

流行性感胃病毒在天然流行中變異的研究—關於 1946 年以後分離的類似 WS 或 PR₈ 株的甲型流行性感胃病毒

朱 旣 明

(中央生物製品研究所,北京)

不論在天然流行中或是在試驗室中,流行性感胃病毒(以下簡稱流感病毒)的抗原性及其他生物學性狀,極易發生變異,已為衆所公認的事實。1918—1919年全世界流行性感胃大流行的確實病原,因當時未有病毒分離,故祇能推斷其為一種具有特殊流行性,但基本上與現在所知道的流感病毒相類似的病毒。自1933年初次分離得流感病毒後,迄今為止,我們至少已認識了三類不同型的流感病毒即甲型、乙型、與最近始經發現的丙型。這三型之中,以甲型流行最廣,致病力最強,故研究得亦比較詳盡。這三型病毒的抗原性全不相同,每型有其特異性的溶解性抗原,可以與他型識別;例如所有的甲型病毒均具有共同的甲型溶解性抗原,而與乙型的溶解性抗原不同,這點可用補體結合試驗證明之。但是流感病毒的複雜性,並不止於此。同型中異株的病毒之間,在抗原性方面雖有共同之處,因而引起交互反應,但各株病毒之間又有或大或小的差異;換言之,即使在同一型之中似乎沒有二株流感病毒的抗原性是完全一樣的。這種現象,不但發現於由不同地區或不同流行中分離得的病毒株之間,且亦常常發現於由同一地區與同一流行中所分離得的病毒株之間。

1933年以後的數年中免疫學方面的研究很快地發現在甲型病毒中,各株間的抗原性互有差別。1933年自英國分離的 WS 株病毒其抗原性甚為特殊,除在1934至1937年間曾有報告過少數幾株類似的病毒外,以後即再無繼續發現;換言之,WS 株病毒似乎已在天然流行中絕跡了。1934年自 Puerto Rico 島分離出的 PR₈ 株病毒,雖亦屬甲型,但其抗原性與 WS 株有顯著的差別,而與自澳大利亞

洲所分離的 Melbourne 株相近似。自 1934 至 1943 年十年之間，全世界各地區曾多次發生大小流行，所分離得的病毒株，大致上與 PR₀ 株大同小異，在這個時期內，用 PR₀ 株製成的疫苗在預防上也獲得了顯著的功效。由此說明了在這十年間的流感病毒，可以用 PR₀ 株來作為代表。自 1946 年以後的逐年流行中（1947，1949，1951），世界各地區突然出現了一種與 PR₀ 截然不同的新甲型病毒，其抗原性與 PR₀ 株相差甚巨，以致於注射 PR₀ 疫苗後，仍不能於流行時獲得絲毫保護；此種新病毒因其雖屬於甲型而異於 PR₀ 株，故命名為“亞甲型”，以 FM₁ 株為其代表。

由於以上的事實，我們可以作出下表來概括甲型流感病毒在不同時期中的流行情況：

年 份：	1918—1919	?—1933(?)	1934—1943	1946—現在
流 行：	世界大流行	大小流行	大小流行	大小流行
代表株：	不知型病毒 但最可能是 甲型的一種	WS 株	PR ₀ 株	FM ₁ 株(亞甲型)

根據上表，我們對在不同時期中出現不同抗原構造的病毒可以有二種解釋：

1. 流感病毒是處在一種不穩定的狀態中，其抗原性在不斷的變異；但是在一個比較長的時間階段中如 1934 至 1943 的十年間，各株間的關係是大同而小異；在進入另一個時間階段時例如 1946 年轉變為“亞甲型”時，則發生了比較巨大的變化，故以兩個不同階段中的病毒來比較時，其間的關係是大異而小同。如果此種假定是正確的話，則往者已逝，已經發生過的病毒如 WS 與 PR₀ 等株，祇不過是在試驗室中保留下來的歷史遺跡，在天然流行中很少可能再次出現的。

2. 以上不同抗原性的病毒（如 WS₁、PR₀、FM₁ 等）是甲型病毒中比較固定的亞型；好似典型細菌學中對肺炎球菌各型的看法一樣，我們可以把流感病毒的許多亞型看做在世界各地區中同時存在，其所以表現出在不同時期中的突然出現，不過是因為其中一個亞型暫時的獲得了優勢而已。據此，則其他的亞型目前雖處於劣勢狀態，但必然依舊存在且能在少數情況下致病（或流行），若一旦情勢有利，很可能捲土重來，再佔優勢。

顯然，在以上的解釋中選擇其一不獨在病毒學和流行病學的理論方面是一個基本問題，而且在實際預防方面，亦很重要。為此作者曾收集了 1946—1950 年間由世界各處分離得的甲型病毒，加以分析比較，其一部分結果業經發表^[1]。我們的總的概念是在此五年間，世界各處所分離得的甲型病毒，絕大多數屬於“亞

甲型”，但另外至少有五個試驗室曾報告分離了與 WS 或 PR₀ 株類似的病毒，其中德國、土耳其、法國、意大利及加拿大各居其一。本文的目的即在報告研究這些類似 WS 或 PR₀ 株的病毒的結果，並討論其在解釋整個流感病毒變異現象時的意義。

材 料 與 方 法

1. 標準病毒種

本報告中用作比較的標準毒種有下列各株：

WS 株 共用了以下的四個亞株；對雪貂及小白鼠之致病力均強。

WS/38, 於 1938 年用小白鼠肺乾燥保存，於 1950 年開啓，傳遞於雞胚尿囊中。

WS/V, 同一毒種，但在各種試驗室動物中連續傳遞保存者。

WS/M, 同一毒種，但於 1938 年為荷蘭雷敦 (Leiden) 大學 Mulder 教授取去後在荷蘭試驗室中傳代達十一年，於 1950 年索回者。

WS/N, 嗜神經性 WS 株，經 Stuart-Harris^[2] 適應於小白鼠腦組織中生長者。

PR₀ 株 共用了以下的三個亞株；對雪貂及小白鼠均有較強之致病力：

PR₀/R, 於 1943 年自美國洛克菲勒研究院獲得，適應於雞胚尿囊中生長。

PR₀/38, 於 1938 年用小白鼠肺乾燥保存，於 1950 年開啓，傳遞於雞胚尿囊中。

PR₀/P, 於 1950 年自法國巴斯德研究院獲得。

FM₁ 株 用了以下二個亞株：

FM₁/S, 自瑞典 Lofstrom 氏處獲得，為乾燥之尿囊液，對小白鼠不致病。

FM₁/P, 於 1950 年自法國巴斯德研究院獲得，曾經適應於小白鼠。

Paris-I 株 於 1949 年自巴黎分離^[1]，為“亞甲型”與 FM₁ 相似，對小白鼠不致病。

2. 病毒傳代及動物試驗

病毒一般於雞胚尿囊中傳代，於 35°C 孵育 2—3 日後吸取其尿囊液。其準備用作抗原分析的材料，按照 Fulton 及 Dumbell 二氏^[3] 的方法製成較純之懸液於 4°C 保存，此種懸液至少可保存一年之久，不起沉澱，亦不喪失其抗原性。準

備用作毒種的材料，則以尿囊液封於安瓶中，保存在固體 CO₂ 中。爲了避免傳代中發生變異，病毒於收到後至多傳遞二代，即行試驗。

雪貂試驗——一般用二只，於麻醉後經鼻腔滴入 0.5 毫升稀釋 1:100 的尿囊液，飼養於隔離室中，逐日觀察並測取體溫二次。用作免疫血清試驗時，於接種以前及接種後 14 日抽取血液，分離其血清保存之。

小白鼠試驗——用體重 12—15 克的小白鼠，於麻醉後經鼻腔滴入 0.05 毫升的病毒，一般用不稀釋的尿囊液及 1:100 的稀釋度，各用小白鼠五只，逐日觀察 14 日並解剖之，記錄其肺部的病變。

3. 電子顯微鏡觀察

一般均用 Dawson 及 Elford 二氏^[4]的方法將病毒吸着於溶解後的雞紅血球上，在 85 K. V. 的 Siemens 電子顯微鏡下觀察並攝影。大部標本於乾燥後曾用鈹 (Palladium) 噴射投影^[5]。

4. 抗原分析方法

應用雞紅血球凝集抑制法，使用雪貂癒後血清，並先用霍亂弧菌濾過液處理，以破壞血清中的非特異性抑制物質，其技術及分析結果的方法，曾經作者詳細敘述^[1]，依此方法，二株病毒間的抗原關係可以“抗原比”代表之。茲舉例以說明“抗原比”之求得方法。

血 清	抗 病毒 I	原 病毒 II	效價比 異血清效價 本血清效價
病毒 I 的免疫血清	640	1280	$1,280/640 = 2/1$
病毒 II 的免疫血清	80	2560	$80/2,560 = 1/32$

$$\text{抗原比} = \sqrt{\frac{2}{1} \times \frac{1}{32}} = \sqrt{\frac{1}{16}} = \frac{1}{4}$$

故病毒 I 及病毒 II 間之抗原關係可用其“抗原比”代表之。即在理想的情況下，病毒 I 的免疫血清對病毒 II 的抑制效價爲其對本病毒效價之 1/4，病毒 II 的免疫血清對病毒 I 的效價亦爲其對本病毒效價之 1/4。兩株病毒的抗原性極相類似或不能區別時，“抗原比”應爲 1/1 或其左右。相反的，“抗原比”的分母愈大如 1/32 或 1/64 即意味着二株病毒的抗原性極爲懸殊。

據作者的經驗，用以上分析方法所獲得的結果與定量補體結合反應^[3]及小白鼠和雞胚的中和試驗結果，大致上是平行的。

試驗結果

1. RK₁ 株 (1948 年自德國分離)

RK₁ 株病毒係於 1948 年四月自柏林一個托兒所中流行性感胃流行中分離的，當時柏林除這個托兒所以外並無大規模的流行。原作者 Henneberg 及 Ortmann 二氏^[6]所報告血清學研究的結果傾向於說明此次小流行的病原是乙型病毒，在 13 次分離試驗中僅有 1 次成功即分離得了 RK₁ 株。本株於雞胚羊膜囊中分離並在尿囊內通過，三、四代後對雞紅血球的凝集價即甚高，且對小白鼠有致病力，但原作者未能予以定型。

作者於 1949 年 4 月獲得本株後發現其有下列特徵：本株病毒於雞胚尿囊中生長良好；其對紅血球的凝集力不為正常小白鼠血清所抑制；不稀釋及稀釋 1 : 100 之尿囊液能使小白鼠得典型肺炎而致死；電子顯微鏡照相顯示其形態為球形顆粒，僅有極少數短桿形者。在抗原性方面 RK₁ 與 PR₈/R 株極相類似（抗原比 1/2.6），與 WS 株則較為懸殊，而與“亞甲型”中之 FM₁ 及 Paris-1 似乎全無關係。由此可以判斷 RK₁ 屬於甲型且與 PR₈ 相類似。

2. 安哥拉病毒 (1949 年自土耳其分離)

1949 年 2 月安哥拉流行性感胃流行甚廣，土耳其工作者用小白鼠先後分離了三株病毒即 Ankara 1, 2, 3。據原作者 Payzin 及 Okkan 二氏^[7]報告，此三株病毒於通過小白鼠二三代後即能使小白鼠得肺炎致死。

作者收到的材料是通過五代後的乾燥鼠肺，三株病毒的性狀一致，故可一併描寫之。安哥拉病毒於雞胚尿囊中生長極好，尿囊液呈極高的紅血球凝集價（1/1280—1/2560）。尿囊液於稀釋至 10⁻⁶ 後仍能使小白鼠致死；未稀釋之尿囊液滴入雪貂鼻腔後於 48—72 小時內致死，肺部完全實變，即稀釋至 10⁻³ 後仍能殺死雪貂，故在製備癒後免疫血清時，必須在不麻醉的情況下感染方能使雪貂生存；由此可知此三株病毒對動物致病力極烈，與一般由人體分離的流感病毒迥不相同。本病毒的紅血球凝集力不能為正常雪貂或小白鼠的血清所抑制。電子顯微鏡照相顯示其形態為球形顆粒，僅有極少數的短桿形者。

用感染小白鼠之肺製成溶解性抗原作補體結合反應，證明安哥拉病毒屬於甲型，但在初步抗原分析中，並不能發現其與試驗室中的任何標準病毒有何抗原關係，經比較的標準病毒種包括 PR₈/R, Weiss, WS/V, FM₁/S, Paris-I, Shope 51

(豕型) 及 Lee (乙型)。

由安哥拉取得的病人癒後血清 5 份對甲型溶解性抗原呈陽性補體結合反應，對乙型則為陰性。用該 5 份血清與標準病毒作紅血球凝集抑制反應時僅發現其對 PR₈/R, Paris-I 及安哥拉有相當的效價，但因無病人的急性期血清作為對照，故殊難判斷其意義。

至此為止，我們可以判斷安哥拉病毒為一種具有特殊抗原性與強烈致病力的甲型病毒。

不久後作者自 Mulder 氏處獲知他亦研究了安哥拉病毒，並發現其抗原性與他的試驗室中所保存的 WS 株病毒完全一致。Mulder 氏的 WS 株病毒 (WS/M) 與作者所用的 WS 株 (WS/V) 原係同株而於 1938 年始分出者，自 1938 至 1949 年間已在兩個試驗室中經歷了 11 年不同的歷史。由於流感病毒在試驗室中變異的事實已屢經報告，故作者立刻想到安哥拉病毒所以與作者所用的 WS/V 亞株極相懸殊而與 WS/M 亞株則完全一致，可能是因為 WS/V 與 WS/M 已經因試驗室變異而不同之故。作者乃向 Mulder 氏索取了 WS/M 並與安哥拉病毒及原有的其他 WS 亞株進行了一個詳細的分析比較，結果如表 1。

表 1. 安哥拉流行性感胃病毒與 WS 亞株間的抗原關係

	WS/V	WS/M	WS/38	WS/N	安哥拉病毒
WS/V	1	1/13	1/13	1/23	1/20
WS/M		1	1/1	1/1.4	1/1
WS/38			1	1/1.4	1/1.15
WS/N				1	
安哥拉病毒					1

表 1 所示結果證實了安哥拉病毒與 WS/M、WS/38 二亞株在抗原性上不能區別，三者與作者原用的 WS 亞株 WS/V 之間均有顯著的差別，嗜神經性的病毒種 WS/N 雖然致病力不同，但在抗原性方面仍與 WS/38 近似。由於 WS/38 係於 1938 年乾燥的原種於最近始經啓開者，故必須看作是代表了 WS 株的原來的抗原構造，而 WS/V 則必然是抗原性的變種亞株。該亞株自 1938 年以來曾經數度易手保存，因此又考慮到是否有為另一個流感病毒所污染而代替的可能，但經與本試驗室中所有的其他流感病毒比較的結果，作者認為這種可能是極小的，因為 WS/V 的抗原性祇有與 WS/38 比較的最為接近，而與其他病毒株則更為懸

殊。以後作者自 Mulder 氏處獲悉又發現了他的 WS 亞株 (WS/M) 與美國密西根大學 Francis 的 WS 亞株間在抗原性方面有很大的差異。

3. 巴黎病毒 (1949 年自巴黎分離)

1948 年終至 1949 年初歐洲流行性感胃大流行時所分離的許多株病毒均已經作者證明為“亞甲型”。此次流行於 1949 年 1 月波及巴黎，當時巴斯德研究院曾用雞胚分離了 10 株病毒，其詳情已經原作者 Lepine 等報告^[1]。簡單說來該作者等分離了 10 株病毒，其中 7 株為 PR_s 族，2 株為 FM₁ 族即“亞甲型”，另一株則為介乎二者之間的中間族，因此該作者等認為在同一次流行中，PR_s 族與 FM₁ 族病毒可以同時出現，且能互相演變。

作者自巴斯德研究院獲得了在雞胚內傳遞了五代的病毒，其原名稱如下：(為了方便起見作者將它們重新命名如法 1，法 2 等，本報告中即用此等新名稱。)

PL (法 1，本株與標準毒種中之 Paris-I 為自同一病人分離而得，但法 1 是在巴斯德研究院分離，而 Paris-I 則是在倫敦分離的。)

Maurin (法 2)，Grillot (法 3)，Chantal (法 4)，Bacha (法 5)，Norrie (法 6)，Fargetot (法 7)，Wase (法 8)，Chastaing (法 9)，Copieux (法 10)。

初步血清學試驗獲得了以下的結果：

(1) 法 1 株：Lepine 等認為係介乎 PR_s 與 FM₁ 間之中間族，在本試驗中證明它與 FM₁ 類似，而與 PR_s 不同。

(2) 法 2 株：Lepine 等認為與 FM₁ 相似，在本試驗中發現其類似 PR_s，但同時在某種程度上亦為 FM₁ 血清所抑制，從表面看來，這株病毒似乎可以歸入中間族，但後節中即將敘述將本株分開成為二個亞株的試驗，其一個亞株相當於 PR_s，另一個亞株相當於 FM₁。

(3) 其餘七株即法 3，法 4，法 5，法 6，法 7，法 8 及法 9 均類似 PR_s，另一株法 10 則類似 FM₁，以上結果與 Lepine 等原報告者相符。

通過了以上的初步試驗，作者選擇了 10 株中 5 的株作為詳細研究的對象，即：

法 1 及法 10 代表“亞甲型”病毒即 FM₁ 族；

法 4 及法 5 代表“甲型”病毒即 PR_s 族；

法 2 代表介乎二者之間的中間族。

由法 2 株中分離出二種抗原性不同的亞株

法 2 株收到時保存於冷凍乾燥的安瓶中，啓開後第一代接種所獲的尿囊液受

抗 PR₃ 血清的抑制,效價為 $1/1,280$ 同時亦受抗 FM₁ 血清之抑制,效價為 $1/80$ 。這點與作者以往的經驗不符,因此二種血清若先經用霍亂弧菌濾過液處理以破壞其中的非特异性抑制素後,在一般情況下是不引起交互反應的。

於是乃將以上的尿囊液病毒在雞胚中進行滴定,稀釋度自 10^{-6} 至 10^{-9} ,每個稀釋度接種 4 個雞胚,培育 3 日後抽取尿囊液作紅血球凝集試驗。在 10^{-8} 之稀釋度中,四個雞胚中有 3 個呈陽性,其中 2 個生長出 PR₃ 族病毒,1 個生長出 FM₁ 族病毒。

次用抗 PR₃ 或抗 FM₁ 的免疫血清與法 2 株病毒在雞胚中進行中和試驗。試驗方法將病毒作 10 倍稀釋而與固定量的血清(內含過量抗體)相混合,接種於雞胚尿囊中,培育 3 日後,抽取尿囊液作紅血球凝集試驗,結果本株病毒不能為二血清的任何一種所中和。但與抗 PR₃ 血清混合接種後長出者為 FM₁ 族病毒,而與抗 FM₁ 血清混合接種後所長出者則為 PR₃ 族病毒。

次用抗 PR₃ 與抗 MF₁ 血清混合後進行中和試驗,結果法 2 株病毒完全被混合血清所中和。

為了摒除法 2 株在作者試驗室中遭受其他病毒污染的可能性,乃另取一支由法國寄來的原管重復以上的試驗,結果與上述者完全一致。由於以上的試驗可以判斷由原來的法 2 株病毒中已分出了兩個抗原性不同的亞株,其中的一個屬於 PR₃ 族,另一個屬於 FM₁ 族,為了識別起見前者命名為法 2_I,後者命名為法 2_{II}。

以上的發現可能有三種不同的解釋:(1)法 2 株病毒係由三個病例的咽喉洗滌液混合後分離的,假設當時巴黎真有 PR₃ 族及 FM₁ 族同時流行,則當然可能分離得如法 2 之混雜毒種。(2) Lepine 等^[8] 倡議於同一流行中 PR₃ 族及 FM₁ 族病毒可以互變,且有中間族之發現,如此說屬實,則法 2 株可能為不穩定的中間族病毒,隨時離析成比較穩定的 PR₃ 族及 FM₁ 族。此說甚為動人,且很容易切合於 Lepine 等所稱由巴黎之同次流行中分離出三類病毒的說法。(3) 試驗室中病毒污染的事實已經多次報告,在作者手中亦曾遇見過,因此在考慮首二個可能前,應該首先摒除污染的可能。

法 2 中分出的亞株的純化與純淨試驗

用上法與免疫血清混合接種後分出的法 2_I 與法 2_{II} 亞株復經二次通過雞胚,每次用 10 倍稀釋的病毒,加上含有過量抗體的異族血清(即法 2_I + 抗 FM₁ 血清,法 2_{II} + 抗 PR₃ 血清),每次自接種最高稀釋度病毒的陽性雞胚中($10^{-8.0}$ 或 $10^{-9.0}$),

收穫病毒。如此二次後再將分出的病毒作純淨試驗。

作純淨試驗時，仍用 10 倍病毒稀釋，但此次加入的是含有過量抗體的同族血清（即法 2_I+抗 PR₃ 血清，法 2_{II}+抗 FM₁ 血清），而後接種於雞胚中。結果原含有 10^{8.8} 個 50% 感染量的法 2_{II} 病毒完全為抗 FM₁ 血清所中和，說明法 2_{II} 株是純淨的 FM₁ 族病毒。原含有 10^{9.3} 個 50% 感染量的法 2_I 病毒與抗 PR₃ 血清混合後，其感染滴度減至 10^{1.5}，且長出的病毒仍屬於 PR₃ 族，說明法 2_I 病毒是純淨的 PR₃ 族病毒，但因病毒量過大，故未能為抗 PR₃ 血清所完全中和。

巴黎病毒株相互間的抗原關係及與 PR₃，FM₁，Paris-I 的抗原關係

次一試驗中，用下列 12 株病毒進行了紅血球凝集抑制試驗，以分析其間的抗原關係：

法 1，法 2，法 2_I，法 2_{II}，法 4，法 5，法 10，Paris-1，PR₃/R，FM₁/S，PR₃/P，FM₁/P。

其中 PR₃/R 及 FM₁/S 為作者試驗室中原存的毒種，而 PR₃/P 及 FM₁/P 則係由法國巴斯德研究院取得的毒種。其所以要包括 PR₃/P 及 FM₁/P 於本試驗中，乃係由於不同歷史之同株病毒可能因變異而發生抗原差異之故。

分析結果如表 2 及表 3 所載，其關係可總結如下：

PR₃/P = 法 3 = 法 4 = 法 2_I ≈ PR₃/R

FM₁/P = 法 10 = 法 2_{II} ≈ FM₁/S ≈ 法 1

法 1 = Paris-I ≈ FM₁/S ≈ FM₁/P

其中：= 表示各株間的抗原性不能區別

≈ 表示各株間的抗原性相近似但可以區別

於此有二點值得提出者：

(1) 本試驗中之法 2 株係乾燥毒種接種於雞胚後之第二代，當時在抑制試驗中其抗原性已以 PR₃ 族為主，但感染雪貂後所產生的免疫血清則含有抗 PR₃ 及抗 FM₁ 的兩種抗體；由此亦可證明該時的法 2 株，實係混雜病毒種。

(2) 法 1 株並非如 Lepine 等所稱為中間族病毒，相反的，其性狀與典型的“亞甲型”（FM₁ 族）完全一致。

巴黎病毒的其他生物學性狀

巴黎病毒的其他生物學性狀及與標準毒種的比較，詳見表 4。由該表中可以看出所試驗的巴黎病毒除法 1 以外，均具有下列性狀：在雞胚尿囊中繁殖迅速而

表 2 巴黎流行性感冒病毒與標準病毒種間交互紅血球凝集抑制試驗

疫 血 漿	試 驗 次 數	凝 集												
		PR ₈ /R	PR ₈ /P	FM ₁ /S	FM ₁ /P	Paris-I	法 5	法 4	法 10	法 2	法 2i	法 2ii	法 1	
抗 PR ₈ /R	1	5120		<20			3200	2560	<20					
	2	2560	1280	<20			1280	2240		960	1280	<20	<20	
	5	2240					2560	4480		1120	1120			
	5	640	2560							2240	2240			
	7		2560	560			<20	<20	1280	20	20	640	<10	
抗 FM ₁ /S	1	<20		480										
	2	<20		640										
	6			480	1120			1280	20		960	640		
抗 FM ₁ /P 抗 Paris-I	3	2560		<20		240	10240	10240	<20			400	240	
	1	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	1120	5120	<20			5120	5120	<20		5120	5120			
抗 法 4	1	480		<20			2560	7560	<20					
	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	280	1120				1280	1280	1920		1280	1280			
	20+		70		30	<20	<20	480	240					
	1	3	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
抗 法 10	1	280		40	160									
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	280	640	20+			5120	5120	640	640	640	280	240	120	
	20+													
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
抗 法 2i	1	560	5120											
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	560													
	<20													
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
抗 法 2ii	1	<20		80	320	60								
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	<20													
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
抗 法 1	1	<20	<10	<20	160	120								
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	<20													
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	

20 + 在 1/20 的血清稀釋度中略有抑制反應。本表係 7 次試驗結果合併而成，為了計算“抗原比”，必須用同一次試驗的結果，方能準確。

表3 巴黎流行性感冒病毒與標準株毒種間之抗原關係(由表2計算而得)

	PR ₆ /R	PR ₆ /P	FM ₁ /S	FM ₁ /P	Paris-1	法 5	法 4	法 10	法 2	法 2i	法 2ii	法 1
PR ₆ /R	1	$\frac{1}{2.05}$			$\frac{1}{2.6}$ $\frac{1}{2.58}$	$\frac{1}{2.5}$ $\frac{1}{2.03}$	$\frac{2}{3.9}$ $\frac{1}{2.65}$	×	$\frac{1}{2.5}$	$\frac{2}{3.8}$ $\frac{2}{3.68}$	×	×
PR ₆ /P		1				$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$		×	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{1}$	×
FM ₁ /S			1	$\frac{1}{1.6}$		×	×	$\frac{1}{1.9}$ $\frac{1}{2}$	×	×	$\frac{1}{2.7}$ $\frac{2}{2}$	$\frac{1}{2.7}$ $\frac{2}{4}$
FM ₁ /P				1				$\frac{3}{1.05}$			$\frac{2}{1.15}$	$\frac{2}{1.9}$
Paris-1					1			$\frac{1}{2}$			$\frac{2}{1.8}$	$\frac{1}{1.15}$
法 5						1		×		$\frac{1}{1}$		
法 4							1	×		$\frac{1}{1}$		
法 10								1				
法 2									1			
法 2i										1.15/1		
法 2ii											1	
法 1												1

× 在 $\frac{1}{50}$ 的血清稀釋度中無交互反應，說明二株間的抗原性相差懸殊。若二株間的抗原關係經於數次不同試驗中分析時，則其結果均列入本表。

良好,其紅血球凝集反應不能為正常雪貂及小白鼠血清所抑制,對小白鼠毒力甚強,在電子顯微鏡下呈球狀顆粒形態。這些性狀都與試驗室中保存而適應於小白鼠的標準毒種相符合,而與其他 1949—1950 年所新分離的“亞甲型”病毒全然不同(圖 1 及圖 2)。祇有法 1 株的性狀是與新分離的病毒一致的。表中 FM₁/S 雖久經保存,但從未適應於小白鼠,故其性狀呈中間狀態,而 FM₁/P 則表現為典型的適應於小白鼠的試驗室毒種。

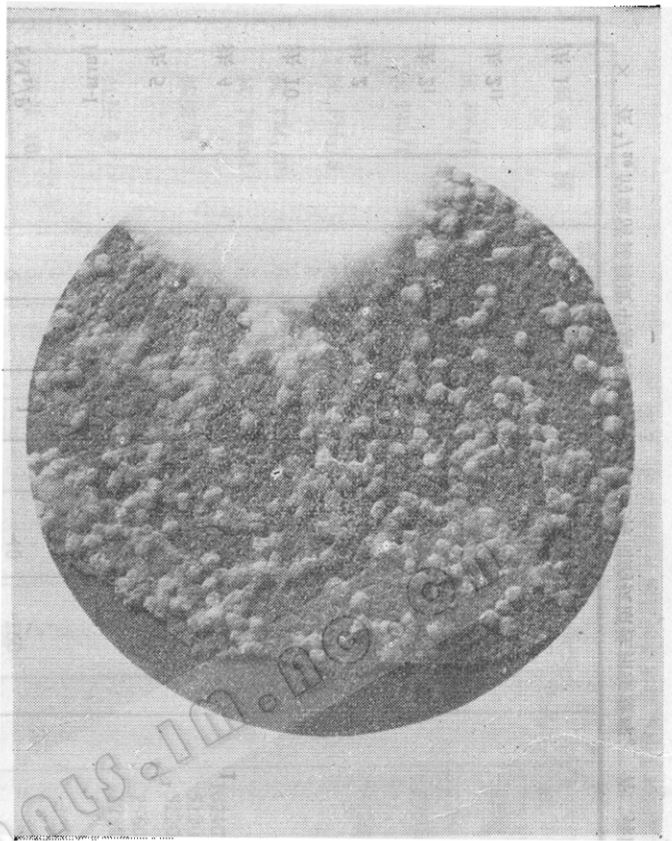


圖 1 試驗室毒種 PR₀ 株的電子顯微鏡照相,顯示球形顆粒的病毒附着於雞紅血球上,經檢查在試驗室中多次傳代的甲型流行性感胃病毒,均與此類似。

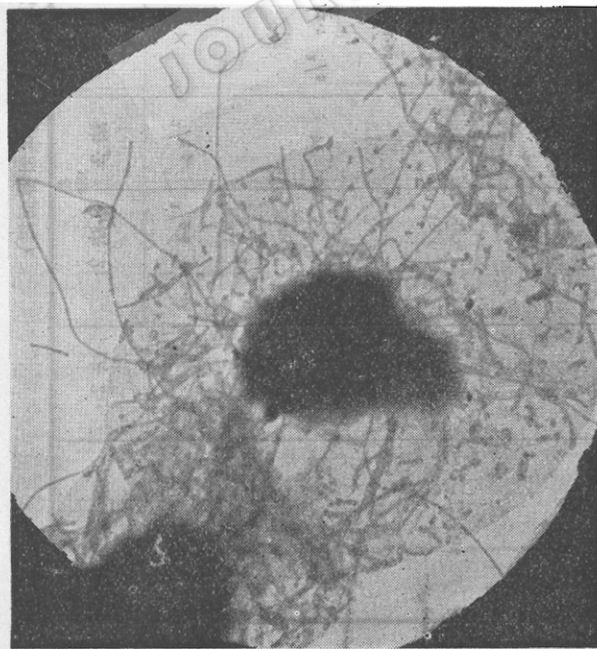


圖 2 1949 年分離的 Paris-I 病毒的電子顯微鏡照相,顯示多數長條形及桿形與少數球形的病毒附着於雞紅血球上,經檢查的由人體新分離的甲型流行性感胃病毒的形態,均與此類似。
(放大 7,500 倍)

表 4 巴黎流行性感胃病毒與標準病毒之生物學性狀比較

株 名	紅血球凝集價 (48小時尿囊液)	正常血清對 紅血球凝集 的抑制度	對小白鼠 毒力*	電子顯微鏡下的形態
法 5	1,280-2,560	-	+	球形顆粒, 偶有短桿形。
法 4	"	-	+	"
法 10	"	-	+	"
法 2	"	-	+	"
法 2 _I	"	-	+	"
法 2 _{II}	"	-	+	"
法 1	160-320	+	-	多數長條形, 偶有短桿形及球形。
PR ₈ /R	1,280-2,560	-	+	球形顆粒, 偶有短桿形。
PR ₈ /P	"	-	+	"
FM ₁ /S	"	+	-	中等量長條形
FM ₁ /P	"	±	+	球形顆粒, 偶有短桿形。
Paris-I	160-320	+	-	多數長條形, 偶有短桿形及球形。

* 用不稀釋及稀釋-1:100 病毒接種小白鼠並通過一代, 以決定有無毒力。

4. 薩地尼 (Sardinia) 病毒 (1949 年自意大利分離)

自意大利 Magrassi 氏獲得了四株流感病毒, 均係於 1949 年由地中海中的薩地尼島上所分離, 為方便起見亦另予命名: Mul (意 1), Tug (意 2), BIA (意 3), CIM (意 4), 其中經原分離者鑑定意 1 及意 2 屬於 FM₁ 族即“亞甲型”, 意 3 及意 4 屬於 PR₈ 族。

作者研究結果證實意 1 屬 FM₁ 族並與 Paris-I 株極為近似。意 4 株未能由乾燥狀態下復活, 故未能研究。意 3 株經接種於雞胚尿囊中後, 分出了兩個亞株, 其一經證明為流感病毒, 另一株則經證明為亞洲雞瘟病毒 (Newcastle disease virus)。分出的流感病毒經純化後表現下列之性狀: 在雞胚內繁殖迅速而良好, 對小白鼠毒力甚強, 在電子顯微鏡下呈球狀顆粒形態, 抗原性與 PR₈/R 不能區別。至於意 3 株病毒中何以有亞洲雞瘟病毒參雜在內, 殊屬費解, 據推測大約並非由於病人咽喉部有該病毒存在之故, 最可能的解釋是由於試驗室污染 (分離該株病毒之試驗室中同時在進行亞洲雞瘟病毒工作), 或由於所用雞卵感染有亞洲雞瘟之故 (供給該試驗室受精雞卵之地區有亞洲雞瘟流行)。

5. 愛斯基摩 (Eskimo) 病毒 (1949 年自加拿大北極地帶分離)

Nagler, van Rooyen 及 Sturdy 等^[9]與 Van Rooyen, Maclelland 及 Campbell 等^[10]曾報告於 1949 年 3、4 月間在加拿大西北地帶的維多利亞島 (Victoria Island) 愛斯基摩人中突然爆發的一次極烈的流行性感胃, 全島 90 人中全部得病, 18 人

死亡,同在該島之少數加拿大人則未受感染。由此次流行中所採集的標本送至渥太華 (Ottawa) 及土倫多 (Toronto) 二個試驗室中化驗。渥太華試驗室由 12 例的咽喉部洗滌液中分離了 11 株流感病毒,並由一例死者的肺及氣管中分離病毒,由另一例死者的肺、肝、脾及心血亦分離得病毒,但關於這些病毒的詳細鑑別,迄未見發表。土倫多試驗室中亦由 12 例的咽喉部洗滌液中分離了 11 株流感病毒,並由 3 例死者之一的肺部分離得病毒。這些病毒曾經研究均屬 PR₀ 族,其特性為對小白鼠毒力特別強,能於鼻腔及腹腔注射後引起肺炎而致死。但在加拿大其他地區所分離的病毒,則除一個未經證實的例外情形以外,均屬於“亞甲型”,且對小白鼠無毒力。據 van Rooyen 等的報告,恢復後的愛斯基摩病人的血清中對 PR₀, FM₁ 及 Weiss 株病毒抗體滴度均高,對乙型流感病毒 (Lee) 則滴度甚低,但若仔細分析該作者等的材料,則大部分血清對 FM₁ 的抗體滴度超過了對 PR₀ 的抗體滴度。

作者獲得了二株病毒,名愛 1 及愛 2。該二株於雞胚尿囊中生長迅速,尿囊液於 40 小時內紅血球凝集價達 $1/1,280$ 以上;對小白鼠毒力甚強;對雪貂感染力強且能刺激大量抗體的產生;在電子顯微鏡下呈球狀顆粒形態。以上的結果基本上證實了 van Rooyen 等的報告。為了進一步了解該二株病毒與標準毒種的抗原關係,又進行了抗原分析,結果見表 5。由此表中,可以看出愛 1 及愛 2 株病毒與 PR₀/R 在抗原性上不能區別,而與 FM₁/S 及 Paris-I 株則大相懸殊。

表 5 愛斯基摩流行性感胃病毒與標準病毒種間的抗原關係

	愛 1	愛 2	PR ₀ /R	FM ₁ /S	Paris-I
愛 1	1	$1.16/2$	$1/1$	$< 1/180$	$< 1/60$
愛 2		1	$1/1.4$		

討 論

以上報告中敘述了近年來自五個不同的國家中分離出的類似 WS 或 PR₀ 的流感病毒的研究結果,這些病毒有幾點共同之處值得注意的。

首先,在此五例中,病人的血清學材料或是不完全,或是與流行病學及病毒學方面的發現相矛盾。例如柏林托兒所的流行在流行病學與血清學方面均似乙型,而分離出的病毒則為甲型。愛斯基摩人的血清反應對 FM₁ 族較高,但所分離

的病毒則全屬 PR₈ 族。Lepinc 等^[8]關於巴黎流行的報告中非常重視病人血清中對 PR₈ 及 FM₁ 的抗體的同時增加的問題，認為這是該次流行中有毒種變異的一種證據。但公認的看法是成人對流行性感胃的血清學反應是比較複雜，並且特異性較低的。如在 1949 年英國雪飛城 (Sheffield) 的流行中，分離出的病毒均屬“亞甲型” (FM₁ 族)，而病人血清中的抗體則對 PR₈ 及 FM₁ 均有增加，但一般的對 FM₁ 的抗體增加較多^[11]。

其次，在此 5 例中所分離得的流感病毒均在一開始時即對小白鼠有強烈的毒力；其紅血球凝集反應均不為正常雪貂或小白鼠的血清所抑制；在雞胚尿囊內繁殖迅速而良好；其形態均為球狀顆粒而無長條形者。這些性狀均與新分離的“亞甲型” (FM₁ 族) 病毒不同^[11,12]。為了闡明新分離的 PR₈ 族病毒與“亞甲型” (FM₁ 族) 病毒是否有本質上的區別起見，作者乃選擇 1943 年分離的 PR₈ 族病毒作為比較對象。這 4 株病毒：Huston (密西根，雞胚 10 代)，D 153 (北加羅里那，雞胚 7 代)，Olson (加里福尼亞，雞胚 8 代) 及 1A43 (俄亥華，雞胚 57 代)，於分離後曾在雞胚中傳代，但從未通過其他動物，即行冷凍乾燥保存。研究結果這四株病毒對小鼠均無毒力；其紅血球凝集反應均為正常雪貂及小白鼠血清所抑制；在電子顯微鏡下呈長條形，短桿形及球形的形態，但一般說來其條形者長度較新分離的“亞甲型”病毒略遜。由此看來，新分離的 PR₈ 族與 FM₁ 族“亞甲型”病毒，原無本質上的區別。而本報告所述各株則顯然是一種突出的例外。

再其次，本報告中所述各株病毒的抗原分析結果，其抗原性與久經保存在試驗室中的標準毒種中的一株，WS, PR₈，或 FM₁，或完全不能區別，或僅有極微小的差別。此點亦屬非常特殊，因自 1934 至 1943 年間，所分離的 PR₈ 族病毒不下百株，其抗原性尚無與 PR₈ 株完全一致者^[13]。

由於以上的理由，使作者考慮到以上報告的這些病毒可能是實驗室污染的結果。如果此說屬實，則安哥拉病毒實係 WS 株；RK₁ 及意 3 實係 PR₈ 株；巴黎病毒中除法 1 外，其餘屬 PR₈ 族者實在即是 PR₈/P，屬 FM₁ 族者實在即是 FM₁/P，而法 2 株則為 PR₈/P 與 FM₁/P 混合污染的結果。

愛斯基摩病毒則有另予討論的必要，這些病毒曾在兩個不同的試驗室中分離，似乎不可能都是由於污染之故。但必須注意者，迄今僅有土倫多試驗室中分離的病毒曾經鑑別報告，因此對渥太華所分離的病毒進行詳細研究將是一個重要的問題。

Andrewes 等^[14] 曾報告了 14 例流感病毒引起試驗室污染的事件。近年來，在作者及其他試驗室內於雞胚接種中亦曾發現過污染情況，而本報告中意 3 株流感病毒為亞洲雞瘟所污染的事實更足說明這種可能。近年來由於廣泛應用活毒作為紅血球凝集抑制試驗及補體結合試驗的抗原，無疑的增加了污染的機會。因此作者認為進行病毒分離的試驗室和人員必須與進行血清學試驗的分開；對每個分離的新病毒，特別是其抗原性與當時流行的一般病毒相異而與試驗室中的標準毒種相似時，應進行以下的幾項檢查：(1) 形態；(2) 對小白鼠的毒力；(3) 與標準菌種間的抗原關係分析；(4) 在雞胚羊膜內祇傳一代或二代的病毒，還應鑑別其為“O”相或“D”相^[15]。

本報告並不能完全否定近年來世界上曾有 WS 或 PR₁ 一類流感病毒的流行，更不能否定流感病毒在一次流行中往返突變的可能，但至少說明了以前所提出的證據均未足以建立這些說法。據作者所知，除以上五例外，1946 年以來所分離的甲型病毒均屬“亞甲型”；如 1949—1950 年之流行中，世界流行性感冒研究中心曾由十二個國家收集了 67 株甲型病毒；1950—1951 年之流行中，曾由二十七個國家收集了 96 株甲型病毒，全部均為“亞甲型”，沒有一株是與 WS 或 PR₁ 相類似的。近年來關於流行性感冒的流行病學和病毒的抗原性結合起來的研究至少已指出了以下幾種現象。

1. 甲型流感病毒的傳播是世界性的，近年來流行的甲型病毒已經詳細研究的均屬於“亞甲型”。流行性感冒的起源可能由各個不同的地區因潛在病毒的活動化而自行爆發，在這種情況下，由各地區所分離的病毒株間的抗原差異稍大；但最廣泛的流行則似乎是由一個地區發源後而沿交通線傳播到世界其他地區的，在這種情況下，由各地區所分離的病毒株間的抗原差異較小或竟不能區別。若將歷年的“亞甲型”病毒（如 1947, 1949, 1951 三年中分離的病毒）加以比較時，則一般在同年發生的病毒株間的抗原性比較一致，而不同年發生的病毒株間的差異稍大^[1, 16]。

2. 在試驗室中，流感病毒的生物學性狀是極不穩定的，即使在別的疾病中比較穩定的抗原性方面，在於流感病毒亦容易發生變異。在一般情況下，這些變異是逐步的^[17, 18, 19, 20]，但在某些情況下面，也可能突然發生顯著的變異^[15, 21, 22, 23]。Francis^[24] 曾報告過二個 PR₁ 亞株在抗原性方面有巨大的差別，本文中所報告的 WS 變異株也類似這種情況，但由於對變異的過程未加研究，我們無法得知這些

較大的差別是由小變異積累而成的或是突然發生的，但無論如何，類似的情況，很可能在天然流行中發生。

總結以上的情况，我們有理由可以相信過去流行的病毒如 WS 及 PR₀ 已經絕跡，且少有可能再次出現；不但如此，即使目前正在盛行的“亞甲型”亦在演變過程中。因此天然界中的流感病毒，並非是幾個固定的類族的此起彼伏，而是在不斷的變異；這種變異一般的是比較小的，因此在流行病學和免疫學上沒有實際的重要性，但也可能是巨大的，因而引起廣泛劇烈的流行。變異的原因可能是由於人體對現行病毒免疫力的增加，也可能還有未知的因素，須待繼續研究。

在預防方面，流行性感冒疫苗的效力早經證明^[25,26,27]，但必要的條件是疫苗中所含的病毒的抗原性須與流行的病毒相接近。1947 年 PR₀ 疫苗免疫的失敗^[28,29,30] 與最近“亞甲型”疫苗免疫的成功^[31,32]，更證實了這點。即使在平時，因流行性感冒而引起併發症的死亡數相當可觀，萬一再有如 1918—1919 年的烈性病毒發生時，則疫苗的需要將更為迫切。必須指出由於流感病毒分離、鑑別和疫苗製造的技術的發展，特別在我國這樣廣闊的土地上，在流行的初期及早分離病毒加以研究，若發現巨大的變異株時，立即進行疫苗製造是完全可能的。據 Isaacs 等報告^[15]，1950 年夏天流行性感冒在瑞典先有散發性的小流行，入秋以後即滅跡，該年冬即爆發成大流行，且夏冬兩季所分離的病毒，經證明為同一類的，這樣的例子以前曾屢見不鮮。如以上的情况屬實，則注意在夏季發現流感的變異種，將有更大的意義。至於似乎已成為歷史陳跡的 WS 或 PR₀ 株，在製造疫苗時，似可不必考慮。

總 結

1. 1946 年以來，五個國家的試驗室中曾分離了類似 WS 或 PR₀ 株的甲型流行性感冒病毒。這些病毒的性狀如形態，對小白鼠的致病力及和標準毒種間的抗原關係等，都不像新分離的病毒；相反的，它們與試驗室中的 WS 或 PR₀ 株標準毒種，極為相似或竟完全不能區別。

2. 綜合流行病學和病毒學方面的證據，這些類似 WS 或 PR₀ 的病毒，最可能是試驗室污染的結果，而並非由病人中分離的。

3. 由於 1946 年以來所分離的絕大多數甲型流感病毒均屬於“亞甲型”，而僅有的數例分離類似 WS 或 PR₀ 的病毒的報告又不能成立，作者推測 WS 與 PR₀ 病

毒，已於天然流行中絕跡，並將此種看法與流感病毒的變異學說及流感疫苗製造的關係，加以討論。

參 考 文 獻

- [1] Chu, C. M., Andrews, C. H. & Gledhill, A. W., *Bull. World Hlth. Org.*, 1950, **3**, 187.
- [2] Stuart-Harris, C. H., *Lancet*, 1939, **1**, 497.
- [3] Fulton, F. & Dumbell, K. R., *J. Gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 97.
- [4] Dawson, I. M. & Elford, W. J., *J. Gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 298.
- [5] Williams, R. C. & Wyckoff, R. W. G., *Nature*, 1945, **156**, 68.
- [6] Henneberg, G. & Ortman, A., *Zbl. Bakt. (1 Orig.)*, 1949, **154**, 178.
- [7] Payzin, S. & Okkan, S., *Turkish Bull. Hyg. Exp. Biol.*, 1949, **9**, 67.
- [8] Lepine, P., Sauther, V., Reinie, L. & Maurin, J., *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **77**, 108.
- [9] Nagler, F. P., van Rooyen, C. F. & Sturdy, J. H., *Can. J. Pub. Hlth.*, 1949, **40**, 457.
- [10] Van Rooyen, C. E., McClelland, L. & Campbell, E. K., *Can. J. Pub. Hlth.*, 1949, **40**, 447.
- [11] Staut-Harris, C. H. 未發表資料
- [12] Chu, C. M., Dawson, I. M. & Elford, W. J., *Lancet*, 1949, **1**, 602.
- [13] Veen, J. Van Der & Mulder, J., Studies on the antigenic composition of human influenza A strains with the aid of haemagglutination-inhibition technique. Leyden. Stenfert Kroese. 1950.
- [14] Andrewes, C. H., Glover, R. E., Himmelweit, F. & Smith, W., *Brit. J. Exp. Path.*, 1944, **25**, 130.
- [15] Burnet, F. M. & Bull, D. R., *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1943, **21**, 55.
- [16] Isaacs, A., Gledhill, A. W. & Andrewes, C. H., *Bull. World Hlth. Org.*, 1952, **6**, 287.
- [17] Chu, C. M., *J. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 739.
- [18] Hirst, G. K., *J. Exp. Med.*, 1947, **86**, 357.
- [19] Isaacs, A. & Edney, M., *Brit. J. Exp. Path.*, 1950, **31**, 196.
- [20] ———, ———, *Brit. J. Exp. Path.*, 1950, **31**, 209.
- [21] Burnet, F. M., *J. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 54.
- [22] Burnet, F. M. & Lind, P. E., *J. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 59.
- [23] ———, ———, *J. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 67.
- [24] Francis, T. Jr., *Proc. Soc. Exp. Biol.*, N. Y., 1947, **65**, 143.
- [25] Members of the Commission on Influenza, Army Epidemiological Board, *J. A. M. A.*, 1944, **124**, 982.
- [26] Francis, T. Jr., Salk, J. E. & Brace, W. M., *J.A.M.A.*, 1946, **131**, 275.
- [27] Hirst, G. K., Vilches, A., Rogers, O. & Robbins, C. L., *Amer. J. Hyg.*, 1947, **45**, 96.
- [28] Francis, T. Jr., Salk, J. E. & Quilligan, J. J. Jr., *Amer. J. Pub. Hlth.*, 1947, **37**, 1013.
- [29] Sigel, M. M., Shaffer, F. W., Kirber, M. W., Light, A. B. & Henle, W., *J. A. M. A.* 1948, **136**, 437.
- [30] Loosli, C. G., Schaenberger, J. & Barnett, G., *J. Lab. Clin. Med.* 1948, **33**, 789.
- [31] Meiklejohn, G., Weiss, D. L., Shragg, R. I. & Lennette, E. H., *Amer. J. Hyg.*, 1952, **55**; 1.
- [32] Meiklejohn, G., Kempe, C. H., Thalman, W. G. & Lennette, E. H., *Amer. J. Hyg.*, 1952, **55**, 12.

STUDIES ON THE VARIATION OF INFLUENZA A VIRUS IN NATURE—THE SIGNIFICANCE OF ISOLATION OF STRAINS ANTIGENICALLY RELATED TO WS OR PR₈ SINCE 1946

CHU C. M.

National Vaccine and Serum Institute, Peking, China

Since 1946, laboratories in five different countries have claimed isolation of influenza A virus related to WS or PR₈. The characters of these viruses, such as their morphology, pathogenicity for white mice and their antigenic relationship to laboratory stock strains, etc., indicate that they are very different from those of freshly isolated influenza A virus. On the contrary, they are either very close to or actually indistinguishable from one of the substrains of stock WS or PR₈ virus.

The combined epidemiological and virological evidence suggests that the strains in question are most probably contaminants accidentally picked up in the laboratory rather than genuine isolations from human cases.

Since the vast majority of influenza A strains isolated after 1946 belong to the A-prime group and since the few claims of isolation of strains related to WS or PR₈ must be considered unestablished, it seems justified to assume that the WS and PR₈ groups of virus has been entirely replaced by later variants and no longer exists in nature. The pertinence of this view to the theory of variation of influenza virus and to the preparation of influenza vaccine is discussed.