

豬瘟不活化疫苗免疫效力探討

鍾明華* 李淑慧 吳詩南 詹益波 邱資峰

台灣省家畜衛生試驗所

摘要 22 頭 5 ~ 7 週齡第二代無豬瘟抗體 SPF 豬，分為五組，第一、二組各五頭，分別免疫注射 LPC-TS 株組織培養活毒疫苗及本所產製 LPC 免化豬瘟疫苗一劑量；第三、四組亦各為 5 頭，分別免疫 LPC-TS 株及 HC-TD 株組織培養不活化油質疫苗二次，間隔四週。疫苗注射後四週第一、二、三組豬之幾何平均中和抗體價分別為 1 : 363、1 : 436 及 1 : 38；攻毒前上升為 1 : 512、及 1 : 60。第四組免疫野外豬瘟不活化疫苗者全無抗體反應。

以 $10^{4.0}$ MLD 之 ALD 強毒肌肉攻擊後，活毒疫苗免疫豬體溫輕度上升 ($<41^\circ\text{C}$) 但未有排毒現象，且全數耐過；不活化疫苗免豬體溫升高 41°C 以上，其中免疫 LPC-TS 株不活化疫苗者，有 2 頭耐過，而 HC-TD 株不活化疫苗免疫者及對照豬全數發病斃死。

剖檢結果，不活化疫苗免疫豬均有脾梗塞、淋巴腺週邊出血或腎點狀出血等病變 (1 頭免疫 LPC-TS 不活化疫苗豬除外)；然而，活毒疫苗免疫豬則全部正常。由此顯示，不活化疫苗尚有待改進。

關鍵字：豬瘟、不活化疫苗、組織培養

緒言

本省豬瘟之防疫工作，在日據時代 (民國 18 年至 38 年)，曾使用福馬林 (Formalin) 臟器不活化疫苗，此疫苗安全性雖高，但免疫效力差，McBryde 及 Cole⁽¹⁵⁾ 創製結晶紫 (Crystal violet) 不活化疫苗，李及林^(1,2,3) 等亦採用結晶紫處理發病豬脾、淋巴腺或毒血，仿製不活化疫苗，此疫苗之免疫期間短，仍不理想。民國 41 年李自菲律賓引進 Rovac 株免化豬瘟病毒，經家兔連續繼代後開發安全有效之 LPC-China 株免化豬瘟活毒疫苗。自此，本省之豬瘟即獲得良好之控制⁽³⁾。

由於組織培養技術的發展，豬瘟病毒可用豬源 (Bass & Ray⁽⁷⁾ ; Boynton⁽⁸⁾ ; Dale & Songer⁽¹²⁾ ; Dunne⁽¹³⁾ 等 ; Lai⁽¹⁴⁾ 等) 及非豬源 (Pirtle & Kniazeff⁽¹⁹⁾ ; Sato⁽²⁰⁾ 等 ; 楊⁽⁴⁾ ; 劉⁽⁵⁾) 細胞增殖。PK-15 株化細胞對豬瘟病毒之敏感性極高；可供病毒分離及增殖，甚為簡便 (Mengeling & Drade⁽¹⁶⁾ ; Carbrey⁽¹⁰⁾ 等 ; Mengeling⁽¹⁷⁾ 等)。筆者等⁽⁶⁾ 亦曾利用豬腎株化細胞 (PK-CL) 增殖 LPC-

China 株免化豬瘟病毒可達 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml。

為了撲滅豬瘟，最後勢將無法繼續使用活毒疫苗，但在撲滅過程中，為了確保低發生率及零發生地區豬隻之安全，考慮以不活化組織培養疫苗提供必要之免疫。本報告旨在檢討不活化組織培養疫苗與活毒疫苗之免疫保護效力。

材料與方法

細胞：

PK-CL 株化細胞係豬腎由來並經筆者予以 Cloning 者，以 Eagle's MEM 加入 7 % Fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 30 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin 及適量 NaHCO₃ 之培養液培養，病毒力價測定時亦同。

病毒：

- (一) LPC-TS 株：為筆者等將 LPC-China 株免化豬瘟株於 PK-CL 細胞馴化所得。
- (二) HC-TD 株：係由豬瘟系分讓之野外毒株。當 PK-CL 細胞單層完成時，即分別接種 LPC-

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

TS 及 HC-TD 株病毒，經吸著後加入含 2 % FCS 維持液，於 37 °C 暖箱內培養 3 天後凍存於 - 80 °C 冰櫃內。

(二) ALD 株：係由生檢系撥讓，供攻毒之用。

病毒不活化：

將凍存於 - 80 °C 之病毒取出解凍，以超音波處理後加入 BEI，在 37 °C 不活化。

不活化疫苗試製：

經 BEI 處理之病毒，先以螢光抗體染色法確認無存活病毒後，加入礦物油、乳化劑等製成油、乳化劑等製成質疫苗。

小豬免疫注射：

22 頭購自民間第二代 SPF 小豬，分為五組，第一、二組各 5 頭，分別肌肉 LPC-TS 及 HC-TD 株組織培養不活化疫苗兩次，間隔 4 週；第三、四組亦各為 5 頭，分別肌肉注射 LPC-TS 株組織培養活毒疫苗及本所產製之 LPC-China 株兔化豬瘟疫苗一劑量；第五組 2 頭為對照組。在不活化疫苗第二次注射後 2 週，所有 22 頭豬隻同時以 $10^{4.0}$ MLD 之 ALD 強毒攻擊。攻毒後每天測量體溫，觀察症狀，體溫上昇者採取口腔棉拭，供排毒檢測用。試驗豬在疫苗免疫前、攻毒前及攻毒後剖檢前採血，測定抗體，攻毒後 2 週所有試驗豬均剖檢觀察病變。

病毒分離、病毒力價測定：

依前試驗方法(6)實施。

抗體測定：

依 Pan et al.⁽¹⁸⁾ 及 Terpstra et al.⁽²¹⁾ 等方法稍加修改實施之。結果以 50 % CPE reduction 判讀之。

結果

病毒增殖：

LPC-TS 及 HC-TD 株病毒在 PK-CL 株化細胞增殖後之病毒力價分別為 $10^{7.0}$ 及 $10^{6.8}$ TCID₅₀/ml。

LPC-TS 株組織培養活毒及不活化疫苗，HC-TD 株組織培養不活化疫苗及 LPC-China 兔化豬瘟疫苗免疫效力比較：

LPC-TS 株組織培養活毒及 LPC-China 株兔化豬瘟活毒疫苗免疫豬在攻毒後，各有 3 頭體溫超過 41 °C，亦各有 2 頭超過 40 °C (圖 1)，但均

耐過，亦無排毒現象 (表 3)，而且剖檢後各臟器均無豬瘟病變。

LPC-TS 株及 HC-TD 株組織培養不活化疫苗免疫豬，攻毒後體溫皆超過 41 °C，部份甚至超過 42 °C (如圖 1)，發燒情形甚為明顯。不活化疫苗免疫豬多呈食慾不振、下痢及部份呈後軀麻痺現象。免疫 LPC-TS 株不活化疫苗 5 頭豬其中有 3 頭在試驗結束前瀕死予以剖檢，而有 2 頭耐過，且無排毒現象；剖檢結果僅 1 頭耐過豬未發現豬瘟病變，其他 4 頭皆呈脾梗塞、腎點狀出血、淋巴結週邊出血等典型豬瘟病變 (表 1)。免疫 HC-TD 株 5 頭豬隻中有 2 頭發病死亡、3 頭病重刺死，剖檢病變亦多有脾梗塞、腎點狀出血等病變 (表 1)；對照豬臨床上呈高熱、食慾不振、下痢及後軀麻痺等症狀，然後斃死 (如圖 1)，剖檢後亦發現脾梗塞、淋巴結週邊出血及腎點狀出血等典型豬瘟病灶。

活毒及不活化疫苗免疫豬之抗體反應：

表 2 顯示，豬在免疫 LPC-TS 及 LPC-China 株活毒疫苗一劑量後四週之幾何平均血清中和抗體分別達 1:38，經二次免疫仍無多大起色，僅達 1:52；免疫野外豬瘟 HC-TD 株不活化疫苗者，則一路掛零，全無反應。

Table 1. Gross lesions of the pigs vaccinated with LPC-TS or HC-TD inactivated vaccine after challenge

表 一 以 LPC-TS 病毒或 HC-TD 病毒株不活化組織培養疫苗免疫豬，攻毒後之肉眼病變

Vaccine	No. of pigs with the lesions indicated				
	SI	KH	LH	IP	TA*
LPC-TS	3	4	3	3	2
HC-TD	4	5	2	3	2

* SI: Spleen infarction

KH: Kidney hemorrhage

LH: Lymph node peripheral hemorrhage

IP: Interstitial pneumonia

TA: Thymus atrophy

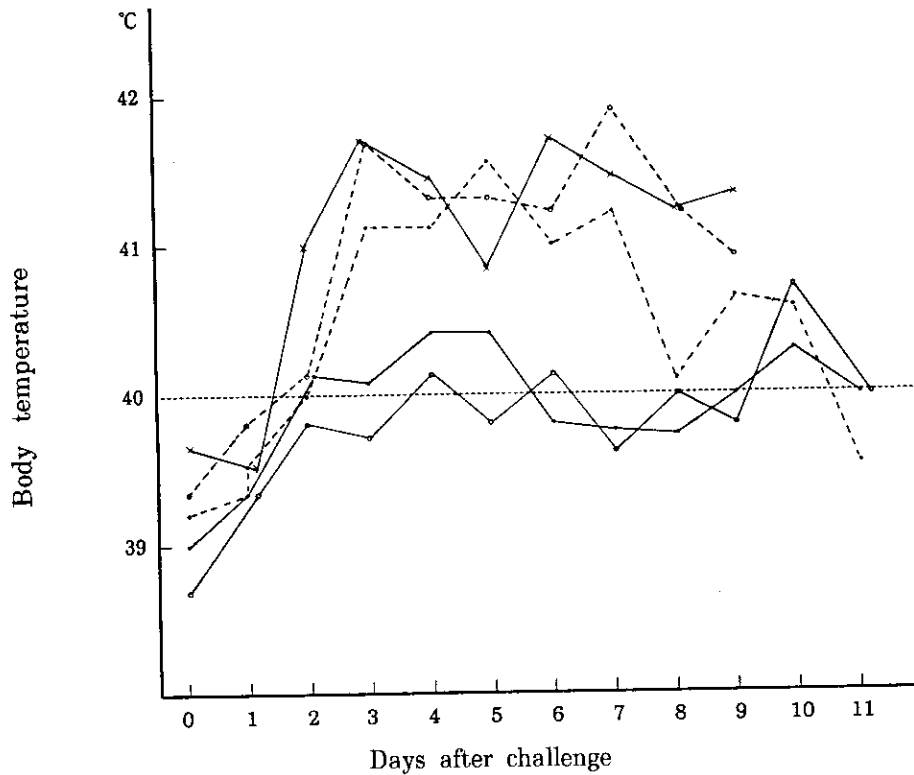


Fig. 1. Mean body temperature of the pigs vaccinated with live LPC-TS strain (·——·), live LPC-China strain (◦——◦), inactivated LPC-TS strain (- - - - -), inactivated HC-TD strain (◦-----◦) and the sentinels (x——x) after challenge.

圖1. 四種不同疫苗免疫豬隻於攻毒後之體溫變化情形

Table 2. Geometric mean serum neutralizing antibody response of the pigs vaccinated with live and inactivated hog cholera vaccines.

表二 豬瘟活毒及不活化疫苗免疫豬之幾何平均中和抗體反應

Vaccine	S N titer		
	0	4	6 (PVW)*
LPC-TS (L)**	0	363	512
LPC-China (L)	0	436	512
LPC-TS (I)	0	38	52
HC-TD (I)	0	0	0

*: PVW: weeks post-vaccination

** : L: live vaccine

I: inactivated vaccine

Table 3. Virus shedding and result of the vaccinated pogs after challenge

表三 疫苗免疫豬攻毒後之排毒情形與結果

Vaccine	Challenge result	Virus shedding
LPC-TS (L)*	5 / 5 **	0 / 5 ***
LPC-China (L)	5 / 5	0 / 5
LPC-TS (I)	2 / 5	3 / 5
HC-TD (I)	0 / 5	5 / 5
Control	0 / 2	2 / 2

* : L: live vaccine

I: inactivated vaccine

** : No. survived / No. challenged

*** : No. shedding / No. tested

討論

一般而言，豬瘟病毒在組織細胞中之增殖性並不佳，僅達 10^{6-7} TCID₅₀/ml⁽²¹⁾，LPC-TS 株及 HC-TD 株野外病毒在 PK-CL 細胞中之病毒力價雖達 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 左右，但欲以此病毒含量製造不活化疫苗，其力尚不足逮，再加上油質疫苗製造過程中，需與礦物油、乳化劑等混合，使病毒抗原濃度更予稀釋，影響疫苗效力。由試驗結果印證，豬瘟組織培養不活化疫苗的免疫效力，尚無法與活毒疫苗匹敵。但從 5 頭免疫 LPC-TS 株不活化疫苗豬隻中尚有 2 頭耐過攻毒的結果觀之，不活化疫苗還是可以引起一定的疫效力。在剖檢中又發現多數不活化油質疫苗免疫豬隻，在注射部位引起相當程度的肉芽腫及吸收不良的現象，而 2 頭耐過豬剖檢時發現吸收不良的情形較輕微，因此，油質疫苗的吸變程度對疫苗效力應有一定之影響。此或許是因為在試驗中使用的超音波乳化機性能欠佳，影響油劑疫苗之結構，直接影響疫苗的吸收，繼而影響疫苗的免疫效力。

Corthier⁽¹¹⁾ 曾以試驗證明在豬瘟疫苗免疫後未發現細胞免疫之存在，但有強烈之抗體反應。由此可見抗體之高低高低可反映豬隻之抵抗力。Terptra 及 Wensvoort⁽²²⁾ 稱 1:32 之中和抗體不足於抵抗強毒之感染，但若有 >1:12.5 之中和抗體即可耐過。本試驗發現免疫 LPC-TS 株不活化疫苗免疫二次後，五頭豬隻之中和抗體分佈為 1:22-1:190，差異極大，其中一頭雖有 1:90 之中和抗體，仍然無法耐過攻毒，而耐過之 2 頭豬隻之中和抗體則分別為 1:128 及 1:190。本試驗中不活化疫苗免疫攻毒斃死及耐過豬在解剖時又發現肺臟有疑似豬生殖呼吸症候群 (PRRS) 之病變，而該肺臟亦分離出疑似 PRRS 之病毒顆粒；此一發現或可解釋豬瘟免疫不盡理想，不幸又感染 PRRS 病毒，致使豬隻無法耐過攻毒。此推論與本省前 PRRS 發生之狀況頗為吻合。因此，若無 PRRS 病毒之侵入及干擾，不活化疫苗或可發揮更佳之免疫力。另一方面，從所有免疫 LPC-China 株免化疫苗及 LPC-TS 株疫苗豬隻均耐過攻毒，亦無病灶可見等結果分析，筆者等⁽⁶⁾ 開發之 LPC-TS 組織培養疫苗之免疫效力可與 LPC-China 株免化豬瘟疫苗等量齊觀。Caij et al.⁽¹⁰⁾ 發現微粒子組織培養可提高豬瘟病毒力價 10 倍，下年度計畫中將予測試。此外，以 Ultra-filtration 濃縮病毒，改善油劑疫苗之吸收，降低乳化劑之比例，間接提高病毒抗原之含量等都值得一試，藉以完成

預期目標。

參考文獻：

1. 李崇道、劉永和、林再春、葉明得。1950。結晶紫豬瘟疫苗製造試驗。台灣省畜牧獸醫學會會報。1: 1-8。
2. 林再春。1958。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。
3. 林再春、李崇道。1983。免化豬瘟疫苗種毒-LPC 株之開發研究綜合報告。國科會專案報告第五號。
4. 楊喜金、田淵清、清水悠紀臣。1983。家兔腎臟培養細胞馴化免化豬瘟毒之性狀研究。免化豬瘟毒之性狀研究。1. 免化豬瘟毒以豬腎株細胞之檢出及其在兔腎培養細胞之增殖。台灣省畜衛試研報。19: 79-99。
5. 劉培柏。1988。持續感染於兔睪丸培養細胞之 LPC 株免化豬瘟病毒之性狀及其組織培養疫苗之開發。國立台灣大學獸醫學研究所。博士論文。
6. 鍾明華、黃金城、詹益波、劉堂輝、紀長文、邱資峰、李振宗。1988。免化豬瘟組織培養疫苗之研製。省衛畜研報。24: 33-41。
7. Bass, E.P. and J.D. Ray. 1963. Evaluation of a tissue culture hog cholera vaccine. J. Am. Vet. Med. Ass. 142: 1112-1117.
8. Boynton, W.H. 1946. Preliminary report of the propagation of hog cholera virus in vitro. Vet. Med. 41: 346-347.
9. Caij, A., A.De. Smet, N.Dubois and F. Kaenen. 1989. High titre hog cholera virus production on cytodex 3 microcarrier cultures. Arch Virol. 105: 113-118.
10. Carbrey, E.A., W.C. Stewart, J.I. Kresse and L.R. Lee. 1965. Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique. Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass. 69: 487-500。
11. Corthier, G. 1978. Cellular and humoral immune response in pigs given vaccinal and chronic hog cholera viruses. Am. J. Vet. Res. 39: 19-1841-1844.
12. Dale, C.N. and J.R. Songer. 1957. In Vitro

- Propagation of hog cholera virus. I. Method of Cultivation and observation on color changes in the medium. *Am. J. Vet. Res.* 18 : 362-368 .
13. Dunne, H.W., A., J. Luedke, C.V. Reich and J.F. Hokanson. 1957. The in vitro growth of hog cholera virus in cells of peripheral blood. *Am. J. Vet. res.* 18 : 502-507.
 14. Lai, S.S., C.S. Chen, T. H. Hung, W.C. Ho and T.C. Lin. 1981. Multiplication of an attenuated hog cholera virus, LPC-China strain in various cell cultures. *Taiwan J. Vet. Med. and Anim. Husb.* 37 : 1-4.
 15. McBryde, C.N. and C.G. Cole. 1936. Crystall violet vaccine for the prevention of hog cholera : A progress report. *J.A.V.M.A.* 89 : 652-663.
 16. Mengeling, W.L. and L. Drake. 1969. Replication of hog cholera virus in cell culture. *Am. J. Vet. Res.* 30 : 1817-1822.
 17. Mengeling, W.L. 1968. A fluorescent micropaque assay for hog cholera virus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 23 : 27-29.
 18. Pan, I.C., T.S. Huang, and W.R. Hess. 1982. New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for sero-diagnosis of African swine fever. *J. Clinical micro.*, 16 : 650-655.
 19. Pirtle, E.C. and A.J. Kinazeff. 1968. Susceptibility of cultured mammalian cells to infection with virulent and modified hog cholera viruses. *Am. J. Vet. Res.* 29 : 1033-1040.
 20. Sato, U., Y. Nishimura, T. Hanaki and K. Nobuto. 1963. Attenuation of hog cholera virus by means of continuous cell virus propagation (CCVP) method. *Arch. ges Virusforsch.* 14 : 394-403.
 21. Terpstra, C., M. Bloemraad and A.L.J. Gieldens. 1984. The neutralizing peroxidase linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet Microbiol.* 9 : 113-120.
 22. Terpstra, C., G. Wensvoort. 1988. The protective value of vaccine induced neutralizing antibody titres in swine fever. *Vet. Microbiol.* 16 : 123-128.

Studies on the Immunoprotective Efficacy of Hog Cholera Inactivated Vaccine

*M.H. Jong, S.H. Lee, S.N. Wu, I.P. Chan and T.F. Chiou

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMZRY Twenty-two hog cholera antibody free secondary SPF pigs with 5-7 weeks of age were divided into 5 groups. Pigs of 1 and 2 were injected intramuscularly with one dose of the live vaccines of the cell culture-adapted LPC-TS strain and LPC-China strain, respectively. Pigs of groups 3 and 4 were injected with the inactivated oily vaccines of LPC-TS strain and HC-TD field strain twice at an interval of 4 weeks. Geometric mean neutralizing antibody titer at 4 weeks after vaccination of the pigs of groups 1, 2, and 3 were 1 : 363, 1 : 436, and 1 : 38, respectively. No antibody response was detected in the pigs of group 4.

After challenge with $10^{4.0}$ MLD of the virulent ALD virus, mild febrile reaction (<41 °C) and symptoms were found in all pigs which were vaccinated with 2 live vaccines (groups 1 and 2) and survived without shedding. Over 41 °C fever was found in the pigs vaccinated with 2 inactivated vaccines and all pigs vaccinated with the inactivated HC-TD strain and controls developed severe symptoms and died after challenge. However, 2 pigs which were vaccinated with the inactivated LPC-TS strain survived.

Gross lesions, such as spleen infarction, peripheral hemorrhage of lymph nodes and petechial hemorrhage of kidney were observed in the pigs vaccinated with the inactivated vaccines (excluded 1 pig vaccinated with the LPC-TS strain). However, nothing happened in the pigs vaccinated with the live vaccines. Results imply that promotion of the quality of inactivated vaccine is needed.

Keywords: *Hog cholera, Tissue culture, Inactivated vaccine.*