

# 17D 黃熱病毒變異之研究

湯飛凡 易有年 李一飛 盧寶蘭

(中央生物製品研究所, 北京)

17D 黃熱病毒在預防醫學中, 與牛痘及狂犬病固定病毒, 佔同樣重要地位。因為 17D 病毒毒力很低, 而且穩定, 所以防疫時人們可以應用活毒注射或作皮膚劃刺<sup>[1]</sup>, 而所產生的免疫性可與牛痘苗比美。

17D 病毒性質雖甚穩定, 但在近來的研究工作中, 我們遇到過變異現象, 茲簡單報告如下。

## 變異的經過

在無菌操作情況下, 我們將盛 17D 病毒的安瓶啓開, 加 2 毫升 10 % 的人血清生理鹽水, 使乾燥的病毒溶化, 然後自氣室注射至 7 天的雞胚附近, 每胚注射 0.2 毫升, 同時注射於一批 7—9 克小白鼠腦內, 每隻注射 0.03 毫升, 滴定病毒的效價。注射結果見表 1。

表 1 17D 病毒雞胚及小鼠注射試驗

病毒稀釋	雞 胚		小 白 鼠	
	接種數	死 亡 數(死亡天數)	接種數	死 亡 數(死亡天數)
10 <sup>0</sup>	4	1(4), 3(5)	6	2(10), 2(11), 1(12), 1(15)
10 <sup>-1</sup>	4	2(6), 1(8), 1(9)	6	1(9), 2(11), 1(12)
10 <sup>-2</sup>	4	無死亡, 接種後 13 天小雞孵出	6	1(12), 1(21)

注射了 17D 病毒的雞胚, 在死以前, 頭、胸及腿部常有充血現象; 孵出來的小雞均未長成, 或因飼養不良或因病毒, 未加追究; 小白鼠發病時皮皺毛豎, 後腿起初行動失靈, 後來癱瘓, 背脊彎縮。

接種後第 4 天、第 5 天, 我們將 1, 2 號雞胚在死前取出, 以一部分組織供

培養試驗，其餘的則置於無菌的中性甘油內保存，約一月後復取出，在無菌生理鹽水管中洗滌二次，磨成懸液，再接再種第 8 天的雞胚一批。接種後第 3 天，將死胚廢棄，活胚則取出，合併成組，並按每胚加雙蒸水 1 毫升，在電動研磨器內磨碎，用每分鐘 2,500 轉的離心力沉澱 30 分鐘。從上清液內吸取樣品若干作無菌試驗，其餘各組的上清液則分別暫置於電氣冰箱內，待無菌試驗有結果後合併分裝，按照冷凍乾燥法乾燥為第一批乾燥病毒。經小鼠滴定，第 1 批乾燥品效價太低 ( $LD_{50} 10^{-0.42}$ )，故又把它通過小鼠 1 代及雞胚 5 代，製作成第 2 批乾燥病毒，並注射猴子 6 隻，每隻注射 0.2 毫升於腦內，結果見表 2。

表 2 第二批 17D 乾燥病毒猴子試驗

猴號	注射病量 ( $LD_{50}$ )	血 循 環 內 病 毒									注 射 結 果
		2 天			4 天			6 天			
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	
1	6,600	$\Delta^5/6$	$2/6$	$1/5$	$0/6$	$0/6$	$1/6$	$1/6$	$1/6$	$2/6$	注射後數日食慾稍減，第 10 天體溫增高至 $40.5^\circ\text{C}$ ，但次日即又正常。觀察一個月，無病狀。
2	6,600	$1/6$	$4/6$	$0/6$	$1/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$1/6$	注射後 9, 10, 11 日最高體溫 $41^\circ\text{C}$ ，旋即正常，觀察一月無病狀。
3	6,600	$1/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$1/6$	$0/6$	$2/6$	第 9, 10, 11, 12, 13 日體溫增加最高 $41^\circ\text{C}$ 旋即正常。觀察一月無病狀。
4	6,600	$1/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$1/5$	$0/6$	$1/6$	$1/6$	9, 10, 11 日體溫 $41.2^\circ\text{C}$ ，15 日恢復正常。觀察 1 月無病狀。
5	6,600	$4/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$0/6$	$1/6$	$4/6$	$0/6$	10, 11 日體溫 $41^\circ\text{C}$ 次日即正常，觀察一月無病狀。
6	6,600	$0/6$	$0/6$	$1/6$	$1/6$	$2/6$	$0/6$	$2/6$	$1/6$	$1/6$	9, 10 日體溫 $41.3^\circ\text{C}$ 旋即正常，觀察一月無病狀。

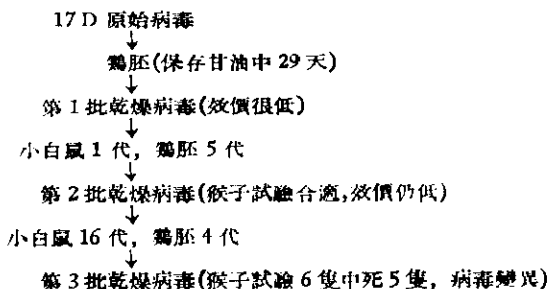
\* 血清稀釋度

 $\Delta$  分子代表小鼠子亡數，分母注射總數； $0/6$  即注射的小鼠 6 隻中死 5 隻。

第 2 批乾燥病毒猴子試驗結果極其理想。所注射的猴子經過 5, 6 或 7, 8 天短時期的不思飲食，行動遲鈍，體溫稍增 ( $41^\circ\text{C}$ ) 外，無其他不良反應，過此期後，便即恢復正常。循環血液內之病毒量之測定，從第 2 天起至第 6 天，一直均有存在，但為量極微。照猴子試驗的結果，第 2 批病毒本可使用，但以其效價太低 ( $LD_{50} 10^{-3}$ ) 故進行改進。

為了增加 17D 病毒的效價，我們取第 2 批乾燥病毒，液化後在小鼠腦內接連傳代 16 次，繼續又在雞胚內傳代 4 次，然後製成第 3 批乾燥病毒，注射猴子。在猴子試驗中我們忽然遇到了病毒變異的現象。茲將變異過程簡示於表 3。

表 3 17D 病毒變異過程



## 變異的研究

第 3 批乾燥病毒製成後即進行毒力測定 ( $LD_{50} 10^{-3.49}$ ) 及水份檢定 (1.3%)。然後注入猴子腦內, 結果見表 4。

表 4 第三批乾燥病毒的猴子試驗

猴號	注射病毒量 ( $LD_{50}$ )	循環血內病毒						注射結果及 主要症狀	屍體解剖			
		2 天		4 天		6 天						
		$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$		
11	20,600	4/4	2/3	0/3	1/3	0/3		2/3	1/3	1/3	生存, 注射後第 4, 5, 6, 7 天發熱, 最高 41°C, 四肢抽瘋, 身體倦縮, 後恢復正常。	
12	20,600	0/4	1/6	0/6	5/5	4/4	0/4	3/6	0/6	1/4	第 10 天死亡。發熱(最高 40°C), 精神疲弱, 叫聲嘶啞抽瘋麻痺。	心血、腦、肝培養陰性。 *切片檢查: 輕度腦炎, 肝呈輕度脂肪變, 無壞死及包涵體。
13	20,600	0/6	4/6	0/3	4/4	5/5	5/5	3/6	2/6	3/6	第 13 天死亡。發熱(41°C), 拒食, 四肢團縮, 毛聳立。	心血、腦、肝培養陰性; 腦肝病毒分離陽性。 切片: 輕度腦炎, 肝脂肪變, 無壞死及包涵體。
14	20,600	4/4		1/3	1/3	0/6	2/6			1/6	第 11 天死亡。發熱(41°C), 昏迷常自架上摔下。	心血、腦、肝培養陰性。 切片: 輕度腦炎, 肝輕度脂肪變。
15	20,600	1/6	0/6	0/6	0/6	5/5	5/5	0/6		0/6	第 9 天死亡。發熱, 抽瘋聲嘶啞, 昏迷。	心血、腦、肝培養陰性; 腦病毒分離陽性。 切片: 輕度腦炎肝呈輕度脂肪變, 無壞死及包涵體。
16	20,600		5/6	0/4	0/6	0/6	2/3				第 9 天死亡。四肢軟弱, 精神疲委。	心血、腦、肝培養均陰性; 腦毒分離陽性。 切片: 輕度腦炎, 肝脂肪變, 無壞死。

▲ 切片檢查是胡正祥教授作的, 謹此致謝。

由表 2 及表 4 的分析, 我們知道第 2 批乾燥病毒注射猴子後, 6 隻全活, 但第 3 批注射後, 6 隻中却死了 5 隻。注射第 2 批乾燥病毒的猴子, 僅僅在短期不

思飲食，行動遲鈍，體溫增加，但不久即恢復正常，循環血液內的病毒量亦不算高。相反的注射第 3 批乾燥病毒的猴子，注射後均有典型的腦炎症狀，如發熱、抽瘋、叫聲嘶啞、精神疲萎及昏迷麻痹等。死後屍體檢查雖找不到明顯的肉眼病變，但在切片檢查中腦膜血管周圍發現有少量淋巴球浸潤，灰質內有散在的 3—5 個的膠質細胞所形成的小堆，神經節細胞有衛星現象及噬節現象；灰質小血管周圍亦有少數膠質細胞增生。肝細胞呈輕度萎縮，內含中等量的脂黃素及輕度脂肪變；未見有壞死或包涵體。循環血液內之病毒量亦顯有增加。同是一種病毒，第 2 與第 3 批乾燥品對猴之致病力參差有如此之大，故我們認為第 3 批病毒必有變異。

在考慮 17 D 病毒變異問題之前，我們必須解決兩個重點：一個是第 3 批病毒之是否混染病菌，一個是此病毒在製造過程中或在製造前的動物傳代中是否有其他的病毒混入，擾亂是非。

關於染菌方面，在第 3 批乾燥病毒製造過程中，我們作了極嚴密的無菌試驗，結果見表 5。

表 5 第 3 批乾燥病毒乾燥前後的無菌試驗

亞批數	培養基	乾燥前				乾燥後*				亞批數	培養基	乾燥前				乾燥後*			
		觀察日數				觀察日數						觀察日數				觀察日數			
		1	3	5	7	1	3	5	7			1	3	5	7	1	3	5	7
1	肉湯	—	—	—	—	—	—	—	—	5	肉湯	—	—	—	—				
	貝瓦氏	—	—	—	—	—	—	—	—		貝瓦氏	—	—	—	—				
	半固體	—	—	—	—	—	—	—	—		半固體	—	—	—	—				
	血斜面	—	—	—	—	—	—	—	—		血斜面	—	—	—	—				
2	肉湯	—	—	—	—					6	肉湯	—	—	—	—				
	貝瓦氏	—	—	—	—						貝瓦氏	—	—	—	—				
	半固體	—	—	—	—						半固體	—	—	—	—				
	血斜面	—	—	—	—						血斜面	—	—	—	—				
3	肉湯	—	—	—	—					7	肉湯	—	—	—	—				
	貝瓦氏	—	—	—	—						貝瓦氏	—	—	—	—				
	半固體	—	—	—	—						半固體	—	—	—	—				
	血斜面	—	—	—	—						血斜面	—	—	—	—				
4	肉湯	—	+	+	+														
	貝瓦氏	—	+	+	+														
	半固體	—	+	+	+														
	血斜面	—	+	+	+														

\* 除第 4 亞批因染菌廢棄外，其餘各亞批合併分裝，乾燥成一批。

貝瓦氏及半固體是需氧培養及厭氧培養的可靠培養基。這兩種與其他的培養

基同時並用，經過 7 天在 37°C 溫度中的培養，結果均是陰性，由此我們可以決定第 3 批乾燥病毒之為無菌。除此之外，我們曾用第 3 批病毒注射體重 350—500 克的豚鼠 5 隻，每隻注射 5 毫升於腹腔內。除一對豚鼠在第 16 天死亡原因不明外，其餘的均健存無恙。又第 11, 13, 14, 15 及 16 號猴子的心血、腦和肝組織的培養亦均為陰性。這些事實，更可證明第 3 批病毒之無菌性。

關於污染其他病毒的問題我們也作了兩次試驗。在第一次試驗，我們取了對 17D 正常病毒免疫過的猴子 3 隻及未免疫的猴子 2 隻，分別注射同樣量的“變異”病毒（即第 3 批病毒懸液）於腦內，結果見表 6。

表 6 17D 免疫猴子注射變異病毒之結果

猴 號	免疫情形	變異病毒注射量	結 果
18	已 免 疫	20,600	觀察 3 星期無病症，體重稍有增加健存。
19	已 免 疫	20,600	
22	已 免 疫	20,600	
30(對照)	未 免 疫	20,600	注射後第 7 天體溫 40.6°C 第 8 天死亡。心血、腦、肝培養陰性。屍體解剖無病變。
31(對照)	未 免 疫	20,600	
			7, 8 天體溫 40.5°C, 10 天死亡。心血、腦、肝培養陰性；解剖右肺葉及胸腺有結核病變，餘正常。

第二次試驗是取注射過“變異”病毒未死的 11 號猴子的免疫血清，減能後稀釋成 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 然後與 100 個 LD<sub>50</sub> 的 17D 正常病毒相混合，置室溫中半小時，然後分組注射小白鼠，每血清稀釋度一組，每組 6 隻，注射結果見表 7。

表 7 11 號猴子免疫血清之保護力試驗

採血時間 (注射後日數)	血 清 稀 釋	血清 (各稀釋度) 病毒 (100 LD <sub>50</sub> ) 混合後腦內 注射結果		血清保護力
		小鼠生存數	小鼠死亡數	
注 射 前 (對照)	1:2	0	6	0
	1:4	0	6	
	1:8	0	6	
	1:16	0	6	
21	1:2	2	4	1:3.3
	1:4	2	4	
	1:8	2	3	
	1:16	2	3	

45	1:2	2	4	1:4.0
	1:4	3	2	
	1:8	3	2	
	1:16	0	5	
60	1:2	3	3	1:6.8
	1:4	3	3	
	1:8	5	1	
	1:16	1	5	
75	1:2	2	4	1:5.6
	1:4	2	3	
	1:8	5	1	
	1:16	1	5	

11 號猴子的免疫血清對 17D 正常黃熱病毒有中和作用，因之能保護小白鼠。此種血清之保護力免疫前並不存在，但注射後日益增加至二個月的時期為最顯著。

由表 6 與表 7 我們得知 17D 正常病毒免疫的猴子 (18, 19, 22 號) 對“變異”病毒有抵抗力，而“變異”病毒免疫的猴子 (11 號) 的血清又有中和 17D 正常病毒之能力，因此可以充分證明，“變異”病毒與 17D 正常病毒之同一性，故其他病毒污染之說，不能成立。

第 2 批與第 3 批乾燥病毒製造過程之不同，僅後者在製造前曾經通過 16 代小鼠及 4 代雞胚；故變異之形成，不在雞胚即在小鼠傳代過程中所發生。為了解決這個問題，我們進行了以下的最後一個試驗。取第 1 批未曾經過小鼠的 17D 乾燥病毒稀釋後接種至雞胚，每 3, 4 日傳代一次，32 次後製成第 6 批乾燥病毒，效價滴定後進行猴子試驗，結果見表 8。

表 8 32 代雞胚病毒猴子注射試驗

猴號	病毒量 (LD <sub>50</sub> )	血 循 環 內 病 毒						結 果
		2 天		4 天		6 天		
		10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	
23	127,000	2/6	1/6	0/6	0/6	1/6	0/6	健存。注射後僅第 2 天體溫 40°C，第 8 天 40.2°C，其餘正常，無病狀，一月後體重增加。
24	127,000	2/6	0/6	1/6	0/6	1/6	0/6	健存。第 8 天上午，體溫 40.1°C，喊叫異常，且圍柱圈走不停，但下午即恢復正常，一月後體重增加。
25	127,000	1/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	健存。第 8, 9, 10 天體溫 40°C，無變狀，月尾體重增加。
26	127,000	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	健存。第 8, 9, 10 天體溫 40.2°C，無病狀，體重稍減。
27	127,000	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	健存。第 9, 12, 13 天體溫 40.1°C，無病狀，體重增加。

由表 8 我們知道 17D 病毒雖然經過了雞胚傳代 32 次但對猴子的致病力仍無增減，因此可以斷定病毒變異的形成，關鍵在於小鼠中連續傳代 16 次之故。

## 討 論

變異或改變生活以適應環境，為一般生物及微生物的共同特性，黃熱病毒係微生物中之最善變者。由嗜臟器性經過小白鼠腦中傳代，可以變為嗜神經性；而嗜神經性通過猴肝接種，又復可變為嗜臟器性。但由很毒的 Asibi 黃熱病毒株轉變為對人及猴幾完全無毒而有免疫功能的 17D 株，却並不容易。Lloyd, Theiler 及 Ricci 等氏<sup>[2]</sup>經過了多年不斷的組織培養研究工作，始抵於成，這已為大家所知道。17D 病毒形成後在一般情況下，它的性質是很穩定的。雖在小白鼠腦內連續接種 20, 40, 61 及 106 代，據 Theiler 氏<sup>[3]</sup>研究，並無不良結果。在雞胚中，雖經過更長時期的繼續接種（200-300 次），據 Fox 等<sup>[4]</sup>的研究，亦認為對病毒的性質完全無影響。我們所遇到的變異，其發生僅在小鼠傳代 16 次之內，故甚覺其奇異。至於此 16 代中變異究竟發生於第幾代，則未予決定。自 1947 年獲得此株病毒之後，有一個較長的時間未曾保存於冰箱內。此長時期在室溫中放置與病毒變異是否有關，亦未加研究。

此次變異明顯的指出鼠腦接種與 17D 黃熱病毒的安全性有關，故對 Dick 氏<sup>[5]</sup>鼠腦疫苗之建議有所懷疑。

## 總 結

在研究 17D 黃熱病毒時，我們製備了 2 批乾燥黃熱疫苗。第 1 批是直接從病毒毒種接種雞胚二代後製成的，第 2 批是從第 1 代雞胚經過小白鼠腦內傳代 16 次而後製成的。第 1 批疫苗的猴子安全試驗，結果正常。第 2 批則在猴子試驗中發現了病毒變異，所注射的猴子因腦炎而死者 6 隻之中有 5 隻。所分離的變異病毒株用血清中和試驗及免疫動物試驗證明其為黃熱病毒而非其他的病毒。對 17D 疫苗的安全製造，文中有所討論。

## 參 考 文 獻

- [1] Hahn, R. G., *Am. J. Hyg.* **54**:50-70, 1951.
- [2] Lloyd, W., Theiler, M., Ricci, N. I., *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.* **29**:481-529, 1936.
- [3] Theiler, M., *Yellow Fever* by Strode McGraw-Hill, First Ed., p. 107, 1951.
- [4] Fox, H. W. and Laemonert, H. W. Jr., *Am. J. Hyg.* **46**:21-40, 1947.
- [5] Dick, G. W. A., *Am. J. Hyg.* **55**:140-153, 1952.

## STUDIES ON A VARIANT OF 17-D YELLOW FEVER VIRUS

TANG, F. F., YI, Y. N., LI, Y. F., and LO, P. L.

*National Vaccine and Serum Institute, Peking*

A variant was encountered in the course of our work with 17-D yellow fever virus. Two batches of freeze-dried virus preparation were made. The first batch when dehydrated and inoculated intracerebrally into a group of 6 monkeys produced only transient illness. The animals, after a short period of illness characterized by fever and general discomfort, all recovered well. The second batch when similarly injected, 5 out of 6 monkeys succumbed. Clinically monkeys in this group all showed signs of encephalitis with typical cranial signs and paralysis. Pathologically, however, only a slight degree of brain inflammation was seen on sections. Liver cells showed some degeneration but no necrosis and no inclusion bodies was discovered. Circulating virus content titrated on 2nd, 4th, and 6th days was higher than the corresponding specimens of the first group of monkeys.

The only difference between the 1st and 2nd batch of the virus preparation was that the latter was preceded by passage from brain to brain in mice for 16 generations followed by 4 passages in chick embryos in an attempt to increase the virulence of the 17-D strain. As the sterility of the dried virus preparation was strictly controlled and for the fact that the "changed" virus was neutralized by known 17-D immune serum and that normal 17-D virus was also neutralized by the serum of the monkey which recovered from inoculation with the variant, we conclude that contamination with pathogenic bacteria or other viruses is out of question and the only explanation is that a variant has been formed from 17-D virus while it was passaged through mice although only for as short as 16 generations. The significance of the variation in relation to the preparation of vaccines was discussed.