

流行性乙型脑炎减毒活疫苗的研究

I. 2-8 株的来源及其生物学性质

中国医学科学院流行病防治研究所脑炎组

(北 京)

1. 利用紫外线处理 SA₁₄12-1-7 株, 获得对乳鼠脑内和皮下不致死的乙脑高度减毒株 3—7 株。

2. 将 3—7 株在乳鼠皮下传代, 提高了其皮下繁殖力, 同时也提高了其免疫力, 而没有相应地显著提高其毒力, 同时获得 2-8-3-4 株 (简称 2-8 株)。

3. 2-8 株乳鼠脑内注射死亡率为 75%; 皮下注射死亡率为 50%; 3 周鼠脑内注射基本不引起死亡; 恒河猴脑内注射不引起发病和死亡; 小白鼠皮下注射病毒, 脑内空针刺激或皮质素致敏, 病毒也不入脑; 经乳鼠脑内盲传 1 代, 毒力稍回升, 但回升最高的 TCID₅₀/LD₅₀ 对数的差数仍为 4.30。

4. 2-8 株皮下 1 次免疫小白鼠, 保护力为 7.0 对数以上; 对豚鼠、地鼠、小白鼠、小鸡、小鸭、兔皮下和猴脑内 1 次免疫, 皆能引起良好的中和抗体反应; 豚鼠 1 次免疫中和抗体可维持 8 个月以上。

流行性乙型脑炎 (简称乙脑) 是严重威胁儿童健康的一种急性传染病, 如何预防是急待解决的。

乙脑减毒活疫苗有可能成为预防本病的重要措施。近年来, 国内外已取得较大的进展, 但尚未得到较为满意的减毒株。

在国外, Hammon 等^[1]用选出的 OCT-541 的减毒株脑内注射 17 只小白鼠有 7 只死亡; 脑内注射 4 只猴子, 有 2 只得脑炎, 1 只死亡。用该株免疫了 24 人, 无不良反应, 其中只有 1 人中和抗体阳转, 最后因免疫性差而放弃。Inoue 等^[2,3]的 Mukai 株对小白鼠脑内毒力高达 3.0 (对数); 脑内注射 6 只猴, 只有 1 只出现肢体麻痹。用该株免疫了 76 人, 无不良反应。Ilyenko 等^[4]进一步纯化了 Mukai 株, 获得 MPK/L 株。该株的小白鼠脑内毒力与原株一样, 脑内注射 10 只猴, 8 只得脑炎, 7 只死亡。用

该株免疫了 528 人, 未发现不良反应, 1 次免疫中和抗体阳转率为 53%, 2 次免疫阳转率才达 80—90%。

在我国, 俞永新^[5]等选出了乙脑减毒株 5-3 株, 对小白鼠和猴脑内注射都已丧失毒力, 经 40 万人群试用, 未发现不良反应。在乙脑流行区儿童接种后中和抗体阳转率为 85—90%; 保护率为 80—90%。

本文报告的乙脑减毒株 2-8 株, 系用 SA₁₄12-1-7 (简称 12·1·7) 株^[6]经紫外线进一步减毒, 再经动物皮下传代提高皮下繁殖力后获得。该株对乳鼠 (2—3 日龄) 脑内和皮下注射仍保持较低的毒力。对多种动物皆能引起良好的免疫反应。豚鼠皮下 1 次免疫, 中和抗体可维持 8 个月或更长。因此, 2-8 株是值得制备活疫苗先在马群

本文 1974 年 5 月 16 日收到。

后在人体进一步观察的。本文着重报告该毒株的来源及其生物学性质。

材料与方 法

一、病毒

乙脑减毒株: SA_{1,12·1·7} 株^[6]; 乙脑强毒株: 京卫研, 株 (简称 A₂ 株)^[7]。

二、蚀斑方法 详见[8]。

三、挑斑选种法

将弯头毛细吸管插入蚀斑所在区域, 吸出其内容物, 将它溶解在 0.5% 的水解乳白蛋白 Hanks 缓冲盐溶液中 (0.5% LH.)。用此材料接种地鼠肾细胞, 37℃ 培养, 待出现病变时即可收获。

四、细胞制备及病毒培养

用金黄地鼠肾, 经 0.2% 胰酶消化法制备单层细胞。用含 10% 乳牛血清的 0.5% LH 液为生长液, 37℃ 培养, 待细胞成片后, 将液体倾掉, 用 Hanks 液洗两次, 然后加入含有 100—1000 TCID₅₀ 病毒量的 0.5% LH 液, pH 7.8, 放 37℃ 培养, 待出现病变时即可收获。

五、毒力测定

皮下毒力测定 病毒接种乳鼠 (2—3 日龄) 和 3 周鼠皮下, 接种量分别为 0.02 毫升/只, 0.03 毫升/只, 观察其死亡率, 共 21 天。

脑内毒力测定 病毒接种各种动物脑内, 每只接种量为: 乳鼠 (2—3 日龄) 0.02 毫升; 3 周鼠 0.03 毫升; 猴 0.2 毫升。乳鼠观察死亡率, 3 周鼠计算其 LD₅₀^[9], 同时在地鼠肾细胞滴定原病毒的 TCID₅₀^[9], 以两者的比值 (TCID₅₀/LD₅₀) 代表其毒力 (以下均用对数表示), 比值越大毒力越弱。猴主要观察体温, 症状及死亡情况。

保护力试验 用 7—9 克小白鼠皮下注射浓病毒每只 0.1 毫升, 免疫后两周, 用强毒 A₂ 株不同稀释度 0.3 毫升进行腹腔攻击, 同时脑内空针刺刺激, 观察 14 天, 按 Reed 和 Muench 法计算 LD₅₀ 及保护指数^[9]。

中和抗体测定 鼠脑中和试验法。

结 果

一、紫外线处理 12·1·7 株获得对乳

鼠脑内不致死的 3—7 株。

紫外灯管为上海华德牌 2537 Å 15 瓦, 距离 25 厘米, 功率为 8 毫瓦/毫米³。

照射时, 将 SA_{1,12·1·7} 株病毒用 0.5% LH 液作 1:5 稀释, 调 pH 7.6—7.8, 将病毒放在直径 7.5 厘米的平皿内, 距紫外灯管为 22 厘米, 紫外线处理前后不同时间收集标本, 接种鸡胚单层纤维母细胞作蚀斑, 在感染后第 5 天进行挑斑, 选出的斑在地鼠肾细胞增殖, 待出现病变时收获, 测定毒力。

从紫外线处理前后不同时间共挑 27 斑, 从中挑出一株对乳鼠脑内注射部分致死和潜伏期显著延长的 3 号斑。取 3 号斑, 按上述方法用紫外线再次处理, 并进行挑斑, 共挑 22 斑, 其中有 1 株 3-7 斑, 毒力进一步降低, 对乳鼠脑内注射无致病力 (表 1)。

二、各系减毒株的毒力、毒力稳定性、免疫原性

以小白鼠和乳鼠脑内注射来观察毒力; 以小白鼠脑内盲传 2—5 代, 乳鼠脑内盲传 2 代观察毒力的稳定性; 以小白鼠的保护力及其他动物中和抗体指数来观察免疫原性 (表 2)。

从表 2 结果可以看出, 3-7 株不仅对 3 周鼠和乳鼠脑内、皮下不致病, 而且也较稳定, 经 3 周鼠脑内盲传 5 代或乳鼠脑内盲传 2 代, 毒力皆不回升, 对小白鼠的保护力有所下降, 但对地鼠、猪、小鸡尚能引起一定的中和抗体升高, 对小鸭免疫无效。

经用乙脑免疫血清对 3 号及 3-7 号斑进行中和试验, 结果证明该二株为乙脑病毒。

三、3-7 株与 A₂ 株抗原性的比较

将 3-7 株及 A₂ 株组织培养病毒悬液加 1:3000 福尔马林 37℃ 作用 6 天, 制成灭活疫苗, 皮下 0.1 毫升免疫小白鼠, 共免疫 2 次, 间隔 1 周, 末次免疫后 2 周, 用强

表 1 12·1·7 株经紫外线照射后获得的 3 号、3-7 号减毒株的毒力测定

斑号*	毒力测定		
	空斑滴度 PF _μ /毫升(对数)	对乳鼠脑内致死力(%)	乳鼠(脑内)**死亡潜伏期(天)
12·1·7	6.62	100	6,6,6,6,6,6,7
12·1·7	6.90	100	6,6,6,6,6,6,6
3	6.38	80	12,13,15,19, A
3	5.90	62	11,12,12,13,13, A, A, A
3-7	4.07	0	A, A, A, A, A, A, A, A
3-7	6.30	0	A, A, A, A, A, A, A, A

* 12·1·7 指未经紫外线照射的 12·1·7 斑; 3 指经紫外线一次照射挑出的 3 号斑; 3-7 指经紫外线照射 3 号斑后, 挑出的 7 号斑。

** A 代表存活的小白鼠。每个数字代表每只小白鼠的死亡潜伏期。

表 2 12·1·7, 3 及 3-7 株的毒力、毒力稳定性及免疫力的比较

毒株	毒力				毒力稳定性				免疫力									
	度 滴 毒 病	对三周鼠 LD ₅₀ / 0.03 毫升		对乳鼠 LD ₅₀ / 0.03 毫升		三周鼠脑 内盲传		乳鼠脑内 盲传		小白鼠 保护 指数	地*	豚*	鸡*	鸭*	猪*			
		脑 内	皮 下	脑 内	皮 下	代 数	升 TCID ₅₀ /毫升	升 I.P. ₅₀ /毫升	一代(死亡数)		二代		中和指数					
											死亡数	TCID ₅₀ /毫升						LD ₅₀ /0.03 毫升
12·1·7	5.5	0.15	0	3.61	—	2 4	6.50 7.00	2.50 6.00	—	—	—	—	7.0	—	2.0	—	—	—
3	6.33	0	0	0.37	—	5	3.67	≤0.5	4/5**	8/8**	6.0	3.17	4.33	—	—	—	—	—
3-7	6.0	0	0	0	0	5	5.50	≤0.5	0/7	0/5	5.0	0	3.00	2.0	—	2.72	0.23	2.0

* 2—3 只动物血清混合测中和抗体。

** 分子为死亡数, 分母为接种数。

表 3 3-7 株和 A₂ 株的抗原性比较

制备灭活疫苗 用毒株	原病毒滴度 TCID ₅₀ /毫升	对小白鼠的保护力		
		对 照 组 LD ₅₀	试 验 组 LD ₅₀	保 护 指 数
A ₂	7.33	8.33	4.50	3.83
3-7	7.00	8.33	4.67	3.66

毒 A₂ 株腹腔攻击和脑内空针刺激(表 3)。

结果如表 3 所示, 3-7 株的抗原性没有改变。

四、3-7 株及 12·1·7 株皮下繁殖力的

比较

用 3-7 株及 12·1·7 株每只 0.02 毫升接种乳鼠皮下, 接种后不同时间, 解剖乳鼠, 取皮下组织研磨, 并在地鼠肾细胞滴定

表 4 12-1-7, 3-7, 2, 4, 6 株在乳鼠皮下的繁殖力比较

毒株	病毒感染滴度 TCID ₅₀ /毫升	感染后病毒滴度 TCID ₅₀ /毫升				
		—*	三	四	五	六
12-1-7	6.33	4.40	3.84	4.16	3.20	3.23
3-7	5.33	0	0	2.90	0	0
2	5.33	3.77	—	3.00	3.76	3.00
4	5.67	3.60	—	2.38	2.30	2.30
6	4.30	3.33	—	2.66	2.66	2.30

* 天数

(表 4)。

从表 4 结果可以看出, 3-7 株在乳鼠皮下的繁殖力显著降低。

五、提高 3-7 株的神经外繁殖力

3-7 株皮下繁殖力较差, 作为活疫苗是不理想的, 可能是影响其免疫力的主要因素。因此, 我们拟通过提高其神经外繁殖力来提高其免疫力, 而不相应提高其脑内毒力。

我们将 3-7 株通过乳鼠皮下传代, 每代取不同天数的皮下局部组织研磨, 接种地鼠肾细胞, 增殖一代, 挑选最晚天数分离到的病毒, 进行传代, 共传 5 代, 再经挑斑获得“2”、“4”、“6”三株病毒(表 4)。

从表 4 可以看出“2”、“4”、“6”三株在

乳鼠皮下的繁殖力, 较 3-7 株有显著的提高。

用“2”株经斑传斑纯化 3 次, 获得了 2-8-3-4 株(简称 2-8 株)。

六、2-8 株的毒力

1. 对小白鼠不同途径感染的毒力

我们用 2-8 株 10⁻⁹ 病毒悬液脑内和皮下接种乳鼠和三周鼠, 观察其死亡率及 TCID₅₀/LD₅₀ 对数的差数(表 5)。

由表 5 看出, 2-8 株对乳鼠脑内和皮下毒力较 3-7 株稍有回升, 但仍保持较低的水平, 皮下注射平均引起 50% 死亡; 脑内注射平均引起 75% 死亡; 对 3 周鼠(7—9 克), 脑内注射有时有个别死亡, 平均死亡率为 0.03%, TCID₅₀/LD₅₀ ≥ 7.0。

表 5 2-8 株对小白鼠和乳鼠的致病力

观察项目	鼠龄及接种途径 观察结果	乳鼠		三周鼠	
		皮下	脑内	皮下	脑内
死亡潜伏期 (天)	最早	11	6	0	10
	最晚	15	15	0	17
	平均	11.8	10.8	0	14
死亡率	平均(%)	50	75	0	0.03
	范围	1/8—6/8	2/8—8/8	0	0—1/8
TCID ₅₀ /LD ₅₀		—	—	≥7.5	≥7.0
实验批数		5	12	8	15

2. 对小白鼠脑的病理观察*

以 A₂ 强毒株及 2-8 株脑内注射浓的病毒, 每只 0.03 毫升, 注射后第 5, 7, 9, 11

天取脑作病理检查, 观察病毒对脑细胞的

* 小白鼠病理理由本所病理组协作。

致病性, 病变程度分为 1, 2, 3, 4, 四级^[10] (图 1)。

由图 1 结果可以看出, 强毒株病毒滴度为 $TCID_{50}$ /毫升 7.0, 在注射后第 4 天病变等级已达 3.5—4.0。而 2-8 株病毒滴度在 $TCID_{50}$ /毫升 6.33—6.50, 在注射后第 5 天仅个别出现病变, 第 7 天病变达高峰, 病变等级大多数 <1.0 , 仅个别达 2.5 级, 结果说明 2-8 株对中枢神经细胞的破坏作用已明显降低(图 1)。

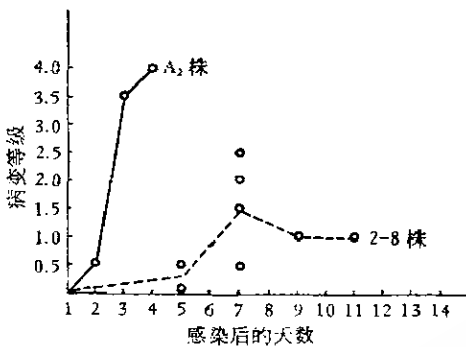


图 1 A₂ 株与 2-8 株鼠脑病理变化的比较

3. 对猴的脑内毒力及脑脊髓病理检查**

以 2-8 病毒 (相当 $6.5 TCID_{50}$) 0.2 毫升/只注入恒河猴丘脑内 (猴体重为 2—3 公斤, 中和抗体阴性者), 随后逐日测体温及观察临床反应, 在 9, 13, 17, 21, 25 天分

别解剖 1 只, 在 28 天全部解剖, 取脑和脊髓作病理检查(表 6)。

由表 6 看出, 16 只猴中只有 6 只在注射后有很低的发烧, 一般在 $40.5^{\circ}C$ 以下(猴

表 6 2-8 株注射猴丘脑后的反应

发 烧 反 应			结 果
潜伏期(天)	最 早	最 迟	6 10
	最 短	最 长	2 4
持续时间(天)	中 低	度 度	0 6 只
	发 烧 程 度*		
发 烧 最 高 达			$40.6^{\circ}C$
发 烧 占 总 数			6/16

* 中度指比正常体温高 $1-2^{\circ}C$ 。
低度指比正常体温高 $1^{\circ}C$ 以内。

正常体温为 $40^{\circ}C$) 只有 1 只体温达 $40.6^{\circ}C$ 。16 只猴都未观察到任何神经系统症状和死亡。

2-8 株的猴脑脊髓病理变化, 如表 7 所示, 是以炎症反应为主, 所有的猴脑内注射病毒后, 都有不同程度的炎症反应, 炎症反应的等级平均为 $1.8-2.4$ ^[10]。而神经细胞坏死则较轻, 病变等级平均只有 $0.7-0.8$, 而且在不同部位只有 $4/16-9/16$ 的猴出现病变, 神经细胞坏死主要发生在 28 天前, 28 天时不少已消失, 特别是腰前角的

表 7 2-8 株的猴脑病变观察

观察项目	丘 脑		黑 质		颈 前 角		腰 前 角		
	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	神经细胞坏死	炎症反应	
病变出现数	9/16*	16/16	5/16	16/16	5/16	16/16	4/16	16/16	
病变出现时间	28 天前占	4/5	5/5	3/5	5/5	4/5	5/5	4/5	5/5
	28 天占	5/11	11/11	2/11	11/11	1/11	11/11	0/11	11/11
病变等级	范 围	0.5—1.5	1.0—3.0	0.5—1.0	1.0—3.0	0.5—1.0	1.0—3.5	0.5—1.0	1.0—3.0
	平 均	0.7	1.8	0.8	2.4	0.8	2.1	0.7	2.0
观察总数	16 只								

* 分子为病变出现数, 分母为观察数。

** 猴子病理由医学生物研究所协作。

神经细胞坏死，28 天时已观察不到病变。这些结果说明，2-8 株引起的猴脑病理变化属于弱毒株性质的。

4. 2-8 株鼠脑试验

空针刺激法 以浓病毒悬液皮下注射 12—14 克小白鼠 20 只，每只 0.1 毫升，同时以空针进行脑内刺激，在病毒注射后 7, 9, 11, 13, 17, 21 天各杀死三只，解剖取脑，冰冻保存，待 21 天取完脑后，同时用地鼠肾细胞和鸡胚纤维母细胞蚀斑分离病毒。

皮质素致敏法 以浓病毒悬液皮下注射 12—14 克小白鼠 20 只，每只 0.1 毫升，在注射前四小时每只小白鼠腿部肌肉注入 0.15 毫克的皮质素。在注射后 7, 9, 11, 13, 17, 21 天各杀死 3 只，解剖取脑，冰冻保存，待 21 天取完脑后，用地鼠肾细胞和鸡胚纤维母细胞蚀斑分离病毒。

三次实验所用的病毒滴度为 log TCID₅₀ 7.0—8.0/毫升，结果从脑内都未分

离到病毒。

5. 2-8 株的毒力稳定性

将 2-8 株在地鼠肾细胞盲传 5 代、10 代，将 5 代、10 代材料作鼠脑和地鼠肾细胞滴定，观察其毒力回升情况(表 8)。

从表 8 看出，经地鼠肾细胞盲传 5 代或 10 代，乳鼠脑内增殖一代后，毒力有一定回升，尤以干燥 3 年后的材料毒力回升高些，但毒力回升最高的 log TCID₅₀/log LD₅₀ 的比值仍在 4.30。

七、2-8 株的免疫力

1. 2-8 株对小白鼠的保护力试验

从表 9 看出，2-8 株的保护指数三次均为 7.33 对数，说明其保护效果是较好的。

2. 2-8 株免疫豚鼠、鸡、鸭、兔、猴的中和抗体反应

以不同批浓病毒悬液皮下免疫鸡(2 周龄)、鸭(2 周龄)、豚鼠、兔，每只 0.5 毫升，1 次免疫后一月及三月(豚鼠、兔)采

表 8 2-8 株的毒力回升试验

地鼠肾细胞 传代代数	原材料的滴度 TCID ₅₀ /毫升	对三周鼠脑内毒力 (死亡率)	乳鼠脑内盲传 1 代毒力的回升	
			地鼠肾细胞滴度 TCID ₅₀ /毫升	三周鼠脑内滴度 LD ₅₀ /0.03 毫升
HK ₅	≥7.50	1/5	6.00	1.29
HK ₁₀	7.50	1/5	8.50	1.55
HK ₅ ^Δ	7.50	1/10	7.00	1.00
HK ₅ ^Δ	8.00	1/10	8.00	2.50
HK ₅ ^Δ	8.00	0/10	8.00	2.12
HK ₅ ^Δ	7.33	1/10	7.63	3.33
HK ₅ ^Δ	8.00	1/10	7.33	2.46

^Δ 干燥保存三年的材料。

表 9 2-8 株对小白鼠的保护作用

免疫途径	免疫剂量	攻击时间	疫苗滴度 TCID ₅₀ /毫升	保护指数* (对数)
皮下	10°	免疫后	6.73	7.33
	0.1 毫升	14 天	8.00	7.33
			7.33	7.33

* 攻击毒力：腹腔攻击脑内空针刺激为 LD₅₀ 7.33。

表 10 2-8 株免疫试验动物的抗体反应

次 数	中 和 抗 体 指 数 (对 数)						
	豚 鼠*		兔*		地 鼠 [△]	小 鸡 [△]	小 鸭 [△]
	一 月	三 月	一 月	三 月	一 月	一 月	一 月
1	2.67	3.17	2.67	2.34	3.00	2.13	2.10
2	2.33	3.17	2.00	2.00	2.88	—	—
3	2.00	3.17	2.00	1.67	2.50	—	—
4	1.50	2.67	1.50	1.17	2.13	—	—

* : 单个动物测抗体; [△] : 2-3 个动物混合血清测抗体。

表 11 2-8 株免疫豚鼠的中和抗体反应

免疫前中和抗体阴性者	免疫后 28 天中和抗体变动情况		中和抗体阳转率 %
	阴 性	阳 性	
11	2	9	82

表 12 2-8 株在豚鼠引起的抗体持久性

次 数	疫苗滴度 TCID ₅₀ /毫升	抗 体 持 续 时 间 (月)					
		1	5	8	10	12	19
1	7.0	3.00	≥3.00	3.00	2.50	2.00	2.00
		1.14	≥3.00	1.83	2.00	2.00	0.49
		1.28	≥3.00	1.83	1.49	—	—
2	8.0	1.67	≥3.17	≥3.85	—	—	—
		1.50	≥3.17	≥3.77	—	—	—
		2.00	≥3.00	—	—	—	—
		2.34	—	—	—	—	—

—: 未做。

血,用鼠脑中和试验法测中和抗体。猴是脑内注射 0.2 毫升/只,注射后 28 天采血,按上述方法测中和抗体(表 10、表 11)。

结果表明,2-8 株在多种动物皆能引起明显的特异性中和抗体反应。

3. 2-8 株在豚鼠引起的抗体持久性:

以浓的病毒悬液 0.5 毫升/只皮下免疫 1 次,免疫后不同时间采血测中和抗体,观察其抗体持久性(表 12)。

从表 12 看出,2-8 株的免疫持久性是比较好的,8 个月抗体仍为阳性,有的豚鼠免疫后 19 个月抗体仍未消失。

讨 论

关于紫外线诱变的工作,在抗菌素方面的应用已获得显著成效。在病毒方面,Demerec^[11]首先用紫外线处理噬菌体获得了变异株。但利用紫外线减毒获得活疫苗株,尚未见报道。

本文用已初步减毒,但对乳鼠(2-3 日龄)脑内和皮下注射仍致死的 12·1·7 株,经紫外线处理 2 次,获得对乳鼠脑内和皮下注射完全不致死的高度减毒株 3-7。经乳鼠脑内盲传 2 代,或 3 周鼠脑内盲传 5 代,毒力仍不回升,远较 12·1·7 株稳定。其免

疫性在不同动物反应有所不同,对地鼠、猪、鸡仍能引起较好的中和抗体反应;对小鸭则不能引起抗体的产生;对小白鼠的保护力有显著降低。

Hammon 等^[12]选出的 OCT-541 的减毒株,曾因免疫力不好而放弃。我们在实验中发现 3-7 株的抗原性变化不大,而皮下繁殖力却显著减弱。因此,作为活疫苗是不理想的。

黄祯祥^[13]的工作曾证明,病毒通过小白鼠脑内长期传代,可以降低对小白鼠的皮下致病力;通过皮下注射,脑内分离病毒长期传代,可以提高其皮下致病力。因此,我们提出在皮下传代,能否提高其皮下繁殖力,而不相应提高其脑内毒力。根据上述设想,我们将 3-7 株在乳鼠(2-3 日龄)皮下传代,传 5 代后,显著提高了对乳鼠皮下的繁殖力,同时也显著提高了其免疫力,而没有相应地显著提高其毒力,再经 3 次斑传斑纯化,获得了 2-8 株。

2-8 株不仅提高了对小白鼠的保护力,而且对原来不引起反应的小鸭也能引起良好的抗体反应。对乳鼠脑内毒力仍为部分致死,致死率为 75%;对乳鼠皮下致死力为 50%。实验结果证明,乙脑活疫苗的毒力和免疫力不一定是平行关系。因此,在一定条件下获得毒力低而免疫力好的减毒株是可能的。

与国外的 OCT-541 的减毒株、Mukai

株和 MPK/L 株比较,无论是猴或小白鼠的脑内毒力,我国的 53 株及 2-8 株都是较低的,而免疫力也是较好的。OCT-541 的减毒株脑内免疫豚鼠不引起抗体的产生,而 2-8 株皮下 1 次免疫,就能引起良好的抗体反应,中和抗体可维持 8 个月以上,其他对小鸡、小鸭、地鼠、兔、猴、小白鼠等动物都有良好的免疫作用。

因此,利用 2-8 株作为乙脑减毒活疫苗是值得在人群试用的。实践已证明,它对预防马的乙型脑炎是有效的,详情见本文第二篇报告^[14]。

参 考 资 料

- [1] Hammon, W. M. et al.: *J. Immunol.*, **96**: 518, 1966.
- [2] Inoue, Y. K. et al.: *Bull. W. H. O.*, **30**:181, 1964.
- [3] Hammon, W. M. et al.: *Immunization for Japanese encephalitis*, 205, 1971.
- [4] Ilyenko, V. I. et al.: *Amer. J. Epid.*, **95**:148, 1972.
- [5] 俞永新等: *微生物学报*, **13**:16, 1973.
- [6] 李河民等: *微生物学报*, **12**:41, 1966.
- [7] 黄祯祥等: *中华医学杂志*, **37**:280, 1951.
- [8] 陈伯权等: *微生物学报*, **9**:53, 1963.
- [9] Reed, L. & Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, **27**:493, 1937.
- [10] 朱荫霖等: *中华病理学杂志*, **10**:113, 1966.
- [11] Demerec, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Wash. **32**:36, 1946.
- [12] Hammon, W. M. et al.: *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.*, **15**:765, 1966.
- [13] 黄祯祥等: *微生物学报*, **10**:1, 1964.
- [14] 中国医学科学院流行病学防治研究所脑炎组等, *微生物学报*, **14**(2): 185-190, 1974.

STUDIES ON ATTENUATED JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS VACCINE

I. METHOD FOR OBTAINING THE ATTENUATED 2-8 STRAIN AND ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

INSTITUTE OF EPIDEMIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
(Peking)

A highly attenuated 3-7 strain of Japanese B encephalitis virus was obtained by twice exposure of a partially attenuated SA₁₁ 12-1-7 strain to ultraviolet light. This strain was not lethal when inoculated intracerebrally to 2-3 day-old infant mice. Its antigenicity showed no appreciable change as compared with A₂ virulent strain. However, when inoculated as a live vaccine subcutaneously to infant mice, multiplication at local sites was found to be very low and thus was not considered suitable as a live vaccine.

In order to increase peripheral multiplication, the 3-7 strain was passed in infant mice. Virus was inoculated subcutaneously and after several days virus was isolated from the site of inoculation. Following 5 successive passages, the 2-8 strain was obtained which caused a mortality rate of 75% when inoculated

intracerebrally and 50% when given subcutaneously to infant mice. The mortality rate in 3-week-old mice when inoculated intracerebrally was only 0.03%. There was no death when inoculated intracerebrally to monkeys and brain and spinal cord sections showed only mild pathological changes. The 2-8 strain had a better multiplication in mice at the local site of inoculation. It gave a high protective index 7.0 (log) when challenge intraperitoneally with virulent virus 14 days after subcutaneous vaccination. There was good immunological response in guinea-pigs, mice, chicks, ducks, rabbits as expressed by neutralization indices of sera obtained 1 month after a single dose of live virus.

The attenuated 2-8 strain is thus considered suitable for trial as a live vaccine.