

# 流行性乙型脑炎病毒的变异

## V. 活疫苗弱毒株的生物学特性\*

俞永新 敖坚 朱蔭耕 方珍 黄念君 刘丽华 武佩芬 李河民

(北京药品生物制品检定所, 北京)

继以前的工作, 我们选择 SA<sub>14</sub>-A 弱毒变异株中的 12-1-7 号蚀斑病毒继续进行减毒和蚀斑纯化, 获得了二株高度减毒而且毒力不易回升的弱毒株, 其中一株 5-3 株的免疫原性较好, 经人体免疫观察证明是安全有效的。5-3 株的主要生物学特性如下:

1. 在地鼠肾细胞内繁殖引起明显的细胞病变作用, 病毒滴度一般可达  $10^{-6}$ — $10^{-7}$  (TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升)。在琼脂覆盖下的鸡胚单层细胞内形成小于 0.1 厘米大小的点状蚀斑, 蚀斑内细胞未完全破坏死亡。

2. 对 3 周龄小白鼠和 2—3 公斤恒河猴脑内接种不引起发病和死亡, 脑内病理改变较原强毒株显著减轻而且局限。

3. 对 1—3 日龄乳小白鼠, 无论脑内或皮下注射均有致病力, 但致病力显著减弱, 引起乳鼠死亡的毒力 (LD<sub>50</sub>), 脑内在 3.0 对数以下, 皮下在 2.0 对数以下。

4. 对 3 周龄小白鼠皮下注射, 病毒只能在周围脏器官内轻度繁殖随即消亡, 而不能侵入脑内繁殖, 脑组织内分离不到病毒, 亦不引起病理改变。

5. 在组织培养细胞内连续传 10 代, 或在小白鼠脑内传 3—5 代, 其残余毒力无明显回升。

6. 对小白鼠皮下一次免疫后表现有较强的保护力。对豚鼠皮下免疫一次后表现有明显的中和抗体产生, 阳转率为 70—80%。

1967 年以来对 5-3 株进行了人群逐步扩大接种观察, 结果未发现活疫苗引起的发热反应和其他异常反应, 人体抗体的阳转率为 85—91%, 人群流行病学效果保护率一般为 80—90%, 证明活疫苗是安全和有较好的免疫效果。

但是 5-3 株尚存在着病毒滴度下降快, 疫苗不稳定, 需冷藏保存等缺点, 因而往往影响疫苗大面积人体使用效果, 需要进一步改进提高。

为了改进和提高乙型脑炎 (以下简称乙脑) 灭活疫苗的免疫效果, 制备乙脑活疫苗, 我们对乙脑病毒的变异和选种工作进行了一系列的研究。我们曾报告了乙脑病毒 SA<sub>14</sub> 株通过地鼠肾细胞连续传代并经过蚀斑挑选纯化而获得了三个蚀斑系病毒弱毒株<sup>[1,2]</sup>, 其中有六株蚀斑病毒对敏感动物的嗜神经性高度减弱, 如对恒河猴脑

内感染不致病, 对幼龄小白鼠仅引起个别致死。但是这些弱毒株在地鼠肾细胞或小白鼠脑内连传三代时则几乎完全恢复其对小白鼠和恒河猴的脑内致病力。因此用于制备乙脑活疫苗尚不够安全。

\* 本文有关人体观察工作承福建、山东省和济南市卫生防疫站协助, 特此致谢。

本文 1972 年 12 月 26 日收到。

由于活疫苗一般较灭活疫苗的免疫效果好而且免疫持久性长, 国外对乙脑活疫苗的研究工作近几年来也在加紧进行中。哈蒙(Hammon)等<sup>[3,4]</sup>选出一株对小白鼠和恒河猴嗜神经性减弱的OCT-541, 35-24系4-5-28株蚀斑病毒, 经少量人体观察, 免疫性很差而放弃, 1969年<sup>[5]</sup>又选出一株对小白鼠脑内毒力更弱的T-11株, 但未上人。伊诺(Inoue)<sup>[6]</sup>曾选出一株对小白鼠和恒河猴脑内感染毒力减弱的m株, 但毒力很容易回升。最近, 伊林科(Ilyenko)<sup>[7]</sup>将日本的m弱毒株进一步纯化后获得mpk/L株, 该株对小白鼠的神经外途径感染虽不致病, 但对其脑内毒力未减, 而且对恒河猴亦保留一定的残余毒力, 如以大剂量病毒脑内接种时能引起猴子发病死亡, 该弱毒株所制备的活疫苗虽经528名20—50岁健康者接种观察未发现不良反应, 但免疫原性方面注射一针者抗体阳转率仅为53%, 注射二针时才达80—90%。此外, 普赖斯(Price)等<sup>[8]</sup>最近选出一株对猴子脑内和脊髓腔内接种不致病而且免疫性良好的A-TC<sub>40</sub>减弱株。纳卡穆拉(Nakamura)<sup>[9]</sup>选出一株对幼龄小猪皮下感染不致病并能产生良好抗体的AT<sub>31</sub>-HK传代株。但这些弱毒株对小白鼠的脑内毒力仍然较强, 并未在人体上观察和应用。

我们考虑到乙脑病毒在人体引起的疾病是严重的, 往往造成死亡和残废, 因此对该活疫苗毒种的要求尤其要严格。为此, 我们对以前获得的减弱株又作进一步减毒, 通过反复多次传代和蚀斑纯化, 终于获得了毒力进一步减弱而稳定的二个弱毒株, 其毒力和稳定性均比国外已报道的弱毒株低和强, 其中一株的免疫原性比较

良好, 经40多万人体接种观察, 证明疫苗是安全有效的。本文报告二个弱毒株的生物学特性和人群免疫结果。

## 材料和方法

**毒株筛选** 选择前文<sup>[12]</sup>中的弱毒株12-1-7蚀斑病毒作为进一步减毒用毒株, 按前文所述蚀斑法挑选孤立的单个病毒蚀斑进行多次纯化, 选出一株蚀斑病毒定名为9-7株, 9-7株又经传代后挑选得到5-3株。该两株病毒与乙型脑炎病毒强毒P<sub>3</sub>株的豚鼠高价免疫血清在地鼠肾细胞管内进行病毒特异性中和试验, 证明是流行性乙型脑炎病毒。

**毒力滴定** 除单独注明者外, 一般采用24—3周龄小白鼠脑内或皮下测定毒力(LD<sub>50</sub>), 脑内接种0.03毫升, 皮下接种0.1毫升, 同时用地鼠肾单层细胞作病毒量测定, 病毒滴度均以TCID<sub>50</sub>/0.2毫升计算。

其他方法均按以前报告两文<sup>[1,12]</sup>所述方法进行。

## 试验与结果

### 一、对小白鼠及恒河猴的毒力

1. 对不同日龄小白鼠的毒力: 选择不同日龄的小白鼠, 脑内接种未稀释的病毒原液, 观察弱毒株对小白鼠脑内毒力, 另选1—3日龄乳鼠, 脑内和皮下接种不同稀释度病毒, 测定其脑内和皮下的毒力(LD<sub>50</sub>)。

从表1结果可见, 5-3株和9-7株除对1—3日龄乳鼠有致病力外, 对二周以上各年龄组小鼠脑内接种均不致死。

表1 5-3株与9-7株对不同日龄小白鼠的致病力

毒株	病毒滴度 (TCID <sub>50</sub> /0.2毫升)	1—3天乳鼠		14—16天	17—19天	21—22天	28—30天
		(脑内)	(皮下)	(脑内)	(脑内)	(脑内)	(脑内)
5-3	7.0	2.50*	1.67**	0/10	0/10	0/10	—
9-7	6.0	3.78	1.00	0/10	0/10	0/10	0/10

\* log LD<sub>50</sub>/0.02 毫升; \*\* log LD<sub>50</sub>/0.03 毫升。

表中分母为接种小鼠数, 分子为死亡数。

2. 对恒河猴的脑内致病力: 为了进一步观察弱毒株对恒河猴的脑内毒力, 选择对乙脑病毒中和抗体阴性的 2—3 公斤重恒河猴, 于脑内视丘部位注射病毒原液或其 10 倍稀释液 0.2 毫升, 每日观察其活动状态并测量体温。以 9-7 株感染 24 只猴子, 其中 8 只猴子分别于第 6、9、11、13、15、17、19、21 天进行解剖, 其余 16 只猴子观察至 28 天时活杀解剖。所有这些猴子在观察期间均未发现神经症状或死亡, 仅 7 只猴有体温升高反应 ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ )。以 5-3 株感染 14 只恒河猴, 观察 28 天, 则未发现任何临床反应。说明 5-3 株和 9-7 株对恒河猴的脑内致病力仍然显著减弱。

3. 对小白鼠及恒河猴的脑脊髓病理观察: 以 SA<sub>14</sub> 强毒株及其变异株 9-7 和 5-3 株, 分别脑内注射 17—19 日龄小白鼠, 每组 30 只, 不同日期解剖, 每次同株至少 3 只, 取脑(部分鼠加取脊髓)作病理检查。结果指出, 强毒株小鼠的病变表现为弥散性脑脊髓炎, 从神经细胞坏死程度看, 大部分小鼠以海马角为重, 大脑皮层次之, 病变等级<sup>[10]</sup>达 3.5—4.0。减毒株小鼠各部位的病变普遍减轻, 神经细胞坏死常局限于海马角, 仅个别小鼠大脑皮层神经细胞可表现不

同程度的坏死, 病变等级为 1.0—2.0 左右。同时, 神经细胞坏死的开始时间较晚, 强毒株在第三天, 弱毒株在第 6 天左右(图 1)。

恒河猴经脑内感染乙脑强毒后, 中枢神经系统的病变亦为弥散性脑脊髓炎, 但其中以腰髓、颈髓、黑质和丘脑四个部位最为严重。随着病毒毒力的逐渐减弱, 各部位的病变亦相应减轻, 但仍以这四个部位为主。脊髓的病变稍晚于脑, 一旦出现又重于脑。强毒的脊髓前角神经细胞常常成群的广泛性坏死, 弱毒株的脊髓则以炎症反

表 2 9-7 株与 SA<sub>14</sub> 强毒株对恒河猴的病理学区别

观察项目	毒 株	
	SA <sub>14</sub> 强毒株	9-7 减毒株
1. 病变率	100%	37.5%
2. 病变过程	第五天脑出现病变, 第 6 天脊髓前角的神经细胞严重坏死, 直至死亡。	二周左右脑有病变, 3—4 周脊髓出现病变。
3. 病变分布	弥散, 但以脊髓、黑质、丘脑为重。	局限, 尤以脊髓、黑质、丘脑为主。
4. 神经细胞坏死	明显, 尤以脊髓前角为著。	显著减轻, 如有亦是个别现象。
5. 炎症反应	以胶质细胞反应为著, 各处弥漫增生, 血管套管浸润的细胞数仅有少数几层。	血管反应较重, 有些套管浸润的细胞数可厚达 5—6 层以至更多, 胶质细胞常限于一定部位增生。

应为主, 如有神经细胞坏死, 亦是个别的。有关强毒株与 9-7 株对恒河猴脑脊髓病变的主要差别列于表 2。

二、病毒对小白鼠的入脑侵袭力

为了观察 5-3 株和 9-7 株皮下感染小白鼠后, 病毒能否侵入脑内进行繁殖, 选择 2.5—3 周龄小鼠, 皮下接种病毒原液 0.1 毫升, 为使动物更加敏感, 在试验时于注射病毒前脑内注射 2—5% 可溶性淀粉或肌肉注射 1.5 毫克氢化可的松致敏, 接种病毒后间日解剖至第 20 天, 取脑作病理学检查或以地鼠肾细胞进行病毒分离, 或同时取半个脑做病毒分离, 另半个脑作病理学检查。

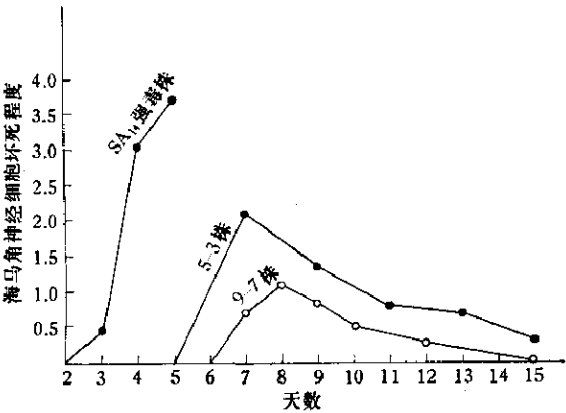


图 1 弱毒株与强毒株对小白鼠的脑内病变程度

5-3 株 TCID<sub>50</sub> 5.5  
9-7 株 TCID<sub>50</sub> 6.0  
SA<sub>14</sub> 强毒株 TCID<sub>50</sub> 6.0

结果以 SA<sub>14</sub> 强毒株皮下感染小白鼠后,病毒迅速侵入脑内繁殖,病毒滴度可达 6.5 对数以上,而弱毒株从致敏或不致敏小白鼠脑组织均未能分离到病毒,也未引起脑组织病理改变。

为了进一步观察弱毒株对 3 周龄以下不同日龄乳鼠神经外途径感染的敏感性,选 5—7 日、10—12 日龄乳鼠,16—18 日龄提前断乳鼠,皮下感染 5-3 株病毒原液,同时脑内作空针刺刺激致敏,于接种后 6—20 天内定期解剖,取脑作病理检查,根据病变出现数进行统计,结果列于表 3。

表 3 5-3 株对不同日龄小鼠的入脑病理检查

病毒滴度	组 别	脑病变出现率
7.0	1—3 日龄	小鼠全部发病死亡
8.0	5—7 日龄	16/21
	10—12 日龄	5/21
	16—18 日龄	0/21
6.0	21—23 日龄	0/21

注：分母表示接种小鼠数，分子表示脑出现病变小鼠数。

结果表明,5-3 株对 3 周龄小白鼠皮下感染后病毒不能侵入脑内,但当小鼠日龄降低到 2 周以下时,弱毒病毒则能入脑,

日龄愈小,愈易入脑,对刚出生的 1—3 日龄乳鼠则全部入脑致死。

三、残余毒力稳定性试验

为了解新选弱毒株的毒力稳定性,将 5-3 和 9-7 株先在组织培养细胞内连传 4—5 代和 10 代,分别以此二代病毒原液脑内接种 2.5—3 周龄小白鼠 10 只,于接种后第 5、7 两天,各解剖 3 只鼠脑,混合传下一代。另以病毒原液脑内注射 1—3 日龄乳鼠 1—2 窝,经 7—8 天潜伏期后,取典型发病乳鼠 3 只,解剖取脑,混合制成 10<sup>-1</sup>病

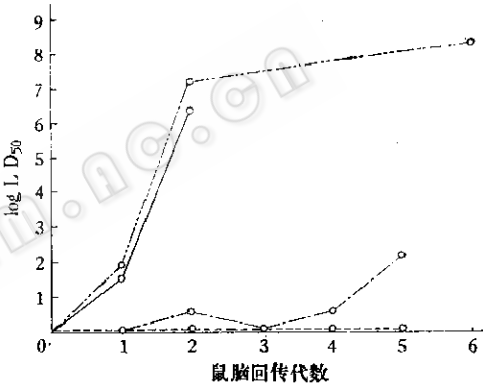


图 2 不同弱毒株鼠脑回传后毒力(LD<sub>50</sub>)

- 9-4-2 株
- 12-1-7 株
- 5-3 株
- 9-7 株

表 4 5-3 和 9-7 株对小白鼠脑内回传后毒力变化

毒株	乳鼠脑一代后对 3周鼠脑内毒力			三周鼠脑回传不同代数后毒力												
	细胞代数	T	L	细胞代数	0		1		2		3		4		5	
					T	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L
5-3	HK <sub>4</sub>	>4.5	0	HK <sub>5</sub>	5.0	0	5.5	0	4.0	0.62	4.75	0	6.5	0.58	6.5	2.21
	HK <sub>10</sub>	7.0	0	HK <sub>10</sub>	5.0	0	5.0	0	5.0	0	6.5	0	6.5	0.70	5.5	2.75
9-7	HK <sub>5</sub>	>7.5	0	HK <sub>5</sub> CE <sub>2</sub>	6.0	0	4.0	0	4.0	0	5.0	0	4.0	0	4.5	0
	HK <sub>10</sub>	8.5	0.75	HK <sub>10</sub>	7.0 —	0 0*	6.0 6.5	0 <1.0	≥6.0 —	0 <1.0	2.5 —	0 1.0	<2.0 —	0 3.17	<2.0 —	0 —

\* 另一次试验结果。  
L 表示 LD<sub>50</sub>/0.03 毫升； T 表示 TCID<sub>50</sub>/0.2 毫升； HK<sub>5</sub>CE<sub>2</sub> 表示地鼠肾细胞 3 代,鸡胚细胞 2 代。

表 5 5-3 和 9-7 株在小白鼠体内的繁殖动态

毒 株	病毒滴度	处 理 方 法	分离材料	不 同 时 间 (天) 病 毒 滴 度							
				1	2	3	4—5	6	7	10	14—15
5-3	6.0	未	脾脏 脑	— —	2.0 —	— —	2.0 0	0 0	— —	— 0	— —
		脑内注射 2% 可溶性淀粉	脾脏 脑	— —	1.5 —	— —	1.5 0	0 0	— —	— 0	— —
		脑内注射 5% 可溶性淀粉	脾脏 皮下组织 脑	1.5 ≥2.5 —	0 0 0	0 0 0	— — —	— — —	— — 0	— — 0	— — 0
SA <sub>14</sub> 强毒株	6.0	未	脾脏	1.5	—	—	1.5	—	≥3.5	≥2.5	0
			皮下组织	0	—	—	2.0	—	≥3.5	0	0
			脑	0	—	—	≥5.5	—	≥6.5	6.5	0

毒液，以 3 周龄小鼠作脑内毒力测定。结果列于表 4 和图 2。

表 4 结果表明，在组织培养细胞内传 4—5 代或 10 代的 5-3 株和 9-7 株，经 3 周龄鼠脑内连续传 3 代时，对小白鼠脑内毒力(LD<sub>50</sub>)无明显变化，传 4—5 代时，毒力略有升高，但未回到原强毒株的程度。经最敏感的 1—3 日龄乳鼠脑内传一代后，其毒力也未升高，说明 5-3 和 9-7 株的残余毒力是比较稳定的，不易回升，与其前身 12-1-7 株和未稳定的 9-4-2 株比较有明显的差别(图 2)。

四、在小白鼠体内的繁殖动态

以 5-3 和 9-7 株皮下感染 2.5—3 周龄小白鼠后，不同时间解剖，取皮下组织和脾脏，以地鼠肾细胞作病毒分离和病毒量测定。

表 5 结果表明，乙脑强毒株皮下感染小白鼠后，病毒在体内繁殖良好，病毒滴度高达 3.5 对数以上，而且维持时间长达 10 天，而弱毒株在体内的繁殖力降低，病毒滴度低，维持时间短暂随即消失，其中以 9-7 株的繁殖力似乎更差些。

五、免疫原性试验

为了检查弱毒株的免疫原性，采用以

下二种方法：

1. 小白鼠保护力试验：以不同稀释度病毒皮下免疫 7—9 克小白鼠，每稀释度 10 只，每只 0.1 毫升，14 天后以乙型脑炎强毒 A<sub>1</sub> 株的 10<sup>-5</sup> 稀释病毒液腹腔攻击，每只 0.3 毫升，同时脑腔注射稀释液刺激。试验结果列于表 6。

表 6 5-3 和 9-7 株对小白鼠的保护力试验

毒 株	病毒滴度	50%最小有效免疫量 (ID <sub>50</sub> )	攻击毒力	
			10 <sup>-5</sup> 死亡数	腹腔 LD <sub>50</sub> /0.3 毫升
5-3*	>4.5	<0.000045	9/10	9.00
	>4.0	0.000051	10/10	8.34
	>4.0	0.000038	10/10	8.78
9-7	6.5	0.00016	9/10	9.00
	7.5	0.00023	5/6	8.17

\* 重复试验时病毒滴度在 6.0—6.5 者疫苗的 ID<sub>50</sub> 与表中结果基本一致。

2. 豚鼠抗体测定：以 10<sup>-1</sup> 病毒液皮下一次免疫 180—200 克豚鼠，每只 0.5 毫升，免疫后不同时间采血分离血清，按血清定量病毒变量法测定中和抗体，血清于试验前先经 56℃ 加温 30 分钟灭活，病毒血清混合液在 37℃ 作用一小时后脑内注射小白鼠。结果列于表 7。

表 7 5-3 和 9-7 株豚鼠免疫血清中和抗体测定

毒 株	病 毒 滴 度	豚鼠号	不同时间(月)中和指数			
			1	2	3	7
5-3HK <sub>1</sub>	>4.0	1	13	316	316	10
		2	36	≥676	≥1000	1318
		3	21	≥676	≥1000	≥3162
		4	13	457	—	—
5-3HK <sub>2</sub>	>4.0	1	67	145	21	—
		2	68	40	68	—
		3	21	100	214	—
		4	—	162	162	—
9-7HK <sub>1</sub>	6.5	1	32	10	19	—
		2	15	19	47	—
		3	19	15	68	—
		4	10	47	15	—
		5	32	100	19	—

从以上二种动物的免疫结果看，5-3 株和 9-7 株均具有一定的免疫性，其中以 5-3 株的免疫性较好。

综合以上动物试验结果，5-3 和 9-7 株对敏感动物小白鼠或恒河猴以敏感途径直接注入病毒，动物不表现病状和死亡，脑和脊髓的病理改变也显著减轻而且局限。当以大剂量病毒皮下感染时，无论是致敏或不致敏动物，病毒只能在体内神经外脏器官轻度繁殖，随即消亡，而未能侵入脑内。通过细胞连续传代和小鼠脑内连续传代，该二弱毒株的嗜神经毒力均未明显增强。因此 5-3 和 9-7 株是高度减弱而稳定的弱毒变异株，用作活疫苗毒株对人体是安全的。

六、人体反应和效果观察

在取得上述安全性和免疫性的试验数据后，我们仍持慎重和对人民负责的态度，首先在我们试验室工作人员身上注射，然后给成年人注射，以后再对适龄儿童（3—15 岁）进行逐步扩大接种观察，当以 9-7 株活疫苗进行小量人体观察时，虽然未发生任何临床反应，但是抗体反应很差，41

名儿童中只有 1 名抗体阳转，7 名由阴性转为可疑结果。因此我们放弃 9-7 株，选用 5-3 株继续进行观察。

1. 疫苗的反应观察

（1）重点观察：选择 3—15 岁儿童，接种前先检查身体健康情况和测量体温，对身体健康状况良好者于上臂三角肌附着处皮下注射疫苗 0.2 毫升，注射后每日测体温一次并检查身体健康状况，连续 14 天。同时选择一部分同年龄儿童同样进行测体温和观察。现将五次观察结果列于表 8。

表 8 5-3 株人体反应观察结果

观察次数	时间(年)	地 点	儿童年龄(岁)	人 数	观 察 结 果
1	1967	福建莆田县	3—10	250	未发现发热反应和其他特异反应
2	1967	济南市	3—7	50	”
3	1970	济南市	4—10	77	”
4	1970	济南市	4—10	113	”
5	1970	济南历城县	4—10	106	”

各次所用疫苗病毒滴度 TCID<sub>50</sub> 为 5.5—7.5/0.2 毫升。

（2）一般观察：接种后每日或隔数日进行巡回访视观察连续 14 天，1970 年在济南市观察 1756 名儿童，发现注射后发生皮疹，皮肤搔痒等反应者 4 例，同年在济南市历城县观察 20514 名儿童，发现 2 例同样反应，除此以外未发现与疫苗有关的发热或其他异常反应。1971—1972 年我们与有关生物制品研究所和防疫站共同协作，在全国四个省六个县接种弱毒株制备的活疫苗 40 万名儿童并进行了反应观察，结果也未发现与疫苗有关的发烧或其他特殊反应。

总之，通过 40 多万名儿童的多次反复观察，说明 5-3 弱毒株制备的活疫苗是安

表9 5-3株人体血清学观察结果

血清号	儿童年龄(岁)	免疫前中和指数	免疫后一个月的中和指数	血清号	儿童年龄(岁)	免疫前中和指数	免疫后二个月的中和指数
9	6	32	$\geq 10,000$	1	6	21	1,000
12	6	7	3,162	2	6	5	10
13	6	0	4,677	3	6	5	3,162
14	6	5	1,000	4	6	3	3,162
16	6	1	6,671	7	6	0	512
22	5	1	537	19	6	21	1,698
23	5	10	1,000	21	5	5	4,571
24	5	31	10,000	29	5	3	2,138
25	5	18	10,000	41	8	2	2,138
27	5	0	21	42	7	10	3,162
32	5	3	214	43	7	0	68
35	5	5	1,349	46	8	4	21
36	5	10	3,162	55	8	21	2,138
37	5	15	3,550	56	8	0	676
—	—	—	—	59	8	2	5

全的。

## 2. 疫苗的效果观察

(1) 血清抗体测定: 1970年3—5月, 乙脑流行季节前, 在山东济南市采取免疫前和免疫后1—2月的双份儿童血清29份, 经中和试验检查免前抗体阴性和可疑的29份血清中免疫后1—2个月抗体水平增长转为阳性者25份, 阳转率为86.2%(表9)。

同年全国活疫苗协作组对浙江和江西地区的免疫儿童进行检查结果, 免疫后的抗体增长率分别为85%和91.7%(免疫前抗体为阴性和可疑的儿童), 试验结果基本一致, 即活疫苗免疫后抗体水平的增长率达85—90%之间。

(2) 流行病学效果观察: 1970年在济南历城县三个公社接种20,514名4—14岁儿童, 通过1970年的乙脑流行季节, 这些儿童均未发病, 而在同一注射村3,300名未接种疫苗的同年龄组儿童中则发生一例乙脑病人, 周围村及注射村非观察年龄组人群中亦发生10例乙脑病例, 这些病人均经济南市传染病医院确诊为流行性乙型脑

炎, 因此初步看出疫苗是有效的。1971年全国乙脑活疫苗协作组在全国四个省六个县进行了40万名儿童的流行病学效果观察结果, 疫苗的人群保护率一般为80%, 高者达93%, 低者为64%。进一步证明活疫苗在人群免疫后的效果。

## 讨 论

近年来, 国外对虫媒病毒毒力变异和选育弱毒株的研究工作取得了一定进展。然而, 弱毒株残余毒力较强, 免疫原性差以及毒力不够稳定容易回升等, 这是影响活疫苗成功地应用于人体的几个主要问题。这些问题在我们的研究工作中得到了逐步地解决。我们曾报告了乙脑病毒SA<sub>14</sub>株毒力减弱的经过<sup>[1,2]</sup>, 本文我们报告了克服毒力回升和提高免疫性之后获得了一株毒力高度减弱而且稳定, 免疫原性较好的弱毒株, 并且开始应用于活疫苗的试制。

从SA<sub>14</sub>-A变异株地鼠肾细胞100代病毒液中分离出三个嗜神经性很弱的蚀斑病毒<sup>[2]</sup>, 其中, 第10号斑病毒在继续纯化过程中又出现毒力增强的病毒颗粒, 另二

个蚀斑病毒(第 9, 12 号)虽然在纯化过程中早期细胞传代时未表现毒力明显增强, 但经小白鼠脑内回传后毒力迅速回升, 说明其遗传性是不稳定的。

为获得稳定性良好的毒株, 我们选 12-1-7 号蚀斑病毒继续进行减毒筛选, 从 125 个蚀斑病毒中选出二个比较稳定的弱毒株。在筛选过程中, 将对小白鼠脑内不致病的蚀斑病毒, 全部经小白鼠脑内进行回传试验, 结果, 绝大多数蚀斑一经鼠脑传一代毒力即迅速回升, 这样的蚀斑病毒往往在地鼠肾细胞内继续传 3—5 代后, 不必要通过鼠脑回传即可表现出对小鼠脑内毒力回升现象。在筛选后期, 出现个别蚀斑病毒在鼠脑传代后毒力升高较为缓慢, 通过进一步的筛选获得了在鼠脑内传 4—5 代, 或细胞内传 10 代后其残余毒力基本上保持稳定的 9-7 株。由于 9-7 株的免疫原性较差, 又经处理后选出 5-3 株。5-3 株的毒力和稳定性与 9-7 株基本相似, 但其免疫原性较 9-7 株显著提高, 因而用 5-3 株进行了人体观察。但是我们认为, 毒力的稳定性也只能是相对的而不是绝对的, 而且是有一定条件的。因此在疫苗的生产过程中, 毒种的保存和传代仍然应该注意恒定和减少传代次数。

5-3 株对 3 周龄小白鼠皮下注射, 病毒不能入脑, 但是随着鼠龄的降低, 病毒对 2.5 周以下哺乳期小鼠的入脑能力有所提高, 日龄愈小, 愈易入脑。考虑到 5-3 株这一致病因素, 人体接种对象应该选择哺乳期以后或更大一些的儿童, 目前暂规定二周岁以上儿童为接种对象, 至于二周岁以下儿童的接种是否安全尚待进一步观察。

5-3 株的免疫原性往往与病毒量、病毒的新鲜程度以及病毒培养液成份和保护剂有关。所制备的活疫苗还与保存、运输和使用过程中的冷藏状况有关。如前所

述, 疫苗的流行病学效果个别地区仅为 64%, 其原因经我们将现场使用的疫苗冷藏带回作病毒量测定, 发现疫苗内病毒量 ( $TCID_{50}$ ) 小于 2.0, 说明与疫苗滴度下降、病毒量过低有关。因此在制备和使用活疫苗过程中应掌握好必要的条件。

5-3 株乙脑活疫苗通过 40 多万名儿童的接种观察, 证明是安全和有较好的免疫效果, 为乙脑疾病的预防开辟了新的前景。乙脑灭活疫苗过去使用过鼠脑疫苗, 其免疫效果虽然较好, 但是反应大, 如发生变态反应性脑脊髓炎。目前使用的组织培养灭活疫苗, 虽然也有一定的免疫效果, 但注射次数多, 注射量较大而活疫苗只注射一次, 注射量小, 反应轻, 因而为广大群众所欢迎。然而活疫苗亦存在一定的缺点, 如疫苗内病毒滴度下降快, 疫苗保存时间短, 保存和运输需要冷藏。这些缺点对疫苗在广大农村的使用效果影响较大, 需要进一步的改进和提高。

## 参 考 资 料

- [1] 俞永新、敖坚、雷文绪、李河民: 微生物学报, 8: 260—269, 1962。
- [2] 李河民、俞永新、敖坚、方珍: 微生物学报, 12: 41—49, 1966。
- [3] Hammon, W. McD., Rohitayodhin, S. and Rhim, J. S.: *J. Immunol.*, 91(3):295—305, 1963.
- [4] Hammon, W. McD. et al.: *J. Immunol.*, 96(3):518—524, 1966.
- [5] French, G. R. and Hammon, W. McD.: *J. Immunol.*, 103(6):1260—1269, 1969.
- [6] Inoue, Y. K.: *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 30: 181, 1964.
- [7] Ilyenko, V. I. et al.: *Amer. J. Epid.*, 95(2):148—156, 1972.
- [8] Price, W. H. et al.: *Immunization for Japanese Encephalitis*, p. 205—211, W. McD. Hammon 氏等主编, 日本出版, 1971 年。
- [9] Nakamura, H.: *Immunization for Japanese Encephalitis*, p. 212—224, W. McD. Hammon 氏等主编, 日本出版, 1971 年。
- [10] 朱荫耕、李河民、臧旭: 中华病理学杂志, 10(2): 113—116, 1966。



## STUDIES ON THE VARIATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

### V. THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF AN ATTENUATED LIVE-VACCINE VIRUS STRAIN

YU Y. S., AO G., CHU Y. G., FONG T., HUANG N. J.,

LIU L. H., WU P. F. AND LI H. M.

(Peking Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Peking)

On the basis of our previous works, by a series of further procedures of attenuation and plaque-purification with the plaque-virus (No. 12-1-7) of the low-virulent variant SA-14-A (JBE), we have obtained two highly attenuated and stable mutants.

Among them, the immunogenicity of the mutant 5-3 has been proved to be more satisfactory in field observations. The main biological characteristics of this mutant are hereby summarized as following.

1. Through multiplication in the primary hamster kidney (HK) cells, the mutant 5-3 produced obvious cytopathogenic effect (CPE), and usually a virus titer of  $10^{-6}$ — $10^{-7}$  per 0.2ml was reached.

2. Under the agar overlay, a kind of pin-head-like plaques was formed in chick fibroblast cells by the "5-3", and the cells within such plaques were not completely destroyed.

3. By intracerebral route of inoculation, "5-3" was incapable of causing disease or death both in mice (3 weeks old) and M. rhesus (2—3 Kgs.), and its pathologic changes in brain appeared to be markedly attenuated and more localized as compared with that of its parental virus SA<sub>14</sub>.

4. 1-3-day-old suckling mice were susceptible to "5-3" by both the intracerebral and subcutaneous routes, but its pathogenicity was evidently reduced.

5. When "5-3" was inoculated subcutaneously into mice three weeks old, the virus multiplied slightly and disappeared fastly in the extra-neural tissues. Since from the brains of the inoculated mice no virus had been found either, "5-3" could be logically considered to be incapable of invading the brain-barrier.

6. After continuous subpassaging of "5-3", involving 10 passages in tissue cell cultures, or 3—5 passages in brain of mice, no reversion to virulence was observed.

7. A stronger protection was conferred on

mice when immunized by a single subcutaneous injection with "5-3". Moreover, when guinea-pigs were immunized by the same way, obvious virus-neutralizing (V-N) antibodies were produced in them with a positive sero-conversion rate of 70—80 per cent.

After we had procured the above-mentioned laboratory data, the projects of field observations were then started and gradually extended step by step. Since 1967 to 1970, five small groups of children had been inoculated for observation of reactions. No rise of temperature or any other abnormal reactions due to the trial vaccination of "5-3" were found.

Through the co-operation of related institutes, an enlarged plan of vaccinating 400,000 children was then carried out for further observations. Because no untoward reaction was recorded, "5-3" is regarded to be safe for human use.

As for the examination of serological samples from the vaccinated children, a positive sero-conversion rate of 85—91% was estimated. Besides, the epidemiological effectivity of the different groups of the vaccinated children was generally illustrated by the protection rate of 80—93% (with exception of an individual group: 64%).

Reviewing the control data in susceptible animals and the epidemiological results in field observations, "5-3" is evaluated to be safe for producing a live JBE vaccine and to be able to give the vaccine a better immunogenicity.

However, the unstability of the virus titer in this live vaccine so far has been the main factor to influence the immunizing effect in large scale vaccination campaign, therefore we should design to start certain investigations for selecting a more suitable stabilizer. And especially we should endeavor to carry out further research for promoting the immunogenicity and thermostability of the mutant virus 5-3 as a fundamental problem.