

# 单层細胞培养制备的流行性乙型脑炎疫苗

## I. 病毒培养及疫苗制备

王用楫 顧佩韦 孙勉 馬文信\*

周宁珍 孙威豪\* 李美容

(卫生部生物制品研究所,北京)

自从单层組織培养技术<sup>[1,2]</sup>应用到病毒培养以来,許多学者先后証明流行性乙型脑炎病毒在单层的鸡胚細胞上<sup>[3,4,5,6,7]</sup>、HeLa 細胞上<sup>[3,4,7,8,9]</sup>、猴腎細胞上<sup>[4,5,7]</sup>、仓鼠腎細胞上<sup>[6,10,11]</sup>、猪腎細胞上<sup>[7,12,13]</sup>、Detroit-6 細胞上<sup>[4,7]</sup>能够繁殖。这就为采用单层細胞以制备乙型脑炎疫苗提供了可能性。

从制备疫苗的目的出发,1958年我們开始选用鸡胚細胞系統培养病毒,制备疫苗,并进行动物实验。1960年已制成相当数量的疫苗,开始在人羣中使用。本文中报导病毒培养及疫苗制备的研究結果;有关抗原性的动物試驗及人羣使用的預防效果在另文中介紹。

## 材料和方法

1. 病毒 用于試驗的流行性乙型脑炎病毒有 P<sub>3</sub>, 西<sub>4</sub>, 中山, 上海及 47 株。其鼠脑系小鼠脑內感染的毒力滴度 (LD<sub>50</sub>) 在 10<sup>-8.5</sup> 左右, 鸡胚系毒力滴度約 10<sup>-6.5</sup>。

2. 鸡胚单层細胞的制备 选用 9—10 日鸡胚經胰酶或胰蛋白酶处理, 以所得到的分散細胞悬浮在組織培养一般使用的生长液內。生长液的成分为:

乳白蛋白水解物	0.5 克
小牛血清	2.0 毫升
Hanks 氏液 <sup>[14]</sup>	97.0 毫升
抗菌素原液(每毫升含青霉素 10,000 单位 鏈霉素 10,000 微克)	1.0 毫升

用前以 5.0% NaHCO<sub>3</sub> 調 pH 至 7.6。已分散的細胞接种至疫苗圓瓶、罗氏瓶或大方瓶內培养, 疫苗圓瓶用于毒种传代容积 250 毫升, 接种細胞数 4000 万, 加生长液 50 毫升; 罗氏瓶用于病毒培养条件試驗, 容积 500 毫升, 接种細胞 6000 万, 加生长液 80 毫升; 大方瓶用于制备疫苗条件試驗, 容积 2500 毫升, 接种細胞 12,000 万, 加生长液 200 毫升。各种細胞瓶加橡皮塞严密封口, 37°C 平置培养一般到 48—72 小时細胞即融合成片, 单个細胞大都呈现梭形。

3. 病毒的培养 选择成片的单层細胞, 先吸出生长液, 以 20—50 毫升的 Hanks 氏液洗滌細胞片一次, 視培养瓶的大小接种 1—3 毫升的病毒悬液, 置 37°C 經過 30 分钟处理以期病毒能吸附至細胞上, 然后加入与生长液等量的 199 培养基<sup>[15]</sup>作为維持液 (pH7.2), 置 37°C 繼續孵育, 以待病毒繁殖。

4. 病毒的滴度 取感染病毒的維持液样品 2.0 毫升置沉淀管中低速离心沉淀, 吸上清按 10 倍連

\* 成都生物制品研究所。

本文 1963 年 2 月 19 日收到。

續稀釋至  $10^{-7}$ 。稀釋液用 10% 的脫脂牛乳生理鹽水或肉湯 (pH7.6)。以  $10^{-3}$ — $10^{-7}$  的病毒液腦內接種 7—9 克小鼠 3—5 只,每只接種量 0.04 毫升。接種後每日觀察,直至第 14 日。依 Reed-Muench 氏法<sup>[16]</sup>計算毒力滴度 ( $LD_{50}$ )。

**5. 疫苗的制备** 为制备疫苗,用 2.0% 乳酪蛋白水解液<sup>[17]</sup>代替前述生长液中的 0.5% 乳白蛋白水解物以培养細胞;为制备疫苗采用 7-氮培养基 (pH7.8) 作为維持液以代替 199 培养基培养病毒。7-氮培养基原系 Rappaport 氏維持液的补充部分<sup>[18]</sup>。其 40 倍浓度的原液中各种成分的用量如下。

左旋半胱氨酸 ( <i>l</i> -cystiene. HCl)	1,200 毫克
左旋异亮氨酸 ( <i>l</i> -isoleucine)	1,600 毫克
左旋組氨酸 ( <i>l</i> -histidine. HCl)	400 毫克
左旋精氨酸 ( <i>l</i> -arginine. HCl)	280 毫克
左旋賴氨酸 ( <i>l</i> -lysine. HCl)	320 毫克
左旋甲硫氨酸 ( <i>l</i> -methioine)	240 毫克
左旋脛丁氨酸 ( <i>l</i> -threonine)	560 毫克
双蒸水	1,000 毫升

細胞片于种毒后置  $37^{\circ}\text{C}$  繼續培养 48 小时,取样进行滴定試驗,然后加福尔馬林使其最終浓度为 0.1%。移  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱灭活。灭活过程中每日充分搖动病毒液一次。至第 14 日为止,并取样做安全試驗。安全試驗即将样品种至小鼠腦內,并連續盲目传递二代;試驗小鼠健存,即认为病毒液中的病毒全被灭活,該病毒液即成疫苗。

## 实 驗 和 結 果

### 实验 1 病毒在鸡胚細胞上的传代

用  $P_3$  鼠腦株、 $P_3$  及西<sub>2</sub>鸡胚株病毒进行这一試驗。毒种悬液低速度离心沉淀后,取上清按 1:1000 稀釋以 1.0 毫升接种至疫苗圓瓶內的細胞片上,加維持液 50 毫升。 $37^{\circ}\text{C}$  繼續培养 48—72 小时。吸取受染維持液 1.0 毫升,轉移至另一瓶細胞片上加維持液 50 毫升。如此繼續传递。取不同代数的病毒液进行小鼠腦內滴定試驗。結果列入表 1。

表 1 乙型腦炎不同毒株在單层雞胚細胞上傳遞中的毒力滴度

传递代数	$P_3$ 鼠腦株 (-对数)	$P_3$ 鸡胚株 (-对数)	西 <sub>2</sub> 鸡胚株 (-对数)
1	5.81	4.25	4.75
3	3.00	3.75	2.50
5	2.89	3.50	2.75
10	2.44	3.75	4.67
15	3.87	—	—
20	2.67	—	—
26	3.50	—	—

如表 1 所示,所有經試驗的 3 株病毒都可以在鸡胚細胞上繁殖及連續传递下去,又来自  $P_3$  鼠腦株的传代病毒株在細胞中目前已传 100 代以上,小鼠腦內感染滴度大都在  $10^{-2.0}$ — $10^{-4.0}$  范围之内。

### 实验 2 病毒滴度与培养時間关系

为了获得乙型腦炎病毒的繁殖曲綫,将西<sub>2</sub> 鸡胚株第 20 代病毒接种于罗氏瓶中的单

层鸡胚细胞，间隔不同培育时间取样以小鼠脑内法滴定毒力。与此同时设计了无细胞的对照瓶。试验结果见表 2。

表 2 病毒滴度与培养时间的关系

种毒与滴定 (时间间隔,小时)	下列稀释度小鼠死亡比率							滴度 (LD <sub>50</sub> )	对照瓶	
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>
12	3/3*	3/3	1/3	0/3	0/3			2.75	0/3	0/3
24		3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	4.75	0/3	0/3
36			3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	5.75	0/3	
48			3/3	3/3	1/3	0/3	0/3	4.75	0/3	
60			3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	3.75	0/3	
84	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3		3.25	0/3	

\* 分母表示接种鼠数,分子表示死亡鼠数。

从表 2 可以看出,对照瓶的病毒在不含细胞的维持液中于 37°C 放置 12 小时后已查不出病毒;而在单层鸡胚细胞上随着时间的增加滴度在逐渐增高,于 36 小时到达高峰(10<sup>-5.75</sup>),随后滴度下降。

除西,鸡胚株外又用其他毒株进行试验,发现病毒最高滴度可达 10<sup>-5.5</sup>—10<sup>-6.0</sup>,出现在种毒后 32—48 小时。60 小时以后滴度明显降低。举出四株病毒试验结果如表 3。由此可以认为,在不同毒株之间,最高滴度的幅度及其出现时间似无明显区别。

表 3 乙型脑炎不同毒株在单层鸡胚细胞上繁殖的毒力滴度

种毒与滴定 (时间间隔,小时)	中山株 (鸡胚 14 代)	上海株 (鸡胚 14 代)	47 株 (鸡胚 18 代)	西 A 株 (鼠脑 62 代)
32	5.50	5.45	—	—
36	5.50	5.75	5.50	5.50
40	6.00	5.50	—	—
48	—	—	—	5.75
60	—	—	4.25	5.00
90	—	—	3.30	—

### 实验 3 受染细胞及其维持液中的病毒滴度比较

为了解受染细胞与其维持液中病毒含量是否相同,我们使用了中山及上海鸡胚株分别感染罗氏瓶中成片的细胞,病毒培养至 36 小时吸取维持液,另用刀刮取紧贴在瓶壁上的细胞。后者在乳钵内充分研碎,离心沉淀,按沉淀物的重量 10 倍稀释,与相应的受染维持液并行滴定。结果见表 4。

表 4 维持液与细胞部分病毒滴度的比较

毒株	培养时间 (小时)	维持液部分的滴度 (LD <sub>50</sub> )	细胞部分的滴度 (LD <sub>50</sub> )
中山株	36	5.50	5.25
上海株	36	5.75	5.75

据试验结果表明,维持液与细胞部分的病毒滴度并无区别。

### 实验 4 7-氮培养基代替 199 培养基

为大量制备疫苗创造条件, 应该寻求成分比较简单的培养基以代替 199 培养基。为此目的, 我们使用 7-氮培养基作为细胞维持液来培养病毒, 同时与 199 培养基进行比较。在并行的试验中罗氏瓶中的同批细胞分别接种西<sub>4</sub>鼠脑株及上海鸡胚株病毒液, 种毒后间隔不同时间抽取样品进行小鼠脑内滴度试验。结果见表 5。

表 5 199 培养基与 7-氮培养基培养病毒的滴度比较

培养时间 (小时)	西 <sub>4</sub> 鼠 脑 株		上 海 鸡 胚 株	
	199	7-氮	199	7-氮
24	5.75	5.75	4.50	4.75
36	6.75	6.00	6.50	6.50
48	5.50	6.25	6.25	6.50
60	5.25	5.25	6.25	6.75

由表 5 的结果可以看出: (1) 病毒培育至 24 小时, 感染鼠脑毒株的细胞维持液中的毒力滴度显然高于感染鸡胚毒株的; 这个差别可能由于在接种量及稀释度相等的毒种液中鼠脑毒种 LD<sub>50</sub> 的含量多于鸡胚毒种的原故。(2) 在 199 培养基中培育至 36 小时, 病毒滴度达到了高峰, 依毒种来源为鼠脑或鸡胚分别为 10<sup>-6.75</sup> 及 10<sup>-6.50</sup>; 二者间不能认为有实际差别。(3) 在 7-氮培养基试验中病毒最高滴度出现在种毒 48 小时或以后。(4) 199 培养基的最高滴度与 7-氮培养基中最高滴度比较, 并没有明显区别; 惟前者发生在种毒后 36 小时左右, 而后者在 48 小时或以后。

### 实验 5 毒种的浓度

为得到毒力较高的病毒液制备疫苗, 合适的毒种浓度至关重要。配制由 10<sup>-2</sup>—10<sup>-7</sup> 六个 10 倍稀释的鼠脑毒种上清液, 各以 3.0 毫升接种至大方瓶的细胞上, 然后加维持液 200 毫升。在孵育期间间隔一定时间各取样进行病毒滴度检查。结果见表 6。

表 6 病毒滴度与毒种接种浓度的关系

培养时间 (小时)	毒 种 接 种 浓 度					
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
24	4.00	4.50	2.77	2.66	1.50	1.50
48	5.00	5.83	5.23	5.50	3.44	2.62
72	2.62	5.00	4.78	4.23	2.75	2.62
96	1.83	5.23	2.00	1.62	1.50	1.75
120	—	—	1.50	1.50	1.50	1.50

从表 6 可以看出: (1) 不管毒种接种量大小, 病毒的繁殖过程基本一致, 最高毒力滴度出现在种毒后 48 小时。(2) 毒种接种浓度在 10<sup>-2</sup>—10<sup>-5</sup> 之间, 均可得到较高的病毒滴度。(3) 毒种稀释度过高 (10<sup>-6</sup> 或 10<sup>-7</sup>), 即病毒接种量太少, 病毒繁殖不佳, 滴度不高。据这个试验结果可以认为, 制备疫苗使用的毒种浓度可在 10<sup>-2</sup>—10<sup>-5</sup> 之间选择。

### 实验 6 细胞培养温度对病毒滴度的影响

对不同温度所培养的鸡胚细胞, 曾进行初步观察, 发现在形态学方面并无明显差别,

对乙型脑炎病毒的繁殖有无影响是需要检查的。为此目的, 用同批消化的細胞种至大方瓶中, 分别置 40°、37°、33°C 培养, 待成片后感染西鼠脑毒株以比較病毒繁殖滴度。先后进行了 7 次試驗, 滴定結果列于表 8。这里应该說明不同温度中, 細胞生长成片所需時間不同, 40° 或 37°C 一般 2—3 日, 33°C 則为 4—6 日。

表 7 病毒滴度与細胞培养温度的关系

試驗次数	細胞培养温度		
	40°C	37°C	33°C
1	4.50	4.50	5.00
2	3.50	4.50	5.23
3	2.67	5.47	4.50
4	4.48	5.33	—
5	4.33	5.00	5.50
6	4.33	4.00	5.00
7	4.50	5.23	—
平均	4.04	4.88	5.05

上述試驗結果表明, 在 40°C 生长的細胞上病毒繁殖的滴度低于其余兩組, 平均滴度相差 0.5—1.0 个对数值。而在 37°C 及 33°C 所得到的病毒滴度則相似。从細胞生长速度及病毒繁殖滴度两方面考虑, 37°C 是培养細胞的合适温度。

### 实验 7 病毒培养温度对滴度的影响

这个实验使用了三組在 37°C 大方瓶中同时培养的細胞, 感染 P<sub>3</sub> 鼠脑毒株后分别置 37°、33°、30°C 孵育, 至 48 小时收液进行滴定, 結果列于表 8。

表 8 病毒滴度与病毒培养温度的关系

試驗次数	病毒培养温度		
	37°C	33°C	30°C
1	5.81	5.81	4.57
2	5.23	5.23	4.00
3	4.50	4.33	—
4	4.50	5.00	4.23
平均	5.04	5.09	4.27

据四个比較試驗結果, 可知除在 30°C 培养的病毒滴度較低外, 在 37°C 或 33°C 所得到的毒力滴度是相似的。

### 实验 8 福尔馬林的浓度对灭活病毒時間的影响

为观察福尔馬林对組織培养乙型脑炎病毒的灭活效果。以倍量稀释此种灭活剂进行灭活時間試驗。取同批組織培养病毒悬液分为 6 等份, 分别加入适量的 10% 福尔馬林, 使其最后浓度从 1:500 开始按两倍递減, 置 4°C 冰箱中灭活, 每日充分搖勻一次, 并取出样品, 脑内接种小鼠, 每次三只, 以观察灭活过程。試驗結果列于表 9。

如表 9 中小鼠发病死亡所示, 可知以 1:500—1:4,000 福尔馬林含量处理时, 在短期內病毒即被完全灭活, 当用 1:8,000 或 1:16,000 浓度时, 虽作用至第 23 日, 仍有活病毒存

表 9 福尔馬林濃度与病毒灭活时间的关系

时 間 (日)	福 尔 馬 林 濃 度 与 灭 活 結 果						对 照 (未加福尔馬林)
	1:500 (0.2%)	1:1,000 (0.1%)	1:2,000 (0.05%)	1:4,000 (0.025%)	1:8,000 (0.0125%)	1:16,000 (0.00625%)	
1	1/3*	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
2	1/3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
3	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
4	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
5	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
7	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3
9	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
11	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3
13	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
15	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3
23	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3

\* 分母表示接种鼠数,分子表示死亡鼠数。

在。

### 实验 9 福尔馬林浓度对疫苗效价的影响

用 7-氨基培养基作为维持液,在大方瓶生长成片的单层鸡胚细胞上接种 P<sub>3</sub> 鼠脑毒种,先后制备两批病毒悬液。每批各分为三等份,分别加入 10% 的福尔馬林,使其最终浓度为 0.5%、0.1%、0.02%,置 4°C 冰箱灭活,每日摇匀一次。先以小鼠脑内感染法证明病毒完全灭活,然后依小鼠腹腔攻击免疫指数法,进行疫苗效价检查。试验结果见表 10。

表 10 福尔馬林濃度与疫苗效价的关系

試驗次数	原液批号	灭活前 (LD <sub>50</sub> )	福尔馬林浓度与疫苗的免疫指数		
			0.5%	0.1%	0.02%
1	P <sub>3</sub> -4	5.3	8	4,000	6,300
2	P <sub>3</sub> -4	5.3	63	8,000	32,000
3	P <sub>3</sub> -6	6.3	160	200,000	160,000
4	P <sub>3</sub> -6	6.3	16	63,000	320,000

由表 10 可知,用 0.5% 福尔馬林灭活的疫苗,其免疫指数值较小(8—160),表明疫苗几乎没有免疫效价或效价很低;反之,以 0.1% 或 0.02% 灭活的疫苗则有明显的免疫效果,免疫指数在 4,000—320,000 之間。

## 討 論

众所周知,狂犬病脑组织疫苗可使受种者产生变态反应性脑脊髓炎<sup>[19]</sup>。在实验条件下接种鼠脑组织亦可引起猴子、豚鼠、大白鼠的变态反应性脑脊髓炎<sup>[20]</sup>。近年来在大量人群中使用时,曾遇到类似事故<sup>[21]</sup>。这样看来,寻求鼠脑以外的材料来制备脑炎疫苗具有重要的意义。

组织培养,特别是单层细胞培养技术已广泛用于病毒培养,并证明乙型脑炎病毒能在多种单层细胞上繁殖,因而就可能采用此种技术制备比较纯净的疫苗。鸡胚具有来源广

闊的特点,适合于疫苗大量生产,同时它又有不含或少含潜在病毒等优点,因而我們选用了单层鸡胚细胞,重点地进行了有关疫苗制备条件的研究。

乙型脑炎病毒在鸡胚细胞上可以連續传代,但鸡胚细胞传代株的毒力、滴度一般較低;而用鼠脑或鸡胚毒株感染鸡胚细胞則可得到滴度較高的病毒液,因此,我們认为制造疫苗的毒种可使用鼠脑株或鸡胚株,而不用鸡胚细胞传代株。

7-氨基培养基作为鸡胚细胞的維持液培养病毒,据毒力滴度試驗結果說明它完全可以代替 199 培养基用于制备疫苗。这就可降低費用,为大量生产提供了方便。以后又証明維持液中只含一种氨基酸(半胱氨酸),亦可得到相似的病毒滴度和疫苗效价。

福尔馬林已用于制备乙型脑炎鼠脑及鸡胚灭活疫苗。組織培养乙型脑炎病毒对此种灭活剂也很敏感,以 1:1,000—1:4,000 的浓度处理数日内即被灭活,同时仍保有明显的抗原性。我們从灭活确实方面考虑用 1:1,000 的福尔馬林浓度制备灭活疫苗。已証明这样的灭活疫苗在冰箱內保存两年对小鼠仍有显著的免疫效价。

对鼠脑疫苗及組織培养疫苗的含氮量曾加測定,每毫升的含量分别为 1.62 毫克及 0.11 毫克,两者相差 10 余倍之多。可以預期組織培养疫苗在人羣使用中引起反应的机会和程度都会降低;就已观察的結果确能說明如此。

## 結 論

1. 流行性乙型脑炎病毒鸡胚株或鼠脑株在单层鸡胚细胞上容易繁殖且可連續传代,但传代后病毒滴度 ( $LD_{50}$ ) 未見增加。繁殖曲線在不同毒株之間至为相似,最高滴度可达  $10^{-5.0}$ — $10^{-6.0}/0.04$  毫升。细胞內与其維持液內之間的病毒含量并无明显差別。

2. 7-氨基培养基能代替 199 培养基作为維持液以培养乙型脑炎病毒。由两者得到的最高病毒滴度基本一致,但出現時間不同。前者于种毒后 48 小时或以后,而后者在 36 小时左右。

3. 为制备組織培养疫苗,建議使用鼠脑株或鸡胚株作为毒种,细胞及毒种培养温度应在 33—37°C 之間;在病毒培养液內加入 0.1% 福尔馬林即可短时期內灭活并保持其免疫原性。

## 参 考 文 献

- [1] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **38**:747, 1952.
- [2] Dulbecco, R. and Vogt, M.: *J. Exp. Med.*, **99**:167, 1954.
- [3] Sanders, M., Kiem, I. and Lagunoff, D.: *A. M. A. Arch. Path.*, **56**:148, 1953.
- [4] McCollum, R. W. and Foley, G. F., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**:556, 1957.
- [5] Bhatt, R. E. and Work, T. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **96**:213, 1957.
- [6] Kissling, R. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **96**:290, 1957.
- [7] 郭輝玉: 微生物学报, **8**:109, 1960.
- [8] Scherer, W. F. and Syverton, J. T.: *Am. J. Path.*, **30**:1075, 1954.
- [9] Фан, Цзи-мин (方繼明): *Вопросы Вирусологии*, **4**:206, 1959.
- [10] 俞永新、敖 堅、雷文緒、李河民: 微生物学报, **8**:260, 1962.
- [11] Diercks, F. H. and Hammon, W. McD.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**:627, 1958.
- [12] Lee, H. W., Hinz, R. W. and Scherer, W. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**:579, 1958.
- [13] 許兆祥、周明先、陈立德: 流行性乙型脑炎研究通訊, **3**:1, 1959.
- [14] Weller, T. H., Enders, J. F., Ribbins, F. C., and Stoddard, M. B.: *J. Immunol.*, **69**:645, 1952.

- [15] Morgan, J. F., Morton, H. J. and Parker, R. C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**:1, 1950.  
[16] Reed, L. J. and Muench, H.: *Am. J. Hyg.*, **27**:493, 1938.  
[17] 王用楫、顾佩韦、谢彦博、马文信、孙勉、孙盛豪、周宁珍, *微生物学报*, **10**: 119—120, 1964。  
[18] Rappaport, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**:464, 1956.  
[19] McKendrick, A. G.: *Bull. Health Org., League of Nations*, **9**:31, 1940.  
[20] 王用楫、卢锦汗、李美容、张永福, *微生物学报*, **9**:1, 1963。  
[21] Ilyenko, V. I.: *Acta Virologica*, **4**:37, 1959.

## JAPANESE B ENCEPHALITIS TISSUE CULTURE VACCINE

### I. CULTIVATION OF THE VIRUS AND PREPARATION OF THE VACCINE

WANG YUNG-CHI, KU PEI-WEI, SUN MIAN, MA WEN-HSIEN,

CHOW NING-CHAN, SUN SHENG-HOU AND LI MEI-YUNG

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

1. Either chickembryo or mouse brain strains of Japanese B encephalitis virus was successfully propagated and serially passaged in chickembryo cell monolayers; however, no evidence of any increase in the intracerebral infectivity titer in mice ( $LD_{50}$ ) was obtained. The growth curve pattern of various strains of the virus in chickembryo cells was studied and found to be identical with a maximum titer ( $LD_{50}$ ) ranging from  $10^{-5.0}$  to  $10^{-6.0}$ . Parallel titrations of the virus content both in the infected cells and the corresponding maintenance fluids gave comparable  $LD_{50}$  titers.

2. It was found that seven-aminoacid-medium might be employed instead of 199 medium as the maintenance fluid for the cultivation of the virus. The maximum titer of the virus fluids from both media approximated each other, but the peak of the virus titer was reached by 48 hours or later after seeding in seven-aminoacid-medium, while that in the 199 medium was reached by 36 hours.

3. For the preparation of the vaccine, it is suggested that either mouse brain or chickembryo strain might be used as the seed virus and that the chickembryo cell monolayers should be cultivated at temperature between  $33-37^{\circ}C$ . Effective vaccines could be prepared from its virus fluids treated with 0.1% formalin.