

麻疹病毒减毒过程的观察*

章以浩 吴绍沅 卢宝兰 王子桂

(卫生部生物制品研究所, 北京)

朱既明 张守德 武文煥 曾国华 肖俊

(长春生物制品研究所, 长春)

本文叙述了列4株麻疹病毒在人羊膜细胞、鸡胚羊膜腔与鸡胚细胞中的传代过程及毒力变化。观察了下列各系病毒接种易感儿后的发热反应与血凝抑制抗体。

一、在人羊膜细胞中传代的“羊膜系”(HAM)其毒力较自然麻疹已显著减轻,但从45代到69代之间继续传代,进一步的减毒作用不显著。

二、在鸡胚中传代减毒作用很明显。以羊膜系病毒适应于鸡胚而获得了“鸡胚系”(CE),第12代时毒力无变化,在12代与20代之间,反应性与抗体水平呈急剧下降,但至33代抗体水平与抗体阳转率仍然维持在20代的水平,未继续下降。

于鸡胚中传18代后改用快速传代法(每4—6天传代,以代替原来的9天传代),病毒繁殖高峰提前,由此而获得了“鸡胚快传系”(CER)。该系毒种的反应性也极低,但虽经快传至18代(合计在鸡胚中共传36代),仍保留了较高的阳转率及相当的抗体水平,与CE₂₀无大区别。

三、羊膜病毒直接适应于鸡胚细胞后出现了三种不同情况: 1) HAM₆₀ CEC系虽然在鸡胚细胞中传至14代,但始终未能适应在该系统中繁殖,减毒作用也不显著; 2) HAM₄₇ CEC系的发热反应已明显降低,但仍不稳定,其免疫性与羊膜系相近; 3) HAM₅₅ CEC系的发热反应极度降低,抗体阳转率仍高,但抗体水平则显著下降。

从以上结果看来,似乎麻疹病毒在鸡胚细胞中传代可出现不同程度的减毒。

四、通过鸡胚后再适应于鸡胚细胞的三系毒种CE₁₅ CEC、CER₈ ECEC和CE₂₆ CEC均能达到高度减毒,但免疫性似有一定损失,其极端者如CE₂₆ CEC不但抗体水平很低,阳转率也显著下降。

根据以上结果,对麻疹病毒减毒的规律性提出了讨论;病毒可依其毒力水平分为强毒、初步减毒株、中等度减毒株、高度减毒株及超减毒株。在人羊膜细胞、鸡胚或鸡胚细胞中传代均有减毒效果。减毒在一定代数后出现,但在某一系统中传递的代数并不是直接决定减毒程度的唯一因素。病毒在某一系统中传代,毒力减弱到一定程度后,继续传代的减毒作用就不明显,而在更换另一系统传代后,就可能出现进一步的减毒。

Enders 等及 Smorodintsev 等^[1,2]曾分别
将 Edmonston 株(简称 Ed 株)及列宁格勒
4 株(简称列4株)麻疹病毒,自人胎肾细胞
传递到人羊膜细胞、鸡胚或鸡胚细胞而获
得了减毒株。这些减毒株的免疫效果是可

* 本文中的临床反应观察是在诸福棠教授领导下由
中国医学科学院儿科研究所及北京市儿童医院的
林传家、宋秀瑛等大夫和顾又芬教授领导的吉林
医科大学儿科刘禹仁、杨巨业大夫进行的。承允
引用有关资料,一并致谢。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

靠的;对人的致病性已大大降低。但是仍然有80%左右的发热反应,且有20—30%左右的高热反应,这就限制了疫苗的大规模使用。因此,寻找进一步减毒而仍然有足够免疫性的毒株就成为麻疹活疫苗研究中的关键问题。

为了获得较理想的疫苗株,需要对病毒的减毒规律性有所了解,以便探索哪些是较有希望的。Enders 及 Smorodintsev 获得减毒株的过程大致相同。其主要区别是:Ed 株是在人羊膜细胞传代之后通过了鸡胚羊膜腔再进入鸡胚细胞的,而列₄株则直接由人羊膜细胞进入鸡胚细胞。两者的临床反应及免疫性也大致近似。Enders^[3]根据猴体试验结果认为病毒在人胎肾细胞阶段毒力没有改变,但随后的减毒究竟是在人羊膜细胞、鸡胚或鸡胚细胞阶段发生的则不能肯定。

通过人羊膜细胞传代,其效果是不同的。如 Smorodintsev^[2]以列₄病毒羊膜株(HAM₃₀)接种 11 个小儿,大部分发热 38℃ 以上,4 例出现皮疹。虽然较自然麻疹反应为低,但较通过鸡胚细胞者(HAM₃₅CEC₉₋₁₅)的反应仍强。黄祯祥等^[4-5]报导另一麻疹病毒 M₆₀₋₅ 接种小儿的结果指出,随着在人羊膜上传代次数的增加(5—26 代)其致病性及免疫性也随之下降。然而余鼎新^[6]报导列₄病毒羊膜 40 代到 56 代的致病性与反应性并无显著差别。

鸡胚传代的效果,也不肯定。Enders 等^[1]曾将上述的 Ed 株(称为 A 疫苗)又返回鸡胚羊膜腔传了 6 代,再在鸡胚细胞上制出了 B 疫苗,其反应性并未进一步减轻。McCrumb^[7]将 Ed 株在鸡胚中传了 22 代再传入狗肾细胞;Okuno^[8]用 Toyoshima 株病毒在鸡胚中传了 39 代,未能获得进一步减毒的毒株。

Goffe 等^[9,10]曾应用了一系在鸡胚细胞

上传至 53 代的 Ed 株,但临床反应并未降低。目前只有 Schwarz^[11]将 Ed 株在鸡胚细胞上长期传代而获得了高度减毒株。

可见,麻疹病毒在体外培养的过程中,总的减毒趋向虽然十分明显,但究竟毒力在那个阶段改变,改变到什么程度,则无法说明。

近年来,我们曾对列₄株的进一步减毒问题进行了一些工作,获得了数系高度减毒的疫苗株^[12-14];并对各种条件下病毒的减毒规律性进行了观察。所获得的一部分毒株的资料已经报导过^[14],本文则叙述对更多系毒种观察的结果,目的在于对病毒的毒力改变过程作一总结。

材料与方法

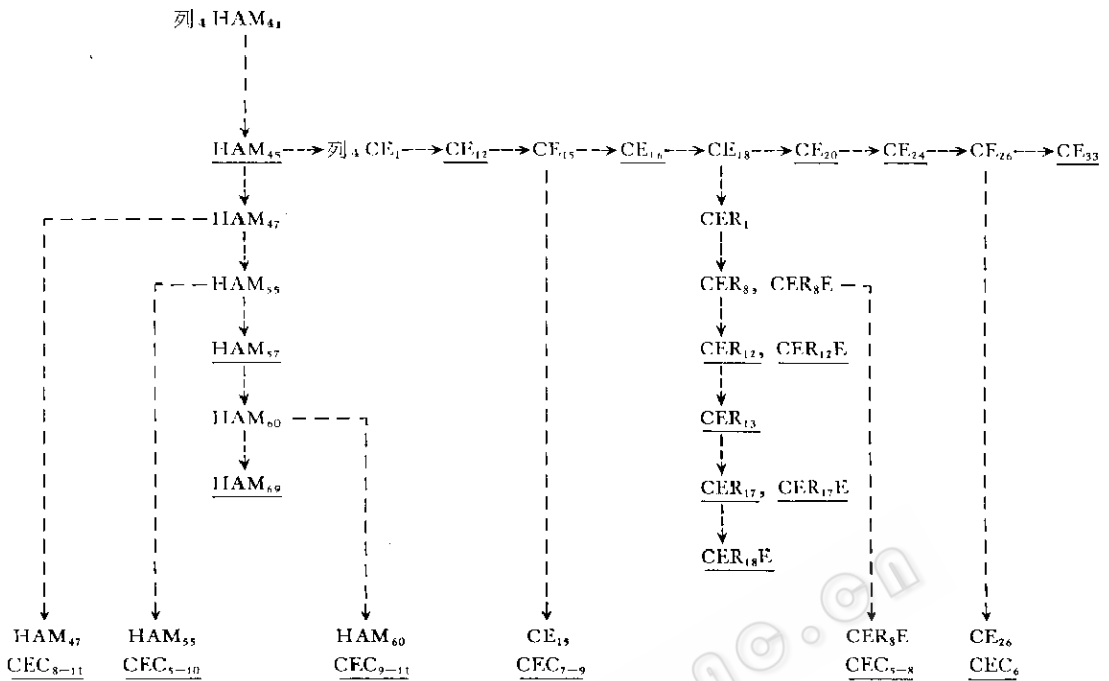
一、病毒 列₄株为 Smorodintsev 在人胎肾细胞中分离并适应于人羊膜细胞的麻疹病毒。自中国医学科学院病毒研究所取得时已在人胎肾细胞中传 26 代,人羊膜细胞中传 41 代(HAM₄₁)。在我们实验中,由此而衍生的各系传代历史见图 1。

二、组织培养 初代人羊膜细胞及鸡胚细胞均用胰酶分散法制备成单层细胞。传代人羊膜细胞为 FL 株。各种细胞的培养条件已作过详细报导^[12]。

三、病毒滴定 病毒以维持液 10 倍连续稀释后,每稀释度接种 3 个 FL 细胞培养管,每管种入细胞悬液 0.5 毫升(含细胞 6—7 万个)与稀释的病毒 0.1 毫升,37℃ 培育 7 天,按 Reed 及 Muench 法计算 50% 组织培养感染量(TCID₅₀)。

四、抗体测定 血凝抑制试验,抗原为列₄株在初代人羊膜细胞上的培养物,使用前于 56℃ 加温半小时。凝集 1% 恆河猴红血细胞的滴度约在 1:8—1:64 之间。血凝抑制采用曾毅等的方法^[15]。血清事先以猴红血细胞吸收,然后自 1:2.5 或 1:5 开始倍比稀释,血凝素为两个单位(部分血清用四个单位血凝素测定者均折合成两个单位的滴度计算)。以完全抑制血凝的稀释度为滴度。

五、小儿接种观察 接种对象为六个月至六



HAM = 初代人羊膜，CE = 鸡胚羊膜腔，CEC = 鸡胚细胞，R = 快速传代，E = 鸡胚体悬液。

图中数字系指代数，有底线者曾制备疫苗。

图1 列4株病毒各系传代历史示意图

岁、绝大部分在二到三岁上下、健康、集体或散居的儿童。经血清学证实均为易感儿。

疫苗存于4℃，以199液作适当稀释，上臂皮下接种0.2—0.3毫升。确实接种病毒剂量按接种当日所作病毒滴定的结果校正，一般均在100—1,000 TCID₅₀之间。接种后2—3星期內每日测量腋温两次，由儿科医师进行观察并记录临床表现。接种后1个月左右取血，连同免疫前的血清同时测定抗体滴度。

試驗結果

(一) 人羊膜细胞系(HAM)

由42代传至69代，各代的滴度波动于10^{2.5}—10^{3.75} TCID₅₀/0.1毫升。

45, 57及69三个代数分别制备了疫苗接种易感儿。

(二) 鸡胚羊膜腔系(CE)

鸡胚羊膜腔传代系由HAM₄₅(10^{3.75}/0.1毫升)开始的。按Milovanovic^[16]方法进行。收获羊水连续传代，每代培育9天。1—9

代及19—23代培育温度为37℃，余均为35℃。5代时病毒滴度为10^{1.75}/0.1毫升，自10—18代滴度上升至10^{3.25}—10^{4.25}，19—23代时改为37℃培育，滴度又下降；后又改为35℃培育，滴度又复上升。在12—18代时发现个别尿膜有水肿，24代以后部分尿膜及鸡胚体本身均出现水肿。

另一个传代系统自CE₁₈开始(见图1)改为培育4—6天传代，称之为“鸡胚快传系”(CER)。特点是在鸡胚中的滴度于5天即达高峰，与原系7—9天开始达高峰，有显著不同。

曾以CE_{12, 16, 20, 21, 33}以及CER_{12, 13, 17}各代羊水分别制备不同批疫苗。CER系于收获羊水同时也用鸡胚体本身以199液制成10%悬液，离心后取上清作为疫苗，即如图1中所示CER₁₂E，CER₁₇E及CER₁₈E等。鸡胚体病毒含量比羊水病毒略低。

(三) 鸡胚细胞系(CEC)

取 HAM₄₇, HAM₅₅ 及 HAM₆₀; CE₁₅, CE₂₆ 及 CER₃E 在鸡胚细胞中传递了不同代数, 并制备疫苗进行小儿接种观察。

各系病毒分别于鸡胚细胞中传不同代数时开始出现病变。其性质为鸡胚细胞失去了原有的顺序而呈交错排列状态, 呈多突状, 相互结成网状物, 其间可见散在的圆形细胞。染色可见嗜酸性核内包涵体(见图



图2 列4株 CER₃ECEC₃ 在鸡胚细胞中所引起的病变(HE染色×530)

2) 酷似 Katz^[17] 所描述者。

所有各系病毒在适应于鸡胚细胞时, 一般前4—5代时在 FL 细胞中的滴度较低, 而后逐步上升, 最后稳定在一定水平。其滴度范围一般波动于 1.5—3.5 之间, 最高可达 4.5 左右。HAM₆₀CEC 系初次适应

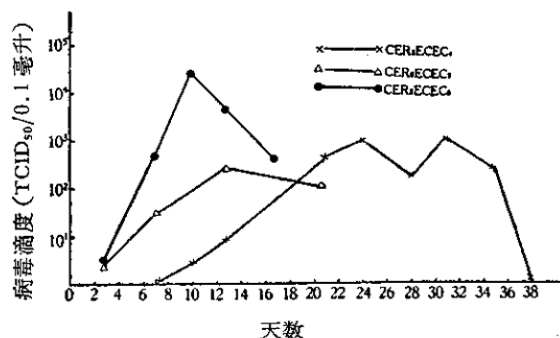


图3 CER₃ECEC 繁殖曲线

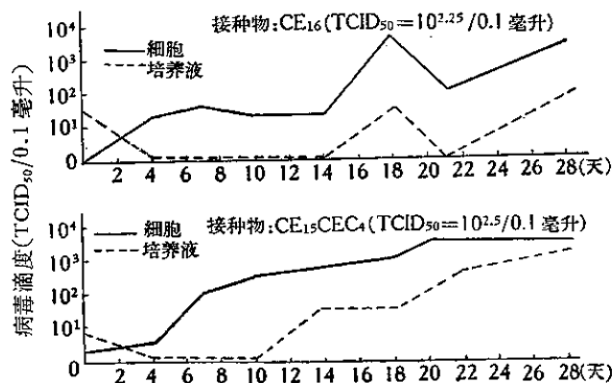


图4 CE₁₆ 及 CE₁₅CEC₄ 在鸡胚细胞上的繁殖曲线

至第5代后, 滴度逐渐下降, 遂取出冻存的第5代材料又复传代, 4次试验均只传1—2代即不能继续。为此于第5—6代之间插入一次人羊膜细胞传代, 病毒滴度有所提高, 但继续传至14代, 滴度又下降而不能继续。似乎该系较不易适应于鸡胚细胞¹⁾。

从图3可见, CER₃ECEC 系的病毒于4代时, 其上清病毒滴度高峰在21天之后, 至6代时已提前到10天左右。如图4所示, CE₁₆ 进入鸡胚细胞第1代的繁殖曲线, 与已适应于鸡胚细胞的 CE₁₅CEC₄ 则显然不同。前者在鸡胚细胞中病毒滴度上升较慢, 培养液中只有少量病毒。而后者在鸡胚细胞中的滴度上升较快, 在14天以后培养液中也出现大量病毒。看来已经在鸡胚细胞中适应过的病毒不但繁殖较快, 且更易向培养液释放。

(四) 反应性和免疫性观察

用以上各系毒种于传代的不同阶段制备了44批疫苗, 接种了725名抗体阴性的易感儿, 其中711名曾测定过免疫后血清抗体。各类疫苗接种后的发热反应与抗体测定结果见表1与图5。

从表1及图5可见各系毒种的反应性

1) 其后此系毒种另一传代系统已适应鸡胚细胞传至40代。

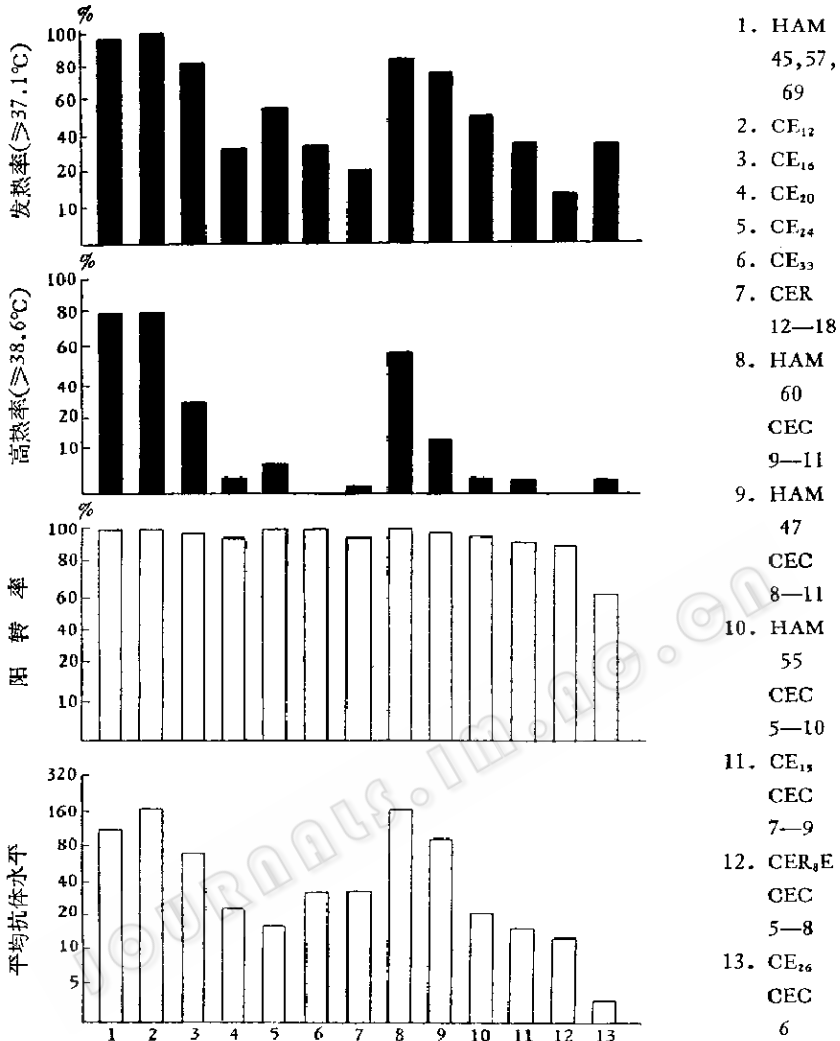


图5 列4麻疹病毒各系的发热反应和抗体反应

和免疫性显著不同。羊膜系 (HAM) 毒种的发热反应很强, 抗体阳转率与平均滴度也很高, 虽然 45, 57, 69 三个代数之间结果有一定的波动, 其中以 HAM₅₇ 的临床反应较强, 但并未出现逐步升高或下降的趋向。与自然麻疹相比, HAM 系毒种的毒力看来已有了显著减弱, 但从 45 代继续传至 69 代, 并没有出现进一步的减毒情况。

鸡胚系 (CE) 毒种于 12 代 (CE₁₂) 时反应性和免疫性与 HAM 系无区别。从 CE₁₂ 经 CE₁₆ 至 CE₂₀ 反应性逐步下降, 抗体水平也相应下降, 但抗体的阳转率不受影响。以后直传至 CE₃₃ 仍维持在 CE₂₀ 的水平, 表

明病毒的毒力于 12—20 代之间剧烈下降后, 在以后的 13 代中不再有显著变化。从鸡胚系分支出来的鸡胚快速系自 CER₁₂ 至 CER₁₅ (按其在鸡胚中传递的总代数相当于 30 至 36 代), 反应性极低, 但抗体水平与阳转率也还维持在 CE₂₀ 的水平, 并未继续下降。

从羊膜系直接适应于鸡胚细胞的三系病毒 (HAM—CEC) 则表现了三种不同的情况: HAM₆₀CEC 系的临床反应仅稍减轻, 其抗体水平及阳转率也与 HAM 系无区别。HAM₄₇CEC 系的高热率已显著降低, 而仍保有较高的抗体水平和阳转率; 但

表 1 經不同方法傳代的各系列 4 株麻疹病毒的发熱反应与抗体測定

減毒方法	疫 苗	人体 观察 次数	发 热 反 应			抗 体		
			观察 人数	发 热 率 [△] (%)	热 率 高 [†] (%)	观察 人数	阳 转 率 [*] (%)	平 均 抗 体 [○]
人羊膜细胞传代	人羊膜细胞 45、57、69 代	4	37	97.3	83.8	31	100	122.4
人羊膜细胞	人羊膜细胞 60 代 鸡胚细胞 9—11 代	2	31	84.0	58.0	31	100	≥168.0
→鸡胚细胞	人羊膜细胞 47 代 鸡胚细胞 8—11 代	5	95	74.7	14.7	94	97	105.0
	人羊膜细胞 55 代 鸡胚细胞 5—10 代	4	76	51.0	4.0	76	96	22.7
人羊膜细胞	鸡胚羊膜腔 12 代	2	12	100.0	83.3	11	100	171.2
→鸡胚羊膜腔	鸡胚羊膜腔 16 代	3	51	82.3	31.4	48	98	75.2
	鸡胚羊膜腔 20 代	2	46	32.6	4.4	44	95	26.6
	鸡胚羊膜腔 24 代	2	48	56.3	8.3	48	100	17.7
	鸡胚羊膜腔 33 代	1	20	35.0	0	20	100	34.0
	鸡胚快传 12—18 代胚体	11	149	20.8	1.4	149	95	34.6
人羊膜细胞	鸡胚羊膜腔 15 代 鸡胚细胞 7—9 代	3	61	34.4	3.3	60	92	16.9
→鸡胚羊膜腔	鸡胚快传 8 代胚体 鸡胚细胞 5—8 代 [*]	4	73	16.4	0	73	89	14.01
→鸡胚细胞	鸡胚羊膜腔 26 代 鸡胚细胞 6 代	1	26	34.6	3.9	26	62	3.5

注：△ 在观察期间最高腋温达到或超过 37.1℃ 者作为发 热；

† 在观察期间最高腋温达到或超过 38.6℃ 者作为高热；

* 接种前血清血抑抗体 1:2.5 阴性，接种后血清阳性者作为阳转；

○ 为所有接种后血清血抑抗体的几何平均数，阴性者作 1:1 计。北京采用 2 个单位血凝素所测得的抗体滴度平均约为长春采用 4 个单位所测得的 3 倍，为了便于合并统计结果，本栏计算平均抗体时将长春滴度折算成北京滴度；

★ 包括一批于鸡胚细胞传代中穿插 1 代羊膜细胞传代者。

其反应性不很稳定，9 代的反应显著地高于 8 代及 11 代。HAM₅₅CEC 系的反应性更低，但抗体水平已显著下降。这三系病毒在鸡胚细胞中所传的代数大致相同，但减毒的程度却很不一致。上面已经提到 HAM₆₀CEC 系较难适应于鸡胚细胞中繁殖，其减毒也最不明显。

羊膜系毒种先通过鸡胚再适应于鸡胚细胞的三系（CE—CEC）的临床反应都很低，其抗体水平则较前两类毒种更低一些，而且抗体阳转率也有不同程度的下降，如 CE₁₅CEC 为 92%，CE₈ECEC 为 89%，CE₂₆CEC 则仅达 62%。看来 CE 系在适应鸡胚细胞后毒力又有了进一步的减弱。

从表 1 及图 5 还可见，随着高热率的降低总的发热率也有明显下降。反应性较低的各系毒种大约只在 1/3 的易感儿中引

起发热反应，但除了 CE₂₆CEC 一系以外，抗体阳转率仍然很高。这就意味着多数接种的易感儿实际上是经历了一次隐性的麻疹感染。

讨 论

麻疹病毒适应于鸡胚羊膜腔和鸡胚细胞早有作者报告过。在鸡胚适应过程中，我们发现应用快速传代方法可以选出繁殖高峰显著提前的变种（CER 系）。鸡胚细胞适应则表现为滴度升高，繁殖高峰提前，病毒大量释放至培养液中，细胞出现病变等特点。目前对病毒适应与减毒的关系还不清楚，现从 HAM₆₀CEC 系较难适应于鸡胚细胞，同时其减毒也最不明显这一事实看来，可能二者之间有一定的联系。

我们初步观察到一些减毒的规律性，

表 2 不同毒力水平的麻疹病毒

病毒类型	费科氏斑	皮 疹	发 热 反 应		抗 体		举 例
			发热率 (%)	高热率 (%)	平均滴度	阳转率 (%)	
强 毒	+++ ¹⁾	一般均发疹明显广泛	100	接近 100	> 320 ²⁾	100	自然麻疹
初步减毒株	+	约 50% 发疹, 较轻, 散在	约 80	> 50	> 160	100	列 ₄ HAM _{45, 57, 69} ; CE ₁₂ ; HAM ₆₀ CEC ₉₋₁₁ ;
中等度减毒株	±	约 50% 发疹, 轻微, 散在	约 80	约 20	约 80	> 95	Edmonston 株 A + B ³⁾ ; 列 ₄ HAM ₃₅ CEC ₉₋₁₅ ³⁾ ; HAM ₄₇ CEC ₈₋₁₁ ;
高度减毒株	-	< 10% 发疹	约 30	< 10	20—40	> 90	列 ₄ CE ₂₀₋₃₃ ; CE ₁₂₋₁₈ ; HAM ₅₅ CEC ₃₋₁₀ ; CE ₁₅ CEC ₇₋₉ ; Edmonston (Schwarz) ³⁾
超减毒株	-	< 10% 发疹	约 30	< 5	< 20	< 90	列 ₄ CER ₈ ECEC ₃₋₈ ; CE ₂₆ CEC ₆ .

注：1) 综合表示费科氏斑的颗数, 典型程度和出现百分率;
2) 血凝抑制抗体滴度的倒数, 按本文法用 2 个血凝单位;
3) 文献中报告的 Edmonston A + B, 列₄ HAM₃₅CEC₉₋₁₅, Edmonston (Schwarz) 的抗体测定用中和或补体结合法, 故平均滴度不能直接相比。

具体表现为以下几点:

一、总结我们的结果和文献报告, 可将麻疹病毒按其毒力水平不同而分为强毒、初步减毒株、中等度减毒株、高度减毒株和超减毒株(表 2)。看来在减毒过程中麻疹病毒最先丧失引起费科氏斑的能力(可能同时失去由呼吸道排出与感染的能力), 其次是引起发疹的能力, 再其次是发热反应, 最后才是其免疫性。在免疫性方面, 先观察到抗体滴度的降低, 然后是阳转率的下降。按此原理就可能选出反应很轻、仍有足够免疫性、高度减毒的病毒作为疫苗株。

二、人羊膜细胞、鸡胚羊膜腔和鸡胚细胞传代都有减毒效果。列₄株在人羊膜细胞上传 45 代后, 其临床反应已较自然麻疹显著减轻, 说明人羊膜细胞传代确有减毒的作用。鸡胚羊膜腔传代的作用, 以前从未被证明过。本文说明鸡胚传代的减毒作用是十分明显的。Schwarz^[11] 报告 Edmonston 株在鸡胚细胞上传 90 代以后出现

了进一步的减毒。在我们的试验中, 列₄株的减毒发生较快, 一般在 5—10 代时即表现得很明显, 例如 HAM₄₇CEC₈₋₁₁, HAM₅₅CEC₅₋₁₀, CE₁₅CEC₇₋₉ 的临床反应较原来未能在鸡胚细胞传代前(即 CE₁₅ 前后相近者如 CE₁₂ 及 CE₁₆)均显著的减轻。最近上海分离的另一株病毒(S₁₉₁)以同样方法在鸡胚细胞中传 10—17 代, 也获得了高度减毒株^[13]。

三、减毒需要在传一定代数后才能表现出来。黄祯祥^[5]曾报告 M₆₀₋₅ 株及列₄株随着在人羊膜细胞中传递代数的增加, 临床反应也相应降低。但其列₄株仍有 3/7, M₆₀₋₅ 仍有 6/9 发生高热反应。本文用同一列₄株病毒在鸡胚中传不同代数后观察的结果证明了代数和减毒的关系; 最剧烈的变化发生在 CE₁₂ 至 CE₂₀ 之间。

四、在某一系统中, 传递的代数并不是直接决定减毒程度的唯一因素。例如 HAM—CEC 的三系在鸡胚细胞中的代数相差不多而减毒程度却有显著的差

别。HAM₆₀CEC₉₋₁₁ 的高热率为 58%，HAM₄₇CEC₈₋₁₁ 为 14.7%，而 HAM₅₅CEC₅₋₁₀ 仅为 4%。在研究中，我们曾将 HAM₄₇CEC 系自 13 代起分为两个支系，分别继续在鸡胚细胞中传代，发现甲系于 25 代以后高热率又进一步降低至 2.9%，而乙系则传至 26 代仍然高达 21%。如果我们以病毒突变与环境的选择作用来解释以上的结果，则可以认为在不同系的传代过程中，虽然总的减毒趋向是肯定的，但是各个突变种的性质和出现机率不会完全一致，而各系各代的具体环境也不会完全相同，因此经过多代选择和淘汰的最终结果也不可能相同。这就可以说明为什么在传代减毒过程中，即有总的规律可循，又有具体细节上的变化，不能期望在同一系统中传相同代数的病毒，性质会完全一致。

五、病毒在某一种宿主系统中传代，毒力减弱至一定程度后，继续传代的减毒作用就不显著，而在更换另一系统传代后就可能出现进一步的减毒。例如列 4 株病毒在人羊膜细胞中自 HAM₄₅ 至 HAM₆₉ 毒力变化不显著，但改在鸡胚或鸡胚细胞中传代后就发生了进一步减毒。在鸡胚中自 CE₁₂ 至 CE₂₀ 毒力急剧下降后，再继续传至 CE₃₃ 或 CER₁₈（相当于 CE₃₆）变化并不显著，但改在鸡胚细胞中传代后似乎又减毒，具体表现为 CER₃ECEC₅₋₈ 和 CE₂₆CEC₆ 两系的抗体水平和阳转率的明显下降。这一现象曾由俞永新等^[19]在观察乙型脑炎病毒的减毒过程时指出，结合我们的经验来看，它可能是病毒传代减毒的一般规律，值得在更多的病毒中进一步的观察。

参 考 文 献

- [1] Enders, J. F., Katz, S. L., Milovanovic, M. V. and Holloway, A.: *New Engl. J. Med.*, 263:153—184, 1960.
- [2] Smorodintsev, A. A., Boichuk, L. M., Shikina, E. S., Batanova, T. B., Bystriakova, L. V. and Peradaze, T. V.: *Acta Virol.*, 4:201—214, 1960.
- [3] Enders, J. F., Katz, S. L. and Medearis, D. N.: in "Perspective in Virology" (M. Pollard, Ed.) 1:103—120, John Wiley and Son, N. Y., 1959.
- [4] Huang, C. H., Chia, P. Y., Chu, F. F., Kuo, K. C., Wang, H. Y., Wu, C. L. and Wu, H. H.: *Chinese Med. J.*: 81:9, 1962.
- [5] 黄祯祥、郭可鸾、贾秉义:微生物学报, 10:344—349, 1964.
- [6] 余鼎新、余 濯、张 箐、陈宗舜、顾祖万、唐姚珍:中华医学杂志, 48:213, 1962.
- [7] McCrumb, F. R., Kress, S., Saunders, E., Snyder, M. J. and Schluederberg, A. E.: *Amer. J. Dis. Child.*, 101:689—700, 1961.
- [8] Okuno, Y.: *Amer. J. Dis. Child.*, 103:381—384, 1962.
- [9] Goffe, A. P. and Laurence, G. D.: *B.M.J.*, 2:1244, 1961.
- [10] Aldous, I. R., Kirman, B. H., Bulter, N., Goffe, A. P., Laurence, G. D. and Pollock, T. M.: *B.M.J.*, 2:1250, 1961.
- [11] Schwarz, A. J. F.: *Amer. J. Dis. Child.*, 103:386—389, 1962.
- [12] 朱既明、肖 俊、张守德、武文焕、曾国华、章以浩、王子柱:中华医学杂志, 50:7, 1964.
- [13] 顾又芬、王维俊、刘禹仁、杨巨业、朱既明、徐特璋、赵克俭、吴绍沅、中华医学杂志, 50:69, 1964.
- [14] Chu, C. M., Ku, Y. F. and Chang, I. H.: *Chinese Med. J.*, 83:483, 1964.
- [15] 曾 毅、邓裕美:中华医学杂志, 47:355—357, 1961.
- [16] Milovanovic, M. V., Enders, J. F. and Mitus, A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95:120—127, 1957.
- [17] Katz, S. L., Milovanovic, M. V. and Enders, J. F.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97:23—29, 1958.
- [18] 诸福棠、朱既明、余鼎新、黄祯祥、张箐、章以浩、顾又芬:科学通报, 12: 1069—1080, 1964.
- [19] 俞永新、敖 坚、雷文绪、李河民:微生物学报, 8: 260—269, 1962.

OBSERVATIONS ON THE COURSE OF ATTENUATION OF MEASLES VIRUS

CHANG I-HAO, WU SHAO-YUAN, LU PAO-LAN AND WANG TSE-CHU
(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

CHU CHI-MING, CHANG SHOU-DE, WU WEN-HUAN,
CHENG KUO-HUA AND HSIAO CHUN
(Changchun Vaccine and Serum Institute, Changchun)

This paper describes the variation in virulence of the Leningrad 4 Strain of measles virus in the course of passage in human amnion cells, chick embryos and chick embryonic cells. The febrile reaction and hemagglutination-inhibition antibody of serum negative children inoculated with the various virus lines were observed:

1. The febrile reaction caused by the human amnion line (HAM) was already much milder than that of natural measles, but in the course of passage from 45 to 69 generations, no further attenuation was observed.

2. Passage in the amniotic cavity of chick embryos resulted in a marked attenuating effect. The chick embryo line (CE) still preserved its original virulence at the 12th passage, but rapid reduction in febrile reaction and antibody level occurred between the 12th and 20th passages. Further passages up to the thirtythird, however, did not cause appreciable further changes.

Starting from CE₁₈, a "Rapid passage line" (CER) was established by passing every 4—6 instead of the original 9 days. This line caused very little febrile reaction, but retained the capacity of inducing moderate antibody response and a high conversion rate even after 18 rapid passages (a total of 36 chick embryo passages).

3. The three lines obtained by adapting human amnion virus directly to chick embryonic cells differed considerably in their behaviour. HAM₆₀CEC which was not well adapted even after 14 passages in chick embryonic cells, appeared to be as reactogenic as the original HAM line. HAM₄₇CEC

caused reduced febrile reaction and retained good immunogenicity, but appeared to be unstable. HAM₃₅CEC induced very little febrile reaction and good antibody conversion rate, but the antibody level of inoculated subjects was appreciably lowered. It seems, therefore, that different degrees of attenuation may be obtained after chick embryonic cell passages.

4. Another three lines were obtained by adaptation to chick embryonic cells after preliminary passages in chick embryos. These three lines, namely, CE₁₅CEC, CER₈ECEC and CE₂₆CEC all caused little febrile reaction, but further loss of immunogenicity seemed to have occurred. In the extreme case of CE₂₆CEC, not only the antibody level, but the conversion rate was markedly lowered.

Basing on the above results, several rules governing the attenuation of measles virus were suggested: Measles virus may be classified into virulent, slightly attenuated, moderately attenuated, highly attenuated and over-attenuated according to their virulence levels. Passages in human amnion cells, chick embryos and chick embryonic cells all exhibited attenuating effect. Attenuation only appeared after a certain number of passages, but the number of passages in a given system was not the sole factor determining the degree of attenuation. When the virulence had been reduced to a certain level after a number of passages in a given system, it remained relatively stable thereafter on further passage. Further attenuation, however, may be achieved by additional passages in another system.