

一种新的小白鼠病毒的研究

II. 病毒的生物学性状

蕭 俊 朱 既 明

(中央生物制品研究所)

关于由小白鼠中分离的一种类似流感的病毒的经过,已于前文报告^[1]。为了进一步了解该病毒的本質,我們又对它的过濾性、血球凝集性状、动物致病范围和抗原性进行了試驗,其目的在求回答以下几个問題:(一)所分离的病原体是否确系病毒?(二)是否可能在我們的操作过程中將流感病毒或几株流感病毒的混雜物污染了小鼠或鷄胚?(三)該病毒是否可能系抗原性和致病性都發生了变异的流感病毒?(四)該病毒是否系其他已知的能在鷄胚中發育并引起血凝的病毒的一种,如腮腺炎、新城病或鷄瘟病毒?(五)該病毒是否系已知的小鼠病毒的一种,如脫脚病、小鼠肺炎(P.V.M.)或 Nigg 氏病毒? 本文报告这些試驗的結果。

材料与方法

(一) 毒种

小鼠类流感病毒:共用了5株。

EMV:从7—9克正常小鼠第一代用肉湯(pH7.2—7.4)經鼻腔滴入每只0.05毫升,三天后將小鼠殺死,取出鼠肺混合研磨制成懸液盲目進行傳遞,三代后獲得。本报告中主要用此病毒進行研究。

15MV⑨:原由流感 PR₈-15 病毒在小鼠中傳代后为小鼠类流感病毒所混雜后,再用中和試驗法与 PR₈ 病类分开后獲得,詳見另一报告^[1]。

2MV⑩:原由流感 Lee-2 病毒在小鼠中傳代后为小鼠类流感病毒所混雜后,再用中和試驗法与 Lee 病毒分开后獲得。

3MV:原由流感 FM₁-3 病毒在小鼠中傳代后为小鼠类流感病毒所混雜后,再用中和試驗法与 FM₁ 病毒分开后獲得。

4MV:原由流感 53-4 病毒在小鼠中傳代后为小鼠类流感病毒所混雜后,再用中和

試驗法与 53-4 病毒分开后獲得。

标准病毒种：共用了 11 株。

PR_A：甲型流感标准毒种。

I_{ee}：乙型流感标准毒种。

FM₁：亞甲型流感标准毒种。

53-7：于 1953 年 1 月自北京分离的亞甲型流感病毒。

以上四株均于 1953 年用雞胚尿囊液干燥保存，于 1954 年 10 月开啓，傳遞于雞胚尿囊二代后于同年 11 月冷冻保存于 -35°C 冰箱，試驗时將冷冻毒种傳遞于雞胚尿囊中。

A' 例：近年來自匈牙利分离得的亞甲型流感病毒。

B 例：近年來自匈牙利分离得的乙型流感病毒。

C 例：近年來自匈牙利分离得的丙型流感病毒。

55-2：于 1955 年从一流感患者分离，經鑒定为乙型流感病毒，傳遞于雞胚尿囊中第二代。

腮腺炎病毒：本室保存毒种。

新城病病毒：为 Doyle 氏原种，本室保存。

雞瘟病毒：本室保存的毒种。

(二) 病毒傳代及动物試驗

病毒是用肉湯稀釋 10^{-3} 接种 0.1 毫升于 10 日齡雞胚尿囊中傳代，于 35—37°C 孵育 44—48 小时后移置 0—5°C。16—18 小时后吸其尿囊液。其中含有沉淀的，用离心机每分鐘 2,000 轉沉淀 5 分鐘以去沉淀，应用的材料不应有沉淀物。

家兔及豚鼠試驗：家兔 2 只用乙醚氣傷 (2:1 比例) 麻醉后經鼻腔滴入 0.5 毫升不稀釋含病毒尿囊液。豚鼠用体重 250—300 克的 4 只，于麻醉后經鼻腔滴入 0.3 毫升不稀釋含病毒的尿囊液。飼养于隔离室中，逐日观察并測取体温。并于感染前及感染后 14 日各抽取血液分出血清，同时作血清中血凝抑制抗体的測定。

大白鼠及中國地鼠試驗：大白鼠及中國地鼠均用 5 只，于麻醉后經鼻腔滴入不稀釋的尿囊液，大白鼠每只 0.2 毫升，中國地鼠每只 0.1 毫升。飼养于隔离室中，逐日观察，14 日后抽取血液分出血清，作血凝抑制抗体的測定。

小白鼠試驗：用体重 7—9 克的小白鼠，分別經鼻腔接种 0.05 毫升，腦腔 0.03 毫升，腹腔 0.2 毫升，皮下 0.2 毫升及靜脉 0.2 毫升 (本組小鼠体重 12—14 克) 不稀釋含病毒尿囊液，每試驗用小白鼠 5 只，逐日观察，如有死亡，立即解剖，記錄內臟病变。

以上所有动物如有不死亡者則均于感染 14 日后解剖之，記錄其內臟器官的病变。

肺病变的程度以“5”、“4”、“3”、“2”、“1”、“ $1/2$ ”記之。肺全部实变而死亡者記之以“5”，全部实变而未死亡者記之以“4”，肺病变占全部肺面積的 $3/4$ ， $2/4$ ， $1/4$ ， $<1/4$ 者分別以“3”、“2”、“1”、“ $1/2$ ”記之。

(三) 鷄胚及小鼠滴定：方法詳見前文^[1]。

(四) 血球凝集試驗及血球凝集抑制試驗：方法詳見前文^[1]。

(五) 鷄免疫血清制备：方法詳見前文^[1]。

(六) 补体結合試驗：整个試驗所用的稀釋液为巴比妥緩冲液^[2]。其配制方法是將氯化鈉 (NaCl) 85 克，巴比妥 (5, 5-diethylbarbituric acid) 5.75 克，巴比妥鈉 (Sodium 5, 5-diethylbarbiturate) 3.75 克，溶于 2000 毫升蒸餾水中，再加入氯化鎂 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 1.68 克及氯化鈣 ($CaCl_2$) 0.28 克。15 磅 20 分鐘蒸汽滅菌后，pH 为 7.2—7.4，保存于 $4^\circ C$ 。用前用蒸餾水稀釋 1:5。

抗原为經尿囊腔感染的鷄胚尿囊膜，每膜加鹽水 1 毫升，冻化三次后，所得到的可溶性抗原及經尿囊腔感染的尿液抗原。

免疫血清是用經含病毒尿液感染后的小白鼠肺組織混合，研磨作成 20% 懸液，經鼻腔滴入 0.5 毫升于 250—300 克豚鼠，每星期一次，共三次。第三次感染后 1 星期抽取豚鼠血液，分出血清冷冻于 $-35^\circ C$ 冰箱中保存之。

致敏的羊血球是將洗滌三次后的羊血球制成 2% 懸液与等量含 2 單位的溶血素混合而成。

补体是用混合 5 只以上的豚鼠血清保存于 $-35^\circ C$ 冷冻冰箱，于保存期中补体效价并未降低。

本报告所作的补体結合試驗是从兩方面來作的。(1) 將抗原自 $1/2.5$ 稀釋至 $1/160$ ，每管含 0.1 毫升，每管加入 4 倍于效价的豚鼠免疫血清 0.1 毫升。(2) 將豚鼠免疫血清自 $1/5$ 稀釋至 $1/320$ ，每管含 0.1 毫升，每管加入 4 个單位的抗原 0.1 毫升。

血清与抗原混合 5 分鐘后，随即加入含 2 單位的补体 0.2 毫升。置 $0-5^\circ C$ 冰箱 16—18 小时后，移置于 $37^\circ C$ 冰箱 5 分鐘，加入致敏羊血球 0.2 毫升，再置于 $37^\circ C$ 水箱半小时，讀結果。以“4”表示血球完全未溶化。而以呈現“2”之管的稀釋度作为补体結合試驗之效价。

試驗結果

(一) 過濾試驗及無菌試驗

取 EMV 病毒的第四代尿囊液，用等量 pH 7.4 的肉湯稀釋后于每分鐘 4,000 轉离

心 30 分鐘, 然后吸取其上清液 10 毫升, 用濾孔平均直徑为 750 毫微米的火棉膠膜過濾, 取濾液 5 毫升再經濾孔平均直徑为 250 毫微米的火棉膠膜過濾。收集原尿囊液, 离心后的上清及二次濾液, 作無菌試驗, 測定血凝效价, 于雞胚尿囊腔中滴定感染效价, 并用不稀釋材料接种 0.05 毫升于小白鼠鼻腔和另一批小鼠左腿脚掌內, 其結果見表 1。

表 1 EMV 過濾試驗及無菌試驗結果

材 料 种 类	無 菌 試 驗	血 凝 效 价	雞 胚 ID_{50} ($-\log$)	小 鼠	
				鼻 腔	脚 掌
原尿囊液	—	5120		5/5	+
离心上清液	—	640	8.3		
750 毫微米濾液	—	20	7.5	5/5	
250 毫微米濾液	—	<1	<1	0/5	—

注: 1. 無菌試驗每種材料用血斜面, 貝瓦氏硫乙醇酸鉍肉湯, 半固體各二管, 每管接种 0.2 毫升, 35—37°C 培育 7 日后观察結果, 另各接种沙氏斜面二管, 于 25—28°C 室溫培育 7 日后观察結果。

2. 血凝效价以倒数表示之, 如 5120 即 $1/5120$, 以后表中同。

3. ID_{50} 以 $-\log$ 表示如 8.3 即 $ID_{50}=10^{-8.3}$, 以后表中同。

4. 小鼠鼻腔接种后的死亡以分数表示, 分母为接种鼠数, 分子为死亡鼠数。

5. 小鼠脚掌接种后“+”表示于接种后 3—6 日内脚背有腫脹, 于 7—10 日内逐漸消退。

由表 1 的材料中, 可知病毒材料的需氧及厭氧培养皆为陰性, 此外曾將尿囊液病毒作直接塗片, 用美藍及 Macchiavello 氏染色法, 均未观察到細菌或病毒原始体。血球凝集效价及雞胚感染效价于濾过 750 毫微米的火棉膠膜后均略有下降, 接种于小白鼠鼻腔后均能使小鼠得肺炎致死。于濾过 250 毫微米以后, 則血凝、雞胚及小鼠感染力均已消失。由此可以确定尿囊液中的病原体确系病毒, 按照 Elford 氏的計算方法^[3], 其大小(直徑)約在 150—500 毫微米之間。一般說來, 血凝与感染效价大致上是平行的。

另一点可注意的是將濃尿囊液病毒接种于小鼠脚掌后, 于 3—6 日間出現腫脹, 主要在脚背部分, 但于 7—10 日内即逐漸消失, 小鼠無其他症狀。接种 250 毫微米濾液者, 則未發現此种現象。將接种后第四日腫脹的脚掌磨碎后接种第二代小鼠, 未再發現脚掌腫脹現象。

(二) 动物感染范围

1. 雞胚感染:

絨毛尿囊膜上接种——將 EMV 尿囊液病毒作 10^{-3} 至 10^{-7} 稀釋, 每个稀釋度接种 0.2 毫升于 4 个 13 日齡的雞胚尿囊膜上, 接种方法如 Beveridge 及 Burnet 所描

述^[4]，于 35°C 培育 3 日后，观察結果。

接种 10⁻³—10⁻⁴ 的病毒材料的雞胚的絨毛尿囊膜略厚并顯云雾狀的混濁，个别雞胚尿囊膜顯示水腫，但在所有的稀釋度中均未观察到明顯的痘狀病灶，僅个别雞胚的尿囊液能凝集紅血球。

尿囊腔接种——將 EMV 尿囊液病毒稀釋为 10⁻³，接种 0.1 毫升于 6 个 9 日齡的雞胚尿囊腔中，培育于 35°C，逐日观察，于 7 日后啓开观察雞胎有無病变，并取尿囊液測定血凝效价。

接种后僅有一个雞胚于第 7 日死亡，其余均生存，但有 2 个雞胎發育得顯著不良，另有 2 个雞胎（包括一个死胎）下腿及爪部發紅，但腦內及全身并無出血性病變。尿囊液的滴度各为：1400, 3200, 5120, 2680, >10,240, >10,240。又 EMV 尿囊液在雞胚尿囊腔滴定，能达 10⁻⁹。

卵黃囊接种——將 EMV 尿囊液病毒稀釋为 10⁻³，接种 0.2 毫升于 6 个 6 日齡的雞胚卵黃囊中，培育于 35°C，逐日观察，于 4 日后啓开，取出卵黃囊塗片用 Macchiavello 氏法染色鏡檢并将研磨后的 10% 卵黃囊懸液及尿囊液測定血凝。

6 个雞胚中于 1 日內死亡 2 个，第 3 日死亡 1 个，其余 3 个于第 4 日啓开时雞胚發育顯著不良，尿囊液中及卵黃囊懸液中均可測出血凝，卵黃囊塗片中未观察到原始体。

对成年雞的致病力——在制造免疫血清时，曾用三株病毒 (EMV, 12MV^③, 15MV^④) 的尿囊液注射萊亨雞靜脉 2 毫升，腹腔 8 毫升。所有雞于 10 日內均健康無病，由此証明本病毒对雞不致病。

2. 对小白鼠的致病力：

將傳遞于雞胚尿囊中第三代不稀釋的 EMV 病毒的尿囊液分別經鼻腔、腦腔、腹腔及皮下接种于 7—9 克重小白鼠，另靜脉接种于 12—14 克重小白鼠，結果如表 2。

表 2 EMV 各种不同感染途徑对小白鼠的致病力

感染途徑		感染剂量 (毫升)	死亡鼠数 / 感染鼠数	死亡时期 (感染后天数)	肺部病变				
鼻	腔	0.05	5/5	3—6	D ^o , D ^o , D ^o , D ^o , D ^o				
腦	腔	0.03	5/5, 5/5	3—7	[D ^o , D ^o , D ^o , D ^o , D ^o]				
腹	腔	0.2	4/5, 2/5	5—7	[D ^o , D ^o , D ^o , D ^o , L ^o]				
靜	脉	0.2	5/5, 4/5	5—7	[D ^o , D ^o , D ^o , D ^o , L ^o]				
皮	下	0.2	0/5	—	L ^o , L ^o , L ^o , L ^o , L ^o				

注：1. 若有重复試驗时，則其結果均列入本表。
2. 表中 D 表示死亡，L 表示生存，数字表示肺部病变。以后表中同。

表 2 所示的結果除皮下接種小鼠不致病外，經其他途徑接種的小鼠均可被感染且有死亡，感染至死亡期間較長，一般于感染后 3—7 天死亡，死前一般症狀為聳毛，背彎，不活動，不食。經鼻腔感染之小白鼠除上述一般症狀外，尚可聞見羅音，經解剖觀察肺病變証明系得典型肺炎致死。在另一試驗中如表 3 証明虽稀釋至 10^{-6} 之尿囊液亦可經小鼠鼻腔感染而得典型肺炎致死。而經腹腔感染的小鼠于感染后 4—5 日所有感染小鼠

表 3 EMV 尿囊液經小白鼠鼻腔感染的 ID₅₀ 測定

病 毒 稀 釋 度	小 鼠 檢 查 及 肺 部 病 變					ID ₅₀
10-3	D°	D°	D°	D°	D°	6.74
10-4	D°	D°	D°	D°	D°	
10-5	D°	D°	D°	D°	D°	
10-6	D°	D°	D°	L ⁴	L ²	
10-7	L ²	L ²	L ¹	L ^{1/2}	L ^{1/2}	
10-8	L ^{1/2}	L ^{1/2}	L°	L°	L°	
10-9	D°	L ¹	L°	L°	L°	
10-10	L°	L°	L°	L°	L°	

均呈上述一般病狀，于接種 5—7 天后死亡，解剖觀察有 2 只小白鼠肺部有散在性病變，胸腔積水，肝脾及腎呈淺褐色，腹腔具有極黏稠棕黃色液體；未死亡者能逐漸恢復正常。經靜脈接種者于接種后 5—7 日死亡，感染后無以上所述一般症狀表現，直至死前 1—2 天小鼠四肢已呈癱瘓狀態時，毛仍光滑如正常小鼠，重復靜脈接種 5 只小鼠，其中有 4 只于感染后第 5 日死亡，死前未觀察到症狀；解剖觀察肺部均為散在性病變，其中有一小鼠胸腔積水，肝脾及腎等臟器肉眼不見病變。經腦腔注射之小鼠除一般症狀外，在臨死前做迴旋試驗有四肢抽搐症狀，強直痙攣而致死。解剖觀察臟器肉眼不見病變。

將經腦腔注射而死亡的鼠腦作成約 10% 懸液，經腹腔注射而死亡小鼠的肝脾混合作成約 10% 懸液并取腹腔的粘稠液體，經靜脈注射而死亡小鼠的肝脾混合作成約 10% 的懸液，個別与 0.5% 鷄血球作直接血凝試驗，用血斜面作無菌試驗培育于 37°C 孵箱 72 小时看結果，并接種鷄胚，結果如表 4。

表 4 各種感染臟器懸液及分泌物的無菌試驗，直接血凝，鷄胚尿囊感染力及第二代接種小鼠結果

途 徑	鼠号及器官	無 菌 試 驗	直 接 血 凝	接種鷄胚后尿囊液之血凝效价	第二 代 接 種 小 鼠
腦 腔	1 腦	—	++++	240	0/4
	2 腦	—	++++	1120	
	3 腦	+	++++	1280	
靜 脉	2 肝脾	—	—	—	
	2 肺	++++	—	1280	
	3 肝脾	—	—	160	
	3 肺	+++	—	960	
腹 腔	1 肝脾	—	—	640	0/4
	1 肺	++	—	640	
	1 腹腔黏液	—	—	1280	

上表說明鼠腦組織懸液的直接血凝及接種雞胚后之尿囊液的血球凝集均為陽性，并且將表 4 中的經腦注射而死亡的 3 只鼠腦懸液混合，在雞胚中滴定能達到 10^{-5} 。除經靜脈注射而死亡的小鼠中有一只小鼠的肝脾直接血凝及接種雞胚后尿囊液均為陰性外，其他經靜脈及經腹腔注射而死亡小鼠的肝脾及肺組織懸液直接血凝均為陰性，但接種雞胚后之尿囊液的血球凝集均為陽性。在另一次試驗中經靜脈及經腹腔注射而死亡的小鼠中各有一只的肝臟直接血凝及接種雞胚后的尿囊液的血球凝集均為陽性。接種雞胚后之尿囊液的血球凝集現象均為 EMV 的雞免疫血清所抑制。無菌試驗結果除肺組織有菌生長外（鼠肺本有細菌），其他組織均無菌生長。由此可以証實小鼠除肺組織能被該病毒感染外，腦、肝、脾等組織亦能被此病毒所侵襲。若將腦腔感染后死亡的小鼠的腦組織或腹腔感染后死亡小鼠的肝脾作成約 10% 懸液再分別接種于小鼠腦腔及腹腔，小鼠在接種后無病狀出現，至 14 日后仍沒有死亡，解剖觀察內臟肉眼均不見任何病變，關於此點可能系感染組織懸液所含之病毒量較少，還不能使小鼠受染之故。*

3. 对家兔、豚鼠、大白鼠、中國地鼠的致病力：

將傳遞于雞胚尿囊中三代的不稀釋的 EMV 病毒尿囊液經鼻腔感染家兔、豚鼠、大白鼠及中國地鼠，結果如表 5。

表 5 EMV 对家兔、豚鼠、大白鼠、中國地鼠的致病力

动 物	感染途径	感染剂量 (毫升)	死亡数/感染数	死亡时期 (感染后天数)	动物检查及肺部病变
家 兔	鼻 腔	0.5	1/2, 0/2	9	D ^a L ¹ L ¹ L ¹
豚 鼠	鼻 腔	0.3	0/4	-	L ^a L ² L ² L ¹
大 白 鼠	鼻 腔	0.2	1/5	7	D ^a L ² L ¹ L ^{1/2} L ^{1/2}
中國地鼠	鼻 腔	0.1	3/5	5	D ^a D ^a D ^a L ^a L ^a

家兔經感染后，不見任何症狀，体温亦無顯著升高。但有一只家兔于感染后 8 日体温升至 40.6°C ，次日即死亡，解剖觀察肺部有少数散在性病變，肺組織懸液直接血凝均為陽性，但滴定效价小于 $1/2.5$ ，接種雞胚后尿囊液血凝為陰性，因此該兔死亡原因不明。重复試驗結果家兔感染后無死亡，体温亦沒有顯著上升，解剖觀察肺病變均為散在性。

豚鼠經感染后不見病狀，次日体温升高至 40°C 以上，第三天驟退，一星期后体温又稍有升高，但無死亡。解剖觀察肺部有嚴重程度不一致的散在性病變。

* 在另一次試驗中，曾將 EMV 尿囊液作 10 倍稀釋，自 10^0 — 10^{-5} ，各注射 0.2 毫升于 5 只小鼠腹腔中。于觀察期中僅在注射不稀釋的病毒的一組中，有一只小鼠死亡，另 3 只于發病后恢復，症狀及解剖所見同前。取死亡小鼠的肝脾磨成 10% 懸液再接種 5 只小鼠，無一發病者。由此証明只有于腹腔注射的病毒量很大時始能使小鼠致死，且不能傳遞給下一代。但由于病毒能在內臟中找到，且潛伏期亦較長，故我們的初步意見認為小鼠系由于感染致死，并非由于中毒致死，確實的情況尚待進一步的試驗加以闡明。

大白鼠經感染后,有一只于感染 5—6 日后,不活动,于 7 日死亡,解剖观察肺全部有散在性病变,將肺組織作直接血凝及接种鷄胚結果均为陰性。其余 4 只不見症狀,解剖观察肺部有極少数散在性病变。

中國地鼠經感染后 5 日有 3 只死亡,死前症狀为聳毛,弯背,不活动,兩眼不睜开,解剖观察全肺实变。未死亡地鼠解剖肺部無病变。將死亡地鼠肺取出作直接血凝及接种鷄胚尿囊結果均为陽性,尿囊液效价达 $1/480$ 。

总结以上四种动物,中國地鼠最易感,表現症狀及肺部实变,且可自肺分离得病毒,而其他三种动物除豚鼠呈现体温升高外,沒有其他症狀表現,在肺中均有散在性病变。

將家兔及豚鼠感染前后之血清及大白鼠、中國地鼠感染后之血清(大白鼠、中國地鼠感染前未獲得血清,因此以正常大白鼠及正常地鼠的血清代替了感染前的血清)作血球凝集抑制試驗,其結果如表 6。

表 6 四种动物感染前后对 EMV 之血凝抑制抗体效价

动 物	家 兔	豚 鼠	大 白 鼠	中 國 地 鼠
动物标记	4096 4185 4402	7961 7962 7963 7964	1 2 3 4 5	1 2 3 4 5
感染前血清血凝抑制抗体效价	<5 <5 <5	<10 <5 <5 <5	<10 <10 <10 <10 <10	<5 <5 <5 <5
感染后血清血凝抑制抗体效价	120 180 20	40 960 <10 60	160 320 80 160 —	320 480 — — —

注:“—”表示感染后动物死亡,未取得血清。

由表 6 可看出所有感染后的动物血清中血凝抑制抗体均有顯著增加,証明該病毒除对小白鼠致病外,对家兔、豚鼠、大白鼠、中國地鼠均能引起顯性或隱性的感染。

4. 豚鼠群中的自然感染:

在我們用补体結合試驗來分析 EMV 的抗原关系时,由抗原的对照組中(即未加免疫血清組)發現 EMV 鷄胚尿膜抗原及尿液抗原对补体(第一批补体)有抗补体作用(表 7)。

表 7 补体結合試驗的抗原对照結果

补 体	EMV 抗 原	抗 原 稀 釋 度				
		1	2.5	5	10	20
第 一 批	尿 膜	4	4	4	4	±
	尿 液	4	4	4	4	±
第 二 批	尿 膜	—	—	—	—	—

注:“4”表示血球完全未溶化。

“—”表示血球完全溶化。

“±”表示血球極少数未溶化。

由表 7 結果看出不論是 EMV 的尿膜抗原或尿液抗原, 对第一批补体均有抗补体现象, 抗补体效价且能达 $1/10$ — $1/20$ 。我們考慮到該抗原抗补体的原因可能有兩点: 第一, 病毒体本身的抗补体作用。第二, EMV 抗原中存在的其他組織成分的抗补体作用。但当我们換用另一批补体(第二批补体, 与第一批补体所用的豚鼠不是同一來源) 來進行試驗时, 即完全不顯任何抗补体作用。用不同批抗原重复試驗时亦得到完全相同的結果。由于用兩批补体所得的結果是不一致的, 顯然不是由于抗原中有抗补体物質的緣故。因此使我們考慮到 EMV 抗原的抗补体作用是由于作为第一批补体的豚鼠血清中含有对 EMV 病毒的抗体, 其与 EMV 抗原作用时必然会呈現陽性的結果, 而非抗原真实的抗补体作用。随后我們用第一批补体加温 56°C 半小时滅活当作豚鼠免疫血清, 自 $1/2.5$ 稀釋至 $1/80$, 仍用上述 4 个單位的 EMV 尿膜抗原, 每管加入 0.1 毫升。再加入 2 單位第二批的补体 0.2 毫升, 置 $0-5^{\circ}\text{C}$ 冰箱 16—18 小时后加入致敏羊血球, 証明作为第一批补体的血清中确含有对 EMV 可溶性抗原的抗体, 效价达 $1/10$ 。在另一方面还進行了血凝抑制試驗, 結果証明作为第一批补体的血清中的血凝抑制抗体达 $1/80$ 。

于是我們自采取第一批补体的豚鼠群中選擇了飼养在一起的 10 只豚鼠, 分別用补体結合試驗及血凝抑制試驗測定其血清中的可溶性抗原的补体結合抗体及血凝抑制抗体, 結果如表 8。

表 8 10 只豚鼠血清中的可溶性抗原的补体結合抗体及血凝抑制抗体之測定

豚 鼠	补体結合抗体效价	血凝抑制抗体效价
1	<1	7
2	15	160
3	4	20
4	>40	160
5	5	15
6	1	10
7	7	240
8	6	15
9	15	15
10	15	160

由表 8 証明这 10 只豚鼠的血清中含有对该病毒可溶性抗原的补体結合抗体及血凝抑制抗体, 且基本上兩者是平行的。由此可見, 該病毒可能在豚鼠中引起了自然感染。

(三) 血球凝集性状:

1. 血球凝集範圍:

所有血球的凝集試驗是应用作者之一曾經做的方法^[5]。血球濃度为 1%。除加入

雞血球及鴿血球的試管置室溫 (18°C) 30 分鐘後讀結果外, 其餘皆于室溫下 90 分鐘後讀結果。結果如表 9。

表 9 不同動物血球與 EMV 的血球凝集效價

血 球	血 凝 效 價	血 球	血 凝 效 價
雞	1120	綿 羊	280
鴿	320	山 羊	120
人	320	豚 鼠	320
馬	<10	地 鼠	<10
牛	400	小 白 鼠	?
		家 兔	?

由表 9 看出該病毒對雞血球凝集效價最高, 鴿、人、牛、綿羊、山羊、豚鼠血球凝集效價次之, 而與馬及地鼠血球凝集效價 <10, 小白鼠及家兔血球本身有自家凝集, 因此結果不能肯定。

2. 血凝受溫度時間及震盪的影響:

將 EMV 病毒由 $1/10$ 稀釋至 $1/2560$, 用相同方法分成三排, 每管 0.25 毫升, 每管加入 1% 雞血球 0.25 毫升後分別置于 4°C 、室溫 (18°C) 及 37°C 培育箱中, 在 30 分鐘及 60 分鐘後讀結果。再將試管震盪使管底的血球搖起, 再分別置于不同溫度, 30 分鐘後讀結果。然後再震盪一次, 置不同溫度 30 分鐘後再讀其結果。結果如表 10。

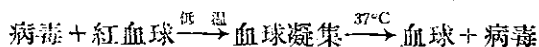
表 10 EMV 血凝于不同溫度、時間及震盪後的效價

時 間	4°C	18°C	37°C
30 分鐘	1120	640	320
60 分鐘	800	640	80
震盪後結果	1280	640	<10
再震盪後結果	1280	640	<10

由表 10 得出, 血凝于 4°C 時效價達最高, 18°C 次之, 37°C 較低, 時間及震盪的影響對於在 4°C 及 18°C 的血凝影響極少, 而在 37°C 時, 60 分鐘後讀取的效價較 30 分鐘顯著降低, 經震盪後則不復能觀察到凝集效價。

3. 吸附及游離:

當紅血球與流感病毒混合時, 第一步是病毒吸附在紅血球表面上, 紅血球聚合而凝集, 第二步病毒則離開紅血球表面而游離出來^[6]。病毒吸附于紅血球致發生凝集現象一般在低溫下進行, 而病毒之游離現象一般在 37°C 時進行。



將 EMV 病毒于 4°C 冰箱使之吸附于雞血球, 血球濃度為 2%, 各于吸附不同時間

离心吸取上清，测定血凝效价。

游离试验是将该病毒于 4°C 冰箱吸附 4 小时后取上清^[样 1]，用冷盐水洗涤血球一次取洗液^[样 2]，上清及洗液均留作血凝效价测定，洗后之血球内加入与原量相等的盐水，混匀分子 3 小试管内置 37°C 水箱，于 10 分钟^[样 3]、1 小时^[样 4]、4 小时^[样 5] 后各取一管沉淀，取上清，所有样本同时测定其血凝效价，结果如表 11a、b 或图 1。

表 11a EMV 的吸附试验

吸 附 时 间	上清血凝效价
原 尿 液	1280
1 小时 后	660
4 小时 后	320
24 小时 后	320

表 11b EMV 的游离试验

样 本	游 离 时 间	上 清 血 凝 效 价
原尿液		1280
[1]	吸附后上清	320
[2]	洗液	140
[3]	10 分钟后	640
[4]	1 小时 后	640
[5]	4 小时 后	640

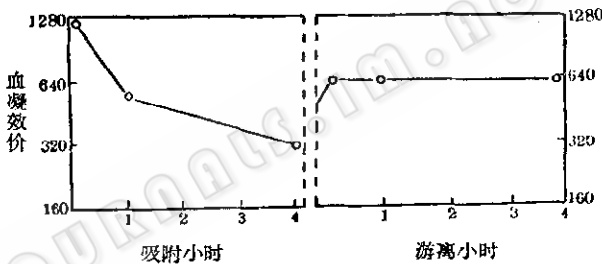


图 1 吸附及游离曲线

由表 11a、11b 看出，该病毒的血凝素能吸附于鸡血球上，于 4 小时吸附已达最高。吸附鸡红血球后放 37°C 病毒亦能从鸡血球上迅速游离，10 分钟后上清液中的效价即到达 640，继续放 37°C 1—4 小时游离的血凝素不再增加。

4. 受体关系：

当病毒从红血球游离出来后，病毒保留其原来之全部性质，但红血球则发生改变，不能再与原来之病毒起凝集。此种作用曾被解释为病毒上的酶作用于血球之受体而受体被破坏所致^[6]。Burnet 氏^[7]更进一步观察到被新城病毒处理后之红血球不能与新城病毒及腮腺炎病毒起凝集，但能与流感病毒起凝集。又观察到被腮腺炎病毒处理后之血球，不能与本病毒凝集，但能与新城病及流感病毒起凝集。因此看出受体被破坏之程度似有不同，有一定之顺序或称之为受体阶。上述之三病毒可排列为腮腺炎病毒、新城病毒及流感病毒。在此受体阶中被前者处理之血球能被后者所凝集，但不被其本病毒及其前面的病毒所凝集。流感中各型株也可排列成受体阶。至于霍乱滤液中的

受体破坏酶(RDE)則能破坏一切流感、新城病及腮腺炎病毒之受体。

我們測定 EMV 病毒在雞紅血球上与其他流感病毒之受体关系是按照 Burnet 氏等方法^[7], 但略加改变:

- (1) 含病毒尿液加入雞紅血球后在 37°C 作用 4 小时——原法作用 2 小时。
- (2) 經处理后血球的不穩定性是用雞免疫血清使之穩定——原法用雪貂免疫血清。
- (3) 用的是雞血球——原法用人血球。

操作方法如下:

(1) 4 毫升含病毒不稀釋尿囊液加 1 毫升的 10% 雞血球(即血球濃度为 2%)。置 37°C 水箱 4 小时(每隔 1 小时搖一次, 共搖二次), 后自 37°C 水箱將試管取出, 去上清, 加 10 毫升鹽水洗滌一次后加入生理鹽水 5 毫升(血球濃度为 2%) 混勻即成处理后血球。

(2) 將处理后血球各取 0.5 毫升分为二管, 每管 0.25 毫升, 一管加入 0.25 毫升含 16 單位本病毒, 另一管加 0.25 毫升鹽水, 結果除經 C 病毒处理的血球外, 經其他病毒处理的血球兩管皆仍有凝集現象, 表示除經 C 处理的血球外, 經其他病毒处理的血球均不穩定。

(3) 于不穩定的血球中加入等量 4 倍于血清效价的特异雞免疫血清(經 55-2 病毒处理的血球加入 8 倍于血清效价的 55-2 雞免疫血清) 置室温作用 30 分鐘后, 去上清, 加 2 倍于原量的生理鹽水洗滌一次, 以洗去剩余的免疫血清, 再加鹽水至原量, 經免疫血清处理后的血球均穩定。

(4) 將 16 單位各病毒 0.25 毫升分別与穩定后血球 0.25 毫升作直接血凝, 結果如表 12。

表 12 EMV 与其他流感病毒的受体关系

用作处理血球的材料	試驗病毒(16个血凝單位)						鹽 水 对 照
	C	FM ₁	Lee	55-2	PR ₀	EMV	
鹽 水	4	4	4	4	4	4	—
C	—	4	4	4	4	4	—
FM ₁	4	—	—	4	4	4	—
Lee	4	—	—	4	4	4	—
55-2	4	—	—	—	4	3	—
PR ₀	4	—	—	4	—	—	—
EMV	4	4	4	4	±	—	—
霍乱濾液	—	—	—	—	—	—	—

注: “4”表示血凝程度与經鹽水处理的血球血凝一样。

“3”表示稍微弱。

“—”表示血凝陰性。

表 12 証明 EMV 与其他流感病毒的受体关系如下：

(1) 用該病毒处理鷄血球不能破坏 FM₁、Lee、55-2 及 C 甸的受体，反之經 FM₁、Lee、55-2 及 C 甸处理的鷄血球亦不能破坏該病毒的受体。故在受体的关系上該病毒与 FM₁、Lee、55-2、C 甸均不相关。

(2) 用該病毒处理鷄血球能破坏本身及 PR₈ 的受体，反之經 PR₈ 处理的鷄血球亦能破坏該病毒的受体。但 PR₈ 还能破坏 FM₁、Lee 之受体，而該病毒則不能破坏 FM₁、Lee 受体。故該病毒与 PR₈ 有一定的受体关系，但并不完全相同。

(3) 經霍乱濾液处理的血球能破坏該病毒的受体。表示在受体关系上属于或近于流感病毒一类。

总之由以上的受体关系看来，并不能排列成一定的受体階 (Receptor gradient)，但在受体关系上，EMV 似与 PR₈ 較接近。

5. 血凝素的穩定性及正常兔血清，小鼠血清及鷄蛋白对其紅血球凝集的抑制，EMV 的血凝素对于温度是極不穩定的，詳見表 13。

表 13 加温对 EMV 血凝素的影响

温 度	血 凝 效 价
未加温前	960
45°C 30 分鐘后	10
46°C 30 分鐘后	5
47°C 30 分鐘后	2
48°C 30 分鐘后	<1

由表 13 可以看出該病毒的血凝素对热是極敏感的，加热 48°C 以上，則完全失去血凝。此点是与流感病毒血凝素的穩定性不同的^[8]。

由試驗發現該病毒对紅血球的凝集力不为正常家兔，小白鼠血清以及鷄蛋白所抑制。

(四) 小鼠类流感病毒相互間的抗原关系及与其他病毒的抗原关系：

1. 血球凝集抑制試驗：

以下試驗中，用下列 16 株病毒進行，紅血球凝集抑制試驗，以分析其間的抗原关系：EMV、15MV⑨、2MV③、3MV、4MV 五株小鼠类流感病毒，PR₈、Lee、FM₁、53-7、A' 甸、C 甸、55-2、腮腺炎、新城病及鷄瘟病毒。

其中 15MV⑨、2MV③、3MV、4MV 为本室于不同时期在流感毒种通过小鼠时所獲得的小鼠类流感病毒。其所以要包括于本試驗中，乃系观察这些以前認為是流感病

毒經過小鼠傳代而獲得的变异毒种的抗原是否与本报告在正常小鼠所分离的 EMV 的抗原相同。

結果如表 14a、表 14b 所載。

表 14a EMV 与其他小鼠类流感病毒在血凝抑制試驗上之相互关系

雞 免 疫 血 清	病 毒				
	EMV	15MV⑨	2 MV③	3MV	4 MV
抗 MMV	1280	1280	1280	1920	1280
抗 15 MV⑨	40	40			
抗 2 MV③	480		320		
抗 3 MV	320			480	
抗 4 MV	480				320

除 EMV 以外的各小鼠类流感病毒間之交互血凝抑制試驗已經另有报告^[1]，証明均系一致，故未重复。

表 14b EMV 与各其他病毒在血凝抑制試驗上的关系

雞免疫血清	病 毒											
	PR ₈	Lee	FM ₁	53	A' 甸	B 甸	C 甸	55-2	腮腺炎	新城病	雞瘟	EMV
抗 PR ₈	640											<10
抗 Lee		320										<10
抗 FM ₁			2240									<10
抗 53				2240								<10
抗 A' 甸					640							<10
抗 B 甸						120						<10
抗 C 甸							>1280					<10
抗腮腺炎									640			<10
抗EMV	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	960

其关系可总结如下:

(1) EMV = 15MV⑨ = 2MV③ = 3MV = 4MV。

(2) EMV 与 PR₈、Lee、FM₁、53-7、A' 甸、B 甸、C 甸、腮腺炎病毒的抗原性完全不同。至于乙型流感病毒 55-2、新城病病毒和雞瘟病毒，則由于我們沒有这三种病毒的免疫血清，故僅能將这三个病毒与 EMV 的免疫血清作試驗，結果完全陰性。

2. 补体結合試驗：用血球凝集抑制試驗只能分析出株的抗原关系，为了更進一步分析 EMV 病毒在型的抗原性上与甲型及乙型流感的抗原关系，因此我們用了甲型及乙型，EMV 的豚鼠免疫血清及經冻化三次的尿膜抗原作补体結合試驗，方法在前述方法中已提及，結果亦証明了該病毒与甲型，乙型流感在可溶性抗原上亦無型的抗原关系存

在(表 15a、表 15b)。

表 15a EMV 与甲型, 乙型流感病毒在可溶性抗原上的关系

豚鼠免疫血清	可溶性抗原效价		
	A	B	EMV
抗 A	80	<2.5	<2.5
抗 B	<2.5	30	<2.5
抗 EMV	<2.5	<2.5	30

注：本表系稀释抗原，定量血清。

表 15b EMV 与甲型, 乙型流感病毒在可溶性抗原上的关系

可溶性抗原	豚鼠免疫血清效价		
	抗 A	抗 B	抗EMV
A	120	<5	<5
B	<5	120	<5
EMV	<5	<5	120

注：本表系稀释血清，定量抗原。

討 論

以上二篇报告中詳細敘述了“小鼠类流感病毒”的發現經過及其性状,除了从正常二号鼠种中分离的一株以外, 总计先后共有五株流感病毒在小鼠傳代过程中为此种病毒所污染。这五株病毒中的四株傳代时所用的鼠种均为一号种, 僅有一株 (Lee-2) 于傳代后期可能使用过二号种, 在用正常小白鼠盲目傳代的試驗中, 我們僅从二号种中分离了这种小鼠病毒, 但是由于我們于使用二号种以前, 至少已有四株流感病毒在一号鼠种中傳代而为这种病毒所污染, 而且所獲得的病毒的抗原性与自二号正常小鼠中所分离的病毒是完全一致的, 故可以間接的确定两个鼠种必然都携帶有該病毒, 只是在一号鼠种中, 在正常小鼠盲目傳代試驗的过程中, 先發現了一种类似 Nigg 氏病毒的路原体, 致使傳代無法繼續進行而已。必須指出这两个鼠种的飼养場所虽然是分开的, 但在飼料及其他方面并未能做到徹底隔离, 而且迄今为止, 已經發現二个鼠种中均携有脫脚病和大头病(可能为胸膜肺炎菌所致的一种疾病)。

根据以上的研究結果, 虽然对小鼠携帶本病毒的情况, 已經大致上沒有疑問。但由于小鼠久已为流行性感胃研究工作者所采用的实验动物, 何以这种病毒在过去从未被發現过, 或至少在文献中从未見有报告呢? 是否可能有其他理論上或技術上的問題存在而導使我們得出一个不正确的結論呢? 关于这个問題, 將分几方面來逐一加以討論。

(一) 关于所分离的路原体是否确系一种病毒的問題——由于含有病原体的尿液的需氧和厭氧培养均未觀察到細菌生長, 塗片亦未觀察到細菌, 通过濾孔平均直徑 750 毫微米的火棉膠濾膜后的濃液仍能引起血凝, 并能感染鷄胚和小鼠, 都可以确实証明它确系一种病毒。

(二) 該病毒是否可能系實驗室中的毒种污染小白鼠或鷄胚的結果——我們曾自正常小鼠体中通过遞續傳代而分离了本病毒, 在操作过程中都特別注意到實驗室中流

感病毒混入的可能，因此在动物室和器械方面完全分开。此外并已充分証明本病毒的性質与實驗室中任何一个流感病毒的性質完全不符，亦不可能为几株流感病毒的混雜物，因此可以除掉由實驗室混入流感病毒的可能。至于鷄胚本身帶有病毒的可能，在文獻上曾經报告的只有新城病病毒，而本病毒并非新城病病毒，此点將于以下論及。此外，我們在正常小鼠的傳代試驗中，曾不通过鷄胚而由鼠肺懸液中直接观察到血球凝集，且此种血球凝集亦为小鼠类流感病毒 (EMV) 的免疫血清所抑制，說明本病毒的來源不可能与鷄胚有关。值得特別注意的是在数年工作中，我們从未从正常尿囊液中观察到血球凝集現象，單純在鷄胚中傳代的流感病毒种，亦从未發現为其他病毒所污染的情形。至于由試驗室中的流感病毒直接感染繁殖的鼠种的可能，亦是不存在的，因为一号和二号鼠种的飼养場离我們的試驗室有数十里之远，中間沒有任何直接接触，試驗用的小鼠均系于前一日或当日始运送到試驗室中使用的。

(三) 流感病毒發生变异的可能——原來是我們在試驗初期考慮較多的一点。但是后来由五个不同的流感毒种(包括甲、乙兩型)均分离了同一的病毒，又由正常鼠体中亦分离了同一病毒，繼續研究的結果又証明小鼠病毒虽然与流感病毒在表面上有若干相似之处，但在致病性和抗原性上是与我們實驗室中所有的流感病毒株截然不同的，因此很容易排除病毒变异的可能性。

(四) 本病毒与其他病毒的鑒別問題。

1. 与腮腺炎病毒的鑒別：首先是分离來源不同；在致病范围方面，腮腺炎病毒不能感染普通試驗室动物；除特殊的适应种以外，腮腺炎病毒一般只能在鷄胚羊膜腔中發育，不能在尿囊腔中發育；此外已經証明这两个病毒中間的抗原性是完全不同的。

2. 与新城病和鷄瘟病毒的鑒別：分离來源不同；除特殊的适应株以外，新城病和鷄瘟病毒对小白鼠的致病力極弱，但对鷄的致病力很强，感染后的鷄胚一般于 2 日以后开始死亡并呈特殊的病变；本病毒則对小鼠及其他齧齒动物的致病力强，对鷄不致病， 10^{-3} 接种后的鷄胚經孵育 7 日后仍然大部生存。此外它們中間亦無抗原性的关系。

3. 与脫脚病毒的鑒別：脫脚病毒于注射小鼠皮下或腹腔均能致病且引起典型的內臟病变和包涵体，很容易傳遞給下一代；注射小鼠脚掌后引起坏死与脫落；在鷄胚尿膜上形成明顯的病灶，而在尿囊腔中則發育不好；这些点都是与本病毒不相符的。特別需要提到本病毒于大量注射腹腔后能使部分小鼠死亡，但死亡后的內臟中未見有包涵体，且肝脾懸液傳遞下一代小鼠并不致病；注射于脚掌后虽能引起暫时的腫大，但不引起坏死脫落，很快即完全消退。在血凝性狀方面，脫脚病毒只能凝集小鼠和某些鷄的血球，其血凝机轉亦是与本病毒完全不同的。

4. 与小鼠肺炎病毒的鑒別：小鼠肺炎病毒只有鼻腔接種後方能感染；在雞胚中不易發育；在鼠肺懸液中与組織顆粒結合而不呈血凝，只有在 75°C 加溫後方能恢復其血凝能力；其血凝範圍和機轉亦可与流感一類病毒不同，如吸附後一般不自血球表面游離，并無破坏受體作用等。

5. 与 Nigg 氏病毒的鑒別：Nigg 氏病毒于腹腔注射後不能使小鼠致病；在雞胚卵黃囊中發育，但不在尿囊中發育；不引起血球凝集；对青霉素敏感。在一般性狀上与鸚鵡熱及淋巴性肉芽腫一類病毒相近似，在塗片時用 Macchiavello 氏染色法可以看到原始體，在抗原性方面亦形成獨特的一組。

至于本病毒和流感病毒的关系，一方面它在小鼠中引起肺炎，在雞胚尿囊腔中能很好地發育，并凝集多种紅血球，在血凝範圍、吸附游離機轉和受體关系上大致与流感病毒相似，从这些特征看來，已有充分理由將它归入流感——腮腺炎——雞瘟一族之中。但在另一方面，本病毒对齧齒类动物的感染範圍較廣，致病力較強，【于腹腔及靜脉注射大量病毒後，能使小白鼠發病致死，在肝、脾、腦中亦有病毒存在，在血凝素的穩定性方面亦与流感病毒不同，在抗原性方面与甲、乙、丙三型流感病毒都沒有关系，故似乎不應該將它归入流感病毒的同一种內。必須指出目前对本病毒的了解还只是初步的，特別对它的大小、形态、詳細的致病性能与天然感染的宿主範圍，还需要作進一步的研究，才能确定它在分类學上的确实地位，僅僅为了方便起見，我們建議暫称之为“小鼠类流感病毒”。

关于本病毒在实际工作中的意义，首先是由于它是正常小鼠中潜伏的一种病毒，且已有初步的血清學証据說明它可能在豚鼠中引起天然的流行。由于小鼠是在各种病毒工作，特別在流感病毒工作中經常应用的試驗室动物，故若是鼠种中携有本病毒時，勢必在試驗工作中造成極大的困难，甚至可能導向錯誤的結論，本報告的第一篇中敘述的情况，是值得我們經常警惕的。其次本病毒在性狀上与流感病毒有許多相似之处，使我們進一步推想它是否可能是流感病毒在小鼠或其他齧齒类中長期適應的產物，或者至少它們在進化上可能具有共同的起源。目前在豚鼠中已經發現有本病毒的天然感染，而在其他动物，特別在野生齧齒类中是否亦有类似的天然感染，是一个很有兴趣的問題。在 20 份人血清中的初步試驗中，虽未明确地找到对本病毒的抗体，但这一点材料顯然是不够的，还需要用更多的試驗來确定本病毒有無感染人类的可能性。

摘 要

本文報告对“小鼠类流感病毒”的生物學性狀的研究結果。

(一) 本病毒能通过滤孔直径 750 毫微米的滤膜, 而不能通过 250 毫微米的滤膜, 由此估计到其直径大小当在 150—500 毫微米之间。

(二) 感染鸡胚时能在尿囊腔和卵黄囊中发育, 达很高的血凝效价, 但一般并不杀死鸡胚, 在绒毛尿囊膜上不形成明显的病灶。

(三) 鼻腔感染小白鼠时 50% 感染量约为 $10^{-6.74}$, 50% 致死量约为 10^{-6} ; 大量注射腹腔、静脉或脑腔时能杀死小白鼠, 死亡小鼠的脑、肝、脾中均含有病毒, 但递传第二代时小鼠并不发病。注射于小鼠脚掌内能引起暂时的肿胀, 但迅即消退, 不引起坏死。

(四) 鼻腔接种家兔和大白鼠后不引起明显的症状, 肺部亦仅有散在的病变。鼻腔接种豚鼠后体温增高, 肺部有不同程度的病变, 但并无死亡; 根据一群豚鼠血清中抗体测定结果, 可以确定本病毒能引起豚鼠中的天然感染。中国地鼠于鼻腔接种后呈明显肺炎, 一部分死亡。在以上几种动物中, 感染后血清中均产生血凝抑制抗体, 故可以认为本病毒能引起不同程度的隐性或显性感染。

(五) 本病毒能凝集鸡、鸽、人、豚鼠、牛、绵羊、山羊的红血球, 但不凝集马及地鼠的血球。能为鸡血球所吸附, 于 37°C 由血球游离, 游离后的血球不能再为本病毒所凝集。本病毒的血球受体能为霍乱滤液所破坏, 其受体关系与 PR₈ 株流感病毒相接近。本病毒的血凝素对温度不稳定, 于 48°C 加温 30 分钟即遭完全破坏。

(六) 由血凝抑制试验及可溶性抗原的补体结合试验证明本病毒的抗原性质与甲、乙、丙各型流感病毒, 腮腺炎病毒, 新城病病毒及鸡瘟病毒没有关系。

(七) 由以上的结果, 确定本病毒为小鼠中的一种新的潜伏的病毒, 并对此种病毒在实际上和理论上的重要性予以讨论。

参 考 文 献

- [1] 朱既明、梁荣根、闻仲权: 一种新的小白鼠病毒的研究 I. 发现经过。微生物学报 4 (1): 33-46, 1956.
- [2] Fulton, F. & Dumbell, K. R. *J. gen. Microbiol.*, 3: 97, 1949.
- [3] Elford, W. J. *Handbuch der Virusforschung*, p. 154, 1938.
- [4] Beveridge, W. I. B. & Burnet, F. M. The cultivation of viruses and rickettsiae in the chick embryo, Medical Research Council, Special Report Series No. 256.
- [5] Chu, C. M. *J. Hyg.*, 46: 239, 1948.
- [6] Hirst, G. K. *J. exp. Med.*, 76: 195, 1942.
- [7] Burnet, F. M., McCrea, J. F. & Stone, J. D. *Brit. J. exp. Path.*, 27: 228, 1946.
- [8] Salk, J. E. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 63: 134, 1946.

A STUDY ON A NEW MOUSE VIRUS

II. BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE VIRUS

HSIAO CHUN AND CHU CHI-MING

National Vaccine and Serum Institute, Peking

In this communication, the biological characteristics of the newly isolated virus from the white mice mentioned in the previous report are described as follows:

1. The virus could pass through gradacol membrane with an average pore size of $750\text{ m}\mu$, but failed to pass through those of $250\text{ m}\mu$ in average pore size.

2. The virus was found to multiply in the amniotic and yolk sacs of the developing chicks, reaching a high hemagglutinating titre but failed to kill the embryo and failed to produce gross lesions on the chorio-allantoic membrane.

3. By intranasal inoculation its LI_{50} was $10^{-6.74}$ and LD_{50} , 10^{-6} , but it required a large inoculum to kill white mice by the intraperitoneal, intravenous, or intracerebral routes. After the death of the animals, virus was, however, found in the brain, liver and spleen, but in small amounts. When injected into the pads of the extremities, only temporary swelling without necrosis was noted.

4. Intranasal inoculation of the virus into rats and rabbits failed to produce any obvious reaction, and only scattered changes could be found in the lungs of the inoculated animals. Similar injections into guinea pigs led to an elevation of the body temperature and various degrees of pulmonary changes without death were also noticed. Part of the Chinese hamsters died after intranasal inoculation, and all showed marked pulmonary changes. In the above types of animals, hemagglutination-inhibiting antibodies were found in the blood sera following patent or latent infections. A study of the sera of some of the normal guinea pigs in the stock revealed the presence of spontaneous latent infection.

5. The virus could agglutinate the red blood cells of chickens, pigeons, human beings, guinea pigs, beeves, sheep and goats, but did not agglutinate the cells of Chinese hamsters. Towards the chicken cells, it behaved in the same manner as that of human influenza virus, type A. The hemagglutinating property of the virus was destroyed by heating at 48°C for 30 minutes.

6. By the use of hemagglutination-inhibiting reaction and the complement fixation reaction, it was conclusively proven that the new virus was entirely different antigenically from human influenza types A, B and C mumps virus, New Castle virus and fowl plague virus.

It is concluded by the authors that the new virus described in the previous and the present reports is indeed a new and hitherto undescribed virus, latent in the white mice of the breeding stock. The significance, both practical and theoretical, is briefly discussed.