

三株乙型脑炎病毒株的空斑形成特征*

陈伯权 许兆祥 柳元元

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

引言

同一病毒株中存在着空斑形成特征不同的病毒颗粒的现象越来越被学者们所重视。许多学者曾从脊髓灰白质炎^[1], 脑心肌炎^[2], 脑脊髓炎^[3], Echo^[4-5] 等病毒中分离得到空斑形成特征不同的毒株。

在脊髓灰白质炎病毒的研究上, Sabin^[6] 曾利用空斑形成特征的差别进行选种, 从而获得供作活疫苗使用的弱毒株。

了解病毒的空斑形成特征对病毒某些生物学性质包括变异的研究以及病毒的选种工作都具有重要的意义。为了研究乙型脑炎病毒的变异问题, 本文对三株流行性乙型脑炎病毒的空斑形成特征进行观察, 着重比较病毒的空斑滴度与小白鼠脑内 LD₅₀ 滴度的比值, 及各株病毒形成空斑的速率和空斑大小比例的差异等特征。

材料与 方法

(一) 病毒

1. 京卫研株(即 A₂ 株): 由黄氏等^[7]在北京从患者脑组织分离的。该病毒经鼠脑传了 37—39 代, 是一株对小白鼠皮下感染有高度致死力的毒株, 对小白鼠脑内和皮下 LD₅₀ 滴度的差为 1 个对数左右^[7]。

2. 京卫研₁ 鸡胚适应株(简称鸡胚适应株): 为京卫研₁ 株病毒经鸡胚传了 73—77 代所得, 对小白鼠皮下感染致死力已大大降低, 对小白鼠脑内和皮下 LD₅₀ 滴度的差为 5—6 个对数。

3. 中山株: 其原来代数不详^[7], 该株病毒在本实验室经小白鼠脑内传了 78—79 代, 是一株对小白鼠皮下感染致死力较低的毒株, 对小白鼠脑内和皮下 LD₅₀ 滴度的差为 5—6 对数左右^[7]。

(二) 病毒滴定

1. 小白鼠脑内 LD₅₀ 滴定: 用 10 倍稀释法将病毒悬液制成不同稀释度, 以本所自行繁殖的三周龄小白鼠通过脑内和皮下途径进行滴定, 按照 Reed 和 Muench 法^[8]计算 LD₅₀ 滴度。

2. 空斑滴定及空斑技术详见前一报告^[9]。

实验与 结果

(一) 空斑滴度与鼠脑 LD₅₀ 滴度的比较

将发病小白鼠的鼠脑制成病毒悬液, 分成二份, 一份在鸡胚纤维母细胞内滴定其空斑滴度, 另一份以小白鼠脑内接种法滴定 LD₅₀ 滴度。三株病毒在同一条件下同时进行试

* 本实验技术部分由范端莲同志担任。

本文 1963 年 7 月 1 日收到。

驗,結果見表 1。重复的實驗說明同一病毒材料的腦內 LD₅₀ 滴度与空斑滴度的比值是較穩定的,但不同毒株的比值相互之間存在着一定的差別。京卫研₁ 株的比值大于鸡胚适应株和中山株,經測定的結果表明其差別具有显著性意义,而在后两株之間則无明显差別。

表 1 三株脑炎病毒的空斑滴度与鼠脑 LD₅₀ 滴度的比較

毒 株	空斑滴度 (log PFU/毫升)	鼠脑滴度 (log LD ₅₀ /毫升)	LD ₅₀ /PFU	LD ₅₀ /PFU (平均数)	P 值	
京卫研 ₁ 株	8.30	9.50	1.20	1.41	京卫研 ₁ 株 中山株 < 1%	
	7.90	9.00	1.10			
	7.82	9.30	1.48			
	7.88	9.30	1.42		京卫研 ₁ 株 鸡胚适应株 < 1%	
	8.00	9.80	1.80			
	7.30	8.96	1.66			
	8.30	9.52	1.22			
中山株	9.15	10.02	0.87	0.84	中山株 鸡胚适应株 > 5%	
	7.30	8.19	0.89			
	8.66	9.35	0.75			
鸡胚适应株	6.14	7.02	0.88	0.82		
	4.52	5.29	0.77			
	6.60	7.40	0.80			

(二) 空斑形成速率的比較

以 20—60 PFU/毫升的病毒量接种于細胞,观察空斑形成的速度,由于在接种病毒后第四天出現肉眼可見的空斑,至第六天空斑的数目已不再增加,因此實驗結果均以接种后第六天的空斑数目作为100%,据此計算在同一条件下三株脑炎病毒在第四、五天所形成的空斑数。試驗共作 9 次,每次實驗結果基本上一致,故将 9 次實驗結果按不同毒株分別統計了 220 个左右空斑,結果如图 1。三株脑炎病毒的空斑形成速率有所不同,京卫研₁ 株的空斑形成速率較慢,在第四天只出現 73%,第五天才达到 92%,而鸡胚适应株和中山株較快,在病毒接种后第四天时均已达 90%以上。

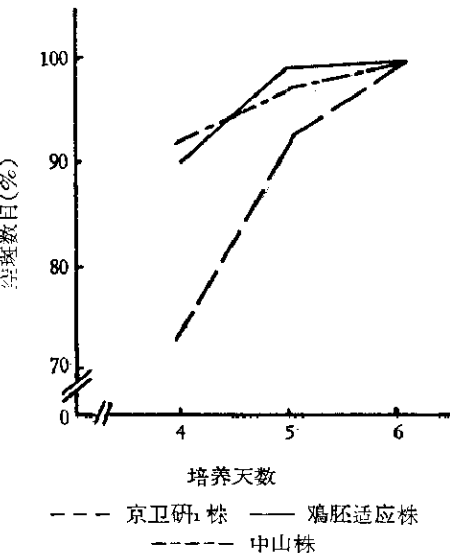


图 1 三株脑炎病毒的空斑形成速率

(三) 空斑直径的增长速度和空斑大小的比例

实验首先观察三株病毒在同一条件下接种20—60 PFU/毫升的病毒量后不同時間空斑直径的增长速度,由于用此病毒量接种时所出現的空斑密度較合适,不易受其他因素的影响,因此空斑大小能得到正常发展。在总共 10 次的實驗中,每株病毒共观察了 500 个以上的空斑。对空斑直径变化的观察是从第三天开始的。結果如表 2。三株脑炎病毒形成的空斑,其直径在接种后第三天相差不大,在第四天后开始漸漸显出差异。在京卫研₁ 株空斑直径增长較快,其次是中山株,鸡胚适

表 2 三株脑炎病毒在不同时间空斑大小的百分比(%)

空 斑 直 径 (毫米)	3 天			4 天			5 天			6 天		
	京卫研 ₁ 株	鸡胚适应株	中山株	京卫研 ₁ 株	鸡胚适应株	中山株	京卫研 ₁ 株	鸡胚适应株	中山株	京卫研 ₁ 株	鸡胚适应株	中山株
0.5—0.9	100	100	100	8.3	42	39.3		34	7		1.8	2.5
1.0—1.9				76	58	56	40	33	56	26.5	48.6	37.5
2.0—2.9				15.7		4.7	54.4	33	36.8	47.8	49.6	48.2
3.0—3.9							5.6		0.2	22.8		11.8
4.0—4.9										2.9		

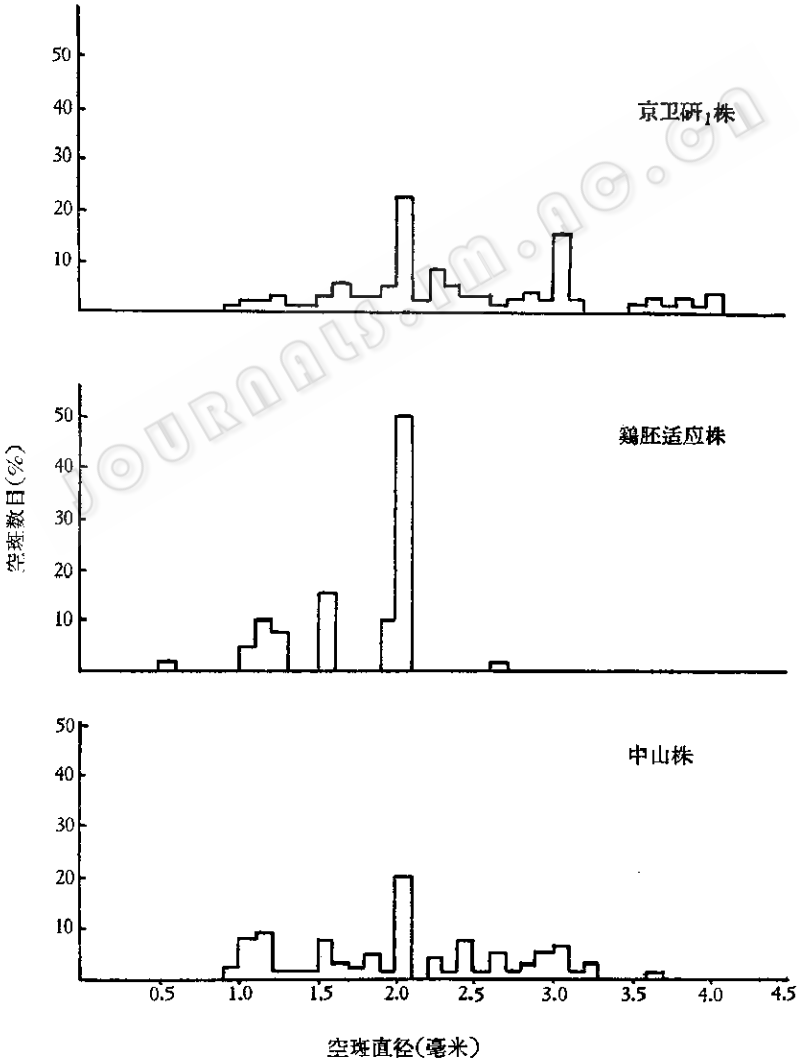


图 2 三株脑炎病毒空斑形成稳定时的空斑大小分布

应株空斑直径增长最慢。在第四天,京卫研₁株 91.7% 的空斑直径在 1.0 至 2.9 毫米之間;而鸡胚适应株和中山株 95% 以上的空斑直径分布在 0.5 至 1.9 毫米之間。在第五天,京卫研₁株的空斑直径增长更快,小空斑都成为較大的空斑,0.9 毫米以下的空斑已經沒有,94.4% 的空斑为 1.0—2.9 毫米、約有 5.6% 直径为 3.0—3.9 毫米;在鸡胚适应株尚有 34% 的空斑直径为 0.5—0.9 毫米,最大的直径也不超过 2.9 毫米;在中山株 90% 以上的空斑直径在 1.0—2.9 毫米之間,仅个别的空斑在 3.0 毫米以上。在第六天即空斑直径达到最大限度时,三株病毒之間的空斑直径显示更大的差异。为了更清楚地表明这差异,将各毒株空斑在这个时期測定的結果列于图 2。图 2 表明,不同病毒之間空斑大小分布有显著的差异。三株病毒中,鸡胚适应株形成的空斑最小,直径在 2.4 毫米以下的占总数的 99% 以上,直径 3.0 毫米以上的几乎沒有;中山株有 72% 的空斑直径在 2.4 毫米以下,大于直径 3.0 毫米以上的只占 11%;京卫研₁株的空斑大小較分散,直径 2.4 毫米以下的占 66%,直径大于 3.0 毫米以上的占 25%。从图中所示,京卫研₁株空斑直径在 2.0 和 3.0 毫米处皆有一高峯,而鸡胚适应株和中山株除了在直径 2.0 毫米处有一較高的峯处,在直径 1.0 毫米处尚有一較低的峯。

討 論

实验說明三株流行性乙型腦炎病毒的空斑形成特征有一定的差异,其中鸡胚适应株与中山株比較相似,而京卫研₁株与此二株則有較明显的不同。

由三株腦炎病毒空斑大小分布比例的結果来看,不同毒株其比例各有不同。但是鸡胚适应株与中山株形成的空斑大小較相似,从空斑滴度与鼠脑 LD₅₀ 滴度的比值以及空斑形成的速率来看,鸡胚适应株和中山株也相似,其空斑形成速率均較京卫研₁株为快,而空斑滴度与鼠脑 LD₅₀ 滴度的比值則較京卫研₁株为小。

鸡胚适应株是用京卫研₁株在鸡胚长期传代所获得的后代,为何其空斑形成特征与原毒株有如此大的不同,反而与中山株較相近呢? 过去实验証明京卫研₁株对小白鼠的皮下感染力較高,但經鸡胚传了 70 代后,其皮下感染力大大降低,而中山株对小白鼠的皮下感染力也較低,这是否由于京卫研₁株在鸡胚及中山株在鼠脑长期传代的結果引起病毒的变异,或由于淘汰,使其中一些原来占劣势的病毒顆粒(其空斑形成特点相似)变为优势,从而获得了二株对小白鼠皮下致死力較低共同性質? 因此,鸡胚适应株与中山株的空斑形成特征較相似是否与它們含有对小白鼠皮下致死力較低的病毒顆粒占优势有关,这还是值得进一步探討的問題。

关于病毒顆粒的空斑形成特征与病毒的生物学性質的关系,有些作者曾进行了研究, Henry^[10] 曾将原来只能形成大空斑 (2—7 毫米) 并对小白鼠腹腔接种可以致死的委内瑞拉腦炎病毒长期感染 L 細胞 7 个月后(慢性感染),获得了形成小空斑 (<2.0 毫米) 的病毒顆粒,并从中获得对小白鼠腹腔不致死的毒株。Sabin^[6] 也报告脊髓灰白質炎病毒滅毒株所形成的空斑直径比有毒株小。由此看来,同一病毒株中,形成大小不同空斑的病毒顆粒可能具有不同的生物学性質,如病毒的毒力等。在我們的試驗中,京卫研₁株的空斑大小分布較其他两株为广,其中也含有一定数量与其他两株相似的空斑,因此,組成京卫研₁株的病毒顆粒可能較其他两株复杂。該毒株的皮下感染致死力虽較高,但是否也含有

与其他两株相似的对小白鼠皮下致死力較低的病毒顆粒是值得进一步研究的。

摘 要

1. 实验比較了乙型脑炎病毒京卫研₁株, 鸡胚适应株和中山株在空斑形成滴度与鼠脑LD₅₀滴度的比值, 空斑形成的速率及空斑大小、分布的特征。

2. 实验結果証明鸡胚适应株和中山株在上述特征方面較相似而与京卫研₁株有明显的不同。

3. 对不同毒株空斑形成特征差异的原因进行了討論, 并认为組成京卫研₁株的病毒顆粒, 按空斑形成情况來說較复杂, 可能同时含有对小白鼠皮下致死力高低不同的病毒顆粒。

参 考 文 献

- [1] Dubes, G. R.: *Virology*, 2:284—288, 1956.
- [2] Fuerest, C. R.: *Virology*, 13:553—554, 1961.
- [3] Ellem K. A. C. and Colter, J. S.: *Virology*, 15: 340—347, 1961.
- [4] Wigand, R. and Sabin, A. B.: *Archiv virusforschung*, Band XI Heft 5:708, 1962.
- [5] Wigand, R.: *Archiv virusforschung*, Band XI Heft. 5:718, 1962.
- [6] Sabin A. B.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 33:17, 1957.
- [7] 黃禎祥、周明先: 微生物学报, 6:32 1958.
- [8] Reed, L. J. and Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, 27:493—497, 1938.
- [9] 陈伯权、許兆祥、柳元元、范瑞蓮, 微生物学报, 9: 53, 1963.
- [10] Henry, J., Hearn, J. R., Willian, F.: *Proc. Bact.* April, 23—27: 150, 1961.

STUDIES ON THE PLAQUE-FORMING CHARACTERISTICS OF THREE STRAINS OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

CHEN BO-CHUAN, HSU CHAO-HSIANG AND LIU YUAN-YUAN

(Institute of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

The difference between plaque-forming titre and the mouse-brain LD₅₀ titre, the plaque forming rate, the rate of development of plaque and the distribution of different plaque sizes of 3 strains (the A₂ strain, the chick embryo adapted A₂ strain and the Nakayama strain) of J. B. E. virus were studied.

The experimental results indicated that the ratio of mouse-brain LD₅₀ titre to the plaque forming titre (LD₅₀/PFU) of these strains was different. It was observed that the ratio obtained from A₂ strain was greater than those of the other two strains, but no significant difference was observed between the adapted strain and Nakayama strain.

The distributions of the sizes of plaques produced by these viruses were not identical. In case of A₂ strain, they varied between 1.0—4.9 m.m., but most of them were of 2.0 or 3.0 m.m. in diameter when observed on the 6th day after incubation. On the other hand, the size of plaques formed by the chick embryo adapted A₂ strain and Nakayama strain ranged from 0.5—2.9 m.m. and 0.5—3.9 m.m. respectively, and most of them were 2.0 and 1.0 m.m. in diameter.

Concerning the rate of development in number and in size of the plaques formed by these strains during incubation, it was seen that the rate was evidently greater in A₂ strain than those observed in the other two.

Finally, the possible reasons for the differences in plaque-forming characteristics and the relation of the plaque sizes to certain biological properties of these strains of J. B. E. virus especially in respect of A₂ strain and the chick embryo adapted A₂ strain were discussed.