

由脊髓灰白質炎病人糞便分離出一株 科賽奇病毒(Coxsackie virus)*

宋 干 林 毓 純 王 蘅 文

(中國醫學院微生物學系病毒室、病理室)

自從1947年 Dalldorf 與 Sickles 二氏^[1]由兩個麻痺型的脊髓灰白質炎病人的糞便中分離到科賽奇病毒後，此類新的病原族的存在即引起醫學界日益增多的注意。近年來不但在世界上許多地方找到此類病毒，而且也查出它們可能同脊髓灰白質炎、疱疹性咽峽炎(Herpangina)、流行性胸壁痛(Epidemie pleurodynia)、無菌腦膜炎(Aseptic meningitis)、夏季感冒(Summer grippe)以及一些病原未明的輕性熱症的病原問題有關^[2]。其中特別是疱疹性咽峽炎和流行性胸壁痛，已經證明是分別由甲族及乙族的科賽奇病毒所引起^[3]。

這一類病原體，在我國尚未見到報告。1952年8月作者曾由脊髓灰白質炎病人的糞便中分離出一株病毒，初步的動物試驗及病理組織學檢查，證明是一株具有甲族科賽奇病毒特性的病毒。本文將對此病毒所作的一些實驗結果作一簡單介紹，為今後有關此類問題的研究工作提供參考資料。

實驗及結果

(一) 病毒的分離

為了分離病毒，共從兒童醫院的4例住院病人(臨床診斷均為脊髓灰白質炎)採取了糞便標本，糞便於採集後保存於普通冰箱內，在採集後第3天分別接種動物，其方法如下：將糞便於無菌的乳鉢內加上適量的生理鹽水研碎，使成10%的懸液。以後，經過低速離心沉澱，取其上層液體加入青霉素(每毫升約1,000單位)及鏈霉素(每毫升約500單位)，放在冰箱內經過3—4小時，然後取出接種動物。所用動物均為本院飼養的生後5天的小白鼠，每份標本接種一窩(5—6只)，均用腹腔內注射，每只0.1毫升。接種後每天至少觀察兩次，結果見表1。

* 1956年4月3日收到。

表 1 由脊髓灰白質炎病人糞便分離病毒之結果

病 例 号	病人年齡 (岁)	病人患病 日 数	接种物細 菌培养	鼠齡 (天)	鼠数 (只)	接种途徑	潛 伏 期 (每只)	主 要 症 狀
1	2	15	+	5	5*	腹 腔	5,5,5	兩后肢弛張性麻痺
2	2	6	+	5	5	腹 腔	未 發 病	無
3	1	10	—	5	5	腹 腔	未 發 病	無
4	7	9	—	5	6**	腹 腔	6,6,6,6,6,6	兩后肢弛張性麻痺

注:

* 接种动物有兩只為母鼠吃掉,未吃之 3 只均發病,其中兩只于接种第 9 日杀死,一只傳代,一只做病理解剖,剩下的一只逐漸完全恢复。

** 6 只接种动物均發病,于接种第 9 日杀死兩只,一只傳代,一只做病理解剖,未杀死的 4 只动物均逐漸完全恢复。

4 例标本中,只有兩例子接种动物后引起症狀(另兩例接种之动物于观察 3 周后,未見發病,即行弃去)。第 1 例标本于接种后第 5 天,动物开始表現后肢麻痺。繼續观察到第 9 天,取其中症狀表現最重的兩只,一只杀死,取其腦、脊髓及大腿肌肉分別制成悬液(10%),經用抗生素处理后,各用生后五天的小白鼠一窩(6只)施行腹腔內接种;另一只做病理檢查,其組織学改变符合于甲族科賽奇病毒在小鼠引起的病变。但此例第二代所接种的兩窩小白鼠在 3 周的观察期中均未表現任何特异性症狀。以后,对此例即未再进行研究。第 4 例标本所接种的小白鼠,均于第 6 天出現輕重不等的后肢弛張性麻痺。到第 9 天,取出症狀較重的兩只,一只傳代,一只作病理檢查。第二代所接种的动物均于第 5 天發病,此例的病原体曾經過以下的初步实验观察及病理組織学檢查。

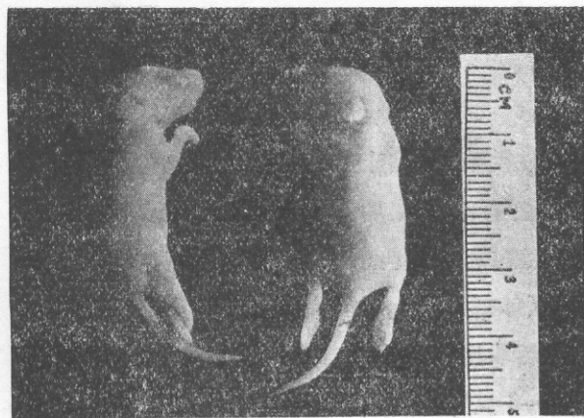


圖 1 生后 4 天未断奶小白鼠,腦內接种病毒(第 15 代)發病后,兩后肢呈掌面朝上,完全伸直性麻痺,前肢腕关节下垂。同时,可以看到臀部肌肉消瘦而变扁平。

(二) 受傳染小白鼠症狀的观察

在將分离出的病毒用未断奶小白鼠进行各項傳染試驗时,观察到受染动物一般均有典型的症狀,最后發生麻痺。小白鼠最初表現輕度的平衡失調,每次吃奶時間縮短,以后,兩后肢由軟弱而逐漸变为弛張性麻痺,臀部肌肉迅速消瘦,呈扁平狀或稍凹陷。前肢則較少發生麻痺。小白鼠多于麻痺症狀出現后 24—48 小时內死亡。小白鼠于受傳

染后表現的症狀由于年齡的差異有所不同。譬如年齡在 1 周以內的小白鼠麻痺后兩后肢均伸直，掌面上翻（圖 1）；年齡在一周以上，特別是兩周左右的小白鼠，發病以后，后肢往往呈大腿伸直，小腿曲起的姿式（圖 2, 3）。年齡達 3 周的小白鼠，在受傳染后多數也發病，但往往症狀輕，而且并不完全死亡（見表 2）。

（三）病毒連續在小白鼠傳代時潛伏期的觀察

于生后 3—5 天的未斷奶小白鼠腹腔內接種病毒懸液（10%），每只 0.035—0.05 毫升。每次均接種有 5—6 只動物的小鼠一窩。用以觀察潛伏期的長短，結果發現每代動物的潛伏期在最初五代是逐代縮短的，平均第一代為 6 天，第二代為 5 天，第三代為 3 天，第四代為 2 天，第六代以後潛伏期已穩定為 1—2 天。

（四）鼠齡及感染途徑對於動物易感性的影響

用第六代小鼠腦病毒 10% 生理鹽水懸液分別接種于不同年齡的小白鼠的腦內，又用第五代小鼠腿肌肉病毒 10% 生理鹽水懸液分別在不同年齡的小白鼠作腹腔接種，觀察兩周，結果（見表 2）發現不論腦內接種或腹腔接種，動物感染后的潛伏期都表現隨年齡增加而延長。但腦內接種時年齡 3 周以上的小白鼠均未發病，腹腔內接種時則年齡 5 周以下的動物全都發病。

（五）不同實驗動物對新分離病毒的易感性

除小白鼠外，曾用田鼠、巨形田鼠、幼齡家兔及幼齡海豬做傳染試驗。試驗均用患病的未斷奶的小鼠腿肌肉病毒懸液（10%）并均由腹腔接種。除小白鼠外，所有接種的動



圖 2 生后 7 天未斷奶小白鼠，腦內接種病毒（第 15 代）發病后，兩后肢呈大腿伸直，小腿屈的麻痺症狀。其前肢也因部分麻痺呈伸張姿式。



圖 3 生后 14 天未斷奶小白鼠，腦內接種病毒（第 15 代）發病后，兩后肢呈大腿伸直，小腿屈的麻痺症狀。

表2 鼠龄及感染途径与动物对病毒易感性的关系

試驗組別	鼠龄(天)	鼠数(只)	病毒代数	接种途径	接种剂量 (毫 升) (10%悬液)	潜 伏 期	动 物 转 归
I	3	5	6 代(腦)	腦 內	0.02	1,2,2,2,2	均于發病后1—2 日內死亡
	6	6	6 代(腦)	腦 內	0.02	3,3,3,3,3,4	同上
	10	4	6 代(腦)	腦 內	0.03	3,3,4,4	同上
	14	4	6 代(腦)	腦 內	0.03	4,5,5,5	同上
	21	6	6 代(腦)	腦 內	0.03	未 發 病	—
	35	8	6 代(腦)	腦 內	0.04	未 發 病	—
II	3	5	5 代(肌)	腹 腔	0.035	1,2,2,2,2	均于發病后1—2 天內死亡
	6	5	5 代(肌)	腹 腔	0.045	2,2,2,2,2	同上
	10	5	5 代(肌)	腹 腔	0.060	2,2,2,2,3	同上
	14	5	5 代(肌)	腹 腔	0.070	3,3,3,3,3	同上
	21	5	5 代(肌)	腹 腔	0.090	4,4,4,4,4	發病第 4 及第 6 天 各死 1 只余均恢复
	35	4	5 代(肌)	腹 腔	0.100	4,5,5,5	發病第 7, 8, 22 天各 死 1 只另 1 只恢复

物都未表現任何症狀。

(六) 病理組織学檢查的結果

科賽奇病毒于未断奶的小白鼠引起極為典型的病理变化，这种病理变化的特点曾被用来做为鑒別病毒及病毒分类的根据。为了証明此次所分离病毒和它的类型，作者曾对第 1 例及第 4 例标本接种第一代發病的小白鼠作了病理檢查。

兩例病鼠的所有內臟均無明显肉眼可見之病变。取出其腦、脊髓、四肢及頸部肌肉、脂肪組織、心、肺、腎、肝及脾等組織于 10% 的福尔馬林溶液中固定。腦及脊髓用火棉膠包埋,其他器官組織則用石蜡包埋。所有切片都用苏木精-伊紅染色。腦及脊髓切片并用甲苯胺藍染色。

兩例小白鼠的病理組織变化基本上是相同的。其中以骨骼肌的变化最显明。在所有檢查过的每一骨骼肌(頸部、背部、臀部、四肢)标本中,大部分都表現有病变。这些病变的特点是:肌纖維分段發生变化,即同一肌纖維中可看到正常及有病变的段节同时存在。在肌肉标本內,同时可以看到肌纖維变性、坏死、炎症性反应、吞噬現象、肌鞘管形成和肌纖維再生等各阶段的变化。

肌肉的病理形态学的改变是:

(1) 肌纖維的断节变性 (segmental degeneration): 橫紋肌纖維的变化如典型的

岑克氏变性(Zenker's degeneration)。病变的初期,肌纖維部分彼此融合、膨脹,肌纖維的縱橫紋變得更加明显(圖4)。其后,肌纖維折皺如波浪形,且折斷成塊(圖5)。此时肌纖維更加膨脹、融合、失去縱橫紋而成同質化(圖6)。此时肌纖維核內的數目偶見增多,形狀不規則,或成固縮狀態。

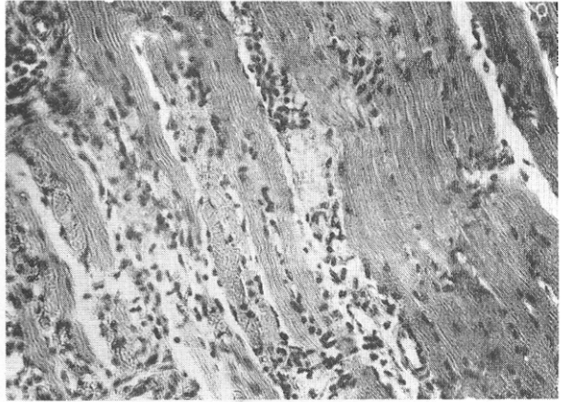


圖4 骨骼肌纖維紋理特別显明。間質有炎症細胞浸潤。
×200

(2) 肌纖維的玻璃样变性及坏死: 同質化和玻璃样的肌纖維分段的染成紅色或紫蘭色, 与完整的肌鞘分开。后来玻璃样的肌纖維段节碎裂而形成小塊(圖6)。



圖5 肌纖維的一段折皺及斷碎。×390

(3) 肌纖維的炎症反应及吞噬現象: 上述玻璃样变性的肌纖維呈現有炎症反应及吞噬現象, 亦即在完整的肌鞘內出現了多形核白血球及單核細胞, 而破碎的坏死肌纖維小塊逐漸為浸潤的細胞所吞噬和吸收。这些肌纖維周圍的間質內發生了水腫、充血, 并有炎症細胞的浸潤(圖7, 8, 9)。

(4) 空肌鞘管的形成: 在肌纖維小塊被吞噬吸收处形成空的肌鞘管(圖8)。管腔較正常纖維为窄, 管壁增厚, 管内充滿許多增生的肌鞘細胞, 于此可見細胞核的增多。在有的肌鞘管内填充了密集而排列成行的細胞核的、嗜鹼性的原始母細胞漿帶(圖10)。

(5) 肌纖維的再生: 上述原始母細胞漿帶的形成标志着肌纖維的再生。在再生的过程中, 可見核增大而明亮, 核間距离逐漸加寬, 胞漿嗜鹼性减少(圖10, 11)。核間的胞漿有时显示橫紋, 而核的兩側可見縱紋。但在所有的标本中, 尚未見到宽度及形狀完全与正常相同的再生的纖維。肌肉內的末梢神經纖維有的弯曲而粗細不均, 鞘内有少数白血球浸潤, 神經鞘是完整的。

在脂肪組織中, 可見許多脂肪細胞的胞漿中有紅色顆粒及小圓泡, 及核固縮的脂肪細胞。在部分的脂肪組織內, 有淋巴細胞及少数白血球的浸潤。心肌、肝、肺及脾臟內

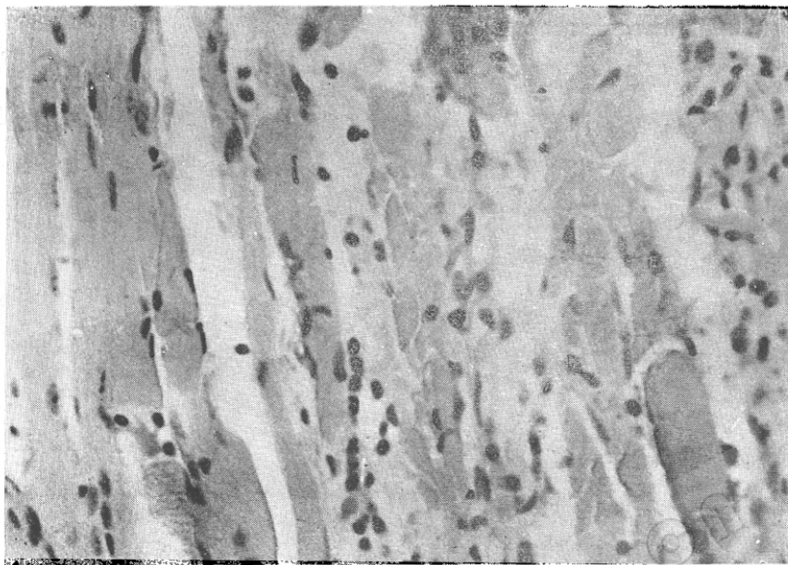


圖6 圖中部肌纖維呈玻璃样变性。×390

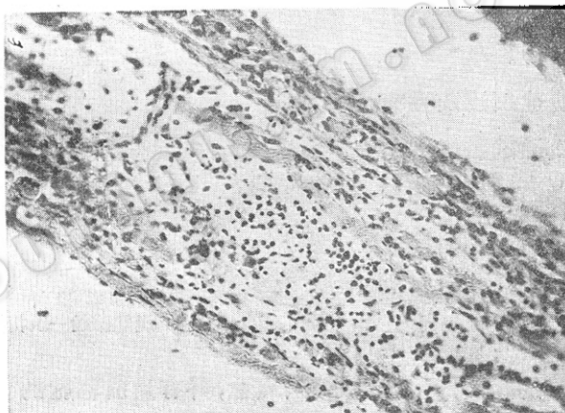


圖7 肌纖維間強度炎症細胞浸潤。坏死纖維小塊为浸潤細胞吞噬吸收。×220

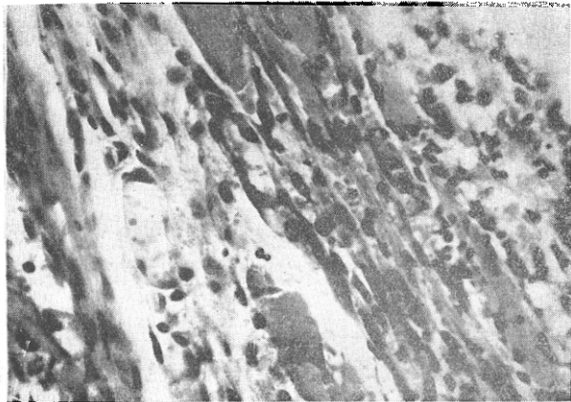


圖8 空肌鞘管形成(右下方)。×390

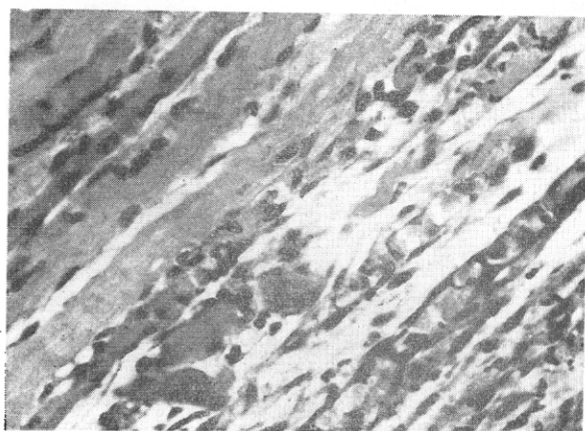


圖 9 空肌鞘管形成。×390

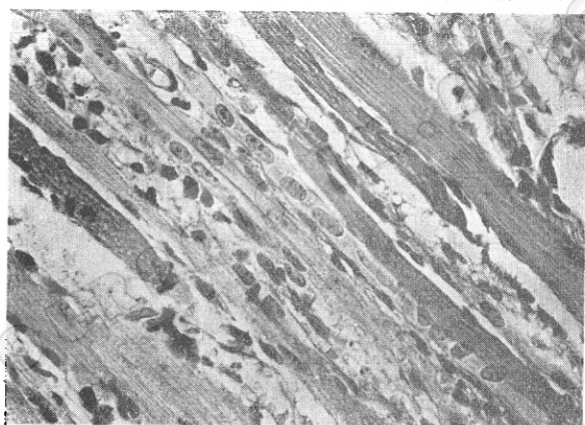


圖 10 再生的原始胞漿帶。×450

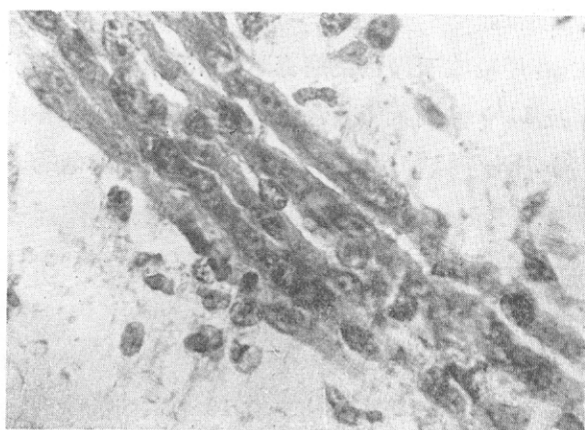


圖 11 再生的肌纖維核較多而肥大, 胞漿內隱約有縱橫紋。×810

均無显著的改变。

在中樞神經系統，可見大腦的腦膜有增厚及散在性淋巴細胞和白血球浸潤灶。大腦皮層、小腦神經核及脊髓前角僅見核聚合 (Satellitosis) 現象，而無任何其他改变，特別未見脊髓灰白質炎所具有的脊髓前角炎症性变化和神經細胞的變性和坏死。在第 1 例小鼠的大腦皮質內曾見到微小的軟化灶。血管周圍偶見淋巴球浸潤。

由上述的病理組織改变可以看到，兩只小鼠都有严重的全身性骨骼肌的段节性變性及坏死，急性間質性肌炎、肌纖維再生、脂肪組織輕度炎症反应、腦及脊髓內核聚合、輕度的軟腦膜炎，以及局限性的腦軟化。这些病變都符合于科賽奇病毒在未断奶的小鼠所致的病理变化。

在骨骼肌病變中，第 1 例的小鼠以再生現象較為普遍，第 4 例的小鼠則以變性、坏死及炎症反应为主。中樞神經系統的病變以第 1 例的小鼠較显著，在第 4 例的小鼠則極為輕微。

根据病理組織檢查結果，第 1 例及第 4 例的小白鼠骨骼肌有严重變性及再生，而中樞神經系統变化輕微，与甲族科賽奇病毒在未断奶小白鼠所引起的病變相符。由于未剖檢的小白鼠發病过程，四肢肌肉瘦削和死亡情形均与剖驗动物类似，而剖驗动物的病變是典型而明显的，所以可將引起此类病變的病原体归之于甲族科賽奇病毒族。

(七) 其他試驗

(1) 濾过試驗：使新分离的病毒(小鼠腿肌 10% 的悬液)通过賽氏(Seitz)濾器，用濾过液接种小白鼠。如此感染之动物，其潜伏期較用未濾过之病毒悬液接种的动物稍見延長，但其發病仍然是非常明显，而死亡也是有规律的。

(2) 細菌培养試驗：曾先后数次用厭²(及需¹)細菌培养法檢查受感染后患病小鼠腿肌病毒悬液，結果为陰性。

(3) 干燥保存試驗：用冷冻干燥法使病毒悬液干燥，然后保存于普通冰箱內。以后同时將保存了 8 个月及 11 个月兩批干燥病毒管打开制成悬液，各由腹腔接种生后 7 天的小白鼠一窩。兩窩小鼠均于接种后第 4—5 天發病，呈現典型的肢体麻痹症狀，并且繼于發病后 1—2 天内死亡(未作病理檢查)。

(4) 病毒的滴定：用生后 4 天的小白鼠滴定病毒，其滴度(50%致死量)为 $10^{-8.2}$ 。

討 論

据文献^[2]报告，目前已發現的科賽奇病毒有 16 个不同的抗原类型(甲族 11 个，乙族 5 个)而根据 Dalldorf 氏的分类法^[3]，科賽奇病毒由其在实验动物所引起的病理改变

的不同分为甲族及乙族。甲族病毒使未断奶的小白鼠产生全身性肌炎，并表现有显明的肢体麻痹症状，而乙族病毒则仅引起局限性的肌炎；同时引起脑炎及肩胛间脂肪垫坏死等病变。据最近文献的报告^[1]，另外可能有第三类的科赛奇病毒，即只使未断奶的小白鼠产生脑炎的病毒株。

本文所报告的一株病毒，未能用血清学的方法确定其所属的抗原类型。但是，此病毒使未断奶的小白鼠发生显著的肢体麻痹症状，产生全身性骨骼肌病理改变，同时在其中枢神经系统及内脏器官方面的病理改变很少，所有这些都是符合于上述甲族科赛奇病毒的特征的。

继续分离这类病毒并进一步研究它们与某些疾病病人之间的关系和居民对他们的免疫情况无疑地是十分需要的。这种研究对于进一步阐明脊髓灰白質炎的病原，对于流行性乙型脑炎轻症及非典型病例的鉴别诊断，以及对于其他病原未被阐明的热性疾病的病原的研究都将有所帮助。

特别值得注意的是这类病毒和流行性乙型脑炎的关系。近年来在流行性乙型脑炎的广泛调查研究中，各地都曾发现一些轻度及无典型症状的疑似脑炎患者。他们除了有发烧及脑脊髓液的改变以外，往往没有脑炎的其他特征性表现。这些症状（发烧及同样的脑脊髓液改变）在某些被科赛奇病毒感染的病人中也常发现^[2]。同时科赛奇病毒传染又同样是在夏秋间出现^[3]。因此在流行的季节假如有多数科赛奇病毒传染在居民中出现，就可能影响到流行性乙型脑炎的诊断及其疫情统计资料的准确性。近年在北京利用补体结合试验法检查大量的疑似流行性乙型脑炎病人的血清^[5-6]，就曾发现不少例阴性反应（有些是经过重复检查的）。根据上述情况，在考虑这类病例的病原学问题时，科赛奇病毒族似乎也应为被考虑的因素之一。

总 结

(1) 由 4 例临床诊断为脊髓灰白質炎的儿童患者中一例的粪便标本分离出一株科赛奇病毒(Coxsackie virus)，根据一些实验室的观察和病理组织学检查的结果，都符合于甲族科赛奇病毒的特征性表现。

(2) 由于科赛奇病毒可在人体引起伴有脑脊髓液细胞增多的热症，其流行季节又在每年夏秋间，正是流行性乙型脑炎的流行期。所以这类病毒的研究对轻型及非典型流行性乙型脑炎的鉴别诊断上将有一定的意义。

参 考 文 献

- [1] Dalldorf, G., Sickles, G. M., Plager, H. and Gifford, R.: *J. Exp. Med.* **89**: 587, 1949.
[2] Tobin, J. O. H.: *Britt. Med. Bull.*, **9**: 201, 1953.
[3] Dalldorf, G.: *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **26**: 329, 1950.
[4] Stanley, N. F., Dorman, P. C. and Pansford, T.: *Aust. Exp. Biol. and Med. Sci.* **31**: 31, 1953.
[5] 宋干、周明先、沈中: 中华医学杂志, **37**: 287, 1951.
[6] 宋干、周明先、闾世雄、黄镇祥: 中华医学杂志, **38**: 1033, 1952.

ISOLATION OF A COXSACKIE VIRUS FROM THE STOOL
OF A CASE OF POLIOMYELITIS

SUNG KAN, LING YU-CHENG AND WANG HENG-WEN

Division of Virology and Pathology, National Hygiene Institute, Peking

Since the first isolation of a new type of virus from the stool of 2 cases of poliomyelitis by Dalldorf and Sickles in 1947, the now well-known Coxsackie virus has been isolated all over the world, and the virus has been implicated in the etiology of poliomyelitis, herpangina, epidemic pleurodyna, aseptic meningitis, summer gripple and of certain other minor ailments of unknown etiology.

The present report deals with an isolation and identification of one strain of the virus after 4 attempts at examination of stools of cases of poliomyelitis. After careful experimental observations and histological studies of the experimental materials, it was concluded that this strain belonged to type A of the virus. The possibility of its being confused with the locally prevalent encephalitis virus is stressed.