

流行性乙型脑炎病毒在小白鼠(不同途径及不同龄)传代毒力变异的研究*

黃 禎 祥

(中国医学科学院病毒学系, 北京)

1954年我們曾观察到中山株对3周龄小白鼠皮下感染的毒力很低, LD_{50} 为 $10^{-1.1}$, 同一材料在脑内滴定为 $10^{-8.5}$ 。这是与 Lennette 与 Koprowski^[1] 1944 年的报告不同 (LD_{50} 腹腔为 $10^{-6.3}$, 脑内为 $10^{-8.4}$)。其脑外途径感染致死力降低可能与該株长期在小白鼠脑内传代有关。为了証明这种看法, 从1954年开始进行用皮下毒力很高的京卫研₁株在小白鼠脑内传代并观察其毒力变动的情况。以后为了进一步認識有关变异机制問題, 从1955年又先后开展了該毒株在不同鼠龄以不同途径传代的变异研究。本文报告京卫研₁株在鼠脑传代皮下毒力随着传代次数的递增而下降, 降低的速度又与鼠龄有密切关系; 相反地, 病毒通过皮下接种传代皮下毒力不降低, 已降低的皮下毒力变异株, 毒力可以回轉。

一、材料与方 法

(一) 病毒株 系采用京卫研₁株病毒, 通过3周龄小白鼠脑内传了31—34代。

(二) 病毒的传代試驗 分为脑内及皮下两途径进行。脑内传代又分别在7天乳鼠、3周、5周及1年鼠四組进行; 皮下传代則分别在7天乳鼠及3周鼠进行。以上各組传代的病毒材料均采自发病的鼠脑組織, 用10%脱脂牛奶生理盐水制成10%悬液, 經 3,000R.P.M. 沉淀30分, 注射0.03毫升上清液。传代的代数計算均以开始传代的毒株, 如京卫研₁的31—34代为零代。

(三) 变异株毒力回轉試驗 将京卫研₁株在一年龄小白鼠脑内传50及147代的变异株在小白鼠皮下传代, 前者在3周龄, 后者在10天乳鼠进行。传代的病毒材料也均采自发病的鼠脑組織。

(四) 病毒毒力的測定 每传10—20代用发病垂死的鼠脑分别在3周鼠的皮下及脑内滴定, 每传20代左右則分别在7天乳鼠皮下及脑内滴定, 以便观察毒力的变动, 动物死亡观察时间为3周。病毒滴度的計算系按 Reed 及 Muench 的方法来計算病毒的50%致死度。

二、实 驗 及 結 果

(一) 病毒在脑内传代, 鼠龄对病毒毒力改变的影响

用31~34代京卫研₁株病毒在不同龄小白鼠脑内传代的实验結果见图1, 2, 3及4。从下图可以明显地看出病毒在小白鼠脑内传代, 皮下毒力随着传代次数的增加而逐渐降低, 但皮下毒力降低的速度及幅度則与传代的鼠龄有密切关系。病毒在成年鼠(5周及1年)脑内传代(图3及4), 皮下毒力降低較在幼鼠(7天及3周)脑内传代者的速度快、幅度

* 本实验的传代及滴定工作, 由馬国良同志进行, 謹致謝意。
本文1963年5月2日收到。

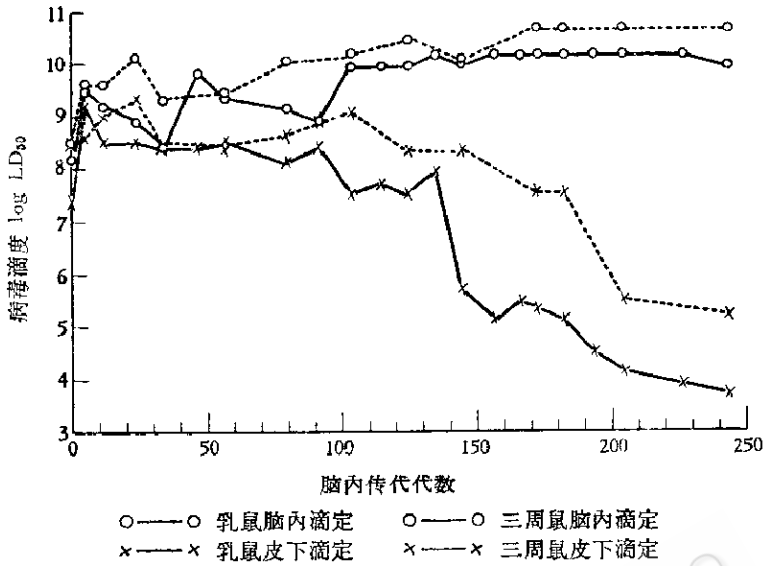


图1 A_{23} 31代开始在7天乳鼠脑内传代

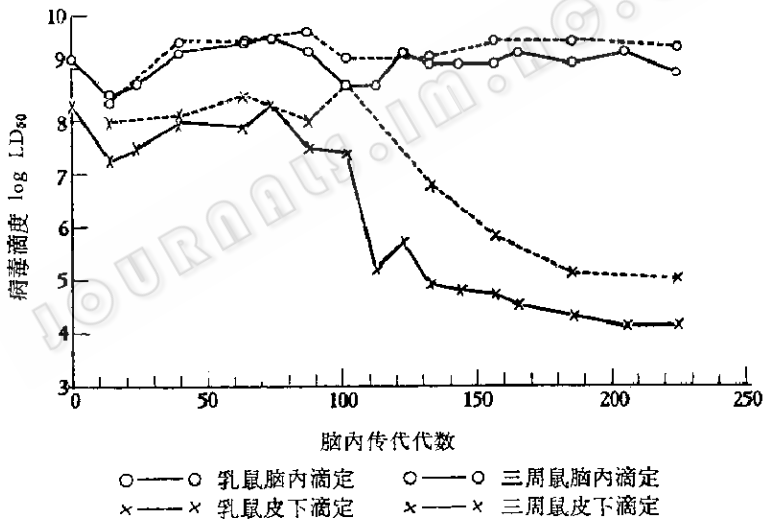


图2 A_{23} 33代开始在3周鼠脑内传代

大(图1及2)。病毒经成年鼠传50代左右后对3周鼠的皮下致死力降低4.5—6.0对数。在5周龄鼠传代的病毒从51代起到142代止对3周鼠的皮下毒力基本上维持在1.9—1.3对数,没有进一步下降的趋势,而在一年龄鼠传代的病毒到118代后则对3周鼠失去其皮下毒力;病毒在幼鼠脑内传代,其皮下毒力降低甚慢,在3周鼠传代的病毒,到113代以后才明显地看出皮下毒力降低,而在乳鼠传代的病毒则到145代以后才有明显的降低。但无论是在3周鼠或乳鼠传代的病毒,皮下毒力降低的幅度都不大,到200多代以后对3周鼠的皮下毒力还保持在 10^{-4} 左右。

以乳鼠脑内及皮下滴定来观察各组脑内传代的病毒,也同样看出上述变异的规律。从图4还可以看到在1年鼠脑内传代的病毒,由118代起皮下毒力还继续下降,118代为 $10^{-4.6}$,147代为 $10^{-3.1}$,但从147代到215代则不继续下降,而这个时期的变异株对3周

鼠已失去了皮下毒力。

為了更正確的表達病毒皮下毒力的改變將腦內與皮下接種 LD_{50} 的差距隨着傳代的變動情況列於圖 5。如圖 5 所示，在幼鼠腦（乳鼠及 3 周）傳代的病毒，皮下毒力的改變是在約 100 代後才開始的，改變的速度也是緩慢的，到 200 代左右才達最大幅度，而在成年鼠腦（5 周及 1 年）傳代，這種改變看不出有明显的潛伏期，並且到 50—100 代就達到最大幅度。從圖 5 可以看出鼠齡對皮下毒力降低速度及幅度的影響並不是平行的，乳鼠與 3 周鼠對病毒毒力改變的影響差別不大，同樣地 5 周與 1 年鼠的差別也不大，但 3 周與 5 周鼠則有很大的差別。

經腦內傳代後病毒的腦內感染致死力沒有明顯的改變。但如將各組每傳 50 代過程中 3—5 次滴定結果，計算其平均數進行比較（表 1）則可看出在幼鼠腦內傳代（乳鼠及 3 周鼠）的病毒對 3 周鼠腦內攻擊，其毒力是隨着傳代次數的增加而稍有提高，而在成年鼠腦內傳代（5 周及 1 年鼠）則腦內毒力隨着傳代次數的增加而稍為下降。

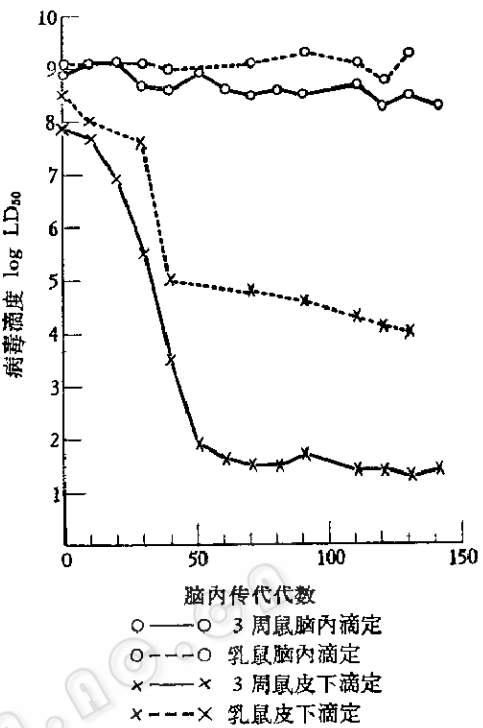


圖 3 A₂ 34 代開始在 5 周鼠內傳代

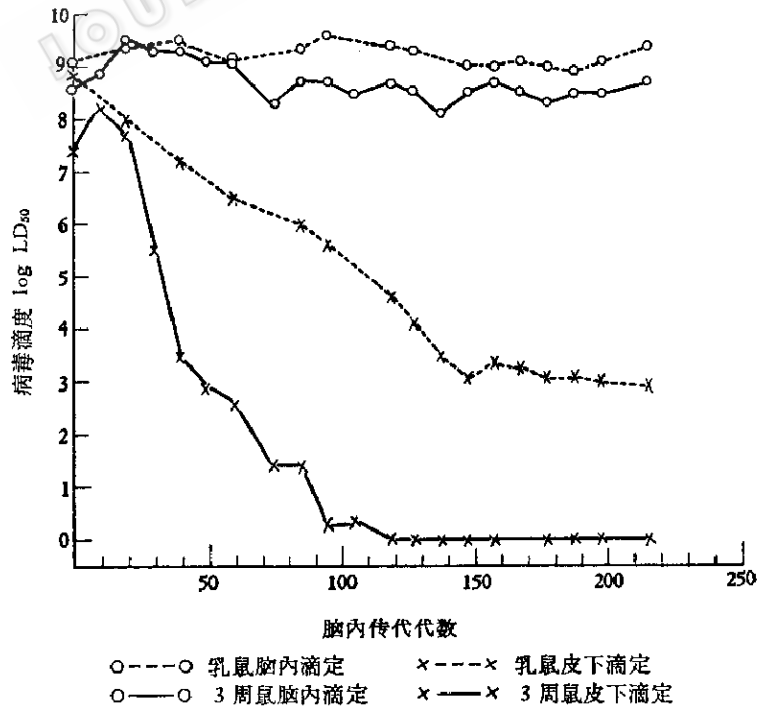


圖 4 A₂ 33 代開始在一年鼠內傳代

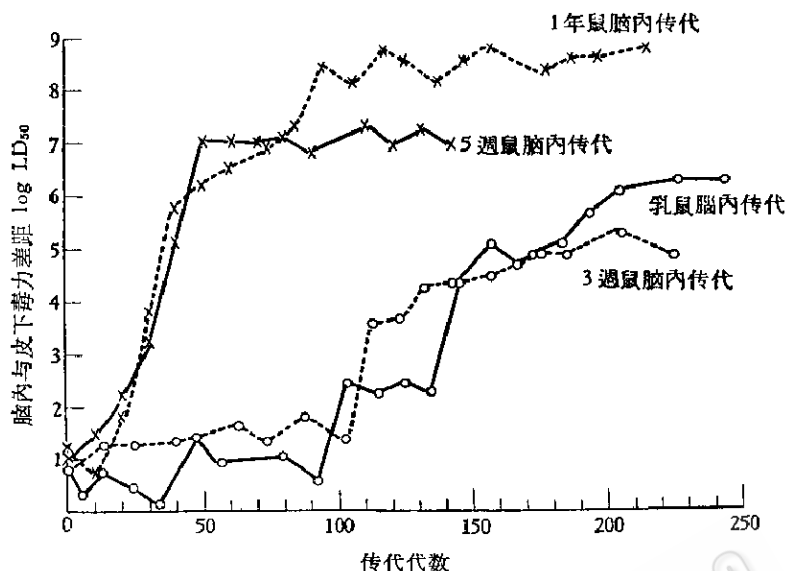


图5 病毒在不同龄小白鼠脑内传代,脑内与皮下毒力差距变动的比较

表1 病毒在小白鼠不同龄及不同途径传代对3周鼠脑内毒力变动情况

| 传代途径 及鼠龄 | 传 代 代 数 | | | | | 与1—50代的差别 | | | |
|-------------|---------|--------|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|---------|
| | 1—50 | 51—100 | 101—150 | 151—200 | 201—250 | 51—100 | 101—150 | 151—200 | 201—250 |
| 乳鼠脑内 | 9.18* | 9.13 | 9.96 | 10.10 | 10.03 | -0.05 | +0.78 | +0.92 | +0.85 |
| 3周鼠脑内 | 8.83 | 9.47 | 8.98 | 9.17 | 9.10 | +0.64 | +0.15 | +0.34 | +0.27 |
| 5周鼠脑内 | 8.88 | 8.62 | 8.45 | — | — | -0.26 | -0.43 | — | — |
| 1年鼠脑内 | 9.22 | 8.70 | 8.46 | 8.50 | — | -0.52 | -0.76 | -0.72 | — |
| 乳鼠皮下 | 9.30 | 9.50 | 9.48 | 9.70 | 9.77 | +0.20 | +0.18 | +0.40 | +0.44 |
| 3周鼠皮下 | 8.63 | 8.80 | 8.75 | 8.77 | — | +0.17 | +0.12 | +0.14 | — |

* 每50代中3—5次滴定的平均对数。

(二) 病毒皮下传代毒力改变情况

用京卫研₁株31及33代病毒分别在7日及3周龄小白鼠皮下接种,每次传代的病毒材料也均采自发病垂死的小白鼠脑组织。实验结果见图6及7,每传50代过程中3—5次

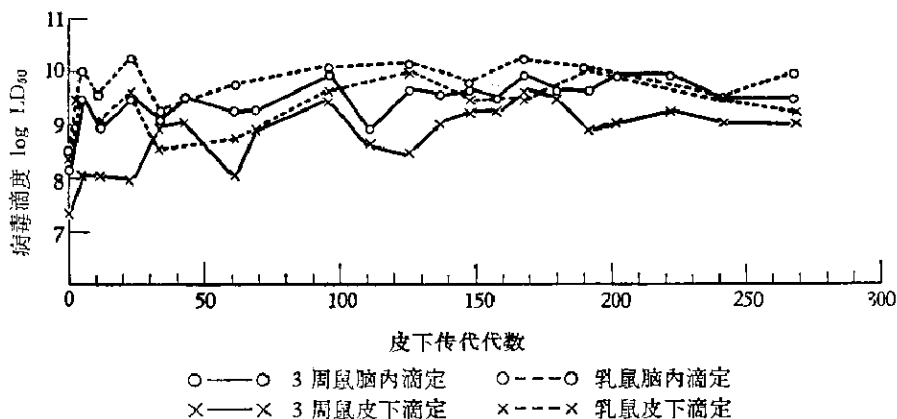


图6 A₂ 31代在7天乳鼠皮下传代

滴定結果的平均數見表 1。從圖 6、7 可以看出經皮下傳代的病毒雖在乳鼠傳了 269 代, 在 3 周鼠傳了 190 代以後對 3 周及乳鼠的皮下毒力並不隨傳代次數的增加而降低, 這是與病毒在腦內傳代的結果完全不同。

病毒通過皮下傳代的腦內毒力隨着傳代次數的增加稍為提高, 但不顯著。

(三) 變異株皮下毒力回轉試驗

由於通過皮下傳代的病毒皮下毒力不降低, 因此採用在一年齡小白鼠腦內傳了 50 代的變異株(圖 4, 此株對 3 周鼠皮下毒力已下降到 $10^{-2.7}$), 改在 3 周鼠皮下傳代, 以便觀察皮下毒力是否回升, 結果見圖 8, 隨着傳代次數的增多, 病毒對 3 周鼠的皮下毒力也逐漸提高, 到 115 代為 $10^{-7.1}$, 增加 4.4 對數, 腦內與皮下 LD_{50} 的差距, 也由開始的 6.3 縮小到 115 代的 1.0 對數。

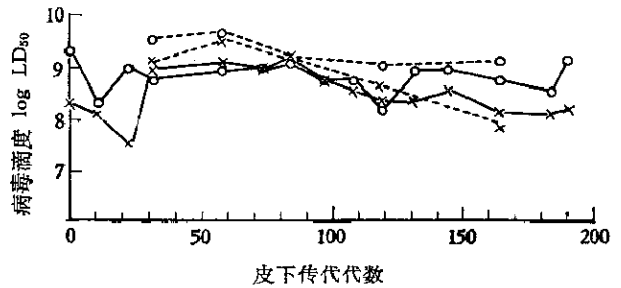


圖 7 A: 33 代開始在三周鼠皮下傳代
○——○ 3 周鼠腦內滴定 ○---○ 乳鼠腦內滴定
×——× 3 周鼠皮下滴定 ×---× 乳鼠皮下滴定

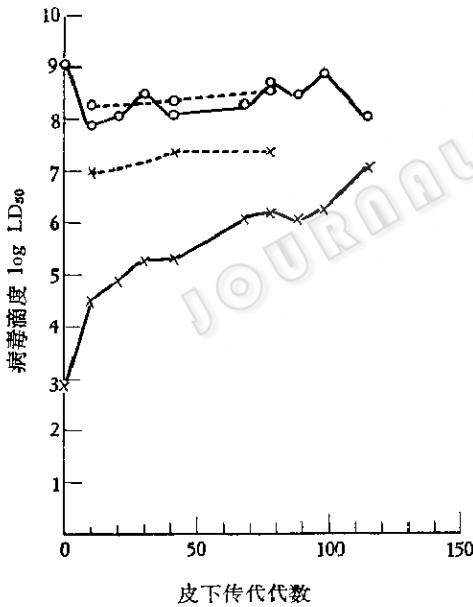


圖 8 在 1 年鼠腦內傳代 50 代的變異株
在 3 周鼠皮下傳代

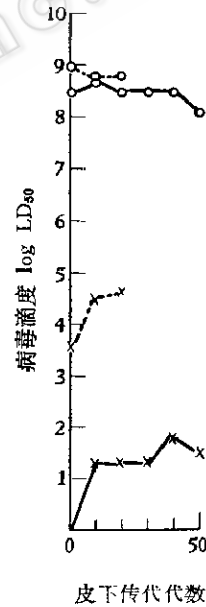


圖 9 A: 在 1 年鼠腦內傳 147 代的變異株
在乳鼠皮下傳代

進一步的回轉試驗採用在一年齡小白鼠腦內傳了 147 代的變異株, 此株已失去了對 3 周鼠皮下感染的致死力, 但對乳鼠皮下感染還有一定毒力, LD_{50} 為 $10^{-3.5}$, 因此改用在乳鼠皮下傳代。實驗結果見圖 9。本實驗僅傳到 50 代, 雖然還看不出有顯著的改變, 但已可初步看出皮下毒力有回升的趨勢, 對 3 周鼠的皮下 LD_{50} 由零回升到 $10^{-1.5}$, 腦內與皮下 LD_{50} 的差距由開始的 8.5 對數縮小到 6.4 對數。

三、討 論

从图 5 可以看出病毒通过鼠脑传代皮下毒力变化的过程似乎有 3 个阶段,即由原代到开始出现变异的潜伏期;从皮下毒力开始出现改变到变异高峯的显性期;及变异达到高峯后的水平或变异幅度——稳定期。变异的潜伏期在成年鼠(5 周及 1 年鼠)很短,0—10 代,而在幼鼠(乳鼠及 3 周鼠)则很长,90—100 代;在显性变异期的毒力改变速度,幼年鼠与成年鼠差别较小;而在皮下毒力下降的幅度,幼年鼠与成年鼠又有较大差别。如图 1—5 所示,在幼鼠脑内传代的病毒到 200 多代以后对 3 周鼠皮下毒力的下降才到 10^{-4} 左右,脑内与皮下毒力的差距为 5—6 个对数而在成年鼠传 50—117 代,皮下毒力已降低到 $10^{-4.5}$ —0,脑内与皮下毒力的差距则为 7—8.7 个对数。更值得指出的是无论在那一鼠龄传代,皮下毒力下降到一定水平后就维持在这一水平,不继续下降(图 5)。为什么在幼鼠与成年鼠脑内传代后的病毒,皮下毒力下降的速度及幅度不同?过去的研究曾指出皮下毒力的强弱与病毒在神经外组织繁殖能力有关^[2],但值得注意是否由于小白鼠在生长发育过程中脑组织成分的改变影响病毒在神经外组织的繁殖能力。

本实验的变异是在最敏感的鼠脑传代而实现的,失去了皮下毒力的变异株在鼠脑繁殖能力比原始株仅有小差别。从表 1 可以看出虽然病毒在乳鼠脑内传代,脑内病毒量随着传代次数的递增有规律地稍为增加,但在一年鼠脑内传代能使皮下毒力降低较快的环境,病毒量反而是随着传代次数的递增而有规律地稍为降低,后者说明变异株在脑组织繁殖能力并不比原始株强。从每代传代小白鼠发病天数来看也未看出潜伏期有改变,在乳鼠脑传代的动物,从 1—244 代均于接种后 3 天发病,在 3 周鼠脑传代的动物一般在 3 天发病,其中少数在 4 天发病,在 5 周及一年鼠脑内传代的动物则各代均于 4 天发病。这些事实虽然不是比较病毒繁殖周期,但间接地指出本实验的病毒皮下毒力变化,不太象是通过繁殖较快及强这一选择性途径来实现的。由于脑内毒力基本上不变,而仅是皮下毒力改变,在幼鼠脑内传代变异的潜伏期很长,以及皮下毒力下降速度和最终幅度在不同鼠龄而异的现象,都指出本实验的病毒变异大概是通过适应过程来实现的。利用空斑技术进一步比较不同代数的毒株形成空斑后,不同空斑病毒毒力差别的比例变化当有助于澄清此问题。

通过皮下传代的毒株虽然也同样地经历了鼠脑这一环境繁殖,但皮下毒力却始终未降低(在 3 周鼠传 190 代,在乳鼠传 269 代)。从变异株回轉試驗来看(图 8, 9),皮下毒力也能回轉但极为缓慢。研究通过皮下传代后病毒的不同纯系的脑内毒力对于阐明变异的机制可能是一个好方法。

从幼鼠脑内传代病毒变异的潜伏期很长的观察,可能帮助解释李河民等^[3]发现不同流行性乙型脑炎毒株在同一环境传代变异速度不同的现象。如果在自然界所获得的毒株与本实验毒株传 90 代左右的性质一样已有一定的改变(虽然其皮下毒力与零代时没有明显差别),则在幼鼠脑内传代只需要几次传代就能观察到毒力的变异;反之,如所获得的毒株与零代的性质差不多,那么在幼鼠脑内传代皮下毒力的改变就需要长时期传代才能观察到变异。

从上面的研究及讨论可以看出病毒变异的某些规律:一方面与原来病毒株的性质有

关;另一方面是取决于环境,环境越不同于原来环境,病毒变异的潜伏期就越短,幅度越大。

通过成年鼠脑内传代的变异株(66及129代),血凝性质也有改变,零代株的血凝素很低而变异株很高,详细结果将在有关皮下毒力与血凝素关系研究的另文报告。

本病毒皮下毒力的改变也可以通过在其它环境繁殖而实现,根据我们的实验室里的未发表资料,許兆祥在1956年曾观察到在腹水瘤细胞传代的病毒,以及任貴芳在1957年曾观察到在鸡胚绒毛尿囊膜传代的病毒,皮下毒力降低的速度都较在一年小白鼠脑内传代为快,这就说明病毒在自然界如经历了不同环境,新分离的野株病毒是可以有不同毒力性质的。流行性乙型脑炎病毒在自然界存在有不同毒力的毒株^[4],这是否与该病毒在自然界有较广泛的宿主,不少有蹄动物及鸡^[5]以及多种媒介,不同蚊属及蠓^[6]有关。因此,研究流行性乙型脑炎在不同蚊种的长期传代,以及在家畜及鸟类的长期传代,观察其皮下毒力变异的情况,将不仅有助于认识病毒变异规律的理論問題,也可能有助于追查流行性乙型脑炎不同毒力毒株的来源;甚至尚未解决的长期宿主問題以及預防措施的实际問題。

流行性乙型脑炎流行周期性及不同地区流行程度和疾病的严重性不同的一系列問題都还未解决,除了了解与人羣及动物免疫的关系外,研究病毒皮下毒力的演变可能有助于阐明这些問題。

从皮下传代不影响皮下毒力下降的观察,这对于保存这一毒株性质有重要意义。

此外,由于本病毒在乳鼠脑内长期传代后病毒滴度增加将近一个对数,应用此变异株制备补体結合抗原及灭活疫苗可能提高抗原或疫苗效价。至于利用对3周鼠皮下无毒力的变异株做活疫苗的問題,还需要观察变异株的免疫原性及皮下感染后通过一系列的刺激病毒能否侵入脑内才能决定。

四、总 結

本实验的变异研究是在最敏感的动物——小白鼠进行的。通过脑内传代的病毒皮下毒力随着传代次数的递增而下降,反之,通过皮下传代的病毒皮下毒力不下降,用皮下毒力已下降的变异株进行皮下传代皮下毒力能回升。通过脑内传代的病毒皮下毒力下降的潜伏期及幅度与鼠龄有关,在幼鼠传代的病毒,变异的潜伏期及幅度较在成年鼠传代的为长而且小。这些现象指出病毒变异的一些规律:一方面取决于原始株的性质,另一方面是取决于环境,环境越不同于原始环境,病毒变异的潜伏期就越短,幅度越大。

文章討論了有关自然界存在有不同毒力毒株的来源及流行病学等問題。

参 考 文 献

- [1] Lennette, E. H. & Koprowski, H.: *J. Immunol.*, **49**: 175, 1944.
- [2] Huang, C. H. & Wong, C.: *Acta Virologica*, 1963.
- [3] 李河民、俞永新、季淑蓉、武佩芬:微生物学报, **8**: 251, 1962.
- [4] Huang, C. H.: *Acta Virologica*, **1**: 36, 1957.
- [5] 吳皎如、吳樹吟、張華杰:微生物学报, **7**: 43, 1959.
- [6] 吳皎如、吳樹吟:微生物学报, **5**: 22, 1957.

STUDIES ON THE VARIATION OF PERIPHERAL PATHOGENICITY OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS IN WHITE MICE

HUANG C. H.

(*Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

The present studies on the variation of Japanese B encephalitis virus were carried out in the most susceptible animal. Passage of the virus was carried out by intracerebral and subcutaneous inoculations separately and among those of different age groups. Harvested virus material for passage from either route of inoculated mice was obtained from the brain. Results show that after cerebral passages, the virulence of the virus which showed no marked change when titrated by intracerebral route in 3 week-old mice, decreased as the number of passages increased when titrated by the subcutaneous route. Definite evidence of decrease in peripheral pathogenicity of the virus was detected only after 90—100 passages (a long latent period) in young mice (7 day- and 3 week-old) while in adult mice (5 week- and 1 year-old), the period was very short (0 to 10 passages). The magnitude of the decrease in subcutaneous virulence when passaged in young mice is smaller (4 log.) than that in adult mice (6.5—8 log.). The above magnitude of decrease in young mice was reached after more than 200 passages and maintained at this level on further passages, while in the adult mice, the lowest level was attained after 50—117 passages. From the above findings, it can be seen that there seems to have 3 period of change in virus virulence in the course of cerebral passages, namely: a latent period (a period before evidence of change in virulence can be detected); a variation period (a period where progressive decrease in virulence was noted); and a maintenance period (a period where the decrease in virulence reached its maximum and maintained at the same level).

Contrary to the above findings by cerebral passage, there was no decrease in virulence when the virus was passed by the subcutaneous route even after 190 and 269 passages in 3 week- and 7 day-old mice respectively. By using the 50th cerebral passage virus material of 1 year-old mice for subcutaneous passages, the subcutaneous virulence gradually increased, and by the 116th passage the virus titre rose from 10^{-3} to $10^{-1.7}$.