

LPC 組織培養及兔化豬瘟疫苗免疫效力比較 ^{>6-3}

鍾明華 詹益波 李振宗 邱資峰

台灣省家畜衛生試驗所

LPC - TS株凍結乾燥疫苗與本所產製之兔化豬瘟疫苗同時以 1 / 100 及 1 / 500 劑量注射 8 週齡小豬各 2 隻。攻毒後，對照小豬及注射兩種疫苗 1 / 500 劑量之 2 頭小豬中各有 1 頭發病死亡，亦皆有病毒血症及排毒；其他耐過小豬皆無此現象。結果顯示，兩者之免疫效力相若。

田間試驗，16 胎仔豬分為四組，每組 4 胎，以哺乳前、哺乳前及 6 週齡、3 及 6 週齡、6 週齡等四種免疫方式分別注射 LPC - China 株 LPC - TS 株疫苗。16 胎仔豬注射疫苗後，均無任何不良反應，且正常發育。7 週齡時，每胎各選購 2 頭，於 9 週齡時攻毒之。結果顯示所有免疫小豬均耐過，但有體溫上昇現象；對照小豬則發病死亡。

本省畜牧業以養豬為主，在本省豬隻的傳染病中，仍以豬瘟的威脅最大，所幸在 1952 年紐森博士及李崇道博士從菲律賓引進 ROVAC 株兔化豬瘟病毒，並經林再春博士繼續以家兔繼代馴化而獲得 LPC - China 後，本省之豬瘟始獲得良好的控制^(1,10,11)。由於兔化豬瘟疫苗係採取接種家兔之脾臟、淋巴腺為疫苗之製造材料，操作麻煩。再如種兔品系雜亂，個體差異大，使得品管不易。這些缺點可在實驗室中以組織培養方法得以控制。因此，本所多位研究學者^(2,3,4,8,9)曾對 LPC - China 株病毒在組織細胞內之性狀詳加研究，並試圖開發組織培養疫苗。筆者等⁽⁶⁾曾比較 LPC - China 株病毒在豬腎、豬睪丸初代細胞及多種豬源株化細胞中之增殖性狀，結果發現 LPC - China

株病毒在 PK - CL 豬源株化細胞中之增殖性最佳，因而開發組織培養細胞馴化之 LPC - TS 株（暫定名）成功。此 LPC - TS 株病毒對保有低移行抗體之小豬具有良好的保護效力，但在高移行抗體（1:32~1:214）之下，必須有 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 之病毒含量始能克服移行抗體之干擾⁽⁷⁾。

歐洲地區目前仍併用 LPC - China 株兔化豬瘟疫苗及組織培養化疫苗，但 LPC - TS 株與兔化豬瘟疫苗間之優劣點及兩者在田間應時對小豬之保護效力如何亦應闡明，以備選擇之參考。

材料與方法

病毒株及細胞：

LPC-TS 株：為本所LPC-China株以家兔繼代 812次之種毒，經PK-CL株化細胞馴化者。

ALD 株：係豬瘟強毒，由本所檢定分所供應，專供小豬保護效力測定攻擊之用。

PK-CL株化細胞：為豬腎由來之株化細胞，再經株選（Cloning）而得者。本細胞係以EMEM 培養液中加入6~8%山羊血清（BI，以色列）、100U/ml penicillin、100mcg/ml Streptomycin、15 mM HEP-ES，經7.5% NaHCO₃ 調節pH後之細胞培養液培養之。

LPC-TS 株之增殖：

PK-CL細胞在上述培養液培養2~3天後，即接種適量之LPC-TS 株病毒，在37°C 暖房中吸著2~3小時後，即加入為2%山羊血清之維持液培養之，四天後即予收穫，凍結保存於-80°C冰櫃內備用。

病毒力價測定：

1. FA染色法：依前試驗⁽⁵⁾實施之。

2. Immunoperoxidase monolayer assay (IPMA)：病毒液以EMEM 細胞培養液10進稀釋列，將稀釋病毒滴入96孔微滴盤內（50 μ l/well），再滴入等量含 4.0×10^5 cell/ml之PK-CL細胞浮游液，然後再補入等量之細胞培養液。置於37°C，5% CO₂ 暖箱內培養四天，然後將培養液甩乾，以0.15M 生理食鹽水浸洗二次，甩乾後以4% Paraformaldehyde 固定5分鐘，甩乾後再以0.15M生理食鹽水浸洗二次，甩乾後加入 $\times 100$ 稀釋之豬瘟高度免疫血清（50 μ l/well），在37°C暖房內作用60分鐘，甩乾後加入 $\times 500$ 稀釋之 Rabbit anti-swine IgG HRPO 標示抗體，在37°C暖房內作用60分鐘，甩乾後加入AEC 受質，在顯微鏡下判讀之。

中和抗體測定：

依 Terpstra et al 法⁽¹⁵⁾ 實施之。即將待測血清以50°C，30分鐘非熱化後，以2進法在96孔微滴盤內稀釋之，再加入等量（50 μ l/well）含200 TCID₅₀之LPC-TS 株病毒，在37°C，5% CO₂ 暖箱內感作90分鐘，再加

入等量含 4.0×10^5 cell/ml之PK-CL細胞浮游液，經37°C，5% CO₂ 暖箱內培養4天，然後取出，依IPMA 法浸洗、固定，加入 Rabbit anti-swine IgG HRPO 標本抗體、AEC受質等刊讀之。

LPC 兔化豬瘟疫苗及LPC-TS 疫苗對小豬之免疫效力比較：

10隻（P241-P250）購置台糖之8週齡小豬分為5組，每組2隻。第2、3組（P243~P246）分別肌肉注射本所產製第2330批兔化豬瘟疫苗 $1/500$ 及 $1/100$ 劑量；第4、5組（P247~P250）則分別注射LPC-TS株疫苗 $1/500$ 及 $1/100$ 劑量；第1組（P241~P242）為未免疫對照。疫苗注射後10天，以 10^4 LD₅₀之ALD 強毒肌肉注射攻擊。攻毒後每天測量體溫，且分別在攻毒後0、2、3、4、8、11天採取口腔液及血液，測定是否有排毒及病毒血症。疫苗注射前、攻毒前及攻毒後14天採血測定抗體。

田間試驗：

試驗豬場：雲林縣斗六市一飼養管理十分完善之養豬場實施。該豬場之母豬每次空胎時均注射兔化豬瘟疫苗一次。

試驗設計：16胎小豬分為4組，每組4胎，分別在哺乳前、哺乳前及6週齡、3週齡及6週齡、6週齡注射本所產製2333批兔化豬瘟或LPC-TS 株疫苗一次，每種疫苗各注射2胎。每胎小豬在7週齡時各選購2頭送所，另向台糖公司選購同齡未注射疫苗小豬2頭做為對照，在9週齡時以 $10^{4.0}$ LD₅₀之ALD強毒攻擊。攻毒後每天測量體溫，觀察臨床症狀，並於攻擊前、後每發現體溫超過40°C者，即予採取口腔液及血液，測定排毒及病毒血症。所有試驗小豬在攻毒前及攻毒後14天採血，測定抗體。

結 果

1. LPC 兔化豬瘟疫苗與LPC-TS 株疫苗效力比較：

本所產製之LPC兔化豬瘟疫苗與LPC-TS 株疫苗各以 $1/100$ 及 $1/500$ 劑量肌肉注射小豬後，未發現不良反應。注射後10天，

以ALD 強毒攻擊結果，注射LPC 兔化豬瘟 $1/500$ 劑量疫苗之2頭小豬中有1頭 (P 243)，在攻毒後3天 (PCD3)體溫上昇，且於11天 (PCD11)發病死亡，其他3頭均無異狀耐過；注射LPC-TS 株 $1/500$ 劑量疫苗之2頭小豬中亦有1頭 (P248)，在攻毒後2天體溫上昇，且在10天後發病死亡，其他3頭亦無異狀耐過。2頭對照小豬均於攻毒後2~4天體溫上昇至 41°C 以上，亦均於攻毒後9天斃死 (圖1)。

攻毒後斃死之小豬，在攻毒後2天 (PCD2)起有排毒及病毒血症，其作耐過小

豬則皆未發現。不過，在注射LPC 兔化豬瘟 $1/500$ 劑量小豬 (P 244) 及注射LPC-TS 株疫苗 $1/100$ 劑量小豬 (P 249)則分別在PCD11及PCD8 從口腔液中檢出病毒 (表1)。

試驗小豬在疫苗免疫前 (PVD0) 的移行抗體高低不等 ($1:2 \sim 1:45$)，攻毒前 (PCD0)，亦即免疫後10天，之抗體價不僅未見上昇，且均略有下降。攻毒後11天則見大幅昇高，但注射 $1/100$ 劑量LPC-TS 株疫苗及豬 (group 5) 之中和抗體則較低，僅為 $1:22$ (表2)。

Table 1. Viremia and virus shedding of pigs vaccinated with LPC-China and LPC-TS strains after challenge.

Pig No.	Vaccine (dosage)	Viremia / virus shedding					Challenge result	
		0	2	3	4	8	11*	
P 241	ND	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	ND	D
P 242	ND	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	ND	D
P 243	LPC-C (1/500)	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	D
P 244	"	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	S
P 245	LPC-C (1/100)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P 246	"	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P 247	LPC-TS (1/500)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P 248	"	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	ND	D
P 249	LPC-TS (1/100)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	S
P 250	"	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S

* : Days after challenge.

ND : Not done.

D : Died.

S : Survived.

Table 2. Immune response of pigs after vaccination with LPC-China and LPC-TS strains and after challenge with a virulent strain

Group	Vaccine (dosage)	SN titer (GM)		
		PVD0	PCD0	PCD11
1	ND	4	3	ND
2	LPC-C (1/500)	7	2	180
3	LPC-C (1/100)	16	18	45
4	LPC-TS(1/500)	8	4	180
5	LPC-TS(1/100)	6	3	22

GM: Geometric mean
 ND: Not done

2. LPC- China 株與LPC- TS株疫苗在田間對不同週齡小豬免疫效力比較：

16 胎小豬分為四組，每組 4 胎，以哺乳前、哺乳前及 6 週齡、3 週及 6 週齡、6 週齡等四種免疫方式分別注射本所產製 LPC- China 株兔化豬瘟疫苗及 LPC- TS 株疫苗。16 胎小豬注射疫苗後，均無任何不良反應，且正常發育。7 週齡時每胎各選購 2 頭進所，於 9 週齡時以 ALD 強毒攻擊之。

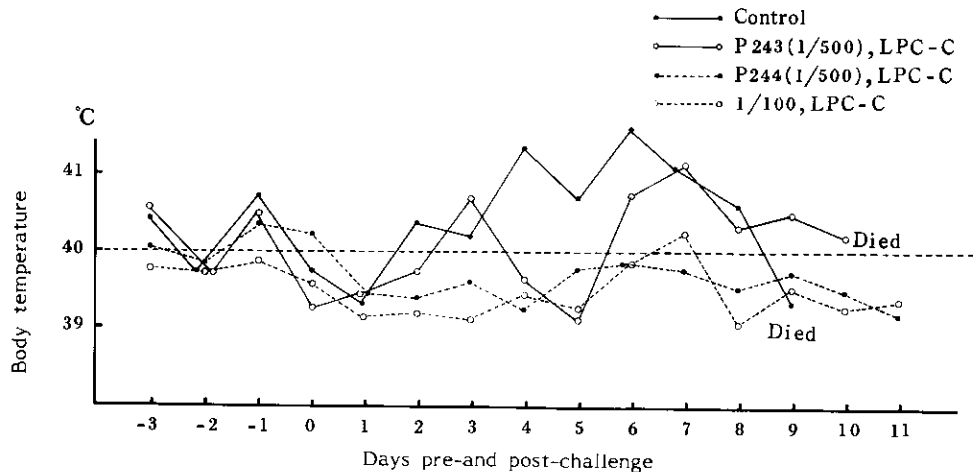
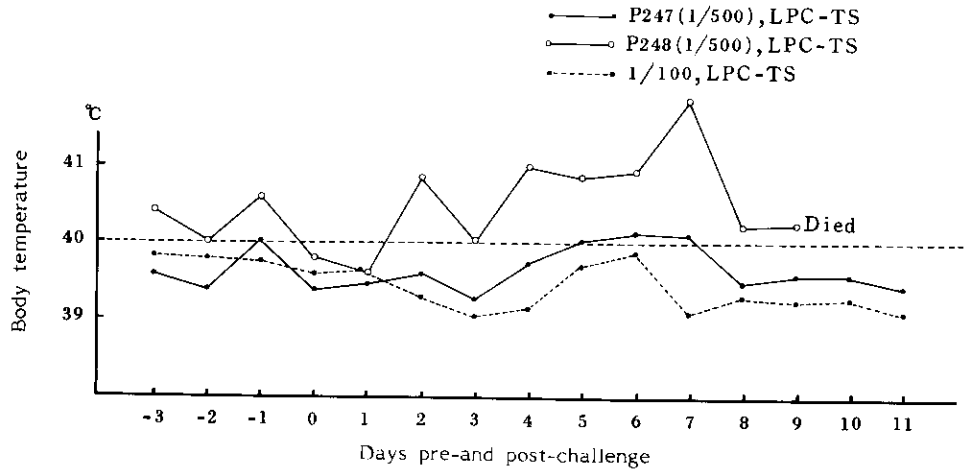


Fig 1. Febrile reaction of the pigs vaccinated with LPC-TS (top) and LPC-China strains (bottom) pre- and post-challenge.

由圖 2 可知，攻毒前，幾乎所有試驗小豬之體溫均超過 40°C 攻毒時，小豬移入攻毒豬舍後，體溫多恢復正常。攻毒後，哺乳前注射 1 劑量免化豬瘟疫苗之小豬，在攻毒後 3 天體溫上昇 (40.7°C)，維持 3 天後恢復正常；3 週齡及 6 週齡時各注射 1 劑量者，在攻毒後 1 天體溫即上昇 (40.6°C)，4 天後恢復正常；其餘各組均正常。對照小豬則在攻毒後 2 天體溫上昇至 41°C 以上高溫，且持續至斃死。注射 LPC-TS 株疫苗之小豬，在攻毒後體溫均有上昇現象，但多在 6 天

後恢復正常 (圖 2, bottom)，所有的疫苗注射小豬，在攻毒後均耐過；2 頭對照小豬則在 11 天斃死。

二種疫苗注射小豬在攻毒前 (PCD0) 之中和抗體價，同一免疫方式之抗體反應均很相似，但以哺乳前及 6 週齡時各注射 1 劑量者最好，3 週齡及 6 週齡時各注射一次者次之，而以 6 週齡時注射一次者最低。攻毒後 11 天 (PCD11) 各組小豬之抗體最超過 1 : 256 (如表 3)。

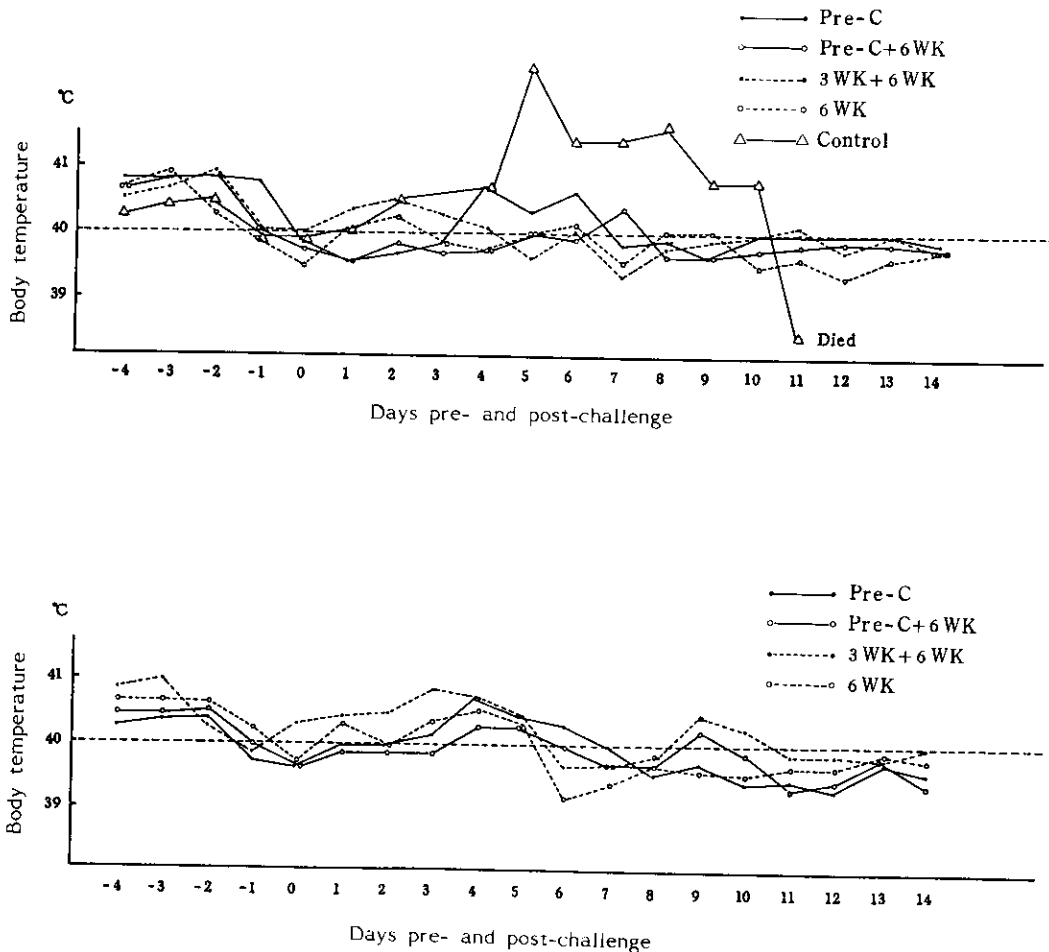


Fig 2. Mean body temperature of the pigs vaccinated by different programs with LPC-China (top) and LPC-TS (bottom) strains pre- and post-Challenge.

Table 3. Immune response of the pigs vaccinated with LPC-China and LPC-TS strains by different programs

Vaccine strain	Program	SN titer (GM)	
		PCD 0	PCD 11
LPC - C	Pre-colos	117	> 256
	Pre-colos+6 WK	> 256	> 256
	3 WK+6 WK	179	> 256
	6 WK	83	> 256
LPC - TS	Pre-colos	197	> 256
	Pre-colos+6 WK	> 256	> 256
	3 WK+6 WK	> 256	> 256
	6 WK	64	> 256

討 論

在保護效力比較試驗中，各以 $1/100$ 與 $1/500$ 劑量注射小豬，攻毒結果發現凡有病毒血症及排毒小豬必定發病死亡，亦必有超過 41°C 之高體溫；凡耐過者皆無此等現象，與前試驗⁽⁷⁾ 所得相同。注射 $1/500$ LPC-China 株兔化疫苗及注射 $1/100$ 劑量 LPC-TS 株病毒之 2 頭小豬中各有 1 頭 (P244 及 P249) 分別在攻毒後 11 及 8 天從口腔中檢出病毒，但由體溫觀之，2 者至無發燒現象，因此判斷係從同居發病小豬 (P243 及 P248) 所排毒中檢拾者，前試驗⁽⁷⁾ 也有類似情形。本所客座專家潘英章博士⁽⁶⁾ 建議，在攻毒時不必將強毒每頭注射，而僅攻毒對照小豬，然後與其他試驗小豬同居，使與自然感染情況相符。本試驗中除了每頭均予攻毒外，尚有發病小豬同居，形成內外夾攻，對試驗成績當有負面影響。因此，疫苗注射小豬若未予攻毒，而僅與攻毒對照小豬同居時，試驗成績或可更為突出。

在不同週齡小豬免疫力比較試驗中，所有注射 LPC-TS 株疫苗小豬均未發生任何不良反應，且正常發育。由此顯示，LPC-TS 株病毒對幼齡小豬極為安全。部份小豬購回攻毒時，因值盛夏，室內外氣溫甚高，影響所致，所有試驗豬隻在攻毒前之體溫均超過 40°C ，攻

毒時大部份豬隻之體溫雖已降至 40°C 以下，但攻毒後，多數豬隻之體溫均曾超過 40°C 。持續的高氣溫是否為因素之一？實大有疑慮。復因試驗豬血液或口腔液病毒檢出測定數次，均因細胞脫離，使試驗失敗而無法予以辨明。又從攻毒結果，兩種疫苗注射之四組小豬均耐過觀之，無論何者免疫方式皆可保護小豬。

參 考 文 獻

1. 林再春、謝竹茂、蘇杰夫、陳清。1972。豬瘟活毒疫苗種毒之病原性復歸試驗。省畜衛試研報 9：1~5。
2. 楊喜金、田淵清、清水悠紀臣。1983。家兔腎臟培養細胞馴化兔化豬瘟毒 (RK-LPC) 之性狀研究。1. 兔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。省畜衛試研報 19：79~99。
3. 楊喜金、田淵清、清水悠紀臣。1983。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。
4. 劉培柏、傅祖慧。1987。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驗工作報告。625~630。
5. 潘英章：私人建議。
6. 鍾明華、黃金城、詹益波、劉堂輝、紀

- 長文、邱資峰、李振宗。1988。兔化豬瘟組織培養疫苗之研製。省衛畜研報24：33～41。
7. 鍾明華、詹益波、紀長文、黃金城、邱資峰、李振宗、洪文凱。1989。兔化豬瘟組織培養病毒對小豬之免疫保護效力。省衛畜研報 25：49～58。
 8. 蘇杰夫、林再春。1971。應用橋樑細胞（豬睪丸）將兔化豬瘟馴化於兔腎細胞之研究。省畜衛試驗報 8：11～17。
 9. Lai, S.S., chen, C.S., Huang, T.H. Ho, W.C. and Lin, T.C., 1981. Multiplication of an attenuated hog cholera virus, LPC-China strain various cell cultures. Taiwan J. Vet. Husb., 37:1-5.
 10. Lee, R.C.T. 1954. Lapinized hog cholera vaccine in Taiwan Scientific Agri. (Taiwan). 2: 4-14.
 11. Lee. R.C.T. 1954. A preliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan, Chinese-American JCRR, Anim. indus. Series No. 5.
 12. Terpstra, C., Bloemraed, M. and Gielrens, A.L.J., 1984. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. Vet. Microbiol. 9: 113-120.

Comparison of Immunopotency of LPC Tissue Culture Vaccine and LPC Hog Cholera Vaccine.

M.H. Jong, I.P. Chan, J.T. Lee, T.F. Chiou.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

SUMMARY

Pigs with 8 weeks of age were immunized with 1/100 and 1/500 dosage of LPC-china and LPC-TS strain virus. The sentinels and one of the two pigs vaccinated with 1/500 dosage of both vaccines were killed with signs of illness, viremia and shedding after challenge exposure. The remainders survived without showing signs.

In field trial, 16 litters of suckling piglets were designed into 4 groups. 4 litters in each group. They were vaccinated once or twice at precolostrum, precolostrum and 6 weeks old, 3 and 6 weeks old, and 6 weeks old with viruses of LPC-China and LPC-TS strains. All vaccinated piglets grew up normally and no adverse reaction was observed. Two pigs from each litter were randomly bought back at 7 weeks of age and challenged at 9 weeks old. Results showed that all vaccinated pigs survived with fibrile reaction. Nevertheless, the sentinels developed severe signs and were killed.