

流行性乙型腦炎病毒的小白鼠鼻腔內感染*

沈鼎鴻**

(四川醫學院微生物學教研組)

自1926年日本學者高木氏(Takaki)從流行性乙型腦炎患者的腦組織內,分離出流行性乙型腦炎病毒之後,曾有許多科學家進行了對小白鼠的不同途徑感染的試驗工作,如河村氏(Kavamura)等^[1],橋本氏(Hashimoto)等^[2]和Webster^[3]氏曾試以鼻腔內感染小白鼠,證明可以使小白鼠發生腦炎症狀和腦組織上有腦炎的病理變化,而且從血液和腦組織中再次分離出流行性乙型腦炎病毒。

在流行性乙型腦炎病毒毒種轉代過程中,病毒毒種組織有幾次被細菌污染,我們以這種污染材料,試用小白鼠鼻腔內感染,曾再次獲得純粹毒種。由此,為了進一步研究(1)利用鼻粘膜對細菌的自然防衛機能,以除去標本中污染雜菌,來分離病毒的純種;(2)觀察鼻腔內感染與小白鼠感受性問題;(3)從小白鼠的肺組織中再次分離病毒的可能性;以及(4)病毒引起鼠肺和鼠腦的病理變化,進行了以下的試驗,茲將試驗結果報告於後,供作今後病毒分離和研究工作的參攷。

試驗材料

(一) 病毒 為北京中央衛生研究院分給的流行性乙型腦炎病毒“京衛研”毒種,其毒力以50%致死量(LD₅₀),測定為10^{-7.4}。

(二) 動物 為四川醫學院動物室在防蚊設備下,自行繁殖的純種小白鼠。年齡在3週左右,體重為12—14克。

(三) 細菌 四川醫學院微生物學教研組所保存的金色葡萄球菌和枯草桿菌。

(四) 稀釋劑 pH 7.6 的脫脂牛乳鹽水。

(五) 病毒滴定度的計算 採用Reed和Muench兩氏方法計算病毒的50%致死量(LD₅₀)。

* 1956年10月12日收到。

** 現在上海第二醫學院微生物學教研組工作。

試 驗 結 果

(一) 鼻腔內感染與小白鼠感受性

將感染京衛研病毒的鼠腦研磨，加 10% 脫脂牛乳鹽水，製成 10% 病毒鼠腦懸液，離心沉澱 (2,500 rpm) 15 分鐘後，吸取其上清液，以 0.02 毫升滴入小白鼠鼻腔內，6 日後開始發病，其所表現的症狀和腦內感染的相同，即豎毛，驚厥，癱瘓，酣睡及呼吸困難等。取此種發病典型的 4 個小白鼠的腦組織，按照 Casals 氏醋酮乙醚浸漬法製成抗原，對京衛研病毒的免疫血清，進行補體結合試驗，其滴定度為 1:8，是陽性的結果。

另取上清液用 10% 牛乳鹽水稀釋為 10^{-2} — 10^{-5} 等四種不同的病毒懸液，每一稀釋度的懸液，選用小白鼠 4 隻，各滴 0.02 毫升於其鼻腔內，所獲得的 50% 致死量 (LD_{50}) 為 $10^{-4.5}$ (表 1)。

表 1 鼻腔感染的 50% 致死量

病 毒 稀 釋 度	死 亡 數	累 積 和		死 亡 比 例	死 亡 百 分 數
		死 亡	生 存		
10^{-2}	3/3	9	0	9/9	100.0
10^{-3}	3/3	6	0	6/6	100.0
10^{-4}	2/3	3	1	3/4	75.0
10^{-5}	1/3	1	3	1/4	25.0

$LD_{50} = 10^{-4.5}$

(二) 通過鼻腔粘膜以除去污染雜菌的觀察

取 10% 病毒鼠腦懸液 0.5 毫升 2 管，分別加入枯草桿菌和金色葡萄球菌的 24 小時固體培養各一標準接種環 (直徑為 2 毫米)，均勻混和後，進行鼻腔內感染，每一種病毒細菌混合懸液，感染小白鼠 3 隻，每隻 0.02 毫升，其潛伏期為 6—8 天。取此發病的鼠腦作細菌培養，觀察 48 小時，均無生長，並進行鼠腦傳代，其所製成抗原，對京衛研免疫血清的補體結合試驗為陽性反應。

(三) 鼻腔感染的小白鼠的不同器官中再分離病毒

當鼻腔感染小白鼠發病後，分別取心血、肺和腦組織，進行病毒分離工作：

(1) 抽取症狀典型的小白鼠的心血，立刻以腦腔內注射於 3 隻小白鼠，每隻 0.03 毫升。受感染後的小白鼠，經過潛伏期 9—10 天發病，傳代後製成抗原，經補體結合試

驗,證明與原來的病毒相符合。

(2) 以症狀典型的頻死的小白鼠,心臟穿刺放血後,無菌的取出肺臟,在冷卻(5°C)的消毒生理食鹽水內洗滌3次,以除去殘餘在肺臟的血液,加消毒海砂研磨,用10%脫脂牛乳鹽水,製成20%懸液,靜置於冰箱中30分鐘,再以每分鐘2,500轉速度的離心沉澱20分鐘,取上層清液,腦腔內注射小白鼠4隻,每隻0.03毫升,經8—10天的潛伏期,發生典型的腦炎症狀,傳代後製成抗原與抗衛研免疫血清的補體結合試驗為陽性反應。

(3) 取上同一發病的鼠腦,分離出病毒並製成 10^{-2} — 10^{-9} 等的稀釋懸液,滴定其50%致死量為 $10^{-7.2}$ (表2),與原來的滴定度無甚區別。

表2 鼻腔感染發病後鼠腦的病毒含量

病 毒 稀 釋 度	死 亡 數	累 積 和		死 亡 比 例	死 亡 百 分 數
		死 亡	生 存		
10^{-5}	3/3	8	0	8/8	100.0
10^{-6}	3/3	5	0	5/5	100.0
10^{-7}	2/3	2	1	2/3	66.7
10^{-8}	0/3	0	4	0/4	0

$LD_{50} = 10^{-7.2}$

(四) 鼻腔感染病毒引起的鼠肺和鼠腦的病理變化的觀察

1. 肺臟病理檢查結果見表1,其中大多數在肉眼上有明顯充血和小出血點。組織切片上可見枝氣管腔有大量急性炎症性滲出物;間質血管高度擴張和充血,有水腫及炎細胞浸潤,肺泡隔顯著增厚及部分的水腫(圖版I,圖1)。又從腦內感染的鼠肺(圖版I,圖2),取出一部分做病理組織檢查,其結果如表3。

表3 經腦內和鼻腔感染流行性乙型腦炎病毒所引起的肺部病變

感染途徑	枝氣管肺炎或 間質性肺炎	肺氣腫及充血	無顯著病變	總 計
鼻 腔	6	4	2	12
腦 內	15	3	0	18

2. 大腦的表面和切面,在肉眼上均有輕度組織的充血。病理變化為血管高度擴張及充血,其周圍有顯著的淋巴細胞浸潤,和少數的小灶性出血。神經組織呈高度充血及

水腫，有顯著的膠質細胞增生，形成多數的散在性小結節，亦偶有神經細胞吞噬現象，神經細胞退變和染色質溶解。病變在第三腦室兩側最為顯著，皮層下、海馬和基底均有炎症灶；小腦一般祇現充血。

討 論

在分離流行性乙型腦炎病毒過程中，曾有二次於傳代時，發現病毒懸液（鼠腦）被革蘭氏陰性桿菌所污染。將污染材料不加抗生素處理，擬利用鼻腔粘膜的天然防禦機能，進行鼻腔內感染，以除去污染雜菌，分離病毒的純種，結果成功。進一步又人工的用枯草桿菌和葡萄球菌混雜於流行性乙型腦炎病毒懸液，再通過鼻腔分離病毒純種，均獲得成功。

鼻腔感染的方法非常簡單，又可以節省常規所用的抗生素，但是需要較大的感染量，根據 50% 致死量 (LD_{50}) 的分析，鼻腔內感染為 $10^{-4.5}$ ，同一材料的腦內接種為 $10^{-7.4}$ ，兩者相差接近於 1,000 倍，所以能否由病屍材料，直接用鼻腔內感染法以分離病毒，尚須應用臨床材料的試驗。

小鼠由鼻腔內感染流行性乙型腦炎病毒後，臨死前取其心血，分離病毒，得到陽性結果。又將感染的病鼠全部放血，採取肺臟用消毒鹽水洗滌至肉眼上沒有血液，製成懸液分離病毒，亦得陽性，同時肺臟的病理組織檢查，有枝氣管肺炎或間質性肺炎的變化，可以證明從肺組織分離出病毒，似乎不是毒血症的關係。

腦內感染流行性乙型腦炎的鼠肺，其中一部分也做了病理組織的檢查，18 隻鼠肺中有 15 個呈間質性肺炎，2 個肺氣腫，祇有 1 個僅僅出現充血。從以上的結果，說明流行性乙型腦炎病毒，除了主要的侵襲神經組織外，對於肺的組織細胞，也有一定程度的親和力。但經鼻腔感染後，所引起的肺部病變率，却較經腦腔內感染為低。其原因將繼續研究。

感染流行性乙型腦炎的鼠腦，其主要的病理變化，包括血管高度擴張與充血，周圍有顯著的細胞浸潤，部分的膠質細胞的增生，以及神經細胞的退變和染色質溶解等，與人類的流行性乙型腦炎的病理變化相類似^[4,5]，但沒有發現由於神經細胞的壞死溶解，形成各種形狀的軟化灶。

總 結

1. 鼻腔內感染流行性乙型腦炎病毒，從第 6 日開始出現典型的腦炎症狀，其 50% 致死量 (LD_{50}) 為 $10^{-4.5}$ 。

2. 通過鼻腔粘膜的天然保護機能，可以除去細菌，從污染的材料，分離純粹的腦炎病毒。

3. 從鼻腔感染的鼠肺和心血，均分離出腦炎病毒。

4. 肺臟有間質性肺炎或枝氣管肺炎等病理變化，並討論了流行性乙型腦炎病毒對肺組織細胞的親和力。

5. 腦炎鼠腦的病理改變，為血管高度擴張和充血，周圍有顯著細胞浸潤，膠質細胞增生，形成小結節，以及神經細胞退變和壞死等，但是各個動物並不一致，而且沒有發現軟化灶。

本文病理學的檢查承江鳴芬、孔錫鯤兩位教授協助和指導，陳新一同志協助具體工作，謹此誌謝。

參 考 文 獻

- [1] Kavamura R. (河村) *et al.*, (a) *Kitasato Arch. Exp. Med.*, **13**: 281, 1936; (b) *Arch. path.* **22**: 300, 1936.
- [2] Hashimoto H. (橋本) *et al.*, *J. A. M. A.* **106**: 1266, 1936.
- [3] Webster L. T., *J. Exp. Med.* **67**: 609, 1938.
- [4] 郭 鶴、劉彥仿, *微生物學報*, **2**: 137, 1954.
- [5] 程德成、吳中立, *中華病理學雜誌*, **1**: 94, 1955.

NASAL INFECTION WITH THE VIRUS OF JAPANESE B ENCEPHALITIS IN MICE

SHEN TING-HUNG

Department of Microbiology, Szechuan Medical College

(ABSTRACT)

The mice infected with the virus of Japanese B encephalitis. They showed, after 6 days, the typical symptoms of encephalitis, e. g. the fur ruffled, hypersensitive, tremors, convulsions, etc. The LD₅₀, which estimated by nasal instillation, was 10^{-4.5}.

The evidences of present experiment indicated, that the nasal secretions and the hairs in nose of mice could filtering out microorganisms, and the possibility to isolate the pure virus-strain from the contaminated materials by nasal instillation has been discussed.

The virus of Japanese B encephalitis recovered after nasal infection in the lung, as well as in the blood stream of infected animals.

Histopathologically, the lung of infected mice showed, interstitial pneumonia or bronchopneumonia. The brain showed: congestion and dilatation of blood vessels, perivascular infiltration, glia cell proliferation, nodules formation, and degeneration and necrose of the parenchymatous cells.

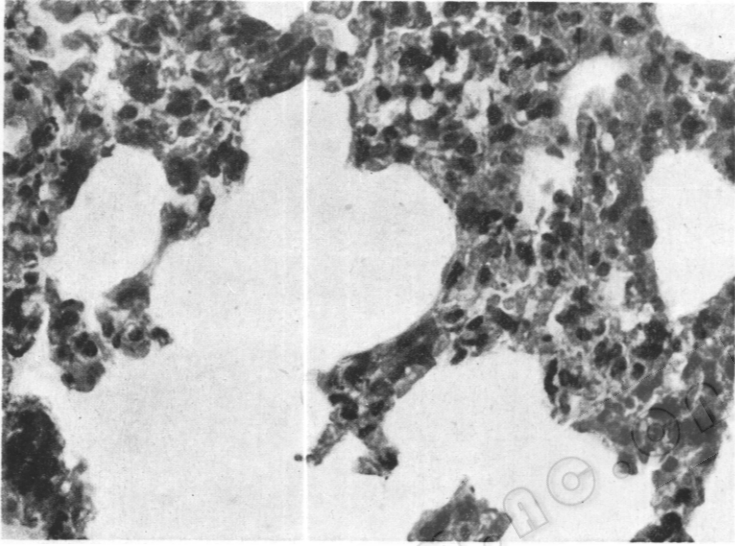


圖1 鼻腔感染流行性乙型腦炎病毒的鼠肺病變：×565 間質充血、肺泡隔增厚，水腫及炎細胞浸潤，肺有氣腫。

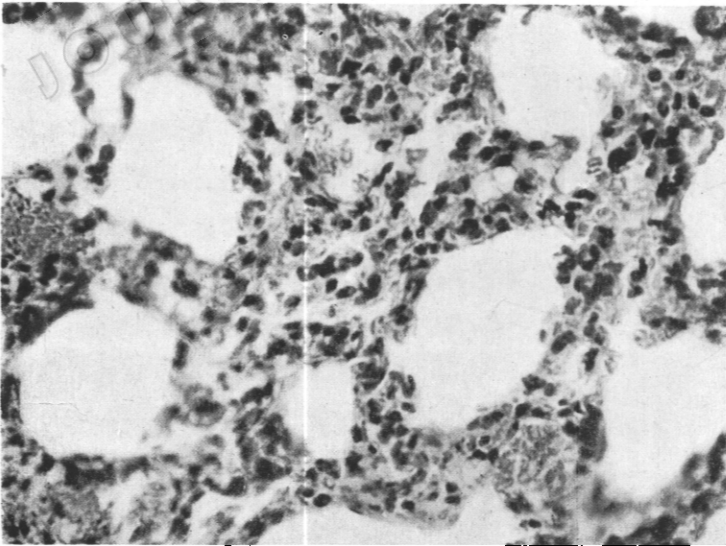


圖2 腦內感染流行性乙型腦炎病毒的鼠肺病變：×565 間質充血、變寬；有炎細胞，主要是單核細胞浸潤。