

## 流行性乙型脑炎病毒的变异

### IV. SA<sub>14</sub>-A 株蚀斑病毒的致病力和免疫力\*

李河民 俞永新 敖坚 方珍

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

预防流行性乙型脑炎疾病的综合措施中,应用疫苗对人羣进行自动免疫,是控制该病的重要方法之一。由于乙型脑炎死毒疫苗存在着反应重或免疫效果较差的缺点,近年来我们着手研究乙型脑炎活疫苗的工作。本文为继以往的工作,将 SA<sub>14</sub>-A 减弱株,继续通过地鼠肾细胞 100 代的病毒培养液中,挑选出 3 株对小白鼠脑内感染几乎不致死而对恆河猴完全不致死的毒株,较原有的 SA<sub>14</sub>-A 减弱株的毒力又有进一步的减弱,而且这些毒株经小白鼠及豚鼠免疫后仍然表现出良好的免疫性。因此,我们认为将这些毒株再做适当的减毒并保持其一定的毒力稳定性后,可以供乙型脑炎活疫苗做为毒株用。

我们曾经在前文<sup>[1]</sup>报告过,以乙型脑炎病毒 SA<sub>14</sub> 株通过地鼠肾单层细胞,在 37°C 连续培养传递 27 代,获得对小白鼠及恆河猴脑内感染毒力减弱的变异株。近年来,在国外已有许多作者按照 Sabin 氏<sup>[2]</sup>选择脊髓灰质炎活疫苗毒株的蚀斑法提取减弱病毒株,其中如 McClain<sup>[3]</sup> 等对猪的 Vesicular Exanthema 病毒,Price<sup>[4]</sup> 等对西尼罗脑炎及类壁虱脑炎病毒,Dunayevich 等<sup>[5]</sup>对西方马脑炎病毒所进行的工作取得较为满意的结果。为了进一步观察我们在地鼠肾细胞传代而获得的 SA<sub>14</sub>-A 株的变异规律,我们又将该病毒在地鼠肾细胞继续传递达 100 代,并且利用蚀斑法从中提取不同的病毒株,发现一些毒株对小白鼠脑内毒力特别低。本文叙述试验经过和结果。

### 材料和方法

**蚀斑试验** 用 9—10 日龄鸡胚经 0.25% 胰酶消化后,以 10% 牛血清 199 培养基稀释,使其

每毫升内约含 400 万细胞。将细胞悬液分装于直径 80 毫米的双碟,每碟 12—15 毫升,平置于玻璃干燥罐内,于罐内点支蜡燭燃烧后盖紧,候蜡燭自灭后,将罐放入 36—37°C 孵箱内培养 36—48 小时。细胞繁育成致密丰满时即可应用。使用时先将培养液吸去,每碟加入 2 毫升适当稀释的病毒,放 37°C 培养 1—2 小时,使病毒吸附于细胞后,吸去液体,覆盖琼脂营养液。

琼脂营养液的配方按 Dulbecco 氏<sup>[6]</sup>法略加修改如下:

3% 琼脂	12.0 毫升
2% 乳蛋白水解物	10.5 毫升
Earle 氏液(4×)	8.4 毫升
中性红(1:1000)	1.5 毫升
乳兔血清	2.0—4.0 毫升
碳酸氢钠(7.5%)	0.4 毫升
抗菌素(青霉素 10,000 单位/毫升) 链霉素 10,000 微克/毫升)	0.4 毫升
全量	35.2—37.2 毫升

在细胞层上覆盖琼脂营养液后继续放置于

\* 实验部分操作由武佩芬同志进行,谨致谢意。  
本文 1964 年 3 月 23 日收到。

干燥罐内,在 36—37℃ 培养 3—5 天。一般在第 3 天开始出现蚀斑,第 4—5 天则较明显,大小易辨。此时即可进行蚀斑挑选。用眼科小镊子将单个蚀斑包括琼脂及细胞层取出,于鸡胚悬浮组织块内培养 3—4 天,再接种于小鼠肾单层细胞。用此病毒材料分别进行所需的试验。

**病毒滴定** 用提前离乳的 16—18 日龄(7—9 克)小白鼠测定 LD<sub>50</sub>,在个别试验中同时用 1—3 日龄乳鼠测定皮下毒力。用地鼠肾细胞观察病毒对细胞的致病变作用(TCID<sub>50</sub>)。

另外,免疫力试验及检查免疫血清的中和试验均按前文<sup>[1]</sup>所述方法进行。唯检定减弱毒株的中和试验系以地鼠肾细胞代替小白鼠进行的。

在每次试验中,除了为检查毒力稳定性而用鼠脑病毒悬液以外,均使用在地鼠肾细胞上培养 48—72 小时一般已引起大部细胞产生病变和脱落的病毒材料。

試驗 結果

一、SA<sub>14</sub>-A 株在地鼠肾细胞继续传代后的毒力变化

将 SA<sub>14</sub>-A 株继续在地鼠肾单层细胞传递 100 代,观察传代后期的病毒对小白鼠及恒河猴的毒力变化。试验结果表明,第 95 代病毒对小鼠脑内毒力(LD<sub>50</sub>)为 2.00,地鼠肾细胞致病变滴度(TCID<sub>50</sub>)为 5.67 log,第 100 代病毒各为 3.72 和 5.25 log,与传代前期的病毒比较,如第 27 代病毒 LD<sub>50</sub> 和 TCID<sub>50</sub> 则各为 2.44—1.43

和 7.00—6.50,因此在小白鼠脑内滴定时似乎看不出继续多代的传递可引起毒力的进一步改变。

为了检查传代的病毒对猴子的致病力,以第 95 代病毒 470,000 和 47,000 个 TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升脑内,于视丘部位感染恒河猴各 2 支,以前一病毒量感染者均出现体温升高、四肢震颤等神经症状;以后一病毒量感染者仅有 1 只出现体温升高而无其他临床症状。4 只动物均存活。另以 SA<sub>14</sub>原株(鼠脑 17 代,地鼠肾细胞 1 代)感染猴子做为对照组,结果以 180,000 及 18 个 TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升感染的 4 只猴子经感染后 10 天内全部发病,并出现震颤、痉挛、四肢麻痺等神经症状而死亡。

为了证明长期连续传代对病毒毒力的影响,我们又将 SA<sub>14</sub>-A 株不同代数病毒通过乳小白鼠皮下 1—3 代进行试验,即将病毒接种于 1—3 天乳鼠腹股沟部位皮下,每只 0.03 毫升,经 3—4 天,将注射部位皮肤连同皮下脂肪及淋巴结取下,经研磨沉淀后,再传下一代。滴定毒力时将皮肤材料通过地鼠肾细胞培养 1—3 代,滴定结果列于表 1。

从表 1 可见,地鼠肾细胞 29 代病毒通过乳鼠 1 代后,对小白鼠脑内毒力立即回升,通过 3 代后则已恢复至原强毒株的毒力,而且皮下毒力亦有明显的升高。第 99

表 1 SA<sub>14</sub>-A 株不同代数病毒通过乳鼠皮下后的毒力变化

代 数	小鼠脑腔 LD <sub>50</sub> /0.03 毫升	小鼠皮下或腹腔 LD <sub>50</sub> /0.25 或 0.3 毫升	地鼠肾细胞 TCID <sub>50</sub> /0.2 毫升	差 距 TCID <sub>50</sub> —LD <sub>50</sub>	备 注 通过乳鼠皮下前毒 力差距
HK <sub>19</sub> 乳 <sub>1</sub> HK-2	4.50	0.50*	7.50	3.00	HK <sub>27</sub> : 4.67
HK <sub>29</sub> 乳 <sub>3</sub> HK-2	6.33	2.37 <sup>△</sup>	6.00	-0.33	
HK <sub>29</sub> 乳 <sub>3</sub> HK-3	≥6.50	—	6.00	-0.50	
HK <sub>99</sub> 乳 <sub>1</sub> HK-2	3.44	—	6.50	3.16	HK <sub>95</sub> : 3.67
HK <sub>99</sub> 乳 <sub>3</sub> HK-1	3.50	—	5.75	2.25	
HK <sub>99</sub> 乳 <sub>3</sub> HK-2	3.52	0*	6.50	2.98	

注:表中数字为 LD<sub>50</sub> 的负对数。  
\* 小鼠腹腔毒力;△小鼠皮下毒力。

代病毒通过乳鼠 1—3 代后,其脑内毒力却未改变或升高不显著,而且腹腔毒力又未出现。

因此,传代后期病毒毒力按乳鼠皮下传代法进行返祖试验时较前期稳定。

## 二、SA<sub>14</sub>-A 株不同代数的不同蚀斑病毒的毒力比较

为了检查 SA<sub>14</sub>-A 株原传代病毒液中

是否含有不同毒力的病毒颗粒,我们挑取病毒在鸡胚单层细胞上繁殖后形成的蚀斑进行试验。用于试验的病毒为经地鼠肾细胞传递第 28 代及 100 代(中间通过鸡胚细胞 4 代)者,根据蚀斑形状自 28 代挑选蚀斑 22 个,毒力滴定 10 个;自 100 代挑选 13 个,滴定 9 个。结果列于表 2。

表 2 可见,第 28 代及 100 代病毒内均

表 2 SA<sub>14</sub>-A 株不同代数病毒形成的不同蚀斑毒力

代 数	蚀 斑 号	小鼠腹腔 LD <sub>50</sub> /0.03 毫升	小鼠腹腔 LD <sub>50</sub> /0.3 毫升	地鼠肾细胞 TCID <sub>50</sub> /0.2 毫升	差 距 TCID <sub>50</sub> -LD <sub>50</sub>	蚀斑大小
HK <sub>28</sub>	2	2.83	—	7.5	4.67	小
	12	3.30	0	7.0	3.70	小
	13	2.32	0	7.5	5.32	小
	14	2.00	0	7.5	5.50	小
	15	2.00	0	7.5	5.50	小
	16	2.00	0	7.0	5.00	小
	17	1.00	0	6.5	5.50	小
	18	4.44	0	8.5	4.06	大
	19	3.14	—	7.5	4.36	大
	20	2.00	0	6.5	4.50	大
HK <sub>100</sub>	1	5.50	0	≥8.5	≥3.00	大
	2	4.77	—	≥8.5	≥3.77	大
	3	4.67	0	7.5	2.83	大
	4	3.56	0	7.0	3.44	大
	5	3.83	0	7.0	3.17	大
	9	0.50(1.00)*	—	7.0(7.0)	6.50(6.00)	小
	10	0(<0.0)	—	6.0(7.0)	6.00(>7.00)	小
	12	0(0.5)	—	7.5(7.5)	7.50(7.00)	小
	13	1.83	0	7.0	5.17	小

注: 大空斑直径约 1—3 毫米,小空斑直径约 <1 毫米。

\* 另一次滴定结果。

存在毒力强弱不同的病毒颗粒,第 28 代内毒力滴度相差较小,病毒对小白鼠的脑内毒力为 log 4.44—1.00,脑内毒力与地鼠肾细胞致病变滴度的差距为 log 3.70—5.50;而第 100 代内则相差较为明显。高者对小鼠脑内毒力达 log 5.5,低者对 7—9 克小鼠脑内注射不致死或仅有个别小鼠死亡,脑内毒力与 TCID<sub>50</sub> 的差距为 log 2.83—7.50。我们抽取毒力强弱蚀斑各 1 个,即第 100 代 1 号及 12 号蚀斑病毒,与已知乙

型脑炎病毒免疫血清按病毒稀释血清定量法在地鼠肾细胞进行中和试验。试验结果表明,免疫血清对 1 号蚀斑病毒的中和指数为 ≥3162,对 12 号蚀斑病毒高于 10,000,而最浓的病毒稀释度又能完全被中和掉。

由于每批地鼠肾细胞在用于传代及其他试验时均有正常对照,因此证明这些对地鼠肾细胞有致病变作用的病毒仍为流行性乙型脑炎病毒。

病毒接种鸡胚单层细胞后第 3 天开始出现蚀斑,再经过 24—48 小时培养后其形状的特点已不发生更大的改变。以低倍显微镜和肉眼观察,蚀斑形状有显著差异的可分为二种:一是小蚀斑,其内部的细胞未完全被破坏,在中心部位仍然有被中性红染色的残余细胞,培养 4—5 天后直径不超过 1 毫米;另一种是大蚀斑,内部细胞完全被破坏,其直径较大为 1 毫米以上。蚀斑大小与病毒毒力似有一定的关系,如第 100 代中 4 个小蚀斑 (No. 9、10、12、13),第 28 代中 7 个小蚀斑则有 5 个 (No. 13、14、15、16、17),其毒力均较低,与 TCID<sub>50</sub> 的差距在 log 5.00 以上。但蚀斑形状与病毒毒力有时也表现相反的关系,此原因有待进一步研究。

三、SA<sub>14</sub>-A 株第 100 代第 9、10 和 12 号蚀斑病毒经纯化 3 代后,对小白鼠及恒河猴的脑内毒力

根据上述结果,我们选择对鼠脑毒力最低的地鼠肾细胞 100 代第 9、10、12 号蚀斑病毒,按上述蚀斑试验法继续挑选孤立的小蚀斑进行纯化,共计 3 代。从第 3 代的蚀斑集落中按照形状挑选一定数量的孤立蚀斑进行毒力滴定,滴定结果列于表 3。

表 3 结果表明,第 12 号第 3 代不同蚀斑病毒的脑内毒力相差较小,并形成小蚀斑,其毒力和蚀斑形状与第 1 代者相似。第 9 号株第 3 代不同蚀斑病毒对小白鼠脑内均具有较低的毒力,但在纯化过程中每一代均出现大小不同的蚀斑,大蚀斑数目少,但其病毒毒力并未发现增强。与上述 2 株比较第 10 号株别有特征,分离出来的病毒虽具有较高的滴度 (>10<sup>6</sup>TCID<sub>50</sub> 或 PFU) 但对地鼠肾细胞仅产生不明显的细胞致病变效果。从 8 株第 10 号第 3 代蚀斑病毒的滴定结果来看,其中有 3 株对小白鼠脑内毒力提高到 log 4.00 以上;2 株稍

表 3 第 9、10、12 号蚀斑病毒纯化 3 代后对小白鼠的脑内毒力

第 3 代蚀斑号	小鼠脑腔 LD <sub>50</sub> 或 10 死亡数	地鼠肾细胞 TCID <sub>50</sub>	差距 TCID <sub>50</sub> —LD <sub>50</sub>	蚀斑大小
9-4-1	<0.0	7.5	>7.50	小
9-4-2	<0.0	6.5	>6.50	小
9-4-3	0.22	6.5	6.28	小
9-4-4	<0.0	6.5	>6.50	小
9-4-6	0.0	6.0	6.00	大
9-4-5	1/10	—	—	小
9-4-8	1/10	—	—	小
9-4-9	0/10	—	—	小
9-4-10	2/10	—	—	小
9-4-12	0/10	—	—	大
10-5-3	4.00	5.50	1.50	小
10-5-4	4.00	6.00	2.00	小
10-5-5	4.33	7.00	2.67	小
10-5-15	<0.00	6.00	>6.00	小
10-5-17	2.50	6.00	3.50	小
10-5-19	<0.00	5.50	>5.50	小
10-5-21	<0.00	5.50	>5.50	小
10-5-22	2.00	5.50	3.50	小
10-5-18	0/9	—	—	小
10-5-20	3/10	—	—	小
12-1-1	<0.0	7.50	>7.50	小
12-1-2	1.23	6.00	4.77	小
12-1-6	1.29	6.00	4.71	小
12-1-7	0.15	7.00	6.85	小
12-1-8	0.44	7.00	6.56	小
12-1-9	<0.0	7.00	>7.00	小
12-1-10	0	6.50	6.50	小

有升高,毒力为 log 2.0—2.50;其他 3 株仍然保持第 1 代低毒力的水平。其实,10 号 2 代蚀斑病毒 (No. 10-5) 的毒力已有所提高,对小白鼠脑内毒力为 log 2.17,与 TCID<sub>50</sub> 的差距仅为 3.83。因此,可见第 10 号蚀斑病毒按其毒力,第 9 号按其蚀斑形状,具有不纯的特性。

我们抽取第 3 代蚀斑病毒 No. 9-4-2、12-1-1、12-1-7、12-1-9、10-5-3、10-5-5 和 10-5-19 株对 1—3 日龄乳鼠进行皮下感染力试验;以未稀释的地鼠肾细胞病毒材料按每只 0.03 毫升接种 5—10 只 1—3

日龄乳鼠皮下，结果每株接种组均有部分或全部死亡者。

我们又从第 9、10、12 号 3 个第 3 代蚀斑中各挑选 3 株对恒河猴进行致病性测定。所有猴子试验前的血清经中和试验证明均对乙型脑炎病毒为阴性。每只猴子脑

内于视丘部注射未经稀释的病毒原液 0.2 毫升，观察 28 天，每日测量体温；与猴体试验的同时测定同份病毒材料的小白鼠脑内毒力和地鼠肾细胞致病变效果。试验结果列于表 4。

从表 4 可见，用蚀斑法分离纯化所获

表 4 第 9、10、12 号蚀斑病毒对恒河猴的脑内致病力

蚀斑号	感染材料病毒滴度		猴号	性别	体重(千克)	感 染 后		转 归
	MICLD <sub>50</sub>	HKTCID <sub>50</sub>				体温反应(℃)	临 床 症 状	
9-4-2	<0.0	6.5	69	♂	4.2	(-)*	无 精神较兴奋,无其他症状	健存 痊愈
			70	♂	3.5	(+)41.3		
9-4-4	<0.0	6.5	71	♀	3.5	(-)	无 上下肢极轻度震颤	健存 痊愈
			72	♀	3.2	(+)41.2		
9-4-6	0.0	6.0	73	♀	3.5	(-)	无 无	健存 "
			74	♀	4.6	(-)		
12-1-1	<0.0	7.5	75	♀	3.2	(+)40.4	无 无	痊愈 "
			76	♂	2.4	(+)40.4		
12-1-7	0.15	7.0	78	♀	2.9	(+)40.3	无	"
12-1-9	<0.0	7.0	79	♂	2.9	(+)40.1	无 无	" "
			80	♀	2.4	(+)41		
10-5-3	≥3.38	≥6.5	21	♂	4.7	(-)	全身震颤 上下肢震颤	" "
			29	♂	4.7	(+)40.3		
10-5-5	≥3.33	5.5	83	♀	4.2	(-)	无 无	健存 痊愈
			84	♂	3.6	(+)40		
10-5-19	<0.0	5.5	81		3.0	(-)	无 无	健存 "
			82		2.3	(-)		

\* 无体温升高反应。

得的 9 株病毒，对猴子的脑内致病力较原地鼠肾细胞培养的 95 代病毒有更进一步的减弱，在以 log 5.5—7.5TCID<sub>50</sub> 大剂量病毒脑内感染时，不但全部被感染的 17 只猴子均未死亡，而且大部分未出现明显的神经症状，个别有症状者表现亦甚轻微；在体温反应方面，约有半数无体温升高，有体温反应者，亦不明显，一般体温高 1—2℃，持续 3—4 天后很快恢复正常。在观察时间内均未出现任何后遗症。值得注意的是，No. 10-5-3 和 No. 10-5-5 2 株病

毒对小白鼠脑内毒力已升高至 log 3.33—3.38，但对猴子的致病力仍然较低，其中尤以 No. 10-5-5 更为明显，被注射的 2 只猴子，只有 1 只体温略为升高，其余均无体温反应和其他临床症状。

四、蚀斑第 9、10、12 号 3 代纯化病毒的免疫性

为了检查进一步减弱毒力的 SA<sub>14</sub>-A 株的免疫性和抗原性，选择了经 3 代纯化的蚀斑第 9、10 和 12 号各 3 个蚀斑病毒，按前文<sup>[1]</sup>所述的方法在实验动物上进行保

表 5 第 9、10、12 号蚀斑病毒对小白鼠的免疫力及血清抗体反应

蚀斑号	免疫材料病毒滴度 (TCID <sub>50</sub> )	免 疫 力 试 验			血清中和指数	
		免疫组 LD <sub>50</sub>	对照组 LD <sub>50</sub>	保护指数	两个月血清	三个月血清
9-4-2	6.50	1.00	7.31	2,042,000	316	1,778
9-4-4	6.50	1.77	7.31	346,700	3	56
9-4-6	6.00	2.50	7.31	64,570	100	18
10-5-3	5.50	0.50	6.00	316,200	1,000	—
10-5-5	≥6.50	0.67	6.00	213,800	2,138	—
10-5-19	5.50	1.50	8.00	3,162,000	4	—
12-1-1	7.50	0.67	8.00	21,380,000	144	3,388
12-1-7	7.00	1.00	8.00	10,000,000	676	1,000
12-1-9	7.00	1.77	8.00	1,698,000	3,162	10

表 6 第 9、10、12 号蚀斑病毒不同途径免疫豚鼠后的血清抗体反应

蚀斑号	免疫材料病毒滴度 (TCID <sub>50</sub> )	免疫途径	血清中和指数	
			两个月血清	三个月血清
9-4-2	6.50	皮下 腹腔	17	18
			4,677	12,030
9-4-4	6.50	皮下 腹腔	214	331
			316	1,778
9-4-6	6.00	皮下 腹腔	10	6
			186	120
10-5-3	5.50	皮下 腹腔	214	—
			3,388	—
10-5-5	≥6.50	皮下 腹腔	316	—
			1,480	—
10-5-19	5.50	皮下 腹腔	1,000	—
			5,012	—
12-1-1	7.50	皮下 腹腔	≤32	≤100
			316	10,000
12-1-7	7.00	皮下 腹腔	457	589
			759	468
12-1-9	7.00	皮下 腹腔	100	562
			1,000	1,778

护力及中和抗体反应的测定。以 10 倍稀释的病毒一次免疫小白鼠后,经 2 周以 P<sub>3</sub> 株病毒腹腔攻毒,又以同份病毒材料注射小白鼠腹腔和豚鼠皮下或腹腔,经 2—3 月后采血,与 P<sub>3</sub> 株病毒作中和试验。获得的结果列于表 5 和表 6。

表 5 和表 6 结果表明,该 9 个株病毒对小白鼠均具有明显的免疫力作用,即保护指数由最低的 6.45 万至最高的 2138 万。对小白鼠和豚鼠仍然能产生较高的中和抗体,但有 3 组小白鼠和豚鼠皮下免疫组的抗体反应较弱。

五、蚀斑 9、10、12 号纯化病毒的毒力稳定性

为了检查减弱毒株嗜神经性的稳定性,我们选择脑内毒力低、其 LD<sub>50</sub> 与 TCID<sub>50</sub> 的差距较大的上述 7 个蚀斑毒株,经 7—9 克小白鼠脑内进行回传。试验结果表明,经回传 2—3 代后全部毒株提高了脑内毒力。

为了观察毒力回升情况,取蚀斑 No. 9-4-2, No. 12-1-1, 2 株回传不同代数病毒对小白鼠或猴子进行脑内毒力测定,结果列于表 7。

从表 7 可见,该 2 株经小白鼠脑内回传 1 代时其毒力已稍有升高,即地鼠肾细胞致病变效果与小白鼠脑内毒力的差距由原来的 log 6.50—7.50 缩小至 4.00—4.17。回传至 3 代以后则脑内毒力几乎与原强毒株相同,而且至第 10 代时 2 株均出现与原强毒株相接近的腹腔毒力。

以 12-1-1 株回传第 3、10 代病毒地鼠肾细胞培养原液脑内感染猴子各 1 只,结果,经潜伏期 5—7 天后发病,表现为严重的

表 7 第 9、12 号蚀斑病毒经小白鼠脑腔回传后的毒力稳定性

蚀斑号	回传代数	小鼠脑腔 LD <sub>50</sub>	小鼠腹腔 LD <sub>50</sub>	地鼠肾细胞 TCID <sub>50</sub>	差 距 TCID <sub>50</sub> —LD <sub>50</sub>
9-4-2	1	≤1.83	0	6.00	4.17
	3	7.17	—	6.50	-0.67
	7	8.33	≥1.00	—	—
	10	8.50	2.23	8.50	0
12-1-1	1	2.50	0	6.50	4.00
	3	6.00	—	7.00	1.00
	7	6.50	—	—	—
	10	8.50	3.23	9.00	0.50
SA <sub>14</sub> 强毒株	12	7.69	≥3.64	8.00	0.31

脑炎症状，并经 3—4 天的病程后迅速死亡。由此可见，通过蚀斑法分离和 3 代纯化所获得的减弱毒株，按其致病性(对小白鼠及恆河猴)尚不够稳定，即通过小白鼠脑内传代易恢复至原强毒株。

讨 论

我们以前<sup>[7]</sup>证明了乙型脑炎病毒在悬浮培养的鸡胚组织中连续传代后发生神经外毒力的下降。毒力变异的过程有一定的阶段性，即经过相对稳定期后毒力表现显著下降，然后其毒力又维持一定水准。另外，SA<sub>14</sub>-A 株在地鼠肾单层细胞连续传递 20 多代后不仅丧失了对小白鼠的神经外毒力，而且脑内毒力亦显著减弱<sup>[1]</sup>。现又继续将该株传递至 100 代，结果发现病毒对小白鼠脑内毒力未再进一步下降，其 LD<sub>50</sub> 对数稳定在 3.74 以下。虽然 SA<sub>14</sub>-A 株经地鼠肾细胞长期传代，自 30 代以后其小白鼠脑内毒力未再发生显著改变，但脑内接种原液病毒及其稀释 1:10—1:100 者小白鼠发病和死亡始终观察到不规则的现象。

由此考虑到经地鼠肾细胞传代后的 SA<sub>14</sub>-A 株的病毒悬液可能含有不同致病力的病毒颗粒。实验证明，SA<sub>14</sub>-A 株地鼠肾细胞第 29 代病毒颗粒的致病力不同于第 99 代；当第 29 代病毒于乳鼠腹股沟

皮下组织传代后再移种于地鼠肾细胞繁殖时，自 1—3 代很快地提高了对小白鼠脑内毒力并出现神经外毒力。可以说，第 29 代病毒经乳鼠皮下组织传递 3 代后，按其对 7—9 克小白鼠的脑内和神经外毒力来说，几乎恢复至原强毒株，但第 99 代病毒则仍然保持着较低的毒力，并且又未表现出神经外致病力。通过乳鼠皮下游传递 1—3 代后病毒毒力的改变可能是由于皮下繁殖力强的病毒颗粒的选择性繁殖而引起的。

由此可见，SA<sub>14</sub>-A 株通过长期传代(99—100 代)以后与传代初期(27—29 代)的病毒致病力比较，在质量上有进一步的改变，但是单用小白鼠测定脑内毒力则不易被显出。同时应该指出，通过乳小白鼠皮下组织繁殖和传代可使乙型脑炎特定毒株发生定向性变异。我们用这种方法已获得了减弱毒力而保持着免疫性的另一毒株，其详细结果将另报导。

以蚀斑法分离病毒不同集落和研究它们的特性，在探讨病毒变异的规律上已被普遍应用。根据我们对蚀斑的挑选和实验结果，又证明了经地鼠肾细胞传代后的 SA<sub>14</sub>-A 株的病毒悬液含有不同致病力的病毒颗粒。而且更有趣的是，致病力较低的第 9、10、12 号蚀斑株具有不同遗传特征。经过 3 代蚀斑纯化，发现第 12 号病毒

在蚀斑形状和脑内毒力方面的变化较少,而第9号病毒虽然脑内毒力变化不大但出现了个别大蚀斑。与第9号病毒相反,第10号病毒虽然始终保持着小蚀斑的形状,但在其第3代的蚀斑病毒之间脑内毒力出现很大差异,有的毒力已接近于原强毒株,有的则仍然保持着低毒力。

在 Dunayevich<sup>[5]</sup> 对西方马脑炎病毒、Rohitayodhin<sup>[8]</sup> 对乙型脑炎病毒的工作中亦曾报导过,用蚀斑法纯化传代减弱毒株的过程中再出现较强毒力的病毒。

依我们的实验结果来看,从第10号病毒繁育出来的2代和3代共13株蚀斑病毒中,虽然各株之间小白鼠脑内毒力强弱有明显差别,但其他主要特征是一致的,如小蚀斑的形成,对恆河猴的致病力明显减弱,以及高浓度病毒对地鼠肾单层细胞所引起的致病变作用不明显等。因此,可以设想,第10号株的第3代含有不同毒力的蚀斑病毒颗粒可能是在地鼠肾和鸡胚单层细胞交替传代中分化出来的,而不是原来混杂的。

如果这种设想是正确的话,可认为,乙型脑炎病毒在一定的繁殖培养条件下不是缓慢地而是很快地发生变异。考虑到这个问题,为获得期望的变异株和保持变异株特性的稳定性是很重要的,将在我们的工作中进一步研究。

9个蚀斑病毒在免疫小白鼠后对乙型脑炎强毒的攻击表现有良好的保护力,在免疫豚鼠后又可产生较高的中和抗体水

准。在我们另一试验中观察到,以 SA<sub>14</sub>-A 株蚀斑病毒免疫小白鼠后不能抵抗小鼠脑心肌炎病毒的攻击,可见,蚀斑病毒株在小白鼠表现的保护力与干扰现象关系不大。

从 SA<sub>14</sub>-A 株 100 代中应用蚀斑法分离和纯化的病毒株,无论对提前离乳的小白鼠或对恆河猴脑内接种的致病性均有极明显的减弱,其剩余毒力已变为很低,而且保持着良好的免疫性和抗原性。这些特性都是活毒疫苗毒种的重要指标。但是,这些毒株的致病力仍然表现不够稳定,经小白鼠脑内回传 2—3 代,毒力很快上升,回传 3 代以后,毒力升高接近于原强毒株。因此,我们下一步的任务是探讨减弱毒株毒力返祖的规律,以及获得致病性稳定、免疫性良好适合于制备活疫苗的毒株。

## 参 考 文 献

- [1] 俞永新、敖坚、雷文绪、李河民:微生物学报, 8: 260—269, 1962。
- [2] Sabin, A. B.: *J. A. M. A.*, 162:1589—1596, 1956.
- [3] McClain, M. E., Hackett, A. J. and Madin, S. H.: *Science*, 127:1391—1392, 1958.
- [4] Price, W. H., Lee, R. W., Gunkel, W. F. and O'Leary, W.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 10:403—422, 1961.
- [5] Dunayevich, M., Johnson, H. N. and Burleson, W.: *Virology*, 15:295—298, 1961.
- [6] Dulbecco, R. and Vogt, M.: *J. Exp. Med.*, 99:167—182, 1954.
- [7] 李河民、俞永新、季淑蓉、武佩芬:微生物学报, 8:251—259, 1962。
- [8] Rohitayodhin, S. and Hammon, W. McD.: *J. Immunol.*, 89:823—833, 1962.



## ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСА ЯПОНСКОГО ЭНЦЕФАЛИТА

### IV. ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ВИРУСА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ АТТЕНУИРОВАННОГО ВАРИАНТА SA<sub>14</sub>-A С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА БЛЯЩЕК

Ли Хэ-минь, Юй Юйнь-синь, Ао Цянь и Фан Чень

(Контрольный институт медикаментов и биопрепаратов миздрова КНР.)

Показатель вирулентности аттенуированного варианта SA<sub>14</sub>-A, последовательно культивированного в культуре почечных клеток хомяк, стабилизировался в определенном уровне после 27—100 пассажа при непосредственном титровании на белых мышках, но авторы доказали качественное различие вирулентности его 29-го и 99-го пассажа после их выращивания под кожей у сосунков-белых мышей и с помощью метода бляшек. В результате выделения и очистки данного варианта с помощью метода бляшек были получены 7 весьма аттенуированных штаммов. Внутримозговое заражение

этих штаммов в ТЦД<sub>50</sub> Log 5,5—7,5/0,2 мл почти не вызывало гибели белых мышей весом 7—9 г и только вызывало временный подъем температуры у обезьян-резусов. Однако их последовательное пасирование через мозги мышей приводилось к быстрому возвращению их вирулентности для этих животных.

Все штаммы обладали хорошей иммуногенностью и антигенностью.

В настоящей работе также рассматривались некоторые вопросы по механизму изменчивости вируса японского энцефалита.