

346

## 兔化豬瘟組織培養疫苗之研製

鍾明華 黃金城 詹益波 劉堂輝  
紀長文 邱資峰 李振宗

### 台灣省家畜衛生試驗所

8週齡豬隻以肌肉內或鼻腔內免疫兔化豬瘟疫苗10天後，以強毒攻擊結果，所有鼻腔內免疫豬均發病斃死，而肌肉內免疫豬則皆耐過，顯示兔化豬瘟病毒在低溫環境下之增殖能力不高。

LPC-China株病毒累代通過豬腎(SK)及睪丸(ST)之初代與ESK、PK-CL及ST-CL等數種株化細胞，結果發現LPC-China株在PK-CL株化細胞中之增殖力最佳，病毒力價可達 $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml，其家兔熱反應達 $10^{7.5}$  RID<sub>50</sub>/ml以上；但ESK、ST-CL株化細胞及SK、ST初代細胞之敏感性稍差。病毒在37°C之增殖性較32°C為佳。

LPC-China株病毒在PK-CL株化細胞馴化6代後，以1/100，1/1,000及1/5,000劑量肌肉注射8週齡低抗體(<1:4)豬，10天後再予攻毒之，結果，未免疫對照豬全數死亡，而所有免疫豬隻均耐過，但大部份豬隻體溫均曾超過41°C。

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，本省為了豬瘟的防疫，從日據時期至民國38年間即使用Terakado福馬林(formalin)不活化疫苗<sup>(26)</sup>，該疫苗之安全性雖佳，惟其免疫效力未臻理想，未能有效控制豬瘟。民國39年起改用結晶紫不活化疫苗<sup>(27)</sup>，此疫苗之免疫持續期間短，致使本省之豬瘟仍無法獲得良好的控制<sup>(28)</sup>。

有鑑於不活化疫苗免疫效力之缺憾，民國41年紐森博士及李崇道博士乃從菲律賓引進ROVAC株兔化豬瘟病毒，並繼續以家兔繼代

滅毒而獲得LPC-China株<sup>(20,21,22)</sup>，經田間試驗獲致良好的成果後，本省即從民國48年起全面使用冷凍乾燥疫苗，本省豬瘟發生率即從民國54年起降為0.02%。

兔化豬瘟疫苗，除了本省使用外，亦廣為歐洲及亞洲各國所採用，然其製法均採取接種家兔之脾臟及淋巴腺作為疫苗製造之材料。以家兔製造，其脾臟、淋巴腺量少、操作麻煩、又不易達到無菌狀態，再加上種兔品系雜亂、個體差異大、使得品管不易。由於科技進步，組織培養技術之建立，使得以家兔為製造來源的缺點，易於實驗室中以組織細胞培養方法得

到控制，本省乃於民國 54 年引進 LOA、LOM 株豬瘟組織疫苗製造試用<sup>(2)</sup>，後因製造材料上的困難而停止。民國 57 年又再度由日本引進 GPE<sup>-</sup> 株豬瘟組織培養疫苗，經田間試驗後認為其免疫效力較 LPC-China 株遜色，而未予推廣<sup>(3)</sup>。本所劉培柏曾將 LPC-China 株病毒持續感染於兔睪丸細胞內而開發 LPC-RT 株病毒<sup>(10)</sup>。本所楊喜金亦曾將 LPC-China 株馴化於兔腎細胞而成為 RK-LPC 株，並對其性狀詳加探究<sup>(8)</sup>。Lai et al 對 LPC-China 株病毒在各種細胞培養之增殖性亦曾予研究比較<sup>(19)</sup>。

一般而論，豬瘟主要係藉直接接觸而傳染，再經消化道或呼吸道侵入體內<sup>(15, 16)</sup>。而豬隻注射 LPC 後，病毒在扁桃腺出現的時間最早，量也最高<sup>(6)</sup>，與假性狂犬病類似，故推測 LPC 病毒或許在體溫較低處較易增殖，De Leeuw 即證實假性狂犬病活毒疫苗經鼻腔接種較肌肉內注射所獲的免疫效力為優<sup>(14)</sup>。

GPE<sup>-</sup> 病毒在 33°C 之增殖性比 37°C 為佳<sup>(24)</sup>。LPC-China 病毒是否亦復如此？本報告乃從另一方向，從兔源細胞以外尋找可供 LPC-China 株病毒增殖的最佳細胞；比較 37°C 及 32°C 之下，病毒增殖差異；再比較鼻腔內及肌肉內免疫 LPC-China 兔化豬瘟疫苗之免疫效力。另外，再以小豬對 LPC-China 株組織細胞馴化病毒的安全性及免疫效力作初步探討。

## 材料與方法

病毒株：

1. LPC-China 株：為本所使用於疫苗製造用第 812 代種毒。

2. GPE<sup>-</sup> 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  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> /ml in ST-1。

3. WEE 株：亦由台大獸醫系賴秀穗教授慨贈。以 ST-1 細胞增殖兩次後分裝供用。病毒力價為  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub> /ml in ST-1。

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 (IHA NDV-Miyadera) 測定結果為  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub> /ml。

5. NDV-Miyadera 株：由本所生物系分讓。以雞胚胎增殖一次，其尿囊液 HA titer = 1 : 640 /ml。

6. ALD 株：係豬瘟強毒，由本所檢定系供應。供疫苗效力檢定攻擊之用。

組織細胞：

供 LPC-China 株病毒增殖用細胞有兩大類：第一為初代細胞，包括初代仔豬睪丸細胞 (ST-1)，及初代仔豬腎臟細胞 (SK-1)；第二為株化細胞，包括豬睪丸株化細胞 (ST-CL)、豬腎株化細胞 (PK-CL) 及豬胎兒腎株化細胞 (ESK)。

所有細胞均以 EMEM 培養基中加入 6-8 % 山羊血清 (GIBCO)，100 U/ml penicillin，100 mcg/ml streptomycin 調節 pH 後之生長培養液培養之。病毒接種後，將山羊血清含量降低為 2 % 供作維持液。

實驗動物：

1. 家兔：由民間養兔場購入，體重約為 2 公斤之健康家兔。

2. 小豬：購自台糖公司專供本所豬瘟疫苗檢定用，未經豬瘟疫苗免疫注射之 8 週齡豬。LPC-China 株組織培養細胞之馴化：

當各種細胞單層在 50-70 % 發育時 (25 cm<sup>2</sup> flask)，以 EMEM 培養基清洗兩次，取 0.3 ml LPC-China 株病毒接種之，在 37°C 暖房內吸著 60-90 分鐘，再以 EMEM 液清洗四次，最後注入 5 ml 含 2 % 山羊血清維持液。分置於 37°C 及 32°C 暖房內，4 天後取出，置於 -80°C 冰櫃凍結，經一次急速解凍後，以超音波擊碎器處理 20 秒，供作下一代接種之種毒。

GPE<sup>-</sup> 病毒增殖及干涉力價測定：

依 Lai et al 法<sup>(19)</sup>，以 ST-1 細胞增殖之，再依 Shimizu 等法<sup>(25)</sup> 稍加修改，先於 96 洞微滴盤內培養 ST-1 細胞，2 天後，抽棄其培養液，再將 10 進稀釋病毒液滴入盤內，50 μl / well。四天後將培養液抽棄之，再加入 150 μl / well 含 500 TCID<sub>50</sub> 之 WEE 病毒液，72 小時後判讀之。

LPC-China 株病毒細胞馴化之定量：

1. E<sup>-</sup> 二段干涉法：依林及賴法<sup>(5)</sup> 實施。先於 96 洞微滴盤內培養 ST-1 細胞，2 天後抽棄其培養液，再將 10 進稀釋病毒液（以 8% 山羊血清生長液行之）滴入盤內，100 $\mu$ l / well。然後再補以生長液，50 $\mu$ l / well。五天後抽棄其培養液，再加入 500 TCID<sub>50</sub> / 150 $\mu$ l / well 之 GPE<sup>-</sup> 病毒液（以 2% 山羊血清維持液製配）。3 天後再抽棄其培養液，加入 500 TCID<sub>50</sub> / 150 $\mu$ l / well 之 WEE 病毒液（以 2% 山羊血清維持液製配）。3 天後判讀之。

2. 家兔熱反應：以 EMEM 液將病毒作 10 進稀釋列。每階段由耳靜脈接種 2 頭，每頭 1 ml。另有四頭，分別注射病毒稀釋用 MEM 及細胞培養液，每頭 1 ml，做為 MEM 及細胞對照。然後每天上、下各測量體溫一次，為期八天。

LPC-China 株鼻腔內 (IN) 與肌肉內 (IM) 免疫效力比較：

20 頭 8 週齡豬，分為五組，每組四頭。第一、二組各以肌肉內注射本所產製之 LPC-China 疫苗 1 / 100 劑量 2 ml；第三、四組則各以鼻腔內接種 1 / 50 劑量 1 ml；第五組為對照組，分別以 IM 或 IN 接種病毒稀釋液 (EMEM) 2 或 1 ml。10 天後，依檢定標準，分別以 IM 或 IN 方式將 10<sup>4</sup> MILD<sub>50</sub> 之 ALD 強毒攻擊之。每天觀察、記錄豬隻之體溫變化及臨床反應。14 天後判定之。

LPC-China 株細胞馴化毒對豬隻安全性及免疫效力試驗：

1. 安全性試驗：2 頭 8 週齡豬，各肌肉注射 10 劑量 (1 ml / dose) 原毒，每日測量體溫、觀察臨床反應。

2. 免疫效力試驗：8 頭週齡豬隻，均分為四組，第一、二、三組分別肌肉注射 1 / 100，1 / 1,000 及 1 / 5,000 劑量病毒 1 ml，第四組注射病毒稀釋用 EMEM 液作為對照組。10 天後每頭各肌肉內注射 10<sup>4</sup> MLD<sub>50</sub> 之 ALD 強毒，每日測量體溫，觀察臨床反應。END 中和抗體測定：

依 Lai et al<sup>(12)</sup> 及楊等<sup>(9)</sup> 法稍予改變，即先在 96 孔微滴盤內培養 ST-1 細胞。2 天後，抽棄其培養液。另外，將豬血清先在微試管內行 2 倍稀釋，再加入等量 (0.2 ml) 含 400 TCID<sub>50</sub> 之 A76 病毒液，充分混合後經 37 $^{\circ}$ C，60 分鐘感作，然後再將病毒-血清混合物移注於微滴盤上之 ST-1 細胞內，100 $\mu$ l / well。然後再補以培養液，50 $\mu$ l / well。4 天後，再把培養液抽掉，再加 NDV-Miyadera，0.1 HA / well。3 天後判讀之。

結 果

LPC-China 株病毒在各種細胞的增殖：

當 ST-1，SK-1 等初代細胞與 ST-CL，PK-CL、ESK 等株化細胞接種 LPC-China 株病毒後，再以連續繼代方式予以馴化。LPC-China 株病毒在各種細胞的表現差異

Table 1. Virus titers of LPC-China strain multiplied at 37 $^{\circ}$ C in different cells at different passages.

Cell culture	Virus titer at different passage indicated							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Primary ST	4.0*	≤ 3.8	≤ 3.8	≤ 3.8	≤ 3.8	ND	ND	ND**
Primary SK	3.6	≤ 2.8	≤ 2.8	≤ 2.8	ND	ND	ND	ND
ESK	5.8	4.3	≤ 3.8	≤ 3.8	≤ 3.8	≤ 3.8	4.0	ND
ST-CL	5.0	4.6	4.8	5.3	5.3	4.3	4.3	ND
PK-CL	6.0	6.3	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.5

\* : Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> / ml.      \*\* : Not done

Table 3. Comparison of intranasal and intramuscular vaccination with LPC-China strain in pigs.

Pig NO.	Vacci. route	Chall. route	SN titer ( PVD )		Challenge result
			0	10	
P 151	IM	IN	<× 2	<× 2	S*
P 152			× 11	× 6	S
P 153			<× 2	<× 2	S
P 154			× 8	× 4	S
P 155	IM	IM	≥ × 22	× 16	S
P 156			× 6	× 3	S
P 157			× 4	× 3	S
P 158			× 8	× 2	S
P 159	IN	IM	× 4	<× 2	D6
P 160			<× 2	<× 2	D6
P 161			× 8	× 4	D6
P 162			<× 2	<× 2	D10
P 163	IN	IN	<× 2	<× 2	D10
P 164			× 8	<× 2	D8
P 165			× 4	<× 2	D10
P 166			× 16	× 3	D10
P 167	ND	IM	× 3	<× 2	D8
P 168		IM	× 8	× 4	D6
P 169		IN	≥ × 22	× 16	D10
P 170		IN	× 3	× 2	D8

\*S : Survival

Dn : D = Dead      n = Day of death after challenge.

Table 4. Safety and immunopotency of PK-CL cell-adapted LPC-China strain in pigs.

Pig NO.	Dosage	SN titer			Challenge result
		PVD0	PVD10	PVD 10	
P 171	1/100	× 2	× 3	>× 256	S*a
P 172	1/100	<× 2	× 3	× 89	S
P 173	1/1,000	<× 2	<× 2	>× 256	S
P 174	1/1,000	× 2	× × 2	× 45	S
P 175	1/5,000	<× 2	× 6	× 89	S
P 176	1/5,000	× 3	× 3	>× 256	S
P 179	ND	ND	ND	ND	D6 *b
P 180	ND	ND	ND	ND	D6
P 177	10	<× 2	× 64	ND	ND*c
P 178	10	<× 2	× 8	ND	ND

\*a S : Survival

\*b Dn : D = Dead      N = Day of death after challenge.

\*c ND: Not done.

四組，前三組分為肌肉注射 1 / 100, 1 / 1,000 及 1 / 5,000 劑量 LPC-PK-CL<sub>7</sub> 病毒 1 ml 後，未發現不良反應，10 天後，以強毒攻毒亦均耐過，但其中大多數試驗豬在攻毒後體溫均曾上昇至 41 °C 以上。二頭對照豬則皆於攻毒 6 天後發病斃死。結果顯示，在 1 / 5,000 劑量低病毒含量之下，仍具保護能力。而試驗豬的中和抗體在免疫前及後 (PVD0 及 PVD10) 無多大差異，不過，在攻毒 10 天後 (PCD10) 才急遽上昇 (表 4)。

## 討 論

為了解決兔化豬瘟疫苗製造上之諸多問題，本所研究人員曾多方嘗試，企圖將 LPC-China 株馴化於組織培養細胞，開發組織培養疫苗<sup>(1,3,8,9,10,12,19)</sup>。在諸多細胞中，林等<sup>(5)</sup> 發現初代 ST 細胞最為敏感；賴等<sup>(19)</sup> 亦作如是觀，並指出初代兔腎 (RK) 細胞不敏感。楊等<sup>(6)</sup> 則發現初代 RK 細胞對 LPC-China 株之敏感性與初代 ST 細胞相近。本試驗結果，LPC-China 株病毒在初代 ST 細胞的增殖性不佳。

一般而言，若欲馴化高病原性病毒時，應將其通過非原宿主細胞，較易達到目的，所製疫苗亦較為安全，因原宿主的其他病毒不易在非原宿主細胞內生長之故，如同當初豬瘟 ROVAC 株以家兔馴化一樣。但病毒在非原宿主細胞之增殖往往不如在原宿主細胞好。本試驗所採用者為 812 代家兔高度繼代之 LPC-China 株病毒，對豬隻已無任何病原性，十分安全的毒株<sup>(9,6)</sup>，似無再予馴化之必要，應可用原宿主 (豬) 之細胞，以提高其病毒力價。但使用原宿主細胞時，則應注意潛伏於宿主細胞之病毒或其他病原體之污染。初代細胞，一般而言，又比 cell strain 及 established cell line 對病毒較為敏感，但取材困難、處理煩瑣，若非取自 SPF 動物或胎兒，則又得冒污染、迷入的危險，又若欲大量培養，來源更形問題。相對地，株化細胞之繼代甚為簡便，大量培養易於克服，但在長時間的繼代培養過程中，外來微生物的污染機會則大增，不得不謹慎求證之。LPC-China 株通過 PK-CL

細胞後，仍有兩次高峰的免熱反應，與 Liu 所得結果一樣<sup>(23)</sup>。

E<sub>1</sub> 二段干涉法過程繁雜、需時冗長，又需初代 ST 細胞，往返採取仔豬睪丸甚感不便，本試驗乃將甫經 0.25% 胰蛋白酶消化處理過之初代 ST 細胞浮游液，直接凍存於液態氮內，使用前取出解凍，配成  $4.5 \times 10^5$  cell/ml 細胞浮游液，滴入 96 孔微滴盤內，150  $\mu$ l / well，2 天內即可使用，結果一樣，堪稱方便。楊等<sup>(6)</sup> 發現 LPC-China 株病毒祇要通過一代細胞培養，即可以 END 法檢出，且可以 CPK 株化細胞取代初代 ST 細胞。本試驗中曾予嘗試，未能成功，因 NDV 對照細胞亦呈現 CPE，難以判讀。林等<sup>(5)</sup> NDV 接種量與 CPE 的出現情形有密切關係。又本試驗中，A76 病毒力價測定時，亦發現 Miyadera 接種量與細胞的生長情形有關，而將 NDV 接種量降低至 0.1 HA Unit，結果比 1 HA Unit 為佳，因此在採用 END 法，若將 NDV 接種量予以降低，或許對 LPC 病毒力價測定會有所影響。

在自然狀態下，豬瘟病毒係藉空氣由呼吸道、扁桃腺之感染為主要的入侵門戶<sup>(15,16)</sup>，故推測 LPC-China 病毒或許在體溫較低處較易增殖，但試驗結果顯示鼻腔內免疫無法引起良好的免疫力 (表 3)，此或可能因 LPC-China 株已經在家兔高體溫之環境下繼代 812 代，已經無法適應較低之溫度，由 32 °C 的病毒力價較在 37 °C 下為差可證實。Burtser 等<sup>(12)</sup> 即認為噴霧免疫比肌肉注射免疫所需次數要多，所需疫苗量也較大。

為瞭解 LPC-China 株組織細胞馴化病毒對豬隻之免疫效力，將不同劑量病毒注射豬隻，再按目前疫苗檢定標準於 10 天後強毒攻擊之。結果發現，免疫豬隻可以耐過，但大部份豬隻均有發燒現象。劉等<sup>(12)</sup> 在豬瘟免疫抗體 (1:2 ~ 1:8) 豬注射兔化豬瘟疫苗時，大都在免疫 2-3 個月後，其中和抗體始可上昇至最高峰；日生研開發的 LPC-CN 株亦有同樣的現象<sup>(12)</sup>；本試驗豬隻在免疫 10 天後、攻毒前之中和抗體僅有微小的揚昇。林<sup>(4)</sup> 又發現豬瘟強、弱毒株在豬體內之感染相差異極

大，亦即兩者之目標器官 ( target organs ) 不同。綜觀上述兩點，筆者認為在豬瘟疫苗免疫 10 天後，亦即在攻毒前，疫苗所能發揮的可能祇有 Homologous virus 之間的干涉作用，而真正的免疫還在方興未艾之中。因此有些免疫豬隻在攻毒後，由於重要的防禦器官，如扁桃腺、脾臟、淋巴腺等可受到疫苗病毒之干涉保護而倖免感染，但其他器官却可能未受到充分保護，強毒因而可續增殖，終致造成豬隻體溫的上昇。

### 誌 謝

本研究承蒙行政院農委會 77 農建 -7.1- 牧 - 46 (A) 計畫經費補助，並承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。而在計畫進行中，本所楊喜金秘書及楊揚輝主任不斷地提供寶貴的意見；對台大賴秀穗教授、本所楊揚輝主任及劉培柏研究員慨贈種毒併表謝意。

### 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。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、謝竹茂、陳由昌、賴秀穗、李正雄、陳正吉、陳守仕。1969。豬瘟 GP 組織培養疫苗之安全性及免疫效力。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。6 : 1-10。
4. 林再春。1969。應用螢光體法測定豬瘟病毒感染增殖之研究。省畜衛試研報 5 : 23-24。
5. 林再春、賴秀穗。1970。兔化豬瘟毒之試管內 ( in vitro ) 檢出及定量法之研究。省畜衛試研報 7 : 1-12。
6. 林再春、謝竹茂、蘇杰夫。1972。兔化豬瘟疫苗接種豬體內病毒分佈消長試驗。省畜衛試研報 9 : 7-14。
7. 李崇道、劉永和、林再春、葉明得。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。
8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. 劉燃炎、葉明得、劉義雄。1968。豬瘟免疫抗體消長試驗。台灣省家畜衛生試驗所研究報告。5 : 45-52。
12. 日本生物科學研究所：未發表報告。
13. Burtser, V.I., Chernyshev, V.I., Rafalovich, A.E., Putilov, B.S., Udovik, V.I. and Fisenko, O.F., 1964. Aerosol immunization against swine fever. Vopr. Vet. 1: 269. Abstr. Vet. Bull. 34:658.
14. De Leeuw, P.W. and van Oirschot, J.T. 1985. Intranasal vaccination of pigs against Aujeszky's disease: Comparison with inactivated vaccines in pigs with low maternal antibody titers. Res. Vet. Sci. 39:34-38.
15. Dune, H.W., Hokanson, J.F. and Luedke, K.A. J., 1959. The pathogenesis of hog cholera. I. Route of entrance of the virus into the animal body. Am. J. Vet. Res. 20:615-618.
16. Hughes, R.W. and Gustafson, D.P.

1960. Some factors that may influence hog cholera transmission. *Am. J. Vet. Res.* 21:464-471.
17. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. 1961. A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. *J. Immunol.*, 87:245-256.
18. Lai, S.S., Ho, W.C., Huang, T.S., Wan, S.K. and Lin, T.C., 1978. A simple and rapid microtiter procedure for END method to determine hog cholera antibody titers. *J. Chinese. Soc. Vet. Sci.* 2:109-111.
19. 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.
20. Lee, R.C.T. 1954. Lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. *Scientific Agri. (Taiwan)*. 2:4-14.
21. Lee, R.C.T. 1954. A preliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan, Chinese-American JCRR, Anim. indus. Series No.5.
22. 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.
23. Liu, Y.H., 1976. Properties in tissue cultures of lapinized hog cholera virus and distribution of the virus in the body of infected. *Bull. Azabu Vet. Coll.* 31:103-132.
34. Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y. and Furuuchi, S. 1969. Field experiments of hog cholera live vaccine prepared in guinea pig kidney cell culture. *Natl. Inst. Anim. Health Q.(Jpn)*. 9: 83-91.
25. Shimizu, T., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, T., 1970. A mutant of hog cholera virus inducing interference in swine testicle cell culture. *Amer. J. Vet. Res.*, 31:1987-1794.
26. Terakado, Y., 1949. Experiments on the hog cholera formalized vaccine. *Exp. Rep. Gov. Expl. Sta. Hyg.*, 20:111-156.

## Development of Tissue Culture Hog Cholera Vaccine

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

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Pigs with 8 weeks of age were vaccinated with live vaccine of LPC-China strain intramuscularly (IM) or intranasally (IN). All pigs vaccinated IN were sick and dead, and all pigs vaccinated IM survived when they were challenged with a virulent strain 10 days after vaccination. Results implied that LPC-China strain could not replicate so well at lower temperature condition.

Primary and established cell lines originated from pig kidney and testicle were used for serial passage of LPC-China strain virus. Results showed that a titer of  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml and  $10^{7.5}$  RID<sub>50</sub>/ml could be reached when the virus was propagated in PK-CL cell line. The virus, however, replicated poorly in primary swine kidney, testicle cell cultures and in ESK, ST-CL established cell lines. The virus replicated better at 37°C.

Doses of 1/100, 1/1,000 and 1/5,000 of the virus which has been serially passaged 6 times in PK-CL cell line, was inoculated IM in 8-week old pigs with low neutralizing antibody. All vaccinated pigs survived with a febrile reaction (over 41°C) when they were challenged 10 days after vaccination; on the other hand, all unvaccinated control pigs were killed after challenge.