

LPC 細胞培養豬瘟及豬丹毒混合雙價 活毒疫苗免疫效力探討

鍾明華¹ 李淑慧¹ 張國慧¹ 陳清¹ 黃天祥¹
楊文郎² 李清圳³ 蔡貴雄³

1. 台灣省家畜衛生試驗所
2. 台灣家畜生物化學製藥廠股份有限公司
3. 雲林縣家畜疾病防治所

摘要 豬瘟 LPC-PRK 株及豬丹毒小金井株二價混合疫苗 0.5 ml 腹腔內接種小白鼠，接種小白鼠皆健存，結果顯示本二價混合疫苗對小白鼠安全無虞，符合檢驗標準。又將本混合疫苗 0.1 ml 皮下注射小白鼠，經 100 MLD 強毒豬丹毒菌攻毒後全數耐過，而對照小白鼠則發病死亡，顯示混合疫苗中豬丹毒疫苗之保護效力極佳。又依動物用藥品檢驗標準所訂進行乾燥兔化豬瘟組織培養活毒疫苗安全及效力試驗，安全試驗中有 8 頭未免疫豬瘟及豬丹毒疫苗豬隻分為二組，每組各 4 頭，分別注射 100 劑量及 1 劑量混合疫苗，結果未發現不良反應，結果顯示本混合疫苗安全性良好。另有 8 頭未免疫豬瘟及豬丹毒疫苗豬隻分為 3 組，第一組 4 頭，注射 1/500 劑量，3 頭注射 1/100 劑量，1 頭為對照，在疫苗注射後 10 天，以 10^4 MLD 之 ALD 豬瘟強毒攻擊之。結果除 1/500 劑量豬隻體溫上升外，其他豬隻均正常耐過，而對照組發病。於雲林縣轄區挑選飼養完善且又有配合意願之養豬農戶，共免疫 1200 頭六週齡小豬，另有 100 頭不予注射，供對照用。結果免疫過之小豬在田間試驗期間皆未發現任何副作用，且活潑健康。

關鍵詞：豬瘟，豬丹毒，雙價活毒疫苗

緒言

豬瘟 (Hog cholera, HC) 係為黃色病毒科 (Flaviviridae) 中之瘟疫病毒 (Pestivirus) 所引起之高度傳染性全身性出血豬隻疾病，死亡率極高。本省在日據時代就有病例報告，為了預防豬瘟之發生，從 1929 年至 1954 年間使用過不同的不活化疫苗，但效果不理想^[1]。1954 年李氏自菲律賓引進 ROVAC 株兔化豬瘟病毒，再於本所繼續通過家兔 800 餘代，發展成 LPC-China 株兔化豬瘟

活毒疫苗並推廣使用後，豬瘟發生情形即遽降，充份發揮疫苗之防治效果^[17, 18]。由於兔化豬瘟疫苗係採取接種家兔之脾臟及淋巴結為製造材料，操作麻煩，又種兔品系雜亂，個體差異大，常造成成品管之困擾，然前述之缺點可藉組織細胞培養方法得以改善。國內外學者亦曾企圖開發細胞培養疫苗^[2, 11, 12, 13, 21]，台灣家畜生物化學製藥廠亦與日本京都微生物研究所合作，以乳兔腎臟細胞培養增殖 LPC-China 株病毒，開發細胞培養活毒疫苗。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

豬丹毒 (Swine erysipelas) 則為丹毒桿菌所引起之發熱性傳染病，急性敗血症型之死亡率極高，慢性型所導致之關節炎及心內膜炎對豬隻發育影響頗鉅。台灣早在 1947 年即有病例報告，當時常被誤認為豬瘟。有關本病之防疫工作，自 1960 年起本省即開始從事活菌疫苗之研發，成效頗獲好評。近年來因受抗生素應用之影響及豬丹毒菌血清型別之不同，使丹毒活毒疫苗之免疫效力大受影響，致本省偶有病例發生。

目前，疫苗有多價化趨勢，豬瘟與丹毒合而為一，亦正符合現實所需，事實上亦有業者將此兩種疫苗混合使用之情形，但缺乏科學之試驗數據，故擬與民營生物製造業者合作探討豬瘟與豬丹毒混合疫苗之免疫保護效力，以供防疫參考。

材料與方法

LPC 免化豬瘟病毒株及其馴化

係由台灣家畜生物化學製藥公司利用本所 LPC 免化豬瘟病毒為種毒，接種初生乳兔腎臟初代細胞培養馴化為 LPC-PRK 株，供疫苗製造用。

ALD 豬瘟強毒

係由本所動物用藥品檢定分所生檢系供應，供疫苗免疫保護效力評估攻毒用。

94-4 病毒

為 1994 年從野外豬瘟病例中分離所得，供中和抗體檢測用。

PK-CL 細胞

為豬腎株化細胞，以 Eagle's minimum essential medium (MEM) 培養基，加入 8% 牛胎兒血清，適當 Na_2HCO_3 及 penicillin 及 streptomycin 之培養液培養之。

丹毒弱毒株

丹毒疫苗製造用種菌為小金井株。

雙價疫苗試製

台灣家畜生物製藥公司依優良藥品製造規

範 (GMP) 規定，以乳兔腎臟初代細胞增殖 LPC-PRK 株病毒；另外，取丹毒小金井株 working seed 種菌，在培養液增菌 24 小時，再移接於製造用培養液增菌約 15 小時，鏡檢確定無雜菌污染時，以離心沈澱法集菌濃縮，供混合疫苗製造用。

雙價疫苗丹毒活菌數、純度及認定試驗

依動物用藥品檢驗標準研列各項規定檢驗之。

雙價疫苗小白鼠安全性試驗

依動物用藥品檢驗標準取二支 20 劑量裝雙價乾燥疫苗，每支各以 20 ml phosphate buffer solution (PBS) 溶解之，以腹腔內注射體重 15 公克之小白鼠五隻，每隻 0.5 ml，觀察其健康情形，為期二週。

認定試驗

取上述 PBS 溶解之疫苗，以 0.45 μ 孔徑之過濾膜過濾，取體重 2.0 公斤左右之健康家兔 6 隻，其中 3 隻靜脈注射 1 ml 疫苗；另取 3 ml 疫苗溶液與豬瘟抗血清 3 ml 混合，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恆溫水槽中作用 1 小時後，將混合液靜脈注射 2 隻家兔每隻 2 ml；最後 1 隻家兔注射 PBS 溶液 1 ml，供對照用。

迷入試驗

取上述認定試驗中與豬瘟抗血清中和過之混合液接種於株化豬腎細胞，接種後每天觀察有無細胞變性 (CPE)，7 天後抽棄細胞培養液，加入 1% 濃度之天竺鼠，鵝及雞紅血球液，觀察有無血球吸著現象。

雙價疫苗小白鼠效力試驗

依動物用藥品檢驗標準取上述安全性試驗以 PBS 溶解之疫苗，皮下注射體重 15 公克之小白鼠 12 隻，每隻 0.1 ml，另有 3 隻為未免疫對照。二週後以 100 MLD 強毒豬丹毒菌皮下注射攻擊之，統計存活數。

雙價疫苗對豬隻安全性試驗

8 頭 8 週齡購自特約豬場未曾免疫 LPC 免

化豬瘟及丹毒菌苗豬隻，分 3 組：第 1 組 4 隻，肌肉注射 1 劑量；第 2 組 2 隻，注射 100 劑量雙價疫苗；第 3 組 2 隻，注射 PBS，為對照組。注射後連續觀察，臨床症狀及測量肛溫二週。

雙價疫苗對豬瘟免疫保護效力檢驗

8 頭 8 週齡購自特約養豬場未曾免疫 LPC 疫苗小豬，分為 3 組：第 1 組 4 頭，注射 1/500 劑量疫苗；第 2 組 3 頭，注射 1/100 劑量疫苗；第 3 組 1 頭，注射 PBS。依豬瘟細胞培養疫苗檢定標準，在疫苗免疫後 10 天，以 $10^{4.0}$ MLD 之 ALD 豬瘟強毒攻擊之。攻毒後每天測量肛溫、觀察症狀、採取唾液棉拭，為期 10 天。

雙價疫苗免疫豬攻毒後排毒檢測

上述豬隻攻毒後採取之唾液棉拭，浸泡於含 2% 牛胎兒血清之 EMEM 維持液內，經擠壓後，其 EMEM 維持液以離心機 10,000 rpm，5 分鐘高速離心之，取上清液接種於 PK 豬腎株化細胞，培養 3 天後，依前試驗方法實施間接螢光免疫染色^[13]。

田間應用試驗

商請雲林縣家畜疾病防治所在其轄區挑選飼養管理完善且有配合意願之養豬農戶數場，任選其 6 週齡小豬 1500 隻，其中 1400 頭注射本疫苗一劑量，另外 100 頭不予注射供對照用。在本疫苗注射前及後 3、5 週，連同對照豬隻隨機抽取 10% 之豬隻血清，供抗體檢測分析。

豬瘟中和抗體測定

依前試驗方法實施^[14]。

豬丹毒抗體測定

依前試驗方法實施^[9, 10]。

結 果

LPC 免化豬瘟細胞培養及豬丹毒雙價疫苗對小白鼠安全性及免疫保護效力

依動物用藥品檢驗標準，腹腔內注射 5 隻小

白鼠，每隻 0.5 ml 混合疫苗，所有小白鼠在注射混合疫苗後全數健存 (Table 1)。另有 12 隻小白鼠皮下注射 0.1 ml 混合疫苗後二週，以 100 MLD 強毒豬丹毒菌皮下攻擊之，所有小白鼠亦全數耐過，而 3 隻對照小白鼠在攻擊後則發病死亡 (Table 1)。由此可知，本混合雙價疫苗中豬丹毒之安全性及免疫效力均達檢定標準。

疫苗認定及病毒迷入

二支乾燥混合疫苗以 PBS 溶解後，一部份直接測定豬丹毒菌之含菌量，結果每劑量可達 $10^{8.7}$ CFU。另一部份以 0.45 μ m 孔徑過濾膜過濾後接種家兔，測定 RID₅₀ 病毒含量。結果每劑量含有 $10^{4.0}$ RID；過濾液與豬瘟抗血清混合後，再接種家兔結果，未發現體溫之變化，接種 PK-CL 細胞後亦未發現有血球吸著現象。顯示混合疫苗無其他病毒。

LPC 免化豬瘟細胞培養及豬丹毒雙價疫苗對豬隻之安全性

8 週齡未曾免疫 LPC 免化豬瘟及丹毒疫苗豬隻，以 100 及 1 劑量注射後，體溫均維持正常，亦無任何臨床症狀，可見本混合雙價疫苗對無抗體小豬安全無虞 (Fig 1)。

LPC 免化豬瘟細胞培養及豬丹毒雙價疫苗對豬瘟之免疫保護效力

8 週齡未曾免疫 LPC 疫苗小豬，分別注射 1/500 及 1/100 劑量混合疫苗後 10 天，以 $10^{4.0}$ MLD 之 ALD 豬瘟強毒攻擊。攻毒後，4 頭免疫 1/500 劑量疫苗豬隻中，3 頭耐過，但另一頭體溫上升，發病死亡；3 頭免疫 1/100 劑量疫苗豬隻全數耐過，其免疫保劑量達到 1/500 劑量，超過標準甚多；對照豬則發病死亡 (Table 2 及 Fig 2)。中和抗體測定成績顯示，疫苗免疫豬隻在攻毒前，亦即在免疫 10 天 (PVD 10) 時，仍無法測得豬瘟抗體，攻毒後 12 天 (PCD 12) 始有抗體出現。

LPC 免化豬瘟細胞培養及豬丹毒雙價疫苗田間試驗豬隻對豬瘟及豬丹毒之免疫反應

雲林縣境內四養豬場 1400 頭保育豬，在 6 週齡時免疫混合疫苗 1 劑量；另有 100 頭不予免

疫，供對照之用。10% 之試驗豬於疫苗時 (PVW 0)、注射後 4 及 6 週 (PVW 4, PVW 6) 採血。中和抗體檢測結果，依移行抗體之高低而有不同之結果，保有低移行抗體 ($\leq 1:3 \sim 1:11$) 小豬在注射疫苗一劑量後抗體即逐漸上升；中移行

抗體 ($1:16 \sim 1:32$) 小豬在疫苗注射後，其中和抗體先下降，然後再微幅上升；高移行抗體 ($\geq 1:45$) 小豬之抗體則一路下滑，其幅度如同對照豬隻 (Table 3)。

Table 1. The safety and protective efficacy of the LPC-PRK and erysipelas combined bivalent vaccine

No. mice	Safety ^a	Protection ^a
5	5 / 5	
12 ^b		12 / 12
3 ^c		0 / 3

a. No. protected / No. tested b. vaccinated c. control

Table 2. The neutralizing antibody response of the pigs immunized with the LPC-PRK and erysipelas combined bivalent vaccine

Pig No.	Dosage	SN titer			Challenge ^d
		PVD 0 ^a	PVD 10 ^b	PCD 12 ^c	
S11	1 / 500	< 4	< 4	64	S
S12	1 / 500	< 4	< 4	64	S
S13	1 / 500	< 4	< 4	4	S
S14	1 / 500	< 4	< 4	NT ^e	D
S15	1 / 100	< 4	< 4	45	S
S16	1 / 100	< 4	< 4	22	S
S17	1 / 100	< 4	< 4	11	S
S18	Control	< 4	< 4	NT	D

a. 0 day post vaccination d. survival (S) : dead (D)
 b. 10 days post vaccination e. not tested
 c. 12 days post challenge

Table 3. The neutralizing antibody response of the pigs with low, median, and high level of maternal antibody in the field trial

Antibody level	Geometric mean SN titer		
	Pre-V ^a	PVW 4 ^b	PVW 6 ^c
Low	4.1	17.8	34.9
Median	21.7	11	18.1
High	77.7	17.9	12.4
Control	28.2	7.7	3.6

a. prevaccination b. 4 weeks post vaccination c. 6 weeks post vaccination

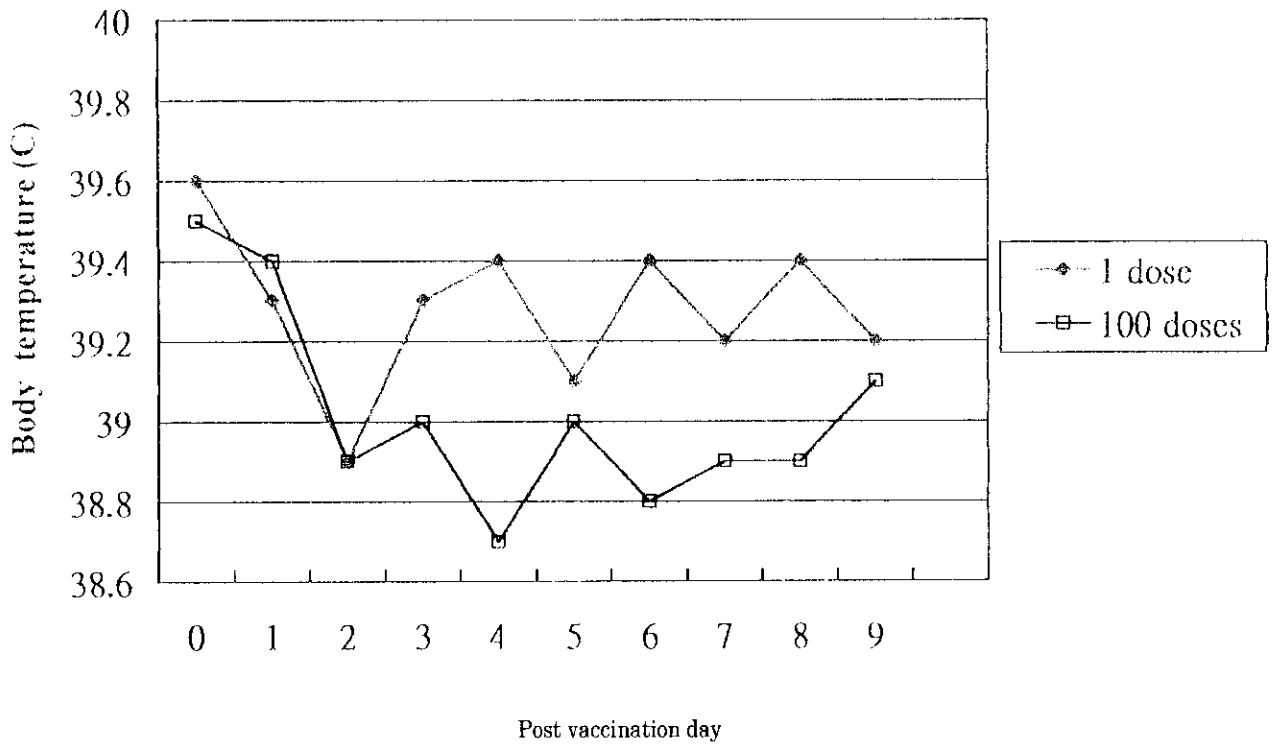


Fig. 1. The safety (febrile reaction) of the pigs after immunization with the LPC-PRK and erysipelas combined bivalent vaccine

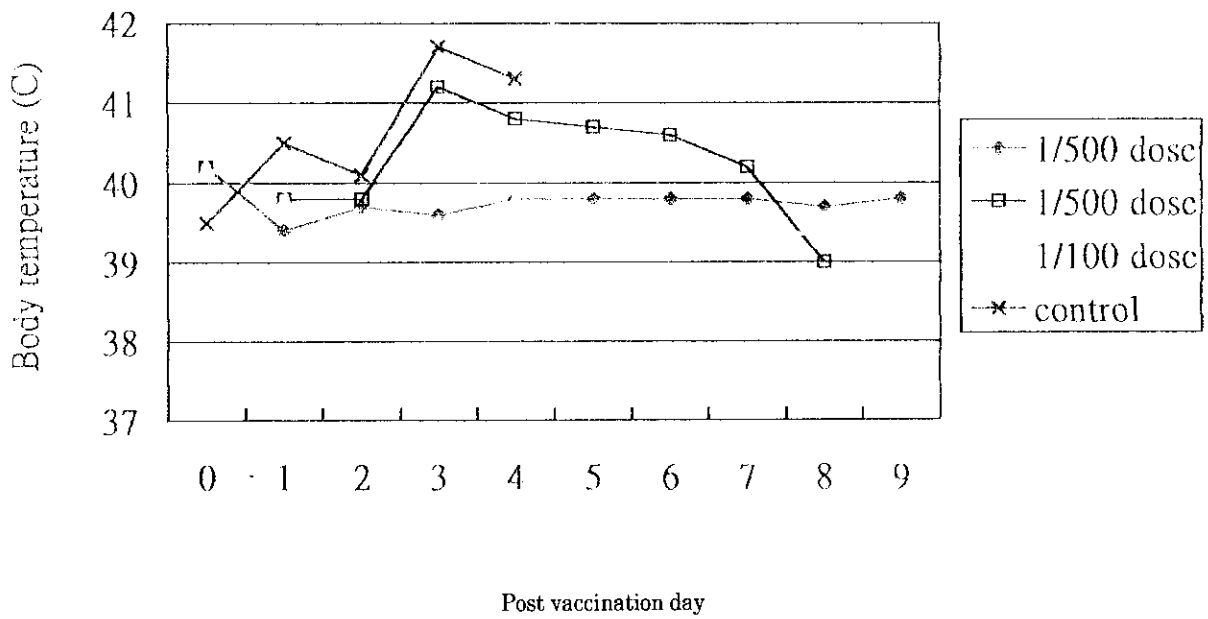


Fig. 2. The temperature of the pigs which were immunized with the LPC-PRK and erysipelas combined bivalent vaccine after challenge

討 論

LPC-China 免化豬瘟病毒可在豬源初代及株化細胞增殖^[13, 14, 16]，可在天竺鼠腎臟細胞增殖^[2, 21]，亦可以家兔睪丸初代及腎臟株化細胞增殖^[11, 12]。台灣家畜生物化學製藥公司即將 LPC-China 免化豬瘟種毒馴化於乳兔腎臟初代細胞，開發 LPC-PRK 活毒疫苗，並與豬丹毒弱毒菌混合成雙價疫苗，此疫苗以國家檢定標準之 1/100 劑量免疫豬隻後可輕易通過檢定，甚至以 1/500 劑量免疫者，亦可耐過攻毒。不過，此疫苗以 PK-15 株化細胞測定時發現其病毒含量甚低，顯示 PK-15 並不適合 LPC-PRK 疫苗檢測之用。為了準確檢測其病毒含量，似應採用乳兔腎臟細胞為宜。前試驗^[13]曾推論豬瘟疫苗免疫後 10 天即予攻毒時，所能檢測者應是 homologous interference 之作用，而非免疫抗體之保護。由於 LPC 豬瘟疫苗毒及大多數豬瘟病毒在細胞培養中不產生 CPE，須以各種方法證實其存在。Mengeling^[19, 20]開發螢光抗體染色法實施豬瘟病毒之定量；林^[4]則就 END 法、干涉法及螢光抗體-組織培養法 (FACCT) 比較豬瘟病毒之定量。林^[5]亦指出豬瘟活毒疫苗接種後第 3 天可在扁桃腺檢出病毒，此與疫苗接種後第 3 天發生效力有關，認係由於病毒干涉現象，且推論豬瘟病毒在培養細胞上對其同類 (homologous) 病毒之再接種感染時必呈同樣之增殖干涉現象。清水悠紀臣等^[15]發現 GPE⁻ 及 WEE 病毒有互相干涉現象，林及賴^[6]將此稱之為 Homo 毒干涉法。在本試驗中，在免疫後 10 天 (PVD 10) 攻毒時之中和抗體均為 $\leq 1:4$ ，且可耐過之結果 (Table 2)，再次得到證明 homologous interference 之推論。

豬瘟移行抗體對 LPC 免化豬瘟疫苗之干擾早有文獻證實，細胞培養疫苗亦無法倖免，Table 3 即顯示，保有低移行抗體 (1:4.1) 小豬免疫後中和抗體緩步上升；中度移行抗體者 (1:21.7)，免疫後其抗體先下降後再上升；高移行抗體者則持續下降，與對照類同。

另外，國內研究人員早年即已投入豬丹毒菌苗之研發工作^[3, 8, 9]，抗生素為對付細菌之利器，對丹毒菌當然不例外^[22]，以往在田間常有丹毒活菌苗失效之傳聞。因此，才有不活化菌苗

之開發，企圖避開保育豬飼料中添加抗生素之干擾^[7, 10]。本試驗在田間應用時亦發現 6 週齡保育豬經過免疫後丹毒抗體甚低 (未以表顯示)，但經查詢後獲悉，保育豬飼料添加抗菌藥物情形甚為普遍。無論如何，由實驗室及田間試驗結果均顯示 LPC-PRK 豬瘟及丹毒混合雙價活毒疫苗對豬隻極為安全，且可通過檢定標準。

目前農村勞力缺乏，為因應此現象，動物用疫苗多往多價化方向發展，於是三合一、四合一、甚至五合一疫苗就一一上市，不管幾種疫苗混合為一，最重要的是，不能發生互相干擾，而影響免疫效力。LPC 免化豬瘟為病毒，丹毒則為細菌，兩者間絕無干擾之可能，因此，在免疫效力上就各有所發揮。

參考文獻

1. 林再春。結晶紫豬瘟疫苗效力之知見補遺。台灣省農林廳獸疫血清製造研究報告。2: 1-2。1958
2. 林再春、謝竹茂、陳田昌、賴秀穗、李正雄、陳正吉、陳守仕。豬瘟 GP 組織培養疫苗之安全性及免疫效力。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。6: 10。1969
3. 林再春、謝竹茂、周懋森、楊揚輝。豬丹毒菌苗冷凍乾燥之研究。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。10: 47-51, 1973
4. 林再春。螢光抗體-組織培養法對於豬瘟病毒檢出及定量之研究。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告第五期，1~22, 1968
5. 林再春。應用螢光抗體法測定豬瘟病毒感染增殖之研究。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告第五期，23-24, 1968
6. 林再春、賴秀穗。免化豬瘟毒之試管內 (in vitro) 檢出及定量法之研究。台灣省畜衛所研報。7: 1-12, 1970
7. 呂清泉、陳清、賴俊雄、柯浩然、郭乃維、詹益波、葉啓明、張文章、蕭宏孟、陳茂振、邱蘭皓、羅壬松。豬丹毒多價不活化菌苗之田間應用試驗-添加抗菌物質飼料對豬丹毒菌苗免疫效果影響評估試驗。台灣省畜衛所研報。33: 47-57, 1997

8. 吳義興、賴俊雄、張天桂、呂清泉。豬丹毒菌苗對小白鼠與豬免疫性之關係。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。10, 47-51, 1973
9. 陳清、詹益波、呂清泉、賴俊雄、柯浩然、盧泰志。豬丹毒病原血清學之調查與菌苗改進之研究。(I) 台灣省農林廳八十二年度試驗研究報告書。134-143, 1994
10. 陳清、呂清泉、林旭志、郭乃維。豬丹毒不活化菌苗與弱毒活菌苗免疫效力之評估。台灣省畜牧獸醫學會會報, 65 卷, 增刊 2, 4, 1995
11. 楊喜金、田淵清、清水悠紀臣。家兔腎臟培養細胞馴化兔化豬瘟毒 (RK-LPC) 之性狀研究。2. 馴化毒之病原性及免疫性。省畜衛試研報 19: 101-122
12. 劉培柏、傅組慧。兔化豬瘟組織培養疫苗田間應用評估。民國七十六年度畜產試工作報告。625-630, 1987
13. 鍾明華、詹益波、紀長文、黃金城、邱資峰、李振宗、洪文凱。兔化豬瘟組織培養病毒對小豬之免疫保護效力。台灣省畜衛所研報。25: 49-58, 1989
14. 鍾明華、詹益波、李振宗、邱資峰。LPC 組織培養及兔化豬瘟疫苗免疫效力比較。台灣省畜衛所研報。26: 15-22, 1990
15. 清水悠紀臣, 古內進, 林重美, 熊谷哲夫, 原二郎: 豚コンラウイルス END 効果における變異。ウイルス, 15: 287-288. 1965
16. Lai, S. S., Chen, C. S., Huang, T. H., Ho, W. C. and Lin, T. C.: Multiplication of an attenuated hog cholera virus, LPC-China strain in various cell cultures. Taiwan J. Vet. Husb., 37: 1-5, 1981
17. Lee, R. C. T. Lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. Scientific Agri. (Taiwan) 2: 4-14, 1954
18. Lin, T. T. C. and Lee, R. C. T.: An overall report on development of a highly safe and potent lapinized hog cholera virus strain for hog cholera control in Taiwan. Council for Agriculture Planning and Development, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, Republic of China, 1-69, 1979
19. Mengeling, W. L., Pirtle, E. C. and Torrey, J. P.: Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence: Application as a diagnostic and assay method. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 246-252, 1963
20. Mengeling, W. L.: Field evaluation of the fluorescent antibody tissue culture test for diagnosis of hog cholera. Proc. Book, 101st Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass. 274-275, 1964
21. Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y. and Furuuchi, S.: Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea pig kidney cell culture. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn). 9: 83-91, 1969
22. Takahashi, T., Sawada T., Muramatsu M., Tamura Y., Fujisawa T., Benno Y., and Mitsuoka T.: Serotype, antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. Journal of clinical microbiology, Mar, 536-539, 1987

Development of Hog Cholera and Swine Erysipelas Bivalent Live Vaccine

M. H. Jong¹, S. H. Lee¹, K. H. Chang¹, C. Chen¹, T. S. Hung¹,
W. L. Yang², C. C. Lee³ and G. S. Tsai³

1. Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.
2. Taiwan Domestic Animals Chemical & Pharmaceutical Co., Ltd.
3. Yunlin hsien Livestock Disease Control Center, Doouluh, Taiwan, R. O. C.

SUMMARY The safety of the bivalent vaccine mixed with LPC-PRK strain of hog cholera virus and Coganei strain of swine erysipelas was verified by the facts that side effects and signs of illness did not observed in the mice which were injected with 0.5 ml intraperitoneally and in the pigs which were injected with 100 doses intramuscularly of the vaccine. The potency of the vaccine was proved that all mice injected with 0.1 ml of the vaccine survived after challenge with 100 MLD of virulent erysipelas. According to the current requirements of quality inspection, the pigs vaccinated with 1 / 100 and 1 / 500 doses were challenged with 10^4 MLD of the virulent ALD strain of hog cholera virus 10 days after vaccination. Febrile reaction was noticed only in one out of four pigs vaccinated with 1 / 500 dose of the vaccine. On the other hand, 3 control pigs developed signs of illness and died after challenge. A field trial was conducted at 4 pig farms in YunLin prefecture. Totally, 1200 pigs with 6 weeks of age were vaccinated and 100 pigs served as the control. All of the vaccinated pigs were normal and healthy during the period of trial.

Keywords: *hog cholera , erysipelas , bivalent vaccine*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.