

# 豬特定傳染病不活化疫苗免疫效力探討

鍾明華\* 李淑慧 丁履紉 吳詩南  
詹益波 邱資峰

台灣省家畜衛生試驗所製劑研究系

**摘要** 豬特定傳染病 TS 株以 ESK 株化細胞增殖，病毒力價可達  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml，經 binary ethylenimine 不活化後，分別與 liquid paraffin (LP) 礦物油及 MVP Emulsigen (MVP) 乳劑混合研製兩種不活化疫苗。5~7 週齡第二代無特定病原小豬間隔 3 週連續免疫兩次後，兩種疫苗均可產生 1:2290~1:2398 之中和抗體。免疫豬與攻毒豬 (challenge donor) 及同居對照豬 (contact sentinel) 同欄飼養，結果顯示免疫豬得到良好的保護；攻毒豬及同居對照豬蹄部均有明顯的病灶。

**關鍵詞：**豬特定傳染病，不活化疫苗

## 緒言

豬特定傳染病於 1966 年在義大利首先發現 [1] 以後陸續在世界各地發生 [8]。本省則在 1973 年於南部地區流行，至今仍偶有病例傳出。本病之死亡率雖低，但感染豬會有疼痛、跛行、生長發育遲緩等現象，引起經濟上之損失。由於本病之臨床症狀難與口蹄疫區別，故各國政府對本病均極為重視。

為了本病之控制，先進國家均採取撲殺政策，但在撲殺方法不切實際時，疫苗免疫即成為唯一的方法。本所呂等 [1, 2] 早年即對不活化疫苗，賴等 [3] 對活毒疫苗進行開發研究，均各有良好的結果。爾來大陸走私動物及畜產品日盛，為防範未然，應積極開發有效之疫苗，供緊急預防之用，本報告旨在探討利用較不傷害病毒抗原蛋白之不活化劑 BEI 及佐劑效益較高的礦物油所研製之不活化疫苗之免疫保護效力。

## 材料與方法

### 病毒：

係由本所疫學系分離之 TS 株做為種毒，供疫苗製造及攻毒用。

### 細胞：

豬胎兒腎臟株化細胞 ESK 為本室保存，以含有 10 mM HEPES，30 µg/ml gentamicin，8 % fetal calf serum 及適量 NaHCO<sub>3</sub> 之 Eagle's MEM 培養，供病毒增殖及中和抗體測定用。

### 病毒增殖不活化及油質疫苗製作：

當 ESK 細胞單層形成後，將培養液抽棄之，加入 TS 病毒液 (約 0.1 MOI)，置於 37 °C 暖箱培養，當細胞變性 (cytopathic effect, CPE) 完成時收集病毒液，加入 0.006 M BEI，在 37 °C 作用 10 小時再接再種 ESK 細胞及 TSA agar 確認無殘留活病毒及無細菌污染後，依前試驗方法 [5] 分別與 liquid paraffin (LP) 礦物油 (MERCK) 及 MVP Emulsigen (MVP) 乳劑混合製作油質疫苗。

### 不活化疫苗免疫效力評估：

第二代 5~7 週齡 SPF 小豬 16 頭，分二欄飼養，每欄 8 頭，第一欄 5 頭肌肉注射 LP 礦物油不活化疫苗一劑量 (2 ml)，另 3 頭為對照；第二欄 5 頭肌肉注射 MVP 佐劑不活化疫苗，另外三頭為對照。三週後再免疫第二次，再過二週，每欄 3 頭對照中選取一頭在蹄冠部皮內，皮下各注射  $10^{7.5}$  TCID<sub>50</sub> 之 TS 株病毒，作為 challenge

\*抽印本索取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

；另外二頭為同居對照，稱為 contact sentinels，每天觀察症狀，測量體溫。對照豬攻毒前及攻毒後第 4、7 及 20 天採血，測定抗體。

#### 中和抗體測定：

依據黃等<sup>[4]</sup>報告之試驗方法實施中和抗體測定及判讀。

#### 結 果

##### TS 株病毒在 ESK 株化細胞之增殖性：

TS 株病毒在 ESK 上之 CPE 極為快速，而且病毒力價亦可高達  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml。

##### TS 株不活化疫苗之免疫保護效力：

第二代 SPF 小豬免疫 LP 礦物油油質疫苗一次後中和抗體達  $1.8 \sim 2.7 \log_{10}$ ，二次疫後達  $3.0 \sim 4.2 \log_{10}$ ；免疫 MVP 佐劑疫苗一次後中和抗體為  $1.5 \sim 2.1 \log_{10}$ ，二次免疫後為  $2.7 \sim 3.9 \log_{10}$  (Fig. 1)。與攻毒豬同居 3 週，攻毒豬蹄冠皆出現潰瘍結痂病灶，部份攻毒豬有跛行，吻部出現水泡；四隻未免疫同居豬隻中有三隻蹄冠有病灶 (Figs. 2 & 3)；五頭 LP 礦物油油質疫苗免疫豬中有一頭蹄冠出現病灶，五頭 MVP 佐劑疫苗免疫豬皆未發現病灶，所有試驗豬體溫均正常 (Table 1)。

表 1 豬特定傳染病不活化疫苗疫豬，同居感染及攻毒對照豬攻毒後之臨床反應  
Table 1 Clinical reaction of the vaccinated, contact sentinel and challenged donor pigs after challenge

Group	Treatment	No. pig	Febrile reaction	Feet lesion
1	LP vaccinated	5	Normal	1 / 5 <sup>a</sup>
2	MVP vaccinated	5	Normal	0 / 5
3	Contact sentinel	4	Normal	3 / 4
4	Challenge donor	2	Normal	2 / 2

a. Number developed lesion / number tested

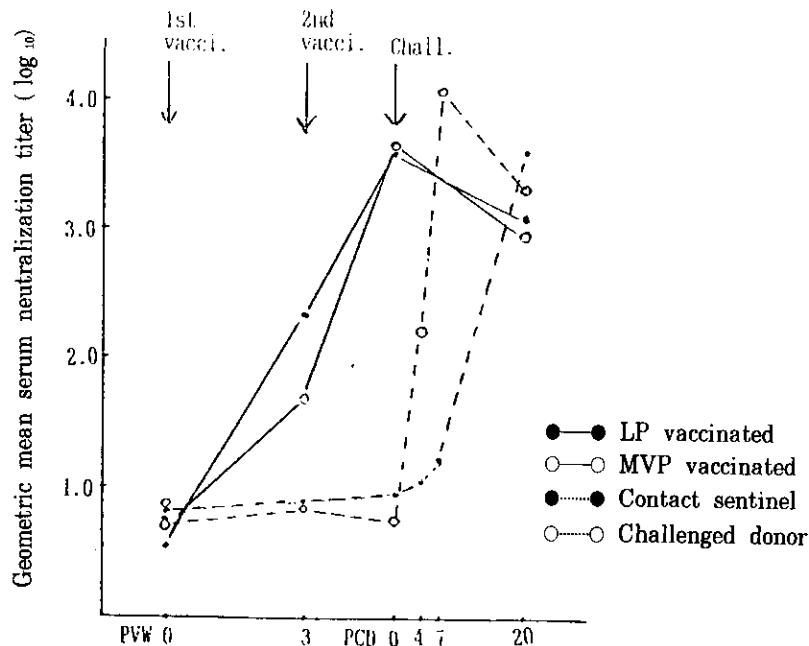


Fig. 1. Antibody response of the vaccinated, contact sentinel and challenge donor pigs  
圖 1 豬特定傳染病不活化疫苗免疫豬，同居感染及攻毒對照豬之抗體反應

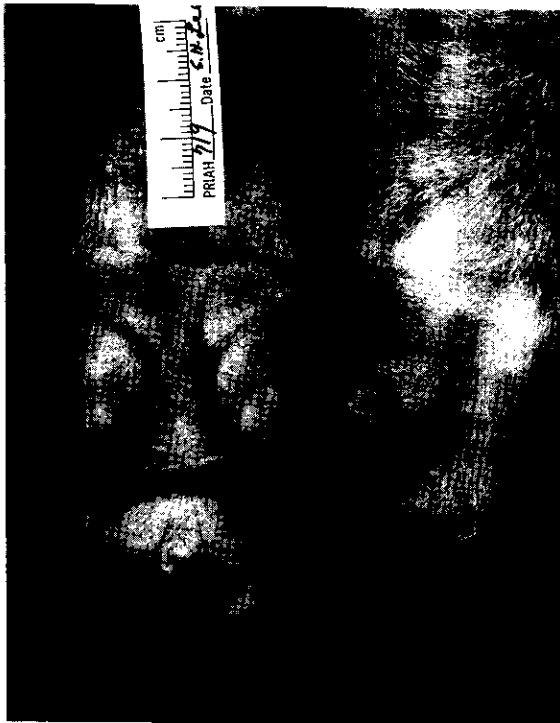


圖 2 人工感染豬之蹄冠部及蹄底肉墊之組織呈紅腫、破潰及蹄裂等病灶。

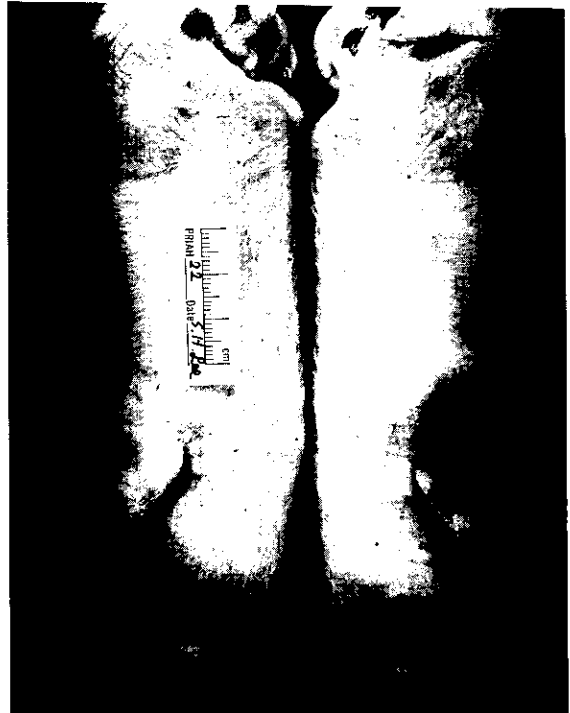


圖 3 人工感染豬之蹄冠部之水泡組織後形成痂皮樣結構。

## 討 論

TS 株病毒在 ESK 細胞上之增殖力價極高，對疫苗之免疫效力極有助益，但在不活化處理過程中，且需大量之 BEI 方能將病毒殺死。由於本病毒僅對 3 日齡哺乳小白鼠具病原性<sup>[12]</sup>，其他動物概不具感受性<sup>[7]</sup>，又在高濃度 BEI 之下，對細胞似具毒性，又無實驗動物可用，增加殘存活病毒檢定之困難。應可先透析，降低其毒性。又病毒力價與所需 BEI 濃度間之關係如何？亦應予究明，使病毒不活化工作可順利完成。本試驗在中和抗體測定中發現，若依種毒力價測定所得之 TCID<sub>50</sub>，計算血清中和之 100 TCID<sub>50</sub> 之病毒量，實際上在 back titration 時僅得 10 TCID<sub>50</sub> 無法如願得到正確之 100 TCID<sub>50</sub>，此時測得部份第二代 SPF 小豬來免疫前之非特異性中和抗體價高達 1:63，較 Armstrong & Barnett<sup>[6]</sup> 所述 1:45 為陽性界限稍高，小豬免疫及攻毒後之中和抗體價亦高（未以表示之）；若將種毒稀釋倍數降低，使與血清中和之病毒量達到正確的 100 TCID<sub>50</sub>（從 back

titration 証實之），小豬非特異性中和抗體即降為 1:16，此時測得之小豬免疫及攻毒後之中和抗體價亦隨之降低，在抗體測定時稍形困擾。在 ELISA 測定時非特異性抗體更高達 1:100<sup>[6]</sup>，小豬之非特異性抗體從何而來，亦感困惑。

佐劑在疫苗之免疫效力上扮演極重要的角色，本所呂等<sup>[1, 2]</sup>曾使用 Al(OH)<sub>3</sub> 及 saponin 為佐劑研製不活化疫苗，得到 100% 之保護效力，Mowat et al.<sup>[10]</sup>亦有類似之報告。本試驗則採用 LP 礦物油及 MVP 乳劑為佐劑，第二代 SPF 小豬經兩次免疫此兩種佐劑疫苗後之中和抗體相近，但保護效力以 MVP 佐劑疫苗略勝一籌。不過兩種佐劑疫苗中病毒抗原體積含量僅及 25% 而已，而以 Al(OH)<sub>3</sub> 為佐劑者，其抗原體積含量一般均達 90%。本試驗兩種佐劑疫苗之保護效力均達 80% 以上，圖 1 亦顯示疫苗免疫豬在攻毒後，抗體不僅未上升反而下降，此是否表示免疫豬曾經被感染，但入侵之病毒迅被抗體中和，未能造次？但不可諱言地在觀察肉眼病灶時，大區域之壞死、脫落、痂皮等診斷容易（圖 2、3），但小區域的

病灶卻不易判斷，有時容易失之主觀。Hedger & Mann<sup>[9]</sup> 稱不活化疫苗無法完全預防感染，但可阻止病毒之散佈及病灶之產生。誠如其所言，腳蹄、唇吻部位表皮最容易受傷，血液也最不容易到達，因此儘管抗體極高，還是無法預防感染，若在衛生管理不良之環境下，易發生細菌感染，使病情加劇，造成經濟損失。

### 參考文獻

1. 呂榮修，豬水泡病研究，農復會補助家畜疾病研究計畫報告，1-18，1977。
2. 呂榮修、鍾明華、李永林、邱朝齊、賴秀穗。1977。豬水泡病死毒疫苗之研究，農復會補助豬水泡病防治之研究計畫報告，1-14。
3. 賴秀穗、陳忠松、何維莊、黃天祥。1981。豬水泡病活毒疫苗之研究—毒力復歸討論，農發會補助豬疾病之研究計畫報告，13-17。
4. 黃金城、鍾明華、詹益波、李振宗。1988。豬水泡病免疫擴散抗原之成品化，畜衛試研報，24：73-82。
5. 鍾明華、李淑慧、邱資峰、楊喜金、詹益波。1994。豬假性狂犬病不活化疫苗油質佐劑在家兔引起之免疫及組織病理反應，省畜衛試研報。30：11-24。
6. Armstrong, R. M. and I. R. T. Barnett. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against swine vesicular disease virus (SVDV). *J. Virol. Methods* 25 : 71-80.
7. Burrows, R., J. A. Mann and D. Goodridge. 1974. Swine vesicular disease: virological studies of experimental infections produced by the England/72 virus. *J. Hgy.*, 72 : 135-143.
8. Done, J. T. 1992. Swine vesicular disease in the European community. *Vet. Rec.* 131 : 246.
9. Hedger, R. S. and Mann, J. M. 1989. Swine Vesicular Disease Virus. In: *Virus Infections of Vertebrates*. Vol. 2 (ed. M. B. Pensaert) pp 241-250.
10. Mowat, G. N., M. J. Prince, M. E. Spier and R. F. Staple. 1974. Preliminary studies on the development of a swine vesicular disease vaccine. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 44 : 350-360.
11. Nardelli, L., E. Lodetti, G. L. Gualande, R. Burrows, D. Goodridge, F. Brown and B. Cartwright. 1968. A foot-and-mouth disease syndrome in pigs caused by an enterivirus. *Nature (London)* 219 : 1275-1276.
12. Weiland, F. and W. Uhlmann. 1975. Histopathological findings in the brains of unweaned mice after experimental infection with the virus of swine vesicular disease (SVD). A method of differentiating SVD from FMD. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 83 : 83-85.

## Studies on the Efficacy of the Inactivated Vaccine of the Specified Disease of Swine

M. H. Jong\*, S. H. Lee, L. J. Ting, S. N. Wu,  
I. P. Chan, T. F. Chiou

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

**SUMMARY** The virus titer of TS strain in ESK cell line could reach  $10^{9.0}$  TCID<sub>50</sub> /ml. Secondary specific pathogen free (SPF) pigs with 5 ~ 7 weeks of age were used to evaluate the binary ethylenimine (BEI) – inactivated vaccines being prepared with LP mineral oil and MVP Emulsigen. Results revealed that both of them elicited neutralizing antibodies of the titers between 1 : 2290 ~ 1 : 2398 after two vaccinations. These vaccines also conferred a good protection over the vaccinated pigs, whereas the control sentinels and challenged donors developed visible lesions on the foot and dewclaw areas.

**Key words:** *pig specified disease; inactivated vaccine*

---

\*Corresponding author

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