

羊痘弱毒疫苗的研究

第一报 羊痘病毒鸡胚培养的研究*

袁庆志 李宝启 沈荣显

(哈尔滨兽医科学研究所)

羊痘在我国普遍流行,严重的危害养羊事业的发展,使国家遭受很大的经济损失。因此消灭羊痘以保障羊只的顺利繁殖,实为当前兽医工作的重要任务之一。

预防羊痘的疫苗有很多种,但各有不同程度的缺点,例如,利用羊痘强毒制造各种活毒疫苗,虽然能确实免疫,然而由于病毒未经减毒处置,易使机体发生严重反应,引起部份损失,并可成为传染的源泉,此种疫苗只宜用于发病羊群的紧急接种,不宜广泛应用。自苏联学者 M. M. Иванов (1952)^[1]来我国介绍斯大林奖金获得者李哈捷夫在 1944 年创造的羊痘氢氧化铝疫苗后,我国才有了制造良好疫苗的方法。近年来虽已大量制造,并在预防工作上取得了良好成绩,但由于羊痘氢氧化铝疫苗成本高,免疫期短,尚不能满足目前广大农牧区的要求,实有进一步研究致弱活毒疫苗的必要性。

羊痘病毒可以在鸡胚绒毛尿膜上培育生长的事实,早已有报导。RAO. R. SANJIVA (1938)^[2]报告:用鸡胚绒毛尿膜上培养的方法将病毒继代至第 9 代,此时病毒仅能引起被接种羊只的局部发痘,而不能引起全身感染,他认为有用作疫苗的可能。但利用鸡胚培养的羊痘病毒作为实际应用的疫苗的报告并不多见。

米丘林生物学证明了生物体与其生活条件构成一个统一的整体,如果生活条件有改变,生物体也就随之发生变化。我们根据这一原理,将羊痘病毒通过鸡胚培养,希望能使它发生定向变异,以便获得制造弱毒疫苗的种毒。目前病毒已在鸡胚尿膜上培养继代至 90 代。兹将试验结果报告如下。

一. 试验材料

1. 羊痘病毒:本试验使用的种毒是太原系(1950 年来自华北农业科学研究所防疫系),内蒙系(1953 年来自农业部兽医生物药品监察所),朝阳系(1953 年 1 月在热河省朝阳羊痘流行区采取的)及青海系(1954 年 4 月由青海省畜牧厅兽医诊断室寄来),毒

* 在工作中蒙农业部兽医生物药品监察所、青海省畜牧厅兽医诊断室供给种毒及东北农学院畜牧兽医系牧场供给纯种羊试验,特此一并志谢。

力均屬良好。太原系及內蒙系的丘疹毒皮內接种于仔羊及靜脉接种于成羊可引起全身發痘,以至死亡。太原系的丘疹毒毒力滴定为 10^{-7} (1毫升皮內接种10顆),可使本地羊局部發痘。

2. 供試綿羊:系哈爾濱地区的本地羊及一代雜種綿羊(个别試驗中曾用一部份的純種羊)和由內蒙購回的蒙古羊。除一小部份利用生后4至6个月的仔羊外,絕大多數是1至3岁者,其中以2岁者为最多。

3. 供試鷄蛋:來航鷄产的种卵。

二. 試驗方法

我們先后共进行6次試驗,第1—4次着重用不同品系的不同含毒組織(丘疹、皮下水腫組織、淋巴液)的羊痘强毒,以不同的方法直接在鷄胚絨毛尿膜(下簡称尿膜)上培养繼代,但均未获得滿意的結果。因此第5次試驗改用鷄胚与綿羊交替繼代,即交替1代綿羊后連續在鷄胚尿膜上繼代,結果較为滿意,現已达90代。其后,我們又用同一种毒,以上述方法进行第6次直接通过鷄胚繼代的試驗,結果繼至第10代即不能使羊發痘和获得免疫。因此本文仅报导第5次的試驗成績,其他各次試驗从略。

第5次試驗开始时是用太原系的丘疹毒制成10倍生理盐水乳剂,以0.1—0.2毫升接种于孵育10—11日的鷄胚尿膜上,在 $35-36^{\circ}\text{C}$ 孵卵箱內培养四日,收获接种局部的尿膜为种毒(下簡称为鷄胚毒)。經細菌檢查無菌者,制成10—20倍乳剂以0.1—0.2毫升接种于次代鷄胚,以此方法傳至第5代时,發現病毒已消失,乃用第3代鷄胚毒接种羊并取羊的丘疹毒再在鷄胚尿膜上繼代,并順利繼代至90代。在繼代过程中,如种毒被雜菌污染时,就用适当量的青霉素和鏈霉素处理后再行繼代。如發生断代时,就进行返復繼代。为了及时了解毒力与免疫原性的变化起見,在每代接种鷄胚的同时并作复归綿羊的試驗,且每隔适当的代数进行鷄胚与綿羊的最小感染量、綿羊的全身感染、同居感染等試驗和測定鷄胚的不同部位的含毒量。一部份羊在观察二至三周后,接种羊痘强毒作免疫試驗。

三. 試驗結果

1. 鷄胚繼代毒的毒力变化

羊痘病毒由于連續通过鷄胚培养繼代,已适应在鷄胚尿膜上發育,其毒力已有显著的减弱,这种变化在鷄胚上虽然表現得并不明显,但是对綿羊則是显著的。

鷄胚毒对綿羊的毒力:羊痘病毒在鷄胚尿膜上的發育繁殖情况,以及其毒力和免疫原性的变化,是以接种綿羊的發痘程度及免疫結果来判断的。从不同代数所接种的羊的痘型可以看出(参考圖1和表2),在 $E_1-E_{15}S_1$ 代的痘型变化均为全經過型,其中I

型者占 $24/31$ (77.4%) 头。相反在 $E_{16}S_1$ — $E_{30}S_1$ 代的 28 头羊中有 24 (85.7%) 头为全经过型的 II 型, 而到 $E_{31}S_1$ — $E_{47}S_1$ 代間 24 头羊除 1 头羊無反应外, 其余均为全经过型的 II 型。尤其是从 $E_{48}S_1$ 代直至 $E_{90}S_1$ 代的接种羊除 6 头無反应外, 其余 89 头均为不全经过型, 而且絕大多数在形成丘疹或較硬的結节后即逐渐消失(参考圖 I-1、2, 强毒对照参考圖 II-1、2)。这类反应羊只, 不仅在痘型上为不全经过型, 而且体温反应亦極輕微或

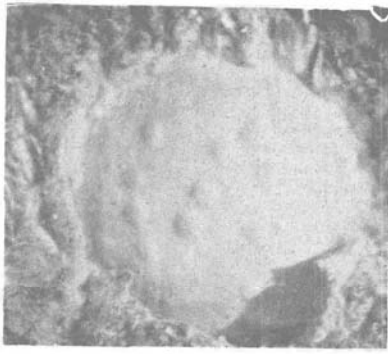


圖 I-1 鷄胚毒皮內接种于綿羊局部發痘的硬結

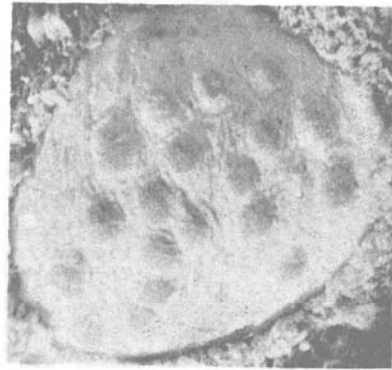


圖 II-1 羊痘强毒皮內接种于綿羊局部發痘的丘疹

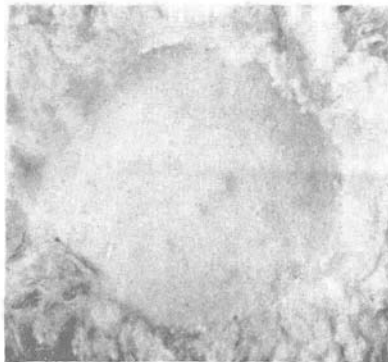


圖 I-2 同上硬結的消失情况

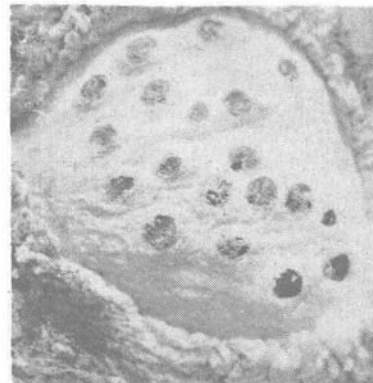


圖 II-2 同上丘疹后的結节

無体温反应, 精神食欲均無影响。可見羊痘病毒連續通过鷄胚繼代后, 其毒力已显著减弱。在复归羊中曾用太原系、内蒙系及青海系强毒接种 92 头进行免疫試驗, 結果, 不論复归羊的痘型变化如何及不論用那个品系的强毒来接种, 均获得了确实的免疫力。其中有在接种鷄胚毒后無反应羊 7 头, 接种强毒后亦無反应, 可以認為是天然免疫的羊。

在繼代过程中, 为了掌握病毒的毒力和免疫原性变化起見, 曾以 $E_{13}S_1$ 、 $E_{23}S_1$ 、 $E_{30}S_1$ 、 $E_{36}S_1$ 、 $E_{46}S_1$ 、 $E_{56}S_1$ 、 $E_{61}S_1$ 、 $E_{71}S_1$ 及 $E_{90}S_1$ 代的鷄胚毒对羊进行了最小免疫量試驗(参考插圖 1)。結果, $E_{13}S_1$ 、 $E_{26}S_1$ 及 $E_{46}S_1$ 代均在 10^{-4} , $E_{23}S_1$ 、 $E_{30}S_1$ 、 $E_{56}S_1$ 、 $E_{61}S_1$ 、 $E_{71}S_1$ 及 $E_{90}S_1$ 代均在 10^{-3} 的稀釋度时可使羊發痘和获得免疫。 $E_{30}S_1$ 、 $E_{61}S_1$ 及 $E_{71}S_1$ 代的 10^{-4} 各接种的 2 头羊, 均只有 1 头發痘和获得免疫, 各代的 10^{-5} 均不能使羊發痘和免疫。这样看来, 現阶段的鷄胚毒对羊的毒力和免疫原性最低是在 10^{-3} 。在 $E_{47}S_1$ 代以前复归羊的

痘型均为全经过型, 毒力滴定五次有三次为 10^{-4} ; 而在 $E_{48}S_1$ 代以后则均为不全经过型, 毒力滴定四次均为 10^{-3} , 因此可以认为对羊最小感染量的变化与复归羊的痘型变化大致是一致的。

表1 鸡胚毒接种绵羊的反应及免疫情况

鸡胚代数	接种羊头数	接种羊的反应							强毒接种	
		●	⊙	◐	◑	⊖	⊗	○	头数	结果
$E_1-E_{10}S_1$	31		24	7						
$E_{16}S_1-E_{30}S_1$	28		4	24					4	无反应
$E_{31}S_1-E_{45}S_1$	22			21				1	3	无反应
$E_{46}S_1-E_{60}S_1$	22			2	6	14			14	无反应
$E_{61}S_1-E_{75}S_1$	40				8	28		4	39	无反应
$E_{76}S_1-E_{90}S_1$	35				5	28		2	32	无反应
强毒对照: 太原系、青海系、内蒙系强毒									5头●	
									29	21头⊙
										3头○

注: 强毒系利用丘疹 20 倍或 1,000 倍乳剂 1 毫升皮内接种 5—10 颗。其后各项试验与此同。

鸡胚毒对鸡胚的毒力: 现阶段的鸡胚毒尚不能致鸡胚死亡, 而且除了接种部位的尿膜外, 其他部位均不含毒或含毒极微。接种部位的尿膜从 E_4S_1 代后, 绝大部分呈现水肿样黄白色的肥厚。从 $E_{14}S_1$ 代后, 在接种局部尿膜上还出现了不甚显著的、不透明的灰白点。这种病痕并不是每代均可看到, 有时明显, 有时用肉眼看不出来, 但用福尔马林固定后, 再以扩大镜或显微镜检查时, 就可以看出来; 但有时也有毫无病痕的。此等病痕是否是特异性的病理变化, 尚待以后组织学的检查来证实。

我们曾以 $E_{30}S_1$ 、 $E_{46}S_1$ 及 $E_{61}S_1$ 代的鸡胚毒对鸡胚作过最小感染量的试验。即将种毒的不同稀释度接种鸡胚, 培养四日采毒, 制成 1:10 倍乳剂, 各以 1 毫升皮内接种 (10 颗) 于绵羊。结果 (参考表 1), $E_{30}S_1$ 的发病至 10^{-4} 为全经过型, $E_{46}S_1$ 至 10^{-4} 及 $E_{61}S_1$ 至 10^{-8} 为不全经过型, 且均能使羊免疫。上述事实, 证明了羊痘病毒连续通过鸡胚后代后, 病毒已适应在鸡胚尿膜上发育和繁殖。

2. 鸡胚毒对绵羊静脉接种试验

上面已经谈到, 鸡胚毒皮内接种于绵羊, 只能引起局部发病, 而不能引起全身发病。我们曾以不同代数的鸡胚毒, 用静脉接种的方法进行了全身感染的试验, 但亦未能引起羊只全身发病 (参考表 3)。除 $E_{25}S_1$ 代鸡胚毒接种的 1 号羊于第 23 日由于严重的寄生虫病并发而死亡。其他羊均健活, 仅部份羊有轻微的或不规则的体温反应, 精神食欲均无显著变化, 部份羊只免疫试验的结果, 第 2—13 号羊中有 6 头获得了免疫, 第 14—20 号羊则均未获得免疫。相反的, 强毒静脉接种的 11 头羊, 有 10 头全身发病, 仅 1 头无反应。发病羊于接种后 10—17 日死亡, 肺部呈现明显的特异的病理变化。在此对比

之下,可以說明羊痘病毒通过鷄胚連續繼代后,毒力显著减弱,以靜脉接种的途徑,亦不能使羊全身發痘,而且靜脉接种 $E_{81}S_1$ 代后的鷄胚毒尚不能使羊免疫。(詳見表 3)

3. 接种鷄胚毒后的發痘羊与健康羊的同居結果

接种鷄胚毒的發痘羊能否引起健康羊的自然感染,对于鷄胚毒的稳定性也是一个重要的标志。我們曾用不同代数的接种鷄胚毒的發痘羊与健康羊同居 20—75 日。結果,健康羊均無任何反应(参考表 4),用强毒接种后仅有 1 头羊發生不全經過型的痘,其他羊的發痘均为全經過型。由此証明在同居期間并未惹起自然感染。相反的,与强毒感染的羊同居的 11 头健康羊仅 2 头未感染,其他 9 头皆在同居后 11—16 日內相繼

表 2 鷄胚毒对綿羊靜脉接种試驗

試驗代数	接种材料及剂量	試驗羊号数	年齡	品种	观察日数	反应情况	結果	免疫試驗結果	備注
$E_{25}S_1$	C.A.M. 1:10, iv 5毫升	1	1 岁	杂种	22	接种后第三日体温上升,温差在 $1^{\circ}C$ 內稽留 4 日恢复常温,經 3 日后又上升稽留 4 日,然后恢复常温,皮膚無反应。第 15 日腹瀉,第 23 日死亡。	死		剖檢結果,肺部呈現少数高粱米粒大半透明的灰白結节。有严重的肝蛭及結节虫寄生
$E_{41}S_1$	5毫升	2	2 岁	杂种	22	体温不規則,皮膚無反应	生	○	
		3	2 岁	本地种	20	体温不規則,皮膚無反应	生		未作免疫試驗
		4	2 岁	本地种	14	接种后第 8 日体温上升;温差在半度內稽留 4 日恢复常温。皮膚無反应	生	○	免疫試驗用 $E_{41}S_1$ 复归羊的丘疹毒接种者,此毒靜脉接种羊可全身發痘
		5	2 岁	本地种	14	無反应	生	○	同上
$E_{44}S_1$	10毫升	6	6 个月	本地种	30	接种后第 2 日体温上升,温差半度內稽留 2 日恢复,皮膚無反应	生		未作免疫試驗
		7	5 个月	本地种	30	体温不規則,皮膚無反应	生		同上
	5毫升	8	6 个月	本地种	30	同上	生		同上
		9	6 个月	本地种	30	同上	生		同上
$E_{46}S_1$	10毫升	10	6 个月	本地种	30	無反应	生		同上
$E_{77}S_1$	5毫升	11	8 个月	杂种	20	無反应	生	○	
		12	1 岁	本地种	20	無反应	生	○	
$E_{91}S_1$	5毫升	13	5 个月	杂种	26	接种后第 6 日体温上升,温差半度內稽留 2 日恢复,皮膚無反应	生	○	
		14	7 个月	本地种	26	体温不規則,皮膚無反应。	生	⊖	
$E_{95}S_1$	5毫升	15	2 岁	杂种	28	無反应	生	●	
		16	1 岁	本地种	28	体温不規則,皮膚無反应	生	●	

E ₉₀ S ₁	5c.c.	17	2岁	杂种	24	無反应	生	⊙	
		18	2岁	杂种	24	接种后第6日体温上升, 温差半度内稽留6日恢复, 皮膚無反应	生	⊙	
		19	2岁	杂种	24	接种后第6日体温上升, 温差半度内稽留5日恢复, 皮膚無反应	生	⊙	
		20	1岁	杂种	24	接种后第3日体温上升, 稽留1日恢复, 皮膚無反应	生	⊙	
强毒对照	太原系及内蒙系丘疹毒 1:20 5-10c.c.iv	21 31	1-3岁	本地种	10 30	經2-5日潜伏期体温上升, 高热稽留, 全身發痘10头, 無反应1头	死7 杀3 生1		死亡均在接种后第10-17日間, 死亡及剖杀羊的主要病痕: 肺部呈现大豆大至蚕豆大的半透明灰白色结节及暗红色斑

注: 1. C.A.M. 代表鷄胚絨毛尿膜。

2. 免疫試驗用太原系强毒。对照羊5头, 4头局部發痘, 1头全身發痘。

全身發痘, 再接种强毒亦無反应; 未自然感染的2头健康羊接种强毒后亦無反应, 証明是天然免疫羊。因此可以确定如果在E₁₇S₁—E₄₈S₁代間的鷄胚毒接种羊, 在其發痘为全經過型的阶段里尙且不能引起健康羊的自然感染, 那么在E₄₈S₁代后的鷄胚毒接种羊均發不全經過型的痘, 就更不易引起健康羊的自然感染了。

表3 鷄胚毒复归的發痘羊与健康羊同居感染試驗

試驗代数	复归的發痘羊		健康羊					
	头数	病程	号数	品种	年龄	同居日数	反应情况	强毒接种
E ₁₇ S ₁	2	从發疹开始与健康羊同居直至脱痂后止	1	本地种	2岁	20	無反应	⊙
			2	本地种	2岁	28	無反应	●
			3	本地种	2岁	28	無反应	⊙
E ₂₃ S ₁	1	同上	4	杂种	2岁	30	無反应	⊙
			5	杂种	2岁	30	無反应	⊙
E ₃₀ S ₁ E ₄₀ S ₁	12	同上	6	本地种	1岁	75	無反应	⊙
			7	本地种	1岁	75	無反应	⊖
			8	杂种	2岁	75	無反应	⊙
			9	杂种	1岁	70	無反应	⊙
E ₄₇ S ₁ E ₄₈ S ₁	7	同上	10	本地种	4个月	48	無反应	●
			11	本地种	4个月	48	無反应	●
			12	本地种	4个月	48	無反应	●
			13	本地种	6个月	48	無反应	⊙
强毒同居 共試驗四次用8个月至2岁的本地羊及一代杂种羊共11头, 感染对照 同居后第11-16日發痘。							全身發痘9头 無反应2头	

注: 1. 4号羊用E₂₉S₁之鷄胚毒作免疫試驗者。

2. 9号羊营养不良体質衰弱观察第70日死亡。

4. 鷄胚毒复归綿羊繼代試驗

本試驗的目的, 一方面在于进一步确定羊痘病毒通过鷄胚繼代的减弱程度及其稳定性; 另一方面又在于明确綿羊反应毒是否有用作疫苗的可能。因为現阶段的鷄胚毒仅有接种部位的尿膜毒可以利用, 其产量过少, 不能满足实际应用的需要。如果綿羊反应毒可供利用的話, 这些困难是可以解决的。

在以鷄胚毒复归綿羊連續繼代以前, 为了了解不同代数間的鷄胚毒复归羊的反应毒(利用丘疹毒)的毒力, 我們曾以 $E_{23}S_1$ 、 $E_{40}S_1$ 、 $E_{41}S_1$ 、 $E_{49}S_1$ 及 $E_{57}S_1$ 代鷄胚毒所接种的綿羊的反应毒对羊进行最小感染量或靜脉接种的試驗。結果, $E_{49}S_1$ 代以前所接种的羊的反应毒的毒力可达 10^{-4} — 10^{-6} (1 毫升皮內接种 10 顆)。 $E_{41}S_1$ 代以前的反应毒 10 倍乳剂 5 毫升靜脉接种于綿羊, 可引起全身發痘(稀發), 但以 $E_{57}S_1$ 代鷄胚毒通过羊繼代三代, 用其第二、三代反应毒靜脉接种羊均未引起全身發痘, 仅部份羊有輕微体温反应, 再以强毒接种亦無反应。从上述結果来看, $E_{41}S_1$ 代以前所接种的羊的反应毒的毒力还是相当强的, 也就是說在这代以前的鷄胚毒的毒力还比較强。其后随着鷄胚代数的增加其毒力則逐渐减弱, 从 $E_{57}S_1$ 代鷄胚毒連續通过三代綿羊的稳定情况来看, 这样通过綿羊繼代是有可能的。因此我們就决定以 $E_{61}S_1$ 代鷄胚毒接种發痘羊的丘疹毒, 开始連續通过綿羊。所用羊只除第三代用过一部份一岁的考利貸純种羊外, 其余均为一至三岁的本地羊或一代杂种羊。本試驗共繼代至 15 代, 其經過与結果可参考圖 2。

从表 5 中可以看到, 第 1—3 代的繼代羊的痘型均为不全經過型, 其最小感染量均为 10^{-3} , 第 3 代对純种羊为 10^{-5} (滴定方法同上)。第 4—15 代間的繼代羊的痘型大部份为全經過型的 II 型, 对羊最小感染量在第 4—10 代均为 10^{-5} , 但第 8 代为 10^{-4} , 第 12、13 代为 10^{-6} , 第 14 代达 10^{-7} 。其中除第 3 代对純种羊的 10^{-2} 、 10^{-3} , 第 5 代的 10^{-2} , 第 13 代的 10^{-5} — 10^{-6} 及第 14 代的 10^{-5} 所接种羊只均为全經過型外, 其余所有發痘羊的痘型均为不全經過型。各代 10^{-4} 以后的發痘羊的潜伏期均有延长, 發痘顆数亦甚少, 但均可使羊免疫。

在第 2—12 代間用靜脉途徑接种的羊, 均無皮膚反应, 仅部份羊有輕微的体温反应, 而且第 8 代以前尚不能使羊获得充分免疫。第 13 代靜脉接种 3 头羊, 其中 2 头有体温反应, 同时在腋下發痘 3—5 顆, 持續 6—7 日逐渐消失。另 1 头仅有体温反应。第 14 代采繼代羊發痘后的 3 日毒接种羊 3 头, 5 日毒接种 3 头, 在接种后第 5—6 日各發痘 2 头, 均为全身稀發。另 2 头仅有体温反应。發痘的羊只除 1 头耐过外, 其他 3 头于第 14—21 日內相繼死亡。肺部呈现大豆大半透明的灰白色結节。从第 9 代以后的無反应羊或發痘后的耐过羊再以强毒接种則均获得了确实的免疫力。

各代發痘羊与健康羊同居 23—56 日后, 健康羊均未發痘。接种强毒后絕大多数發全經過型的痘, 証明它們在同居期間并未自然感染。但是到了第 14 和 15 代时九头同

居的健康羊經强毒接种后就有 5 头未發痘，而且这 5 头羊在同居期間曾出現不同程度的体温反应，强毒接种后亦均有較明显的体温反应，仅皮膚未發痘，可能已自然感染而未获得充分免疫。这和它們同代的靜脉接种羊的反应和对羊最小感染量的試驗結果也是相符合的。

这样看来，鷄胚毒复归于綿羊連續繼代至第 13 代后，其毒力有比較明显增强的傾向，但是在 10 代以前，它的毒力和免疫原性都是比較稳定的。

总之，从以上各項試驗的結果观察，羊痘病毒由于連續通过鷄胚繼代，已适应在鷄胚尿膜上發育，其对羊的毒力已經减弱，而且减弱的程度是相当稳定的，同时其免疫原性并不因毒力的变化受到不良的影响。

四. 討 論

我們的試驗証明，根据米丘林的生物学原理，将羊痘病毒在鷄胚尿膜上繼代培养，迫使羊痘病毒朝着我們所要求的方向去变异，而获得了滿意的結果。病毒已适应了新的外界生活条件，能够在鷄胚尿膜上發育，其对綿羊的毒力有了显著的减弱，而更重要的是免疫原性也得到了保持。从上述的試驗中可以看到，复归羊的痘型是随着鷄胚代数的增加而逐漸發生变化的，从 $E_{48}S_1$ 代后所有复归羊的痘型均轉变为不全經過型，而且不論痘型变化如何均可使羊免疫；以鷄胚毒接种羊發痘后，不能使健康羊自然感染，既使靜脉接种也不能引起全身發痘；以 $E_{61}S_1$ 代鷄胚毒在羊体中連續繼代，其毒力在 10 代前保持在 10^{-3} — 10^{-5} 之間，在 12 代前亦不能使羊自然感染和全身發痘，自年 13 代后毒力增强才比較明显。这些事实，都充分証明了羊痘病毒在鷄胚尿膜上为了适应新的外界生活条件，已获得了新的性能，發生了变异，并且能使这种新的性能逐渐巩固下来，这种变化基本上是符合于米丘林生物学原則的。

我們在試驗方法中曾提到，羊痘病毒直接通过鷄胚培养，五次的試驗均未获得滿意的結果。第六次試驗繼代至第 10 代后即不能使羊發痘和免疫。这个結果和 Я. Е. Кол-яков^[3] 所称羊痘病毒通过鷄胚尿膜培养 10 代，对綿羊即無致病性以及和 SANJIVA 所报告的繼代至第 9 代可使羊局部發痘和获得免疫的結果是一致的，說明羊痘病毒直接通过鷄胚尿膜培养繼代是困难的。相反的，我們利用交替繼代的方法，仅交替一代綿羊即順利地通过鷄胚繼代至 90 代，可見利用交替繼代来动摇病毒的遺傳性，是可以使羊痘病毒逐渐适应于鷄胚尿膜上發育而获得变异。

在我們的試驗中經常注意掌握鷄胚毒的免疫原性的变化，并加以保持或增强，乃是一个重要的問題。上面已經提到，現在的鷄胚毒对綿羊的最小感染量是 10^{-3} ，这个标准不应该再低。如果免疫原性低于 10^{-3} 时，就要和綿羊交替来控制它。至于交替綿羊代数的多寡，要根据病毒变化的具体情况及使用羊种的不同来决定，从第 3 代綿羊反应毒

对純种羊和本地羊最小感染量的差別上可以看到羊只的易感性是有显著不同的。因此用純种羊交替时代数要少, 用本地羊代数可以多些, 以达到恢复或保持免疫原性的目的。

我們試驗的結果奠定了利用鷄胚毒作为預防羊痘的弱毒疫苗的基础。今后在实际应用之前还必须解决鷄胚本身产量甚微的問題。关于這個問題, 我們認為目前有可能利用一定代数內的綿羊反应毒制造疫苗的方式来加以解决, 而且我們已經利用这个方法在實踐上获得了比較滿意的結果^[4]。

五. 結 論

我們利用太原系羊痘强毒通过鷄胚并交替一代綿羊后, 已直接在鷄胚尿膜上培养繼代至 90 代。它对綿羊的毒力已显著减弱; 并且保持了良好的免疫原性, 可以用作制造弱毒疫苗的种毒。这一試驗結果, 在病毒学中再一次証明了米丘林生物学关于生物体是与其生活条件的統一体, 生活条件的改变, 生物体相应地随之变异的基本原理的正确性。

参 考 文 献

- [1] Иванов, М. М.: 兽医生物藥品制造: 畜牧兽医选輯之六, 128—132 (1952)。
- [2] S AJIVAM, RAO. R.: Cultivation of sheep-pox Virus on the chorioallantoic membrane of the chickembryo. Ind. J. Med. Res. 26:497 (1938)。
- [3] Коляков, Я. Е.: Ветеринарная микробиология, 421 (1952)。
- [4] 哈尔滨兽医科学研究所未發表資料。

RESEARCH ON THE LOW VIRULENT VIRUS VACCINE OF SHEEP POX

I. CULTIVATION OF SHEEP POX VIRUS ON THE DEVELOPING CHICK EMBRYO.

(Summary)

YUAN CHING-TZE, LEE PAO-CHI AND CHENG YUIN-SHIAN

We tried to cultivate the Tai-yuan strain of sheep pox virus of strong virulency on the chorio-allantoid membrane of the developing chick embryo. Further successive passages were made possible only when the virus was once back to the sheep skin after the third successive passage on the membrane. The virulency of the virus had been remarkably reduced after 90 successive passages while its good antigence property was still retained. Thus it was made possible to use it as seed virus for vaccine production. The result of this experiment again proves the righteousness of the theory of Michurin biology pertaining to the totality of the living organism with its living requirement, the change of which is followed by a responsible change in the living organism.