

新城雞瘟病毒通過鴿與 小白鼠的初步試驗

方定一 徐 匯 儲靜華

(蘇北農學院)

一. 前 言

我國現用的 Mukteswar 系致弱新城雞瘟活毒疫苗，雖然應用方便，免疫力高，但仍然存在着很多的缺點。第一，該項疫苗保存期太短，在夏季溫度內 3 天即行失效，雖然可在冬季施行預防注射，然冬季雞隻大都業已長成，且多在年關附近殺去，如該時施行預防，則在免疫力開始建立時，雞羣大部即將遭殺，事倍而功不及半，失去避疫的意義；反之，在春夏之交的雞數目既多，也很需要預防，但是爲了疫苗在保存上的困難，很難作大規模有計劃的預防；第二，製造該項疫苗須要具有一定的設備和技術，所以要在農村裏使用的疫苗，不得不仰求於大城市，以我國現有的交通條件，要想在短期內把疫苗運到農村裏而不使它失效，實在是一件困難的事情；第三，該項疫苗雖然安全，仍舊具有一定的致病力，兩個月以下的雛雞、純種雞、以及健康情形稍差的雞，尤其危險。因爲具有上述三點主要缺點，所以雞瘟仍然能夠在農村中十分猖獗，現在還沒法加以控制。

所以如何製造更好的雞瘟疫苗，是目下急待解決的一個問題，作者所做的試驗不過是一個開端，究竟是否有希望還要看將來的發展而定。現在祇報告一些初步的情形，希望大家的指正，以便今後能採取更有效的方法，使病毒致弱，而能成爲較好的疫苗。

在我國現用的疫苗中要算兔化牛瘟疫苗最好，因爲不但價廉、安全和效力高等等優點，最要緊的還是製造方便，可以大量供應，所以作者也採用了動物通過致弱的方法來做下列試驗。

二. 新城雞瘟病毒通過鴿子的試驗

用本病毒通過鴿腦的試驗，以前有人做過，致弱的情形並不滿意，但本人事先缺乏參考書，所以並未看到有關文獻，在 1951 年冬企圖用南通當地病毒以肌肉注射的方式通過鴿子，雖然沒有成功，但從繼代困難的事實中，知道鴿子對本病毒具有相當的抵抗力，所以仍然相信如能長期通過鴿體，其毒力必然會大大的致弱。到揚州來後於 1953 年 5 月初旬起重作下列試驗：

1. 所用病毒：作者在南通時從一自然發病的鷄採得其腦及脾臟，當時寄南京農科所鑑定，現由該所保存，名為南通系強毒，此次從南京取回，再經鷄胚培養後所採得的絨毛尿液。該病毒毒力強大，在揚州曾作一接種試驗。用 2×10^{-2} 濃度注射成年母鷄 4 隻，每隻 0.5 毫升，結果潛伏期祇 26—48 小時，病程 24—48 小時全部死亡。全係呼吸及消化系的症狀，因病程太短，不及顯神經症狀，剖檢為標準的損害，即前胃出血斑、全部腸道粘膜出血、肺充血、氣管支、喉頭有出血發炎及多量分泌物。

2. 通過方法：除第一代用未經稀釋絨毛尿液 0.2 毫升作鴿靜脈注射外，餘均用病鴿腦組織乳液行腦內接種。

(1) 注射方法：用病死鴿大腦組織 10^{-1} 濃度的乳液，吸入結核菌素注射器，安裝 20 號針頭，作注射準備。最初 10 代均選取羽翼初成的乳鴿，拔去頭頂的羽毛，用碘酒在局部消毒後，以左手固定鴿身及鴿頭於桌上，右手持針垂直刺入大腦右半球處（即在眼後上方與耳孔成等邊三角形之點上），深約 3 毫米，每次注入 0.05—0.1 毫升（圖 1），10 代以後即改用成年鴿通過。



圖 1 鴿之固定及注射法

(2) 採腦及腦之處理：採腦時先拔光頸及頭部的羽毛，然後用碘酒在全頸及頭部皮上塗抹，再用利剪在頸胸交界處剪斷頸椎及肌肉組織。將頭皮向上整個剝離至口部為止，小心勿用手觸及顱骨，然後用彎剪先在火焰上燒灼，後從枕骨下部向左右往前剪去，至離眼後角不遠處，即向左右方向作一橫線切斷，此時可用彎剪小心揭去腦蓋及蜘蛛膜；用白金耳在大腦上醃取材料接種鮮血瓊脂，作細菌培養。最後以彎剪從枕骨處小腦底下探入，沿底部向前向上剪去附着組織後，

此時大小腦即可附於剪頭上取下。取出之腦除保存一部份外，即秤定重量入消毒乳鉢或十字形磨碎器，再用生理鹽水稀釋成 10^{-1} 備用。

凡在腦膜上醮取材料接種鮮血瓊脂後有細菌生長的腦，棄去不用，或於每毫升稀釋液中加入青黴素 500 單位及鏈黴菌素 25 毫克在 37°C 保溫至少 1 小時，以消滅染污之細菌，再行繼代。我們從發現染污以後，每代均用上法處理以防染污。

我們因實驗室內沒有冰箱，所以病毒的保存很感困難，普通將整塊腦組織保存於 50% 甘油生理鹽水溶液中，內含有緩衝鹽，並滴入適量的酚紅溶液作指示劑，較正 pH 為 7.4。用此項辦法，保存夏季溫度 ($32-38^{\circ}\text{C}$) 20 天後病毒仍有感染力，惟 30 天後往往不復活動。

3. 注射時的意外

(1) 注射反應：經過 150 多次注射鴿的經驗，知道注射後反應的嚴重與否，決定於注射量大小和注射時是否刺破大腦表面血管而定，注射時針頭刺入的深淺則關係較小。注射量一般在 0.05 毫升以下時雖有反應均很安全；到 0.1 毫升時則發生反應的約佔 90%，死亡者佔注射數全部之 30% 左右，注射量過大的原因往往因針頭阻塞後用力一按所致；在 0.2 毫升時則幾乎全部發生反應，死亡者佔 80% 之多。如遇刺入腦殼後將針頭搖動，或一次發生阻塞即將針頭拔出換針頭重行刺入時則腦血管及組織易於刺破，常有危險；但若注射量不超出 0.05 毫升時則雖稍刺破血管大都可不致死亡。最常見而輕微的反應為嘔吐及精神不振，往往於 5, 6 小時後完全復元，較劇者為旋轉及不能平衡，再劇者為兩腿向後伸直，不能起立及行走，頭彎成鈎狀，亂撲亂衝（圖 2），呼吸辛苦而發聲，此時較為危險，如在 6 小時後仍舊不死的話，則可稍癒而養到正式發病而死亡。反應常於注射後 3—5 分鐘時開始。



圖 2 鴿注射後在地下亂撲之反應

(2) 細菌染污：鴿子對小量的一般非致病性細菌具有抵抗力，所以不易染污，作者因事忙從第 3 代起一直到 16 代都沒有作細菌檢查，到了第 16 代發現有大量革蘭氏陰性桿菌染污；以後，再將各代腦作培養，發現從第 11 代起開始染污，因手頭無抗生素，所以將全部染污材料棄去，從第 10 代重新做起到了第 13 代開始加入抗生素以後一直到現在都沒有發現染污。

(3) 鴿子的天然抵抗：對本病毒具有自然免疫的鴿子不多，在接種 150 多頭

鴿子中，除因反應而死亡者 30 餘頭外，不發病者祇有 4 頭，而其中有兩頭係肌肉接種的（肌肉接種的鴿子總數祇 15 頭）。

4. 病毒在鴿體內適應的情況：到目前為止，病毒在鴿腦內已通過 51 代，先後在鴿腦內共歷 158 日，經過鴿腦通過後，病毒在各方面均有顯著變化。

(1) 對組織的嗜嗜化：南通系新城雞瘟病毒為泛嗜性病毒，所致症狀及變化涉及呼吸、消化以及神經等系統，經腦腔接種於鴿後，鴿子均表現神經症狀（見圖 3）；雖從剖檢中可以發現其逐漸在變化，但不十分明顯。鴿子最初的剖檢病變與雞之損害大致相同，到第 6 代以後，前胃粘膜均無出血。以後的損害主要特徵為：腦充血、頸部皮下出血、筋胃角質層下有淡紅色出血斑，以及大小腸粘膜出血。從 20 代以後變化雖與 6 代後同，但消化道損害愈來愈輕，約有 10% 的鴿子除頸皮下及腦充血外，消化道並無肉眼可見的損害，對神經系統嗜嗜性的變化經接種於雞後則十分明顯；第 6 代接種的雞呼吸系症狀即不顯著，祇於呼吸時發生嚕聲，並無咳嗽症狀，惟剖檢則與原來者沒有區別；從第 12 代到 49 代為止接種的雞共有 30 頭，除 2 頭沒有症狀，2 頭祇顯精神萎靡，旋即恢復外，3 頭顯兩腿麻痺症狀且癒後亦不易復元，其餘的先為不如意的動作繼麻痺昏睡而死亡，除呼吸時或有發聲外無其他呼吸症狀；死亡的雞前胃粘膜有 50% 並無出血，呼吸系無變化，大小腸則常有出血，及輕度卡他炎，腦皮質都有明顯的充血或出血。此外對神經組織的嗜嗜性可以從能在小白鼠腦組織內繁殖來表示之。

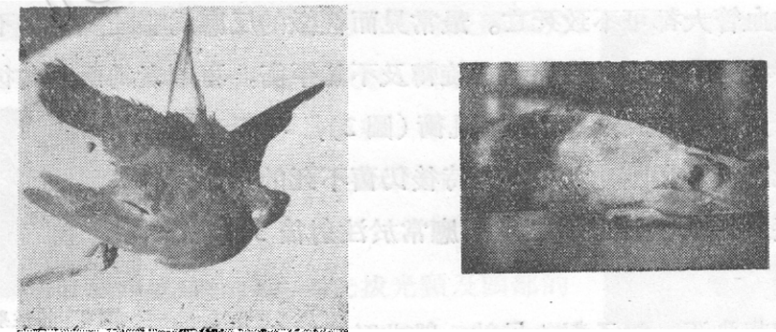


圖 3 (左) 鴿發病後症狀初期，身體向前傾跌，兩足向後伸直，頭向下鈎彎。
(右) 鴿臨死時之姿態。

(2) 對動物種嗜嗜性的轉化：

理論上對動物的專化，應表現在對鴿子毒力的增加和對雞毒力的減弱。試觀下列結果。

對鴿子毒力的增強甚為顯著，第一，從鴿子接種後潛伏期和病程的逐漸縮短

的情形中可以觀察出來。

表 1 鴿子腦內接種病毒後潛伏期和病程的變化

	平均潛伏期日數	平均病程日數	共接種頭數
第 1—10 代	3.5	1	28
第 11—20 代	4*	1	35
第 20—30 代	2	0.5	26
第 30—40 代	1.5	約 6 小時	18
第 40—50 代	1.5	約 6 小時	14
第 51—53 代	1	約 6 小時	4

凡反應死亡者不列入內

* 第 11—20 代因所用為成年鴿，所以潛伏期增長。

除此而外，第 25 代左右的鴿化病毒於本校所飼養鴿羣中的年青鴿發生自然感染，結果先後死亡 4 頭剖解損害，細菌檢查以及接種於成年鴿等試驗中證明為新城雞瘟。以作者過去觀察，鴿子與病鴿同飼一處之環境中從未發現有自然感染而致死的情形，於此證明 25 代時的鴿化病毒對於鴿子的毒力業已大為增加。

對雞毒力的減小，最初 10 代中變化很快；自 12 代以後則變化不大，試觀下表：

表 2 用鴿化病毒人工接種於雞的結果

	發病數	死亡數	無症狀	耐過
第 6 代	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{2}$	0	0
第 12—20 代	$\frac{12}{16}$	$\frac{12}{15}$	$\frac{1}{15}$	$\frac{2}{15}$
第 31 代	$\frac{2}{6}$	$\frac{4}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$
第 49 代	$\frac{0}{6}$	$\frac{5}{6}$	0	$\frac{1}{6}$
原來病毒	$\frac{4}{4}$	$\frac{4}{4}$	0	0

註：分母表示試驗雞數，分子表示陽性頭數。所用雞均為 1 斤左右之雛雞。

* 第 49 代死亡之 5 隻雞中有 1 隻因兩腿完全麻痺，臥地甚久，後始死亡。用第 49 代鴿化病毒接種於雞發病後，仍可感染於有易感性之雞，使其發病死亡。

三. 新城雞疫病毒通過小白鼠的試驗

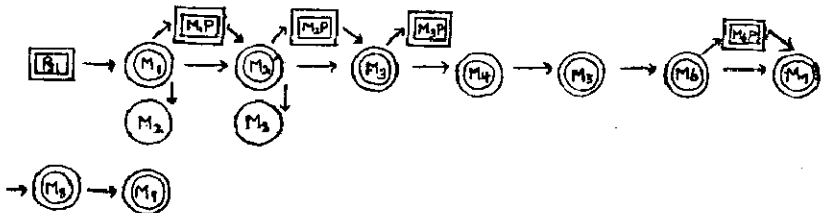
新城雞瘟通過小白鼠繼代的報告已有多起 (П. М. СВИННОВ 1950, Reagan 1950, Brueckner 1950, Kilham 1950)。書上所看到的方法不外兩種：其一為先通過 Hamster 腦（一種短尾地鼠）300 多代後再通過小白鼠腦腔；其二為先用初生乳鼠作腹腔注射，如此通過多代後再通過成年鼠腦。惟我國現在尚未大量繁殖 Hamster；而且南通系病毒不能直接用腹腔接種法使初生小白鼠發病，非另用他

法不可。

1. 失敗的經過：作者在南通時企圖以腦腔接種於豚鼠及小白鼠均無結果(參考南通學院畜牧獸醫期刊第七期)；自來揚州後擬照 Kilham 氏法腹腔注射吮乳小鼠亦無結果；至於用盲目通過法，以及吮乳小鼠，盲目腦腔通過法均無結果。所用材料係鴿腦化病毒，以後該病毒對腦組織逐漸專化，始發生症狀。茲將失敗結果列表於下：

病毒番號	接種小白鼠數	接種法	結果
P ₆	3 (初斷乳)	腦內	無症狀
P ₁₂	3 (初斷乳)	腦內	無症狀
P ₁₆	3 (初斷乳)	腦內	無症狀
P ₂₁	12 (初生)	腦內盲目通過	無症狀且於第二代鼠不能測得病毒
P ₂₄	6	腹腔盲目通過	無症狀第二代腦內無病毒

2. 通過的經過：作者於一連串小白鼠通過中，經驗到普通注射器太大，針頭太粗，腦腔注射吮乳小鼠時極易損壞腦組織而死亡；且針頭粗則注射材料每於注射後從針孔內流失。因此設計了毛細管注射法，用直徑 2 毫米的硬質玻璃管在火焰上拉成毛細管，一端裝一橡皮管，便於用口吹吸，再用 0.1 毫升有 0.001 刻度的吸管測定該毛細管的容量；即用此毛細管吸取第 31 代鴿腦 10^{-1} 濃度 0.005—0.01 毫升，在乳鼠前額稍偏向耳根處垂直注入，每代用 2—3 鼠結果第 1 代經 4 日之潛伏期全部發病，1—3 日內死亡。以死鼠腦組織企圖通過第 2 代鼠即告失敗，所以我們設計了鴿腦加濃法：即以第 1 代死鼠腦（以後稱 M₁ 第 2, 3, 4 代均此）組織注射鴿子，俟鴿發病死亡後採取鴿腦（稱 M₁P 以後均此）加入等量 M₁ 腦接種 M₂，M₂ 也於第 3—4 日發病 1—3 日死亡，也不能直接通過 M₃，仍須接種 M₂P 後方可通過，現在所存的系統見下表。



註：圓形代表小白鼠，長方形代表鴿子，雙邊代表發病，單邊代表不發病。

從 M₃ 以後即可連續通過直至 M₆，中間會有多頭不發病而停頓一下，再通過鴿子腦加濃法而直至 M₉ 發病為止。因為我們小白鼠數目太少到該時已經用完，

所以試驗暫停。

3. 小白鼠的潛伏期及症狀：小白鼠的潛伏期表現得很不規則，最初的一律 3—4 天，從第 6 代起則逐漸增長，而病程亦較長。此種改變並不能用小白鼠年齡來說明，恐在做試驗時母鼠受無症狀感染發生免疫，所以生下的小鼠獲得先天性被動免疫。最長的潛伏期為 14 天（第 7 代），病程最長的有 4 天（第 8 代），仍未死亡，結果恐其痊癒，所以把它殺死。一般症狀：發病第 1 天恆為運動興奮，即未開眼的小白鼠也能走得很遠，較大的鼠則不斷行走或驚躍，走時把身體抬得離地很高，開籠時則常逃出籠外，後則有陣發性痙攣，最後則以麻痺而死亡。（見圖 4）

4. 通過小白鼠後病毒的變化：

(1) 對雞毒力的變化：最近以鴿腦化病毒第 49 代，



圖 4 痙攣時前後肢緊縮。

與小白鼠腦第 6 代再通過鴿腦之病毒 ($M_6 P_1$) 皮下接種雞各 6 頭作一比較試驗，結果如下：

病毒名稱	注射量	發病數	死亡數	耐過後情形	自然感染
P_{49}	10^{-2} , 0.1ml	$\frac{6}{6}$	$\frac{5}{6}$	仍有神經症狀	$\frac{1}{1}$
$M_6 P$	5×10^{-2} , 0.1ml	$\frac{4}{6}$	$\frac{4}{6}$	完全痊癒	$\frac{0}{6}$

分母表示供試雞數，分子表示陽性雞數。

(2) 對鴿子毒力的變化：從 M_1 及 M_2 的病毒對鴿的潛伏期為 1 天半至 2 天；至 M_6 注射的鴿子 4 頭，潛伏期均為 3 天；病程則無變化。反觀第 31—50 代的鴿病毒對鴿的潛伏期平均不及 2 天似可說明對鴿的毒力亦在致弱中。

綜計 $M_6 P$ 病毒共經鴿體 34 代及小白鼠 6 代，以所需時間而論，則 P_{49} 鴿化病毒較久，而對鴿致弱之能力則不如經小白鼠 6 代的 34 代鴿病毒。從接種 P_{49} 雞發病後尚可自然感染其他有易感性的雞而 M_6 不能感染的事實看來，更可表現。

討 論

1. 鴿化病毒對雞致弱的限度。從達爾文、米丘林的學說中，我們學習到，凡是生物都有適應不同環境的能力。這種適應可以逐步完成的，但如環境的改變是暫時的，那末此種改變也隨之而失掉；但如長期屢代的生活在一個改變的環境裏，則此種適應也逐漸完善而穩定下來，並可以遺傳於後代。病毒適應環境的情形也可用這一道理來說明。長期引用腦腔接種後，該病毒對神經組織的嗜性也逐

漸發生專化，這一點已在上述試驗中完全證明了。但完全適應於鴿腦的病毒，對於鴿仍保持有適當的致病及致死能力，從第 12 代到第 49 代鴿化病毒的比較中對雞的毒力，並無顯著差別，原因可能在於鴿體與雞體的環境相差太小，因此我們推想用同病毒再繼續通過鴿腦的話，雖然對雞多少還可以致弱一些，但終久不能使人滿意。在天然情形下本病毒經過雞體已不知道有千萬代之多，然到現在為止對鴿子還有致病力的事實，就可以說明。同樣的我們也難以期望用長期雞胚培養的方法，來將現有疫苗減弱得對雞毫無致病能力。

2. 對於小白鼠化病毒的希望：引用與上相同的原理，我們就致力於其他種族較遠的試驗動物，來作病毒通過的試驗，因為小白鼠價廉而易於繁殖，而其本身對本病毒具有強大抵抗力，更可證明其身體環境與雞的相差很大。因此病毒在小白鼠的體內的適應，也必然大大的減低了對雞的致病力。雖然祇有短短的 6 代小白鼠腦腔通過，為期也共祇一個月，而其減弱的程度則很顯著。因此用這一方法產生更安全的疫苗是可能的。

參 考 文 獻

- [1] 馬聞天，粟壽初：新城雞疫減弱病毒疫苗免疫本地雞試驗，畜牧獸醫期刊第一期，南通學院出版，1950。
- [2] 李善達：新城雞疫疫苗之製造及使用，單行本，畜牧獸醫圖書出版社，1952。
- [3] 馬聞天：私人通訊。
- [4] 岩科一治等：鳩腦通過佐藤系病毒之雞胎肺出血性第 34 回日本獸醫學會記事，1952。
- [5] 方定一：雞新城疫的初步觀察和試驗，畜牧獸醫期刊，第七期，南通學院出版，1952。
- [6] 斯文佐夫：亞洲雞瘟，蘇聯獸醫第二期，哈爾濱東北獸醫研究所，1951。
- [7] Kilham L., Transmission & multiplication of Newcastle disease virus in brains of suckling mice, 1950.
- [8] Reagan, Reginald L. & Brueckner, Response of the Swiss Albino mouse to the virus of Newcastle disease *J. Bact.* 61 (4):453, 1951.
- [9] Reagan R. L., H. O. Lineweaver & A. L. Brueckner, The pathogenicity of mouse-adopted N.D.V. for several strains of mice. *Cornell Vet.* 42 (1):50.

THE EFFECT OF PASSAGE OF NEW CASTLE DISEASE VIRUS IN PIGEONS AND WHITE MICE

FANG, T. I., CHU, G. & TSU, C. H.

In an attempt to produce a more superior living vaccine than that now available, so that it is easily produced more resistant to heat and less virulent for young chickens, serial passages of a virulent New Castle disease virus locally isolated in pigeons and white mice were carried out. Intracranial route of injection was used in all cases. During the first 10 passages, baby pigeons were employed and later, adult birds were used. After 49 such passages, little reduction of virulence of the virus for adult fowls were noticed. Further resort was then made to repeat the same procedure in suckling mice, and only after 6 passages, some reduction in virulence for adult fowls was found. It is hoped that further study in this line would eventually result in a modified virus for the manufacture of usable living vaccine.