

74-10

猪假性狂犬病疫苗檢驗之研究

蘇杰夫 黃文徹 陳忠松

台灣省家畜衛生試驗所

以猪假性狂犬病不活化疫苗接種於小白鼠、天竺鼠、家兔及猪隻後，發現在家兔中具有較優良的防禦力價者，在小白鼠及天竺鼠的防禦指數也較高。而此中則以天竺鼠接種較高疫苗劑量的二次免疫組最具有取代家兔為模式的檢定方式。猪隻抗體的產生則仍偏低，顯示疫苗生產者仍須改進。

本省自 1971 年首次在屏東發現猪假性狂犬病的病例後，本病即逐漸蔓延至全台各地，造成嚴重母猪流死產及仔猪之死亡^(2,7,9)。目前吾國僅准許不活化疫苗之使用，但現有近十種成品疫苗，其添加之佐劑約有二類，即含糊精 (Dextrane) 及不含糊精，不同處方的疫苗接種在猪隻後，抗體產生效力高低略有不一^(4,10)，有些甚至在接種後數週仍無抗體之產生，但却能耐過強毒的攻擊。由於假性狂犬病 PrV 疫苗大都以母猪為接種對象，因此抗體不易產生或抗體力價太低者，仔畜如欲藉由母畜乳汁而獲得移行抗體之被動免疫效果上，並非十分適合的疫苗。如果某一疫苗能兼具抗體易產生且能耐強毒攻擊力價高者，自是較合適的疫苗。於吾國現行國家檢定標準中，僅能篩選耐強毒攻擊力價高的疫苗，而美國國家檢定標準則僅能篩選抗體產生高的疫苗⁽¹⁾，因此該二種檢驗方法皆有檢討之必要。本試驗即希望能尋求一較適當的模式，以避免那些抗體產生較差之疫苗的高合格率，同時為配合攻毒毒力的公正性，避免現行 100 LD₅₀ 攻毒毒力調配時有太強或太弱的顧慮⁽⁸⁾，應尋求以防禦指數作為判定

標準之可行性。

材料與方法

1. 攻毒用病毒株：

係由本所於民國 68 年在罹患假性狂犬病小豬腦組織中分離之 PrV-TNL 株，以 RK-13 株化細胞繼代，-76℃ 凍結保存。

2. 疫苗：

市售之猪假性狂犬病不活化疫苗二種廠牌之不同批號疫苗，一為含糊精佐劑，另者不含糊精，簡名為 A₁, A₂ (A 廠二批疫苗) 及 B₁, B₂ (B 廠之二批疫苗)。

3. 供試動物：

- (1) 小白鼠：15~17 公克重之健康小白鼠。
- (2) 天竺鼠：250~300 公克重之白色健康者。
- (3) 家兔：2~2.5 公斤重之白毛紅眼健康者。
- (4) 猪隻：15~18 公斤無假性狂犬病抗體之健康者。

4. 小白鼠、天竺鼠及家兔致死劑量的測定 (LD₅₀)：

將假性狂犬病 PrV-TNL 株病毒，依十進法自 10⁻² 稀釋到 10⁻⁷，然後分別接種於此三

種供試動物之肌肉、皮下、腹腔、腦內等部位，接種量小白鼠為 0.03 ml 或 0.2 ml，家兔和天竺鼠則各為 1 ml。接種後觀察 14 天，記錄其致死力。

5. 假性狂犬病不活化疫苗之免疫及效力測定：

- (1) 小白鼠之免疫及效力測定：將 A₁、B₁ 二種供試疫苗分別接種於小白鼠之後腿肌肉（IM, 0.2 ml / 隻），其中一半之小白鼠於第一次接種後七天，再以同劑量，IM 法補強注射。于第一次接種後 14 天，所有小白鼠分別以假性狂犬病強毒 PrV-TNL 株依不同之稀釋倍（即 10⁻¹~10⁻⁹），以腦內注射攻擊（0.03 ml / 隻），無疫苗免疫之對照鼠亦攻毒。攻擊後觀察 14 天，記錄其致死劑量，並計算其防禦指數（對照組 LD₅₀ 減免疫組 LD₅₀）。
- (2) 天竺鼠之免疫及效力測定：將 A₂、B₂ 二種疫苗各分為 0.5 ml 及 0.2 ml 二種劑量組，分別接種在天竺鼠之後腿肌肉內。每一組（0.5 ml / 隻或 0.2 ml / 隻）再各取一半之鼠於第一次接種後七天，再以原劑量（0.5 ml / 隻或 0.2 ml / 隻）IM 法補強注射。于第一次接種後 14 天，所有供試天竺鼠分別依不同稀釋倍數之假性狂犬病 PrV-TNL 株強毒肌肉注射攻擊（1 ml / 隻），無疫苗免疫之對照鼠亦攻擊。攻擊後觀察 14 天，記錄其致死劑量，並計算其防禦指數。
- (3) 家兔之免疫及防禦劑量測定：選取健康之家兔，分別於不同時間接種 A₁ 及 B₁ 和 A₂ 及 B₂ 疫苗，每一種疫苗分別給予 1、1/2 及 1/3 劑量，15 天後，同一隻家兔，再給予第一次

免疫時之相同劑量作補強注射，補強後 15 天，再以假性狂犬病 PrV-TNL 株攻擊（100 LD₅₀ / 家兔），觀察 14 天，並計算其防禦劑量（依 Read and Muench 法）。

(4) 豬隻之免疫及抗體之測定：

- ① 選健康 15~18 公斤重而無假性狂犬病抗體之豬隻，分二次，每次 6 頭，除 2 頭為陰性對照外，另 4 頭分別接種 A₁ 及 B₁ 二種疫苗（另一次接種 A₂ 及 B₂ 疫苗）。
- ② 中和抗體測定：利用 RK₁₃ 株化細胞及假性狂犬病 RK₁₃ 株化細胞繼代毒，依鍾氏等方法⁽⁴⁾ 予以測定。即受檢血清經 56°C，30 分鐘非動化后，依二倍稀釋法由 2⁻¹ 稀釋至 2⁻⁶，然後各稀釋階再加入藥量之 100 TCID₅₀ 之假性狂犬病 RK₁₃ 株化細胞繼代毒，經 37°C，1 小時之感作後，再將各階之血清病毒中和液接種至 RK₁₃ 株化細胞。

結 果

1. 小白鼠、天竺鼠及家兔 LD₅₀ 之測定：

以不同接種途徑及不同注射量（0.03 ml 至 1 ml 等），接種於前述之實驗動物，於 14 天之觀察期間內發病斃死者依 Reed and Muench 法計算 LD₅₀ 值。如表 1 中所示，仍以家兔之腦內接種者，得較高之 LD₅₀ 值為 10^{7.5}。天竺鼠者則以肌肉路徑注射者較高，為 10^{6.0}。小白鼠腦內接種者之注射量為最低，然其 LD₅₀ 值亦達 10^{4.1} LD₅₀ / 0.03 ml 較肌肉、皮下、腹腔等路徑注射者為高（0.2 ml）。

表 1 假性狂犬病-TNL 株強毒對實驗動物致死力之比較

接 種 途 徑	家 兔	天 竺 鼠	小 白 鼠
肌 肉	10 ^{7.0} LD ₅₀ /ml	10 ^{6.0} LD ₅₀ /ml	10 ^{2.75} LD ₅₀ /0.2 ml
皮 下	10 ^{6.5} "	10 ^{5.5} "	10 ^{2.0} "
腹 腔	10 ^{6.0} "	10 ^{5.0} "	10 ^{2.0} "
腦 內	10 ^{7.5}	—	10 ^{4.1} LD ₅₀ /0.03 ml

註：— 未測定

2. 假性狂犬病疫苗對小白鼠之免疫及其防禦力之測定：

將小白鼠分成一次及二次免疫組，各組分別接種A₁或B₁疫苗，免疫後14天攻擊，依其感染死亡後計算各組的LD₅₀值，其結果如表2所示，接種A₁疫苗一次，其LD₅₀值和對

照者並無差異。二次免疫者，LD₅₀由4.5降為4.3亦無顯著差異。但接種B₁疫苗者，尤以二次免疫組，其LD₅₀由4.5降為2.1，顯示防禦力甚強。也即B₂疫苗對小白鼠之防禦力較A₁疫苗為佳。

表2 假性狂犬病疫苗免疫小白鼠之防禦力

免 疫 別	A ₁ 疫 苗	B ₁ 疫 苗
一 次 免 疫	10 ^{4.5} LD ₅₀ / 0.03 ml	10 ^{3.9} LD ₅₀ / 0.03 ml
二 次 免 疫	10 ^{4.3} "	10 ^{2.1} "
對 照	10 ^{4.5} "	10 ^{4.5} "

註：免疫接種IM，0.2 ml / 次

3. 假性狂犬病疫苗對天竺鼠之免疫及其防禦力之測定：

將天竺鼠各依一次或二次免疫接種A₂及B₂疫苗，14天後攻擊結果如表3所示，B₂疫苗對天竺鼠之防禦力，不論是較高或較低劑量，一次或二次免疫，都比A₂疫苗之防禦力

強。尤以B₂疫苗之0.5 ml劑量之二次免疫有顯著的效果，其LD₅₀由10^{6.0}降至10^{4.8}，差距甚為鉅大；而A₂疫苗之同一條件下僅由10^{6.0}降至10^{4.5}。又劑量較小者（0.2 ml組）對A₂或B₂疫苗二次免疫效果並不比一次免疫效果來得好。

表3 假性狂犬病疫苗免疫天竺鼠之防禦力

疫苗及接種量別	A ₂		B ₂	
	0.5 ml / 隻	0.2 ml / 隻	0.5 ml / 隻	0.2 ml / 隻
一 次 免 疫	10 ^{5.5} LD ₅₀ / ml	10 ^{5.5} LD ₅₀ / ml	10 ^{3.0} LD ₅₀ / ml	10 ^{3.5} LD ₅₀ / ml
二 次 免 疫	10 ^{4.5} "	10 ^{5.5} "	10 ^{4.8} "	10 ^{3.5} "
對 照	10 ^{6.0} LD ₅₀ / ml			

4. 猪隻之免疫反應：

無假性狂犬病抗體之猪接種A₁及B₁二種疫苗（另一次接種A₂及B₂疫苗）各一次後，於不同期間測定其假性狂犬病中和抗體之力價，其結果如表4所示，A或B廠疫苗的抗體力價都甚低，勉予平均加以比較則B廠為1.5

倍，A廠為2.75倍，遠低於美國檢定標準的8倍。

5. 強毒攻擊後之防禦力和猪隻抗體產生之相關比較：

如表4所示，A₁，A₂，B₁，B₂在家兔之防禦劑量皆小於1/3劑量（3⁻¹劑量），符合

現行我國檢定標準，但若以小白鼠或天竺鼠為模式分析其防禦力價，則 A_1 以小白鼠方式測定僅達 $10^{0.2}$ ，幾近於 0，然 B_1 則效果良好，可達 $10^{2.4}$ 。以天竺鼠方式測定則 A_2 效果

尚可達到 $10^{1.5}$ ，但 B_2 則極高達到 $10^{4.2}$ 。豬中和抗體產生，則僅於第 4 週始有低倍抗體產生。

表 4 假性狂犬病不活化疫苗接種於不同動物之效力反應比較

疫 苗	* 小白鼠之防禦力價	* 天竺鼠之防禦力價	家 兔 之 防 禦 劑 量	豬隻中和抗體倍數		
				免疫前	免疫後 2 週	免疫後 4 週
A_1	$10^{0.2}LD_{50}/0.03ml$	—	3^{-1}	0	0	3.5
B_1	$10^{2.4}LD_{50}/0.03ml$	—	3^{-2}	0	0	0
A_2	—	$10^{1.5}LD_{50}/ml$	$3^{-1.2}$	0	0	2
B_2	—	$10^{4.2}LD_{50}/ml$	$3^{-1.7}$	0	0	3.0

* 二次免疫組之防禦力價 = 對照組 - 免疫組

— 未測定

註 對照豬抗體為 0

討 論

豬假性狂犬病不活化疫苗於測定防禦指數時，須用大量的動物，就經濟而言小白鼠應是最佳的選擇⁽²⁾，但以本項試驗得知，小白鼠 LD_{50} 值之測定，須以腦內接種才能達到 $10^{4.1}LD_{50}/0.03ml$ ，理想性欠佳，雖然增加接種量可提升 LD_{50} 值，但腦內接種途徑之實際操作上有困難，因為腦腔內所能接種之注射量有限。就表 2 在免疫小白鼠經攻擊結果，顯示免疫組 (A_1) 和對照之 LD_{50} 值差距未見拉大，因此藉小白鼠供為本劑效力檢定上無意義。然以天竺鼠測試防禦指數時，不但天竺鼠之 LD_{50} 值適合 (表 1)，且經強毒株攻擊結果 (表 3)，顯示 A_2 及 B_2 二種疫苗確可分出其優劣，同時較差者之免疫鼠與對照組仍有極明顯差距 ($10^{6.0}$ 和 $10^{4.5}$ 之別)，且此效應和現行檢驗標準之以兔子來測試結果甚相致 (表 4)，因之以天竺鼠為本劑之效力檢定是值得重新評估之對象，惟其缺點是檢定用量大時，天竺鼠之體型遠大於小白鼠十倍以上，將為採

用上之顧慮。

豬隻感染活毒假性狂犬病試驗疫苗時抗體產生在 4 週時可達 $\times 16 \sim \times 32^{(6)}$ ，而於不活化次單位疫苗經濃縮病毒液時，於第四週可達 $\times 4 \sim \times 8^{(5)}$ 。而在本試驗表 4，則在 $\times 3.5$ 以下， B_1 組甚至未能測出抗體產生。美國之檢驗標準是依使用方法時，5 頭試驗豬 4 頭應產生 $\times 8$ 以上抗體⁽¹⁾。

因此，為能提升高力價抗體的疫苗，應設法研究改進開發新的假性狂犬病疫苗。

誌 謝

本試驗得到本研究室同仁彭衍初、謝榮宗、杜慶鍾先生之協助，謹致謝忱。

參 考 文 獻

1. Code of Federal Regulations. Animal and Animal products, The National Archives of the United States. No. 9 1986 P.431-432.

2. Hsu, F. S., W.B. Chung and F.Y. Liu. 1981. Pseudorabies I. Pathogenesis of abortion in pregnant sows infected with pseudorabies virus. Anim. Ind. Res. Inst. Taiwan Sugar Corporation Annu. Res. Rept. 1981:151-156.
3. Intervet, Around 1982. Nobi-Vac. Aujeszky. Potency in Mice.
4. Jong, M.H., Lai, S.S., Lin, Y.P. 1978. Efficacy Studies of the Inactivated Pseudorabies Virus Vaccine in Swine. Tai. Pro. Res. Inst. for Ani. Hlth. No. 15., 63-67.
5. Jong, M.H., Liu, T.H., Chan, I.P. 1985 Development of the Subunit Vaccine against Pseudorabies. Tai. Pro. Res. Inst. for Ani. Hlth. No. 21, 17-22.
6. Jong, M.H., Liu, T.H., Chan, I.P., Chiu, T.F., and Tseng, C.W. 1985 Development of Live Pseudorabies Virus Vaccine I. Attenuation of the Wild Strain and Its Characterization. Tai. Pro. Res. Inst. for Ani. Hlth. No. 21, 23-27.
7. Kluge, J.P. and C.J. Mare. 1974. Swine pseudorabies: abortion, clinical disease and lesions in pregnant gilts infected with pseudorabies virus (Aujeszky's disease). Am. J. Vet. Res. 35:911-915.
8. Lin, K.F. 1977. Studies on the production of Pseudorabies Vaccine for Swine. The Virulence and Immunity of the Isolates of N3 Strain after 120 Subpassages in Bovine Hlth. No. 14, 87-91. Bovine kidney cell culture. Tai. Pro. Res. Inst. for Ani. Hlth. No. 14, 87-91.
9. Tung, M.C., S.C. Lin, H.S. Kwang and G.N. Chang. 1980. Outbreaks of Abortions and Stillbirths of Pregnant Sows with Pseudorabies Virus Infection. J. Chinese Soc. Vet. Sci. 6:123-132.
10. Wittmann, G., J. Jakubik and R. Abl. 1980. Multiplication and Distribution of Aujeszky's disease Pseudorabies Virus in vaccinated and Non-Vaccinated Pigs after intranasal infection. Archives of Virology. 66(3) 227-240.

The Assay Improvement of Pseudorabies Inactivated Vaccine

Su. J.F, Huang. W.C. Chen. C.S.

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Pseudorabies (Pr.) inactivated vaccines were assayed with mice, guinea pigs, rabbits and pigs. The results showed that vaccine having higher protective titer in rabbits could also have good protective titer in mice or guinea pigs. The model of guinea pigs vaccinated twice with higher dose group was regarded as the best one to replace rabbit model.

The antibody response in swine for Pr. vaccines was not good enough, it meant that vaccine quality should be improved.