

24-7

## 假性狂犬病毒TK<sup>-</sup>變異株疫苗開發

鍾明華 劉堂輝 詹益波 紀長文  
邱資峰 李振宗

### 台灣省家畜衛生試驗所

假性狂犬病毒TNL株以LTK<sup>-</sup>細胞馴化37代後，在1,000 mcg/ml BUdR存在下，繼續交互通過於LTK<sup>-</sup>及ESK細胞或單獨通過ESK細胞，然後測定其Thymidine kinase的活性及其在試管內之安定性。結果顯示 TNL-LTK<sup>-</sup>, ESK<sub>15</sub>, TK<sup>-</sup>變異株不僅在HAT培養液內不增殖，對一日齡雛雞無病原性，且對家兔之病原性亦大幅降低；在連續通過RK-13細胞後對一日齡雛雞及家兔之病原性已漸安定，僅有小幅度之回升。

TK<sup>-</sup>變異株對懷孕母猪十分安全，強毒攻擊後對照母猪有四天的發燒，且食慾廢絕、精神萎靡；而免疫母猪僅有一天的發燒，且無任何臨床症狀。

假性狂犬病 (PR) 為目前威脅本省養豬事業的重要傳染病之一，本所在農委會支持下，不活化疫苗業已商品化供應本省養豬農戶使用，但國內、外報告均顯示，無論不活化疫苗或次單位疫苗皆無法保護免疫豬隻再感染，亦無法阻止野外毒之殖增 (colonization)，因此病毒始終存在於豬場，而無法根除<sup>(8)</sup>。活毒疫苗在歐美地區仍被普遍使用，而活毒疫苗之優點為眾所週知之事<sup>(4,7)</sup>，但其對小白鼠、家兔、幼齡仔豬等仍具病原性，為避免此一缺憾，開發無胸腺嘧啶激酶 (thymidine kinase deficient, TK<sup>-</sup>) 變異株為一可行之路。報告顯示 PR 病毒 TK<sup>-</sup> 變異株不僅對小白鼠、家兔、山羊等無病原性外<sup>(6,10)</sup>，更能阻止野外毒株在豬神經節及呼吸道上皮細胞之增殖<sup>(9)</sup>

。筆者等曾將本省分離毒 TNL 株以 BUdR 馴化至對一週齡哺乳仔豬無病原性，也未造成潛伏感染，且可刺激仔豬產生良好的免疫效力，耐過強毒之攻擊<sup>(2)</sup>。不過，此一 TK<sup>-</sup> 變異株在試管內 (in vitro) 尚不十分安定，其 TK 活性有迴歸之勢，本報告乃繼續馴化之工作，使其 TK 活性不再迴歸並檢討其對懷孕母猪之病原性及免疫保護效力。

### 材料與方法

#### 1. 病毒：

TNL 株為本所分離者，供 TK<sup>-</sup> 變異株馴化用；P7 株為屏東農專分離撥讓，專供攻擊用。

#### 2. 細胞：

LTK<sup>-</sup> 為老鼠細胞，經株選無 TK 活性者；ESK 為豬胎兒腎臟株化細胞。三種細胞均以含 8% 牛胎兒血清之 Eagle's MEM，加入標準量之 streptomycin 及 penicillin 與 30 mcg/ml gentamicin 之培養液培養之。

### 3. TK<sup>-</sup>變異株之分離及株選 (cloning) :

依前實驗<sup>(2)</sup>將 BUdR 濃度逐漸提高至 1,000 mcg/ml，並改以直線通過 ESK 細胞或交互通過 LTK<sup>-</sup> 及 ESK 細胞方式繼續馴化 TNL 株，每代均以斑灶形成予以株選。

### 4. 馴化毒株對一日齡雞及家兔病原性測定：

依前實驗<sup>(2)</sup>將 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>38</sub>ESK<sub>9</sub>，-LTK<sup>-</sup><sub>42</sub>ESK<sub>6</sub>，-LTK<sup>-</sup><sub>64</sub>ESK<sub>16</sub> 等三株未通過及連續通過 RK-13 細胞 10 代之  $10^{5.7-6.0}$  TCID<sub>50</sub> / 0.1 ml 之馴化病毒注入雛雞腦內，並以 EMEM 做為對照，注射後觀察二週。

對家兔病原性測定時，則將 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>38</sub>ESK<sub>9</sub> 馴化病毒以 EMEM 做 10 進稀釋，然後每稀釋階肌肉內注射體重 2 公斤左右家兔 2 隻，並以 TNL 原毒及 EMEM 做為對照。注射後觀察三週。

### 5. 馴化毒對懷孕母豬之病原性及免疫保護效力測定：

四頭懷孕一個月無 PR 抗體之母豬分為二組，每組各兩頭。第一組肌肉注射  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> LTK<sup>-</sup><sub>47</sub>ESK<sub>10</sub> 馴化病毒；第二組注射 EMEM 培養液做為對照。注射後連續測量體溫及觀察臨床症狀 21 天，並在注射 45 天

後，每組各選一頭，鼻腔接種  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 強毒攻擊之，每組中之另一頭則予以自然分娩，所產仔豬則於出生後四週，強毒攻擊之。

### 6. TK 活性迴歸試驗：

依前試驗<sup>(2)</sup>將未通過及通過 RK-13 細胞 10 代之馴化病毒接種於 LTK<sup>-</sup> 細胞 (MOI = 0.1)，經吸著 1 小時後以 EMEM 培養清洗四次，再把感染細胞分成四組：第一組加入正常之 EMEM 維持液後，立即凍結保存；第二組亦加入正常之 EMEM 維持液；第三、四組則加入 HAT 培養液。第二、三、四組細胞在加入各種培養液後置於 37 °C 暖房內培養之。48 小時後，將第二、三組細胞凍結保存；第四組則延至 72 小時後再予凍結保存。四組細胞經解凍一次後測定病毒力價。

## 結 果

### 1. 馴化毒對一日齡雛雞及家兔之病原性：

當一日齡雛雞腦內注射  $10^{5.7}$  TCID<sub>50</sub> 之 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>38</sub>ESK<sub>9</sub> 馴化病毒及其連續通過 RK-13 細胞 10 代 (TNL-LTK<sup>-</sup><sub>38</sub>ESK<sub>9</sub> RK<sub>10</sub>)  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 病毒後，前者皆存活，而後者則全部斃死。又一日齡雛雞腦內注射 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>42</sub>ESK<sub>6</sub> 馴化病毒及通過 RK-13 細胞 10 代 (TNL-LTK<sup>-</sup><sub>42</sub>ESK<sub>6</sub> RK<sub>10</sub>) 病毒各  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> 後，前者亦皆存活，後者亦全部斃死。而注射  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub> 之 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>64</sub>ESK<sub>16</sub> 及通過 RK-13 細胞 10 代 (TNL-LTK<sup>-</sup><sub>64</sub>ESK<sub>16</sub> RK<sub>10</sub>) 病毒後，前者

Table 1. Virulence of TNL-TK<sup>-</sup> mutants to day-old chicks and rabbits.

Virus	Chicks	Rabbits (Log RLD <sub>50</sub> / ml)
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>38</sub> ESK <sub>9</sub>	10 / 10*	ND**
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>38</sub> ESK <sub>9</sub> RK <sub>10</sub>	1 / 8	ND
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>42</sub> ESK <sub>6</sub>	10 / 10	ND
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>42</sub> ESK <sub>6</sub> RK <sub>10</sub>	0 / 10	ND
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>64</sub> ESK <sub>16</sub>	10 / 10	1.5
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>64</sub> ESK <sub>16</sub> RK <sub>10</sub>	9 / 10	2.0

\* : No. survived / No. tested.

\*\* : Not done.

皆存活，而注射後者之 10 隻雛雞中僅一隻死亡。接種 EMEM 培養液者皆相安無事。

又當家兔分別肌肉注射 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>54</sub>ESK<sub>15</sub> 及其通過 RK-13 細胞 10 代病毒後所測得之致死劑量分別為 1.5 及 2.0 RLD<sub>50</sub> / ml (表 1)，通過 RK-13 細胞後，其病原性似有小幅度的迴升。TNL 原毒之家兔致死劑量則高達 10<sup>8.9</sup> RLD<sub>50</sub> / ml，略高於具 TCID<sub>50</sub> / ml (10<sup>8.0</sup>)。

2. 馴化毒之 TK 活性及其迴歸：

TNL-LTK<sup>-</sup><sub>38</sub>ESK<sub>9</sub> 馴化病毒及其通過 RK-13 細胞 10 代病毒，接種 LTK<sup>-</sup> 細胞後

，在 HAT 培養液中培養 48 小時，其病毒力價分別為 10<sup>4.8</sup> 及 10<sup>4.5</sup>，均較吸著一小時者為低 (分別為 10<sup>5.3</sup> 及 10<sup>5.4</sup>)。而 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>42</sub>ESK<sub>6</sub> 及 TNL-LTK<sup>-</sup><sub>15</sub> 病毒及其通過 RK-13 細胞 10 代病毒亦同 (表 2)。此三 TK<sup>-</sup> 變異株在 HAT 培養液中無法增殖，顯示其 TK 活性在試管內已趨安定，未再迴歸為 TK<sup>+</sup>。

3. 馴化毒對懷孕前期母豬之病原性及其保護效力：

第一組二頭懷孕母豬，注射馴化病毒後體溫正常，未發現任何不良反應；第二組二頭注射 EMEM 培養液對照母豬亦同。但第一及二

Table 2. Yield of TNL-TK<sup>-</sup> Mutants under Various Conditions.

Virus	Virus titers (TCID <sub>50</sub> / ml) (log <sub>10</sub> )		
	EMEM (1 hr)	HAT (48 hrs)	EMEM (48 hrs)
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>38</sub> ESK <sub>9</sub>	5.3	4.8	6.3
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>38</sub> ESK <sub>9</sub> RK <sub>10</sub>	5.4	4.5	6.5
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>42</sub> ESK <sub>6</sub>	5.4	5.0	6.4
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>42</sub> ESK <sub>6</sub> RK <sub>10</sub>	5.5	4.7	6.8
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>54</sub> ESK <sub>15</sub>	5.3	5.0	6.5
TNL-LTK <sup>-</sup> <sub>54</sub> ESK <sub>15</sub> RK <sub>10</sub>	5.4	5.3	7.0

組中各有一頭母豬重發情，又第二組中之另一頭母豬在注射 EMEM 培養液 40 天後正常分娩。在免疫注射 45 天後，一頭免疫組母豬與新購懷孕二個半月齡對照母豬同時點鼻接種

10<sup>8.0</sup> TCID<sub>50</sub> 之 P7 強毒攻擊之。免疫母豬之體溫僅在三天後上升至 40.8 °C，隨即恢復正常；而對照母豬之體溫亦於三天後上升 40.8 °C，但繼續維持四天後始下降；另一方面，免

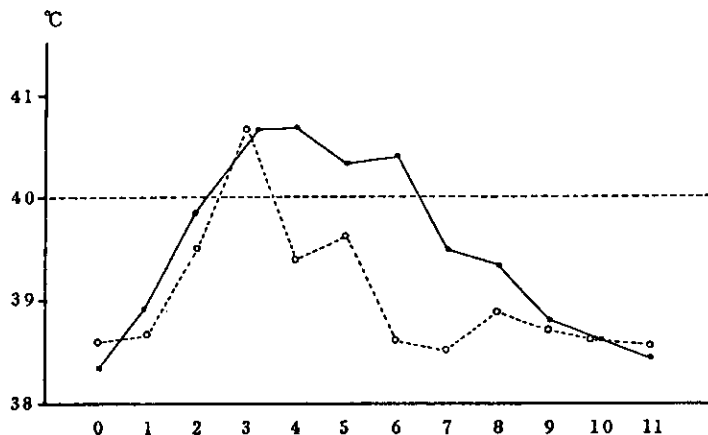


Fig. 1. Temperature responses of sows after challenge. ○.....○ vaccinated, —•— control.

疫母豬攻毒後無任何症狀。對照母豬則有食慾廢絕、精神萎靡之症狀，一週後始略有改善（圖1）。可惜，二頭母豬均未見分娩。

## 討 論

前試驗筆者等曾利用 LTK<sup>-</sup>細胞將 PRV-TNL 株病毒以 BUdR 馴化成 TK<sup>-</sup>變異株，由於其 TK 活性在試管內之安定性尚有疑慮<sup>(2)</sup>，故再將 BUdR 之濃度提高至 1,000mcg/ml。Hirsch 等<sup>(5)</sup>稱 Acyclovir 需要病毒之 Thymidine kinase 才能形成 Acyclovir monophosphate，而細胞之 Kinase 之作用非常有限。然後却需要細胞之 Kinase 使之成為 Di-, Tri-phosphate，取代病毒核酸中之鳥唯唯核甘，用以阻止疱疹病毒之增殖。BUdR 之作用與 Acyclovir 相似，同為核甘類似物。但在 LTK<sup>-</sup>細胞中，並無 TK 的活性，應無法形成 Di-, Tri-phosphate，因此 BUdR 亦應無法取代 Thymidine 才對。故為求更多的變異，乃利用正常的細胞，如 ESK 細胞中的 Kinase，使產生更多的取代，然後再以 LTK<sup>-</sup>細胞作篩選，結果顯示此一改變似有效果，因為利用此交互通過 LTK<sup>-</sup>及 ESK 細胞所篩選的 TK<sup>-</sup>變異株之 TK 活性未再迴歸，但對一日齡雛雞之病原性仍有恢復之勢。推測病毒對一日齡雛雞之病原性除了 TK 活性外，尚有其他有關的因素<sup>(3,9,11)</sup>，而且這些活性經過 RK-13 細胞培養後會再恢復。TNL 病毒株之病毒力價為 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub>/ml，而其家兔致死劑量為 10<sup>6.3</sup> RLD<sub>50</sub>/ml。但 TNL 株病毒經高濃度 BUdR 及高度繼代馴化後，在 LTK<sup>-</sup><sub>54</sub> ESK<sub>15</sub> 代時，其 TCID<sub>50</sub>/ml 為 10<sup>0.6</sup>，而 RLD<sub>50</sub>/ml 為 10<sup>1.5</sup>，對家兔之病原性顯已大幅降低，對疫苗之開發應用具相當的意義。

由母豬在注射 TK<sup>-</sup>變異株病毒後之體溫變化及臨床反應觀之，TK<sup>-</sup>病毒對懷孕母豬之安全性應無疑慮；強毒攻擊後，免疫及對照母豬相比較之下，亦可見 TK<sup>-</sup>變異株之保護效力甚佳。由於缺乏儀器資以準確地測知胎兒的發育，TK<sup>-</sup>變異株對胎兒的安全性無法評估；另一方面，又由於免疫及對照母豬攻毒後

皆未見流、死產，亦無正常分娩，使兩組成績無法區別，此或因攻毒劑量太高所致。因此，TK<sup>-</sup>變異病毒對懷孕母豬及胎兒的安全性及保護效力應再予追試之。

## 誌 謝

本研究蒙行政院農委會 77 農建-7.1-牧-34 (C) 計畫補助，並承家畜衛生科林再春科長及本所邱仕炎所長之指導與鼓勵始得以完成，謹誌由衷謝忱。

## 參 考 文 獻

1. 鍾明華, J.T. Oirschot: 豬假性狂犬病病毒 TK<sup>-</sup>變異株之分離及其性狀, 省畜衛試研報 22: 73-79, 1986。
2. 鍾明華、劉堂輝、詹益波、邱資峰、紀長文: 假性狂犬病 TK<sup>-</sup>變異株之病原性及其免疫保護效力。省畜衛試研報 23: 141-146, 1987。
3. Berns, A., A. Van Den Ouweland, W. Quint, J. Van Oirschot and A. Gielkens: Presence of markers for virulence in the unique short region or repeat region or both of pseudorabies hybrid viruses. J. Virol. 53:89-93, 1985.
4. De Leeuw, P.W. and J.T. Van Oirschot: Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory condition. Vet. Quarterly 3:191-197, 1985.
5. Hirsch, M.S., S.C. Kaplan: Anti-viral therapy. Sci. Amer. April: 66-75, 1987.
6. Kit, S., M. Kit and E.C. Pirtle: Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutant of pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 46:1359-1367, 1985.
7. McFerran, J.B. and C. Dow: Studies

- on immunisation of pigs with the bartha strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 19:17-22,1975.
8. McGregor, S., B.C.Easterday, A.S. Kaplan, T. Ben-porat: Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 46:1494-1497,1985.
  9. Lomniczi, B., S. Watanabe, T. Ben-porat and A.S. Kaplan: Genetic basis of the neurovirulence of pseudorabies virus. J. Virol. 52: 198-205,1984.
  10. Tatarov, G.: Het ontwikkelen van een a virulente mutant van het virus van de ziekte van Ajueszky onder invloed van de inwerking van 5-bromodeoxyuridine tijdschr diergneesk., deel 108, aft 5:204-209.1983.
  11. Tenser, R.B., S.J.Ressel. F.A. Fralish and J.C. Jones: The role of pseudorabies virus thymidine kinase expression in trigeminal ganglion infection. J. gen. Virol. 64: 1369-1373,1983.

## Development of Thymidine Kinase-Negative Mutant of Pseudorabies Virus

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

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

After 37 passages in LTK<sup>-</sup> cells, the TNL strain of pseudorabies virus was further attenuated either alternatively in LTK<sup>-</sup> and ESK cell lines or straightly in ESK cell under the presence of BUdR of a concentration of 1,000 mcg/ml. activity and stability of the kinase of the mutant in vitro were studied. Results indicated that the TK<sup>-</sup> mutant of TNL-LTK<sup>-</sup>ESK could not replicate in HAT medium. It was not virulent to day-old chicks and its virulence to rabbits was greatly reduced. A little reversion of the virulence was found when it was serially passaged 10 times in RK-13 cell without BUdR.

The TK<sup>-</sup> mutant was safe to pregnant sows. The control sow lost appetite and showed deep depression and febrile reaction for 4 days after challenge. On the other hand, the vaccinated sow had temperature rise for one day only and did not show any clinical signs.