微 生 物 學 報

第2卷 第2期 145—151頁 1954年11月

# 長沙市流行性腦炎病原的研究

## I. 長沙市1953年流行性腦炎病毒的分離與鑑定

吳潔如 何方麗 劉秉陽

（湖南醫學院細菌免疫學科）

遠在三十餘年前[1]，長沙湘雅醫院小兒科醫師在診治病例中，曾觀察到有類似流行性腦炎症狀之病例，但因當時缺乏檢驗設備，未加證實。其後雖偶有類似腦炎病例，因爲數甚少，診斷亦不確實，未引起重視。1949—1950年北京[2]、天津[3]等地，均發現有腦炎流行，在北京且已由黃、王[4]二氏自病死者腦組織中分離出病毒三株，並經鑑定爲流行性"乙型"腦炎病毒。因此乃引起長沙市醫務界人士的注意。1951年8月，長沙市腦炎流行，病例增多。但當時以條件限制，只做到臨床症狀的分析，病原方面，未獲證實。

1952年5月長沙市又有類似"乙型"腦炎病例發生，7月初以後，疑似病例日漸增多，終至流行。在此期間，我們曾採取了患者血清與流行性"乙型"腦炎病毒抗原作補體結合試驗協助診斷，並於10例疑似患者恢復期血清中，檢查出有特殊性"乙型"腦炎抗體存在。其中有4例在病程早期的血清補體結合試驗呈陰性反應，但至病癒期時俱轉爲陽性。據此我們曾指出長沙市當時流行的腦炎係屬"乙型"腦炎，但由於沒有直接從患者或病死者腦組織中分離出病毒，故對於病原的類型，仍缺乏確實的鑑定。

在1953年腦炎流行期間，我們曾於7、8兩月先後從病死者的腦組織中分離出兩株病毒，因此對長沙市流行性腦炎類型的確定取得了進一步的證據。

## 材 料 及 方 法

（一）標本來源：

腦脊液：採用患者發病後3日以內的腦脊液。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

腦組織：用延髓穿刺術[4,5]自病死者所獲得之腦組織碎塊。

上項標本於採取後接種動物前俱保存於冰浴中。

（二）動物來源：小白鼠係自北京中央衛生研究院分得，地鼠自北京市上買來，其他動物如豚鼠、家兔等均爲本實驗室所飼養，鷄由市上買來。每種動物在實驗之前，均經過相當長時間的觀察，認爲健康無病，才用作實驗。

（三）流行性"乙型"腦炎病毒和聖路易型腦炎病毒均係於 1952 年春由中央衛生研究院分給。

（四）病毒分離方法：如係從延髓穿刺所獲得之腦組織碎塊，往往混入許多腦脊液在內，則以無菌技術取出腦組織置於組織研磨器中研碎後加入原來混懸組織的腦脊液少許，置離心器中於每分鐘 2,000 轉旋速離心沉澱 10 分鐘。取上層清液，接種 0.03 毫升於健康幼小白鼠（出生後 10—14 日左右的）腦內，每一標本接種小白鼠 6 隻，於注射動物同時，並將標本接種於含血培養基中，測驗原標本中是否有普通細菌生長。小白鼠於接種後，至少觀察 3 星期，每日觀察 2 次以上。觀察時注意動物有無不正常的表現，如皮毛粗糙、活力減少或反應性增強、震顫。有時旋律性抽搐、繞圈、聳立、蜷曲、尾強直或麻痹症狀。小白鼠發病後，密切注意，俟其垂死時，即行殺死，取腦傳代，並進行各種鑑定。

若係腦脊液，則不加處理，即行注射，方法與上同。

## 結 果

（一）病毒的分離

自 1953 年 7 月 10 日開始，從 9 病例臨症腦炎患者的腦脊液及病死者的腦組織中進行病毒分離，共計 11 次，其中包括腦脊液 4 份，自延髓穿刺獲得的腦組織 7 份。9 病例的分離結果，有兩例陽性，這兩株病毒都是用延髓穿刺法採取的腦組織中分離的（見表 1）。

（二）分離病毒的鑑定

由長沙市腦炎患者分離出的兩株病毒，分別定名爲長沙腦研"1"及長沙腦研"2"。此兩株病毒，經小白鼠腦內傳代，俟病毒適應於鼠腦及固定後，始作下列各種鑑別試驗。

1．動物感染範圍試驗：將分離的兩株病毒，感染小白鼠，取 10% 鼠腦懸液，分別接種於小白鼠、豚鼠、家兔、地鼠等動物腦內及孵育 10—12 日的雞胎

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表1　自臨症腦炎患者病毒分離的結果

| 患者檢驗號 | 分離日期 | 患者姓名 | 年齡 | 病程(日數) | 標本採取至接種動物時(小時) | 病人死亡至接種動物時(小時) | 標本來源 | 分離病毒 | | | 備註 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | 接種途徑 | 死亡數/接種數 | 接種至死亡時間(日數) | |
| 1 | 10/VII | 馮△△ | 3歲 | 3 | 1 | | 腦脊液 | 腦內 | 0/5 | | |
| 2 | 19/VII | 黃△△ | 8歲 | 3 | 2 | | 腦脊液 | 腦內 | 3/6 | 4,7,9 | 非特殊性死亡(細菌感染) |
| 3 | 21/VII | 黃△△ | 8歲 | 5 | | 5 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 3/6 | 9,10,11 | 非特殊性死亡(細菌感染)原標本中腦組織很少 |
| 4 | 22/VII | 馬△△ | 10月 | 3 | 2 | | 腦脊液 | 腦內 | 3/6 | 3,6,8 | 非特殊性死亡(細菌感染)原標本中有細菌生長 |
| 5 | 22/VII | 韓△△ | 3歲 | 6 | 2 | | 腦脊液 | 腦內 | 2/6 | 8,8 | 非特殊性死亡(細菌感染) |
| 6 | 25/VII | 韓△△ | 3歲 | 9 | | 12 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 0/6 | | 原標本中腦組織甚少 |
| 7 | 26/VII | 鄭△△ | 4歲 | 4 | | 8 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 6/6 | 5,6,6,6,8,8 | 分出病毒定名爲長沙腦研"1" |
| 8 | 1/VIII | 劉△△ | 7歲 | 7 | | 16 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 3/7 | 4,6,10 | 非特殊性死亡(細菌感染) |
| 9 | 1/VIII | 蔡△△ | 2歲 | 3 | | 3 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 0/6 | | 原標本中腦組織甚少 |
| 10 | 12/VIII | 楊△△ | 7歲 | 4 | | 12 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 0/5 | | |
| 11 | 24/VIII | 鍾△△ | 4歲6月 | 5 | | 3 | 用延髓穿刺法取腦組織 | 腦內 | 5/6 | 6,6,7,7,8 | 分出病毒定名爲長沙腦研"2" |

註：第2與第3號爲同一患者，第5與第6號爲同一患者。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

絨毛尿囊膜上。動物接種後，每日觀察至少2次，共觀察3星期，結果詳見表2。

表2 動物感染範圍試驗

| 動物種類 | | 小白鼠 腦內 | 小白鼠 腹腔 | 豚鼠 (腦內) | 家兔 (腦內) | 雞 (腦內) | 地鼠 (腦內) | 雞胎 (絨毛尿囊膜) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 病毒株號 | 長沙腦研"1" | 4—5日發病死 | 5日發病死 | 不病 | 不病 | 不病 | 不病 | 死亡 |
| | 長沙腦研"2" | 4—5日發病死 | 4—5日發病死 | 不病 | 不病 | 不病 | 不病 | 死亡 |

2．濾過試驗：將分離的病毒，感染小白鼠，製成10%鼠腦懸液，通過蔡氏濾菌器後，再將濾液接種於小白鼠腦內，觀察濾液是否仍如未濾懸液一樣能使該動物感染並死亡，結果詳見表3。

表3 濾過試驗

| 病毒株號 | 未通過蔡氏濾菌器前之腦懸液(小白鼠感染情況) | 通過蔡氏濾菌器後之腦懸液(小白鼠感染情況) |
|---|---|---|
| 長沙腦研"1" | 4日發病死亡 | 4日發病死亡 |
| 長沙腦研"2" | 4日發病死亡 | 4日發病死亡 |

從表3可以看出病毒懸液在未通過蔡氏濾菌器前與通過濾菌器後同樣能使小白鼠感染發病死亡，並能傳代。因此證明所分離的兩株病毒體積甚小，能通過蔡氏E. K. 濾板。

3．相互補體結合試驗：將分離的兩株病毒與"乙型"腦炎病毒，聖路易型腦炎病毒，以同法製成抗原與免疫血清，作相互補體結合試驗，結果詳見表4。

表4 相互補體結合試驗

| 血清種類 \ 抗原種類 | | 病毒抗原* 長沙腦研"1" | 長沙腦研"2" | "乙型"腦炎病毒 | 聖路易型腦炎病毒 | 正常鼠*腦抗原 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 免疫血清+ | 長沙腦研"1" | 1:32 | 1:32 | 1:32 | 0 | 0 |
| | 長沙腦研"2" | 1:16 | 1:16 | 1:8 | 0 | 0 |
| | "乙型"腦炎病毒 | 1:32 | 1:32 | 1:32 | 0 | 0 |
| | 聖路易型腦炎病毒 | 0 | 0 | 0 | 1:32 | 0 |
| 正常血清 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*病毒抗原和正常小鼠腦抗原是用醋酮乙醚浸漬法[8]製成。

+免疫血清是用我們分離的兩株病毒及"乙型"腦炎病毒，聖路易型腦炎病毒，分別製成10%小鼠腦懸液，多次注射豚鼠腦內，使之免疫後取血獲得。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

從上述試驗的結果，可以看出長沙腦研"1"及長沙腦研"2"與"乙型"腦炎病毒的補體結合反應相似，而與聖路易型腦炎病毒不同。

4．病理檢查：將分離的兩株病毒，分別接種於小白鼠腦內，俟小白鼠發病死亡後，取出其腦，由本院病理學科檢查研究有腦炎之病理改變，結果如下：

**長沙腦研"1"**

肉眼觀察：腦組織，淺紅色，質地軟，切面組織灰紅色，無顯明改變。

鏡檢：腦組織顯神經細胞變性及瀰漫性多形核白血球浸潤，變性之神經細胞呈橢圓形或三角形，細胞核藍染着色較深，少數神經細胞之細胞核消失。腦組織內有瀰漫之中性多形核白血球浸潤，尤以血管周圍較爲顯著，血管顯輕度充血現象。

**長沙腦研"2"**

肉眼觀察：除腦膜血管充血外，無其他顯明改變。

鏡檢：腦皮質部分切片顯神經細胞變性及瀰漫之中性多形核白血球浸潤，變性之神經細胞呈圓形、橢圓形或多角形。細胞核着色較深、藍染、核小仁消失，部分神經細胞之細胞核全部消失，僅可見紅染殘存之胞體輪廓，小膠質細胞顯輕度增生現象，有些腦組織軟化，形成大小不等之空腔，散存於皮質各部，皮質內有瀰漫之中性多形核白血球浸潤，尤以血管周圍較爲明顯，血管顯輕度充血現象。

根據上面各種試驗的結果，可知當 1953 年夏秋季腦炎在長沙流行時，自病死者腦組織中分離出的兩株病毒，經證明與流行性"乙型"腦炎病毒相似。

## 討　　論

這次自長沙市腦炎患者分離的兩株病毒，都是由延髓穿刺法採取的腦組織中所獲得的。證明延髓穿刺術是一種簡易而有效的分離病毒的方法，因此在腦炎流行的地區，若不可能作到屍體解剖取腦組織時，用延髓穿刺術獲得腦組織確是一種值得採用的方法。但是必須注意採取的標本必須含有腦組織，若僅係帶血的腦脊液而無小塊的腦組織存在時，則不易達到分離病毒的目的。

從患者腦脊液中分離腦炎病毒[7]，雖有可能，但甚困難。如患者馮△△及馬△△在其發病後第三日抽取腦脊液，立即接種於實驗小動物，如此並未能分離出病毒，而此兩患者已經補體結合試驗證明係流行性"乙型"腦炎患者。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

新分出的兩株病毒，經感染小白鼠後，能使該動物發病，且呈現腦炎典型症狀[8]。病毒通過小白鼠傳至第二代後，鼠中發病潛伏期卽行縮短，以後卽固定在 3—4 日。

新分離的病毒接種於地鼠腦內後，地鼠在一月中不顯病象[9]，觀察中除僅見有嗜睡現象外，并無其他症狀，這點與王、柳、黃[8]三氏報告中所敍述的稍有不同。

新分出的兩株病毒，經過動物感染範圍試驗、濾過試驗、相互補體結合試驗和病理學檢驗，結果證明一般符合於腦炎病毒的性狀。雖然目前因爲動物數量不夠，致尙未能完成相互中和試驗和相互自動免疫試驗，但根據動物感染範圍和相互補體結合試驗的結果[10,11]，特別是在相互補體結合試驗中，吾人同時採用了"乙型"腦炎病毒與聖路易型腦炎病毒作比較。結果足以初步說明長沙市今年自病人分離出的兩株病毒是屬於流行性"乙型"腦炎病毒的範疇。

## 總 結

1. 1953 年夏秋季長沙市腦炎流行中，由二個病死者的腦組織中分離出兩株病毒，定名爲長沙腦研"1"及長沙腦研"2"，這兩株病毒都是用延髓穿刺法從腦組織中分離出來的。

2. 由動物感染範圍試驗和相互補體結合試驗的結果，初步證明所分離的兩株病毒都屬流行性"乙型"腦炎病毒。

## 參 考 文 獻

[1] Shibly, G. S. Summary of the case history of a patient, *China Med. J.* 1922, **36**: 418—420.

[2] 吳斌、崔振宇：北京市 1950 年流行性腦炎 79 病例的臨床觀察。中華醫學雜誌，1951，**37**:746—750。

[3] 天津市 1950 年流行性腦炎總結報告。東北醫學雜誌，1951，**4**：219—225。

[4] 黃禎祥、王逸民：北京市流行性腦炎病毒的分離和鑑別。中華醫學雜誌，1951，**37**：280。

[5] 宋幹、李佩筠、黃禎祥：腦炎病毒簡易分離法。中華醫學雜誌，1952，**38**：1029—1032。

[6] 中央衞生部防疫處：流行性"乙型"腦炎的防治。健康報社，1952，22—54。

[7] Hammon, W. McD. Diagnostic procedure for virus and Rickettsial Diseases. 1st. edition. p. 187 Amer. Pub. Heal. Ass. 1948.

[8] 王逸民、柳元元、黃禎祥：關於流行性"乙型"腦炎病毒的一般生物學性質的觀察。中華醫學雜誌，1952，**38**：1066—1072。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[9] 張乃初、劉永、劉鳳亭：中國地鼠對各型腦炎微子的感受性實驗。中華醫學雜誌，1953，第9號 648。

[10] 黃禎祥：腦炎微子類型的鑑別。中華新醫學報，1950，1 (1)：34。

[11] 汪美先、徐漢傑、甄桂芳：西安市流行性"乙型"腦炎病毒的分離與鑑定。微生物學報，1953，1 (2)：183—190。

# STUDY ON THE NATURE OF THE EPIDEMIC ENCEPHALITIS IN CHANGSHA

## I. PRELIMINARY STUDY OF THE VIRUS LOCALLY ISOLATED

Wu, C. J., Ho, F. L. and Liu, P. Y.

*Department of Bacteriology and Immunology, Hunan Medical College, Changsha*

From the brain materials of patients died from acute encephalitis disease in the summer of 1953, two strains of neurotropic virus were isolated. Preliminary identification by means of their range of pathogenicity and cross complement fixation test suggests that these two strains are identical with Japanese B encephalitis virus.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn