

25-17

兔化豬瘟組織培養病毒對小猪之 免疫保護效力

鍾明華 詹益波 紀長文 黃金城
邱資峰 李振宗 洪文凱

台灣省家畜衛生試驗所

當保有低移行抗體 ($< 1:2 \sim 1:32$) 小猪免疫注射 $2 \sim 1,000$ TCID₅₀ 的 LPC-China 株細胞培養病毒後 10 天，以強毒攻擊結果，所有對照小猪及二頭注射 2 TCID₅₀ 病毒中之一頭均發高燒、發病死亡，其餘均正常耐過。三頭死亡小猪皆有病毒血症及排毒現象，但所有耐過小猪則未發現。

保有高移行抗體 ($1:150 \sim 1:256$) 小猪免疫注射 $10 \sim 5,000$ TCID₅₀ 病毒後，受到移行抗體之干擾，在攻毒後，二頭對照小猪中之一頭的體溫上昇至 42°C 以上，且有病毒血症及排毒現象，在攻毒後 13 天死亡。其餘小猪均有發燒現象，但均在 40.6°C 以下而耐過，亦無病毒血症及排毒。

另有高移行抗體 ($1:150 \sim 1:214$) 小猪，分別免疫注射 $10 \sim 10,000$ TCID₅₀ 病毒，免疫抗體反應結果顯示，僅有注射 $10,000$ TCID₅₀ 病毒者能克服移行抗體之干擾，在注射一個月後始見抗體明顯的上昇。

本省畜牧業以養豬為主，而本省豬隻的傳染病中，又以豬瘟的威脅最大，本省爲了豬瘟的防疫，曾試用過多種不活化^(3, 20)及活毒疫苗⁽¹⁾，但均因其免疫效力或製造上的問題而未發揮防疫效果，一直到 LPC-China 株兔化豬瘟疫苗開發成功並推廣使用後，本省之豬瘟疫情始獲得良好的控制^(2, 15, 16)。由於兔化豬瘟疫苗係採取接種家兔之脾臟、淋巴腺作爲疫苗之製造材料，操作麻煩，不易達到無菌目標。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^(4, 6, 8, 11, 14)。筆者等曾比較 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，以此細胞所增殖之病毒對小猪之免疫保護效力十分良好⁽¹⁰⁾。然而，本病毒對保有低、高移行抗體之小猪的有效劑量如何？又本病毒經過組織細胞後具病原性是否會迴歸等問題一併在此報告中探討。

試驗材料與方法

病毒株：

1. LPC-China 株：為本所豬瘟疫苗製造用種毒，培養於 PK-CL 細胞者。
2. GPE⁻ 株：由台大獸醫系賴秀穗教授贈讓。以仔豬睪丸初代細胞 (ST-1) 增殖兩次後分裝供用，其病毒力價為 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml。
3. WEE 株：亦由台大獸醫系賴秀穗教授贈讓。以 ST-1 細胞增殖兩次後分裝供用。病毒力價為 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml。
4. A-76 株：由本所豬瘟系分讓。以 ST-1 細胞增殖一次後分裝供用。病毒力價以 END 法測定結果為 $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml。
5. NDV-Miyadera 株：由本所生物系分讓。以 SPF 雞胚胎增殖一次，其 HA titer = 1:640/ml。
6. PRV-TNL 株：係由本所分離之豬假性狂犬病毒 (PRV)。

組織細胞：

1. ST-1：為初代仔豬睪丸細胞，係以無菌操作摘取仔豬睪丸，經 0.25% 胰蛋白酶消化後，離心收集後，以 EMEM 培養基中加入 6~8% 山羊血清 (BI, 以色列)，100 U/ml penicillin、100 mcg/ml streptomycin、15 mM HEPES，經調節 pH 後培養之；或立即以 10% DMSO 保存於液態氮，使用前取出解凍，再以上述培養液培養之。

2. PK-CL 為豬腎株化細胞，以前述培養液培養之。

LPC-China 株病毒之株選 (cloning)：

將 LPC-PK-CL₇ 病毒以極限稀釋法稀釋之，然後接種於 24 孔培養盤中之 PK-CL 單層細胞上，經 37°C，2 小時吸著後，以 EMEM 培養基充分清洗，然後加入含 2% 山羊血清之 EMEM 維持液。在 37°C CO₂ (3%) 暖箱中培養 4 天，然後將培養盤凍結、解凍一次，每孔培養液以吸管充分混合後，以 E⁻ 二段干涉法測定病毒之有無，選取最高稀釋而病毒陽性者，再重複株選一次。

E⁻ 二段干涉法：依前試驗實施之⁽¹⁰⁾。

螢光標示抗體 (FA) 製備及病毒力價測定：

SPF 小豬先以本所兔化豬瘟疫苗免疫後，再以 ALD 強毒腹腔攻擊三次，放血後其血清以硫酸銨沈澱三次純化後，將免疫球蛋白與 FITC 螢光色素標示之，經 Sephadex 及 DEAE-Cellulose 管柱純化去除未標示抗體後製成螢光標示抗體。

病毒力價測定時，則將 10 進稀釋病毒液與 PK-CL 細胞浮游液同時加入 96 孔微滴盤內，在 37°C、3% CO₂ 暖箱中培養 4 天。然後將培養液抽棄，以 PBS 清洗一次後，以 4% Paraformaldehyde 固定 5 分鐘，以 PBS 清洗後，以 FA 染色 1 小時，再以 PBS 清洗後，以倒立螢光顯微鏡判讀。

LPC-China 株細胞培養病毒病原性迴歸試驗：

依林等⁽⁴⁾方法將 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 之 LPC-PK-CL 培養病毒肌肉注射於 5 週齡 SPF 小豬一頭，注射後 5 天撲殺之，取其脾臟及扁桃腺做成乳劑，然後再注射第二頭 SPF 小豬。從注射當天起至撲殺止，每天測量體溫，採取口腔棉拭及血液，測定排毒及病毒血症。

LPC-China 株組織細胞培養病毒對保有低、高移行抗體小豬最低有效劑量測定：

14 頭 8 週齡購自台糖之低移行抗體 (< 1:2~1:32) 小豬 (P191~P204)，分為七組，每組二隻：第一組為未免疫對照；第二組至第七組分別肌肉注射 2、10、50、100、500、1,000 TCID₅₀ 之 LPC-PK-CL₁₄ 病毒。

另有 14 頭 6 週齡購自民間保有高移行抗體 (1:150~1:256) 小豬 (P221~P234)，亦分為七組，每組二隻：第一組為未免疫對照；第二組至第七組分別肌肉注射 10、50、250、500、2,500、5,000 TCID₅₀ 之 LPC-PK-CL₁₄ 病毒。

病毒注射後 10 天，以 $10^{4.0}$ MLD₅₀ 之 ALD 強毒攻擊之，攻擊後每天測量體溫、觀察臨床症狀，並於攻擊前及攻擊後 2、4、6、9、12 天採取口腔棉拭及血液，測定排毒及病毒血症。所有試驗小豬在病毒注射前及攻毒前、攻毒後 14 天採血以 END 法測定中和抗體。

END中和抗體測定：

依前試驗方法實施之⁽¹⁰⁾。

高移行抗體小豬免疫注射LPC-China株組織培養病毒後之抗體消長：

爲了解高移行抗體小豬免疫注射LPC-China株組織培養病毒後之抗體消長，將9頭6週齡保有高移行抗體(1:150~1:214)小豬分爲五組：第一組1頭爲未免疫對照，其他四組各2頭，分別注射 $10^{1.0}$ ， $10^{2.0}$ ， $10^{3.0}$ 及 $10^{4.0}$ TCID₅₀之病毒。注射前及注射後每週採血、分離血清，以END法測定其中和抗體消長。

結 果

LPC-China株細胞培養毒對低移行抗體小豬之免疫保護效力：

14隻8週齡保有低移行抗體小豬平均分爲七組：第一組爲未免疫對照；後六組分別注射不同病毒量後未發現臨床症狀。注射後10天以

強毒攻擊結果，2頭未免疫對照小豬在攻毒後3天(PCD3)，體溫開始上升至41°C以上，併發嚴重症狀，7天後(PCD7)即斃死；二頭接種2TCID₅₀病毒之小豬亦有發燒現象，其中一頭(P194)上升至41.9°C，亦於10天後斃死，另外一頭則耐過；其他各組均正常耐過(圖1)。三頭斃死小豬亦同時在攻毒後3天(體溫上昇時)檢出病毒血症，一直到7天。同樣地，在攻毒後3天從對照小豬口腔中檢出排毒，一直到7天；接種2TCID₅₀而於攻毒後斃死之小豬(P194)則僅在攻毒後5天檢出排毒；不過，在攻毒後7天亦分別從免疫注射10及50TCID₅₀之小豬(P196, P197)中之一頭檢出排毒(表1)。

試驗小豬之幾何平均中和抗體反應，由表2可知，大多數小豬之抗體在免疫注射時(PVD0)介於<1:2~1:32，攻毒前(PCD0)大多略有下降，而於攻毒後(PCD14)才急速上昇(表2)。

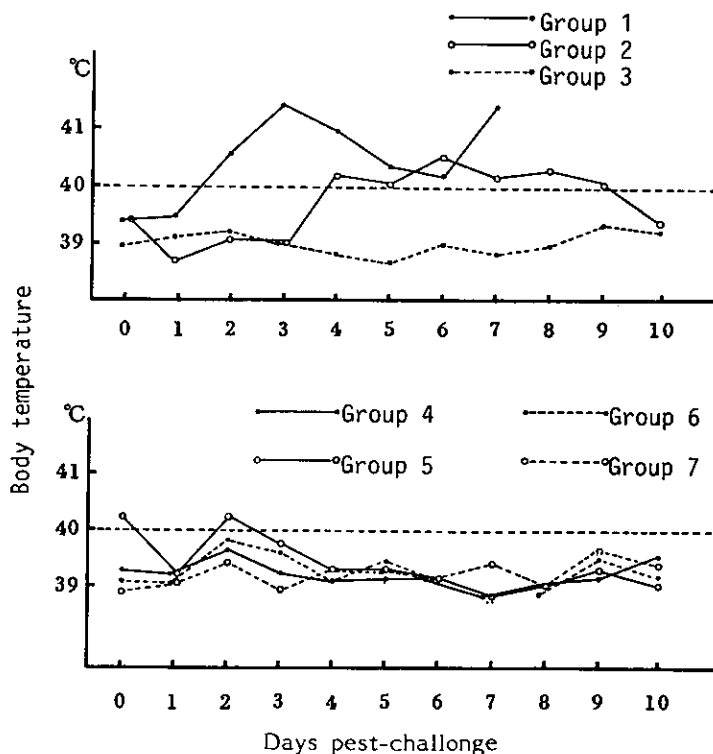


Fig. 1. Mean body temperature of the vaccinated pigs with low maternal antibody after challenge.

Table 1. Virus recovery from serum samples and oral swabs of vaccinated pigs with low maternal antibody after challenge.

Pig No.	Vaccine dosage (TCID ₅₀)	Viremia / virus shedding						Challenge result
		0	1	3	5	7	10	
P191	ND	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	ND/ND	D
P192	ND	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	ND/ND	D
P193	2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P194	2	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	ND/ND	D
P195	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P196	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	S
P197	50	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	S
P198	50	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P199	100	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P200	100	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P201	500	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P202	500	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P203	1000	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P204	1000	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S

ND: Not done.
D : Died.
S : Survived.

Table 2. Immune response of pigs with low maternal antibody after vaccination and challenge.

Group	Vaccine dosage (TCID ₅₀)	SN titer (GM)		
		PVD 0	PCD 0	PCD 14
1	ND	3	2	ND
2	2	11	8	128
3	10	8	7	180
4	50	22	9	100
5	100	2	2	76
6	500	4	2	150
7	1000	23	16	64

GM: Geometric mean.

ND: Not done.

LPC-China 株細胞培養毒對高移行抗體小豬之免疫保護效力：

14 頭 6 週齡購自民間養豬場保有高移行抗體平均分爲七組：第一組爲未免疫對照；後六組分別注射不同病毒量後亦未發現臨床症狀。注射後 10 天以強毒攻擊結果，除了第一組未免疫小豬之體溫上升至 41°C 以上，其中一頭於 13 天斃死外，其他各組小豬均耐過，但均有輕微發燒現象 (40.6°C 以下) (圖 2)。而病毒血症及排毒檢查結果，僅於未免疫對照斃死小豬

(P221) 發現病毒血症及排毒 (表 3)。

各組小豬之幾何平均中和抗體反應，由表 4 可知，在注射低劑量病毒 ($\leq 500 \text{ TCID}_{50}$) 時，移行抗體未受影響；但注射高劑量病毒後 ($\geq 2,500 \text{ TCID}_{50}$) 後，移行抗體則有明顯的下降。攻毒時 (PCD0) 受抗體的干擾下，攻毒後之抗體上昇之幅度並不如低移抗體者明顯 (如第 6、7 組)，部份部有下降之勢 (表 4)。

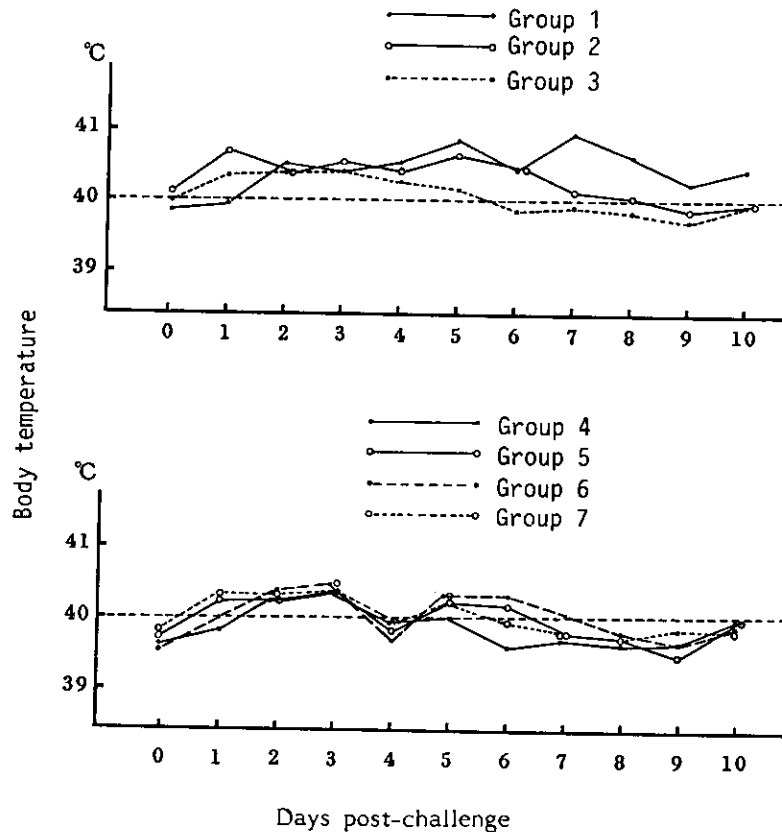


Fig 2. Mean body temperature of the vaccinated pigs with high maternal antibody after challenge.

Table 3. Virus recovery from serum samples and oral swabs of vaccinated pigs with high maternal antibody after challenge.

Pig No.	Vaccine dosage(TCID ₅₀)	Viremia / virus shedding						Challenge result
		0	2	4	6	9	12	
P221	ND	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	ND/ND	D
P222	ND	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P223	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P224	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P225	50	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P226	50	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P227	250	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P228	250	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P229	500	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P230	500	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P231	2500	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P232	2500	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P233	5000	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S
P234	5000	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	S

ND: Not done.

D: Died.

S: Survived.

Table 4. Immune response of pigs with high maternal antibody after vaccination and challenge.

Group	Vaccine dosage (TCID ₅₀)	SN titer (GM)		
		PVD 0	PCD 0	PCD 14
1	ND	150	150	180
2	10	213	181	150
3	50	150	150	128
4	250	256	256	126
5	500	181	213	126
6	2500	181	64	150
7	5000	180	45	90

GM: Geometric mean.

ND: Not done.

高移行抗體小豬免疫注射 LPC - China 株組織培養病毒後之抗體消長：

高移行抗體 (1:150 ~ 1:214) 小豬分別免疫注射 $10^{1.0}$, $10^{2.0}$, $10^{3.0}$ 及 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 之 LPC - China 株組織培養病毒後，小豬之抗體皆逐漸下降。而且，注射劑量越

大，下降幅度越大。前三組小豬之抗體在第 5 週降至谷底，然後才逐漸上昇，但極為緩慢，尤其是注射 $10^{1.0}$ 病毒者似乎欲振乏力；注射 $10^{4.0}$ 病毒小豬之抗體在第 4 週降至最低，然後即明顯上昇；而對照小豬之抗體則江河日下 (圖 3)。

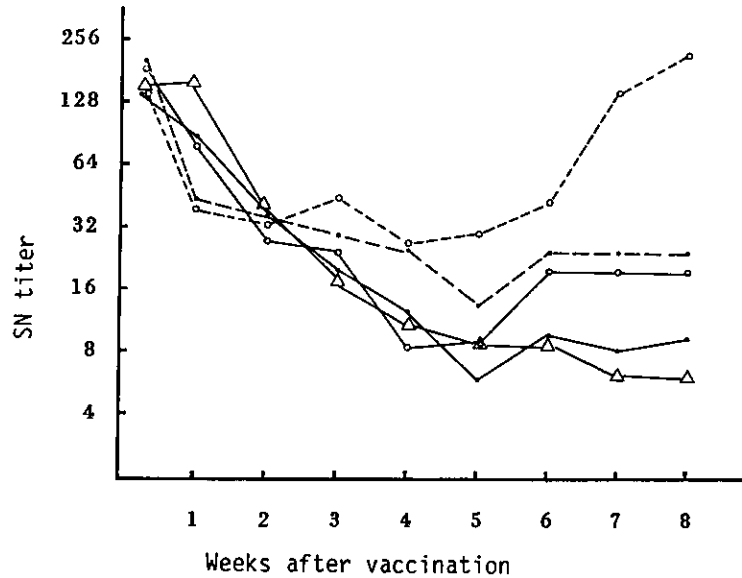


Fig 3. Development of neutralizing antibody (geometric mean titers) of pigs after vaccination with PK-CL cell adapted LPC-China strain virus.

—○— $10^{1.0}$; ○—○— $10^{2.0}$;
 - - -○- - - $10^{3.0}$; ○- - -○- - - $10^{4.0}$;
 △—△ controls.

討 論

當保有低移行抗體小豬中未免疫注射對照小豬攻毒後，在第 3 天起即有排毒血症，亦皆發病斃死；免疫注射 2 TCID₅₀ 病毒小豬中有一頭排毒及病毒血症，也發病斃死。因此，病毒血症及排毒之有無，尤其是前者，應為是否能耐過攻毒之指標。但免疫注射 10 及 TCID₅₀ 病毒小豬中，各有一於第 7 天從口腔中檢出排毒，但無病毒血症，由於其等皆與對照小豬共飼於一欄內。因此，所檢出之病毒應為對照小豬所排出而為其檢獲者。保有高移行抗體而未免疫對照小豬中之一頭，於攻毒後亦有排毒及

病毒血症，結果亦發病斃死，由此亦可再次印證病毒血症及排毒為可否耐過攻毒之指標，另外一頭對照小豬則由於移行抗體之干擾及保護而未斃死；其他各組小豬亦皆耐過，但是否為免疫注射病毒所發揮之干擾作用？抑或高移行抗體之保護所致？因免疫注射與攻毒間隔僅為 10 天而難以評估。不過，從表 4 免疫前 (PVD 0) 與攻毒前 (PCD 0) 之中和抗體價顯示，免疫劑量越高，抗體下降也越大；圖 3 中免疫前與免疫後一週之抗體消長曲線亦可見類似效應。

豬瘟仍然是本省豬隻最大的威脅，養豬農戶十分重視，加上本省產製之豬瘟疫苗售價低

廉，致使母豬免疫頻度過高，結果可能造成仔豬之高移行抗體，直接干擾疫苗之效力^(6,7,12,13,18,19)，間接影響豬瘟的控制。

Terpstra 等發現免疫母豬所產仔豬，在 8~9 週前尚有 50% 無法對疫苗產生免疫反應⁽²¹⁾；並稱 < 32 之抗體力價（以 NPLA 方法測定者）不足以抵抗強毒攻擊，必須有 ≥ 50 之抗體力價方能免於發病排毒⁽²²⁾。爲了克服高移行抗體之障礙，唯有提高單位疫苗內之病毒量。1964 年 Coggins 即認爲需以高於正常量 100 倍之疫苗方可使保有移行抗體小豬耐過攻毒⁽¹²⁾，或從掌握移行抗體的消長，而適時予以免疫，或採用哺乳前免疫。日前，哺乳前免疫方式仍有爭議^(9,17)，執行上較爲困難；豬群個體間，甚至同窩小豬間皆有抗體差異，因此，以移行抗體消長而適時免疫之策略時有漏洞，且不易掌握；於今之計，提高單位疫苗內之病毒含量較易採行。圖 3 顯示可能只有注射 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 之病毒能克服高移行抗體，但亦需時一個月方能見到抗體之上昇。

誌 謝

本研究承蒙行政院農委會 78 農建 - 7.1 - 牧 - 61 (1~2) 計畫經費補助，並承蒙家畜衛生科林再春科長及劉永和技正與本所邱仕炎所長之指導與鼓勵始得以完成，謹誌萬分謝忱。

參 考 文 獻

1. 王銘堪、劉燃炎、葉明得、劉義雄、李新進、陳世珍。1966。乾燥組織培養豬瘟疫苗製造試驗。台灣省家畜衛生試驗所研究報告 3: 53~63。
2. 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。
3. 李崇道、劉永和、林再春、葉明德。1951。結晶紫豬瘟疫苗製造之研究。台灣省家畜衛生試驗所研究報告 1: 17~25。
4. 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。

5. 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. 馴化毒之病毒性及免疫性。省畜衛試研報 19: 101~122。
6. 楊喜金、賴俊雄、張天桂、劉燃炎、吳義興、詹益波。1971。豬瘟中和抗體之研究，第二報，母豬初乳對豬瘟免疫抗體產生之研究。台灣省畜衛試研報 8: 25~34。
7. 楊喜金、賴俊雄、張天桂、劉燃炎、吳義興、詹益波、劉義雄、陳守仕。1972。豬瘟中和抗體之研究。第三報仔豬豬瘟預防注射適當時期之預測。台灣省畜衛試研報 9: 21~41。
8. 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。
9. 劉培柏、蔡向榮、費昌勇、邱仕炎。1987。哺乳前及哺乳後初生仔豬之豬瘟免疫。省畜衛試研報 23: 109~119。
10. 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。省畜衛試研報 24: 33~41。
11. 蘇杰夫、林再春。1971。應用橋樑細胞 (豬睪丸) 將兔化豬瘟毒馴化於兔腎細胞之研究。省畜衛試研報 8: 11~17。
12. Coggins, L. 1964. Studies of hog cholera colostral antibody and its effect on active hog cholera immunization. Am. J. Vet. Res., 25, 613-617.
13. Corthies, G., 1976. Swine fever: Influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). Ann Rech. Veter. 7(4): 361-372.
14. 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 in various cell cultures. *Taiwan J. Vet. Husb.*, 37: 1-5.
15. Lee, R.C.T. 1954. Lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. *Scientific Agri. (Taiwan)*. 2: 4-14.
16. Lee, R.C.T. 1954. A preliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. *Chinese-American JCRR, Anim. indus. Series No. 5*.
17. Lee, Robert C.T., Wang, J.T., Lai S.S., Wu F.M. and Lin, Tracy T.C. 1980. Studies on precolostral vaccination against hog cholera using an attenuated virus LPC-China strain. 6th IPVS Congress Proceedings. 133.
18. Lin, T.T.C. and Lee, R.C.T., 1979. 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.
19. Sanders, E.F. Brueckner, A.H. Newberne, J.W., and Mitchell, F.E. 1961, Serum interference with modified live hog cholera vaccines. *Vet. Med.*, 56: 261-266.
20. Terakado, Y., 1949. Experiments on the hog cholera formalized vaccine. *Exp. Rep. Gov. Expl. Sta Anim. Hyg.*, 20: 111-156.
21. Terpstra, C. and Wensvoort, G., 1987. Influence of the vaccination regime on the herd immune response for swine fever. *Vet. Microbiol.* 13: 143-151.
22. Terpstra, C. and Wensvoort, G., 1988. The protection value of vaccine-induced neutralising antibody titers in swine fever. *Vet. Microbiol.* 16: 123-128.

Immunoprotection Induced by Tissue Culture-adapted LPC Strain of Hog Cholera Virus.

M.H. Jong, I.P. Chan, C.W. Chi, C.C. Huang, T.F. Chiou,
J.T. Lee and W.K. Hung

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Pigs with low maternal antibody (1:2-1:32) vaccinated with 2-1,000 TCID₅₀ tissue culture LPC-China strain virus were challenged 10 days after vaccination. Results showed that all control pigs and one of the pigs received 2 TCID₅₀ virus developed high fever and were killed. The rest of the pigs survived without signs after challenge. Moreover, viremia and shedding could only be detected in those 3 victims.

Pigs with high maternal antibody (1:150-1:256) vaccinated with 10-5,000 TCID₅₀ tissue culture LPC-China strain virus were also challenged 10 days after vaccination. Results revealed that only one of the control pigs was killed with high fever, viremia and shedding. However, mild febrile reactions below 40.6°C were noticed in the rest of pigs.

On the other hand, immune responses of the pigs with high maternal antibody (1:150-1:214) after giving with 10-10,000 TCID₅₀ tissue culture LPC-China strain virus were monitored. Results implied that dosage of 10,000 TCID₅₀ was needed to overwhelm high maternal antibody barrier, and antibody response could only then be elicited one month later.