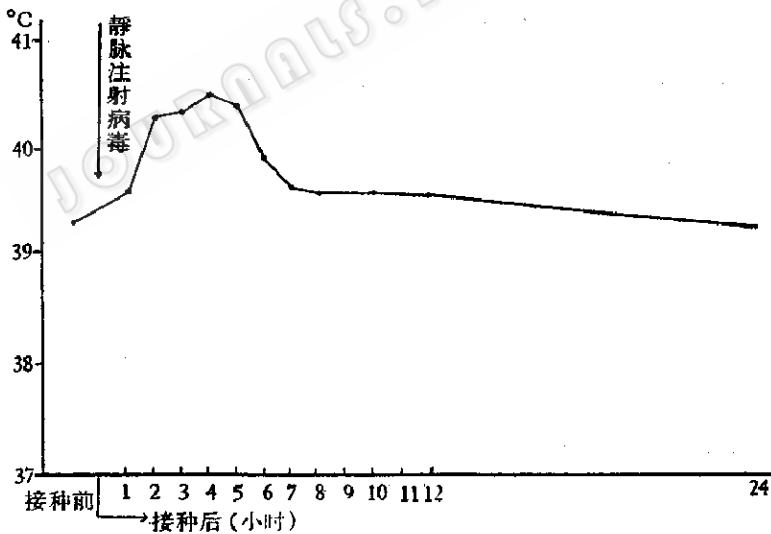


图 5 亚甲型京科 56-1 株鸡胚尿液病毒家兔静脉注射后的发热反应

三、討 論

亚洲甲型 I、II 相流感病毒, 經鸡胚传 6 代, 經眼前房注射均可引起家兔角膜混浊反应, 并引起血清抗体产生。再次注射仍可引起混浊反应, 但反应程度和持續時間均有減輕和縮短的现象, 这可能与机体免疫有关。

亚洲甲型 II 相病毒, 經鸡胚传 20 代, 引起家兔角膜反应不規律。这一现象可能与病毒在鸡胚传代后的毒力变异有关。

亚甲型京科 56-1 株,經鸡胚传 7 代,引起家兔角膜混浊反应的結果,較亚洲甲型 I、II 相鸡胚传 6 代的病毒所引致的反应強和持續時間长,表明亚洲甲型流感病毒引起角膜反应的毒性作用可能是較弱的。

亚洲甲型 I、II 相病毒,鸡胚传 6 代或 5 代,家兔靜脉注射后均引起双峯热波反应,第 2 热峯出现在注射后第 4—5 小时,第二热峯出现在第 10—12 小时。同株鸡胚传 20 代的病毒仅引起第一热峯的出现。看来此型病毒随鸡胚传代的次数增加,其引起家兔发热的能力亦发生改变。亚甲型流感病毒經鸡胚传 7 代亦只引起与长生 57-2 E₂₀ 类似的单峯热型反应,似乎不同型别的毒株在引致家兔发热反应的能力上有所不同。Bennett 等^[9]报告,家兔在第一次注射甲型或乙型流感病毒 (PR₈ 株或 Lee 株) 后可以产生耐力,耐力持續 11 日,在此期間再次注射同型或异型流感病毒不引起发热反应。在我們的試驗中发现在第一次注射病毒后的第 6、7、14 及 28 日再次注射同株或异株病毒,均未見耐力現象的出现。这亦可能是亚洲甲型流感病毒的一个特点。检查家兔第一次注射后第 14 日的血清,发现有 1:80—1:1280 的血凝抑制抗体,說明发热反应与机体的免疫状态无密切联系。

四、結 語

1. 經鸡胚传 6 代的亚洲甲型流感病毒能引起家兔角膜混浊反应,病毒在鸡胚传 20 代后,其毒性作用有不規律的趋向。同側再次注射时反应不規律,且提早消失。

2. 在鸡胚中传 6 代的亚洲甲型流感病毒,靜脉注射家兔可以引起双峯型的发热反应,但經鸡胚传 20 代的病毒,热型只呈单一高峯。亚甲型病毒只呈单峯热型。

参 考 文 献

- [1] 童葵塘,刘錦棠,朱既明:微生物学报,7:273,1959。
- [2] 刘錦棠,童葵塘,朱既明:微生物学报,7:284,1959。
- [3] Henle, G., Henle, W.: *Science*, 100:410, 1944.
- [4] Henle, G., Henle, W.: *J. Exp. Med.*, 84:623, 1946.
- [5] Henle, W., Henle, G.: *J. Exp. Med.*, 84:639, 1946.
- [6] Evans, C. A., Rickard, E. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 58:73, 1945.
- [7] Bennett, I. L., Wagner, R. R., LeQuire, V. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 71:132, 1949.
- [8] Wagner, R. R., Bennett, I. L., LeQuire, V. S.: *J. Exp. Med.*, 90:321, 1949.
- [9] Bennett, I. L., Wagner, R. R., LeQuire, V. S.: *J. Exp. Med.*, 90:335, 1949.
- [10] Wagner, R. R., Bennett, I. L.: *J. Exp. Med.*, 91:135, 1950.

STUDIES ON THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE ASIAN A TYPE INFLUENZA VIRUS

III. TOXICITY AND PYROGENICITY TO EXPERIMENTAL ANIMALS

WANG CHIH-LUN, JEN KUEI-FANG, CHIAO YUNG-CHEN, CHU CHI-MING

(Laboratory of Influenza, Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

1. The Asian A type influenza virus, which had been passed through embryonated eggs up to the 6th passage, caused corneal turbidity after inoculation into the anterior chamber of rabbits. However, this reaction became irregular when the 20th passage virus was employed. The reaction produced after reinoculation of the virus at the same site was also irregular and subsided quickly.

2. When injected intravenously into rabbits, the 6th passage virus caused a rise in temperature which was characterized by a two-peak fever curve, while the injection of a 20th passage virus caused only one-peak fever curve. A prime strain also gave an one-peak fever curve.