

從人、豬及蚊體內分離的流行性乙型 腦炎病毒株的致死力

黃禎祥 戴 瑩

(中國醫學科學院病毒學系)

根據我們以前的研究報告^[1]，流行性乙型腦炎病毒京衛研₁株與中山株對小白鼠的腦外途徑感染具有顯著不同的致死力。京衛研₁株病毒具有高度的皮下致死力而中山株則很低。考慮到這種致死力的不同可能是與中山株病毒在鼠腦內長期傳代引起變異有關，也可能是自然界本來就存在着不同毒力的病毒株，或是兩種情況都存在。為了進一步闡明自然界是否存在有不同毒力的毒株來解釋人類受流行性乙型腦炎病毒感染後的不同臨床表現，本文報導關於由人、豬及蚊體內分離的流行性乙型腦炎病毒株對小白鼠腦內及皮下感染的致死力比較的研究，結果證明在自然界中的確存在有不同毒力的毒株。由於我們實驗的結果與日本及蘇聯學者^[2-3]所報導的結果不相同，我們也進行了這個問題的探討。至於中山株的感染特性是否與長期傳代變異有關，我們正在研究中。

材 料 和 方 法

(一)病毒株：

1. 由死於本病的患者腦組織懸液經鼠腦接種分離而得的病毒共檢查 21 株，其中除京衛研₁、京衛研₂、京衛研₃等三株病毒為本系在北京分離的毒株外，中山株系 1935 年在日本分離的毒株，由美國 Hammon 氏供給，過去傳代歷史不詳，在我們實驗室經鼠腦傳至 65—68 代；以及 M₄₇ 株系 1945 年蘇聯學者在我國東北分離的毒株，過去傳代歷史亦不詳，在我們實驗室經鼠腦傳至 7 代。其餘 16 株都是由我國各地腦炎研究組在當地所分離，經鼠腦傳代送給我室的。

2. 由我國各地不同種蚊體內，經鼠腦接種分離而得的病毒共檢查 20 株，其中 9 株系本系從北京採集的蚊蟲分離而得的，其餘都由各地分離供給。

3. 由豬血液內分離的病毒共 12 株，是本室王逸民氏等^[4]於 1955 年在北京近郊及本院的豬分離的。

以上病毒共 53 株，均經血清學鑑定為流行性乙型腦炎病毒，都是冰凍乾燥保存於 -20°C 低溫冰箱中，各株病毒分離的地點及時間見表。表中所記載的代數，除中山株及 M₄₇ 株外，均為實驗時的代數。

(二)稀釋劑：除在比較稀釋劑對病毒影響的試驗中曾採用 0.85% 生理鹽水外，其餘試驗均用 10% 脫脂牛奶生理鹽水。

(三)實驗動物：均採用本院動物房在防蚊設備下飼養的三週鼠齡的正常小白鼠，皮下接種組體重為 7—9 克，腦內接種組均未稱重量。

(四)實驗方法：

病毒的滴定：在每次試驗前將乾燥病毒經三週小白鼠腦內連續傳兩代，然後用三週小白鼠以腦內及皮下二種途徑進行滴定。每個稀釋度注射鼠 5 隻，腦內及皮下注射量均為 0.03 毫升。全部操作過程在冰盤內進行。感染後的小白鼠觀察 21 天。感染的半數致死量(LD₅₀)終點以 Reed 和 Muench 方法計算。

實 驗 結 果

(一)由病死者的腦組織分離的不同毒株對小白鼠腦內及皮下感染致死力的比較：共進行了 21 株病毒，結果總結在表 1。由表 1 中可以看出，雖然這些病毒株的腦內 LD₅₀ 滴度差別不大 ($10^{-7.4}$ — $>10^{-9.5}$ ，相差約為 2.1 對數)，但是，其皮下感染的 LD₅₀ 則差別很大 ($10^{-0.8}$ — $10^{-8.1}$ ，相差約為 7.3 對數)。由於同一株病毒在不同時間滴定的結果指出，其腦內 LD₅₀ 高時，皮下 LD₅₀ 亦隨之提高，(見表 1 京衛研₁ 及中山株不同代數的結果)，所以考慮到更確實的表現株與株之間的差別應以其腦內與皮下滴定度的差數來比較。如以各株腦內與皮下 LD₅₀ 的差數來比較，則其差別為 1—7.4 對數，相差 6.4 對數。

表 1 從病死者腦組織內分離的流行性乙型腦炎病毒不同毒株的腦內及皮下致死力

毒 株	分離 地區	病毒 代數	分離 時間	病毒滴度 (LD ₅₀ 對數)		腦內及 皮下滴 度之差	毒 株	分離 地區	病毒 代數	分離 時間	病毒滴度 (LD ₅₀ 對數)		腦內及 皮下滴 度之差
				腦內	皮下						腦內	皮下	
京 衛 研 ₁	北京	34	1949	9.1	8.1	1	京 衛 研 ₈	北京	4	1949	8.8	4.5	4.3
京 衛 研 ₅	北京	15	1949	8.3	7.2	1.1	京 衛 研 ₂	北京	28	1949	8.3	4.4	3.9
都 ₂ 號	成都	10	1954	8.5	>6.5	<2	都 ₂ 號	瀘州	9	1954	8.4	4.2	4.2
熱 ₂ 號	熱河	21	1954	>8.5	>6.5	2	都 ₃ 號	成都	10	1954	8.4	4.0	4.4
滬 ₃	上海		1952	8.4	>6.5	<1.9	都 ₄ 號	自貢	11	1954	8.4	4.0	4.4
熱 ₁ 號	熱河	17	1954	8.2	6.2	2	馬 六 標	無錫	13	1955	8.2	4.0	4.2
滬 ₄	上海		1952	8.6	6.1	2.5	都 ₆ 號	成都	11	1954	8.5	4.0	4.5
高 順 生	石家莊	17	1953	>9.5	5.8	>3.7	蘇 聯 ₄₇	東北	9*	1949	9.2	3.0	6.2
劉 本 大	無錫	12	1955	8.8	5.8	3.0	滬 ₁	上海		1952	8.3	2.2	6.1
都 ₁ 號	成都	11	1954	7.7	>5.5	<2.1	中 山	日本	70*	1935	7.6	0.8	6.8
都 ₇ 號	成都	10	1954	7.4	5.4	2	中 山	日本	67*	1935	8.5	1.1	7.4
王 三 孩	南京	14	1955	9.0	5.3	3.7	M ₄₇	大連	7*		7.9	1.5	6.4

* 以前代數不明，此代數為本實驗室所傳代數。

(二)自豬血液中分離的不同毒株對小白鼠腦內及皮下感染致死力的比較：共進行了 12 株。實驗結果見表 2，其腦內 LD₅₀ 是 $10^{-7.5}$ — $>10^{-9.5}$ ，相差為 >2.0 對數，而皮下 LD₅₀ 則為 $10^{-4.1}$ — $10^{-6.2}$ ，其差為 2.1 對數。如以各株病毒腦內與皮下 LD₅₀ 的差數來比較，則其差別為對數 2.3— >4.5 ，相差 >2.2 對數。

(三)由蚊體分離的不同毒株對小白鼠腦內及皮下感染致死力的比較：共進行 20 株。從表 3 所列的實驗結果看出，其腦內 LD₅₀ 是 $10^{-7.4}$ — $>10^{-9.5}$ ，相差為 >2.1 對數，而皮下 LD₅₀ 為 $10^{-2.2}$ — $>10^{-6.5}$ ，相差為 >4.3 對數。如以各株腦內與皮下 LD₅₀ 的差數來比較，則其差別為 <1.8 — >6.4 ，相差 >4.6 對數。

表 2 從北京豬分離的流行性乙型腦炎病毒不同毒株的腦內及皮下致死力

毒 株	分離 地區	病毒 代數	分離 時間	病毒滴度 (LD ₅₀ 對數)		腦內及 皮下滴 度之差	毒 株	分離 地區	病毒 代數	分離 時間	病毒滴度 (LD ₅₀ 對數)		腦內及 皮下滴 度之差
				腦內	皮下						腦內	皮下	
六 耶 ₁₃₈	六耶莊	4	1955	8.5	6.2	2.3	廣 ₁₈	廣安門	4	1955	9.0	5.0	4.0
永 ₂₃	永定門	5	1955	8.2	5.6	2.6	彭 ₈₂	彭 莊	4	1955	>9.5	5	>4.5
六 耶 ₈₈	六耶莊	4	1955	8.5	5.4	3.1	六 耶 ₁₁₇	六耶莊	4	1955	8.8	4.4	4.4
彭 ₄₈	彭 莊	5	1955	8.7	5.2	3.5	豬 ₆₆	本 院	4	1955	7.5	4.3	3.2
永 ₃₅	永定門	4	1955	9.0	5.2	3.8	豬 ₇₈	本 院	4	1955	8.6	4.3	4.3
廣 ₂₂	廣安門	4	1955	9.1	5.2	3.9	六 耶 ₃₆	六耶莊	4	1955	8.5	4.1	4.4

表 3 從蚊體分離的流行性乙型腦炎病毒不同毒株的腦內及皮下致死力

病 毒 來 源		病毒 代數	分離 時間	病毒滴度 (LD ₅₀ 對數)		腦內及 皮下滴 度之差	病 毒 來 源		病毒 代數	分離 時間	病毒滴度 (LD ₅₀ 對數)		腦內及 皮下滴 度之差
蚊 種	地區			腦內	皮下		蚊 種	地區			腦內	皮下	
尖音庫蚊淡色變種 ₄	南京	31	1953	>9.5	>6.5	3	尖音庫蚊淡色變種 ₆	南京	15	1955	9.2	4.5	4.7
尖音庫蚊淡色變種 ₁	北京	5	1950	8.6	>6.5	<2.1	三 節 吻 庫 蚊 ₂	北京	8	1953	7.8	4.2	3.6
尖音庫蚊淡色變種 ₂	北京	22	1953	8.3	>6.5	<1.8	尖音庫蚊淡色變種 ₃	北京	6	1954	8.7	4.2	4.5
鎮 定 裝 甲 蚊 ₍₈₇₎	重慶	18	1953	8.2	5.6	2.6	三 節 吻 庫 蚊 ₃	北京	4	1955	7.6	3.5	4.1
三 節 吻 庫 蚊 ₁	北京	20	1953	8.6	5.5	3.1	三 節 吻 庫 蚊 ₄	北京	4	1955	7.8	3.5	4.3
尖音庫蚊淡色變種 ₅	南京	33	1953	9.4	5.8	3.6	三 節 吻 庫 蚊 ₇	南京	11	1955	8.1	3.2	4.9
三 節 吻 庫 蚊 ₄	北京	9	1955	9.2	5.4	3.8	尖音庫蚊淡色變種 ₇	南京	15	1954	8.5	3.1	5.4
三 節 吻 庫 蚊 ₆	北京	3	1955	8.4	5.2	3.2	尖音庫蚊淡色變種 ₈	南京	32	1953	>9.5	3.1	>6.4
致 乏 庫 蚊 ₍₈₀₎	重慶	16	1953	8.4	4.9	3.5	白 紋 伊 蚊 ₍₄₅₎	重慶	16	1953	7.4	3	4.4
白 紋 伊 蚊 ₍₈₂₎	重慶	17	1953	>8.5	4.6	>3.9	致 乏 庫 蚊 ₍₈₈₎	重慶	15	1953	7.8	2.2	5.6

由以上結果看出,在自然界中,由人、豬及蚊體分離的病毒株,對小白鼠皮下感染的致死力存在有不同的毒力,特別是由人及蚊體內分離的毒株。

(四)稀釋劑對病毒的影響:由於以上研究的結果與日本及蘇聯學者的報告不同,我們考慮到這可能是與所採用的稀釋劑不同對病毒的影響有關。因此,我們比較了用 0.85% 生理鹽水和 10% 脫脂牛奶鹽水稀釋京衛研₁ 株病毒來觀察其對小白鼠的致死力。取 2 隻受京衛研₁ 株病毒感染發病的鼠腦,平均切成左右各半,為了使兩組實驗條件儘量相同,因此,一隻鼠腦的左半部與另一隻鼠腦的右半部混合,用 10% 脫脂牛奶鹽水製成 10% 懸液,再用同稀釋劑作一系列 10 倍稀釋;而前一隻鼠腦的右半部和後一隻鼠腦的左半部混合,用 0.85% 生理鹽水製成 10% 懸液,再用生理鹽水為稀釋劑,作成一系列 10 倍稀釋。以上二種懸液製備完畢後,分別在三週小白鼠進行腦內和皮下感染。從取鼠腦到接種病毒約經過 35 分鐘,在此時間內除沉澱時間 (20 分) 外,病毒懸液一直放在冰盤中。實驗結果列於表 4。表 4 中指出,用 0.85% 生理鹽水作稀釋劑的,其腦內及皮下感染致死力的 LD₅₀ 皆比用 10% 脫脂牛奶生理鹽水者為低,尤以皮下感染的滴度降低更為明顯,與脫脂牛奶製備的懸液比較,腦內感染的 LD₅₀ 降低 0.6 對數,而皮下感染的 LD₅₀ 則降低 2.6 對數。同時我們也考慮到當病毒與 0.85% 生理鹽水接觸時間延長,操作時又不在冰盤中進行,則可能有更大的差別。

表4 稀釋劑對京衛研₁株病毒腦內及皮下致死力的影響

稀 釋 劑	接種途徑	病 毒 稀 釋 度							LD ₅₀ 對數
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
10%脫脂牛奶生理鹽水	腦 內	—	—	—	5/5	5/5	4/5	0/5	8.4
	皮 下	—	—	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5	8.2
0.85%生 理 鹽 水	腦 內	—	—	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	7.8
	皮 下	5/5	5/5	5/5	1/5	0/5	0/5	—	5.6

討 論

從以上由人、豬及蚊不同來源的 53 株病毒的研究所獲得的結果，可以明顯地看出，這些不同的毒株對小白鼠的致死力有顯著的差別。在我們所採用的毒株中，中山株及 M₄₇ 株病毒對小白鼠具有特別低的皮下感染致死力，這可能是與這兩株病毒長期在鼠腦傳代變異有關（這兩株病毒過去在鼠腦傳代的歷史不詳）。但是，其他毒株，大多為新分離的傳代較少的毒株，其中京衛研₁ 株病毒雖然已傳至 34 代，但其對小白鼠皮下感染的致死力與 15 代比較並沒有降低。因此我們認為在自然界的確存在有對小白鼠皮下感染不同毒力的毒株，這就可能解釋人類受感染後有輕重不同的臨床表現及不顯性感染的原因。從人、豬、蚊三種不同來源毒株的實驗結果來看，由人及蚊體獲得的毒株，其腦內與皮下感染致死力的差異較由豬獲得的為大，由人來源的病毒為對數 1—7.4，如除去 M₄₇、中山株以及滬₁ 的代數不詳外，則為 1.0—4.5 對數，蚊為 < 1.8—> 6.4 對數，而由豬獲得的毒株的差別則僅為 2.3—> 4.5 對數。這種現象是值得進一步研究的，以便闡明不同宿主對病毒毒力的影響。進行這方面的研究，可能對探求病毒的存儲宿主的問題也有所幫助。人是由帶有病毒的蚊蟲叮咬而受染的，因此，研究由蚊蟲分離的毒株毒力的差異是比研究由人及豬所獲得的毒株更為重要。

由不同時期、不同地區、以及由不同蚊種分離的病毒株的觀察未能看出毒株間毒力的差異與這些因素有關，但我們認為需要做更多的工作才能更確實的分析這一問題。

至於日本及蘇聯學者未能發現有對小白鼠不同皮下感染致死力的毒株，經我們的實驗說明可能是與他們所採用的稀釋劑以及在操作過程中溫度及時間對病毒滴度的影響有關。同時，也應考慮到這種不同結果是否與所採用的小白鼠種類及體重不同有關。

總 結

實驗比較了 53 株由人、豬及蚊體內分離的不同毒株對小白鼠腦內及皮下感染的致死力，結果證明，這些毒株對小白鼠腦內感染的 LD₅₀ 差別不大，而對皮下感染的 LD₅₀ 則有較明顯的差異。由人及蚊分離的毒株其毒力差異較由豬獲得的為大。由不同年代、不同地區以及不同蚊種獲得的毒株未能看出其毒力的差異與這些因素有關。文章討論了自然界不同毒力的毒株對於引起不同臨床表現及不顯性感染的關係，我們也用實驗的方法來說明其他學者未能發現有不同毒力的毒株的原因很可能是與所採用的稀釋劑有關。

參 考 文 獻

- [1] 黃禎祥、周明先：一株對小白鼠皮下感染有高度致死力的流行性乙型腦炎病毒京衛研 株與中山株感染力的比較，微生物學報，**6** (1)：32—36, 1958.
- [2] Kasahara, S., Ueda, M., Okamoto, Y., Yashide, S., Hamano, R., & Yamada, R.: *Kitasato Arch. Exp. Med.*, **13**: 48, 1936.
- [3] Дробышевская, А. И. и Неустроев, В. Д.: Нейровирусные инфекции, Медгиз, стр. 199, 1954.
- [4] 王逸民等：豬在流行性乙型腦炎流行中的作用，中國醫學科學院科學論文摘要，**2**: 98, 1956.

THE PATHOGENICITY OF DIFFERENT STRAINS OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED FROM HUMAN, SWINE AND MOSQUITOES

HUANG, C. H. and TAI, Y.

Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences

53 strains of Japanese B encephalitis virus (21 from human, 12 from swine and 20 from mosquitoes) were compared on their pathogenicity by intracerebral and subcutaneous routes of inoculation in 3-weeks-old mice. Results show that while there was not much difference in the LD_{50} among these strains when the virus was introduced by the i.c. route, there was, however, great difference in the LD_{50} if the virus was inoculated subcutaneously. The subcutaneous virus titer in negative log on virus strains isolated from human cases varied from 0.8 to 8.1; those from mosquitoes varied from 2.2 to >6.5 and those from swine varied from 4.1 to 6.2. All these findings indicate that there exist in nature strains of Japanese B encephalitis virus with different pathogenicity and this may offer an explanation for the difference in manifestations of its infection in man.

From our comparative studies on the effect of diluents on the pathogenicity of the virus, it is felt that the failure of the Japanese and Soviet workers to find any difference in the peripheral pathogenicity among strains they have studied may be related to the diluent they have used for the preparation of virus suspension.