

猪假性狂犬病病毒TK⁻變異株之分離及其性狀

鍾明華¹ J.T. van Oirschot²

台灣省家畜衛生試驗所

本省分離毒P7, TNL及C2A株, 在BUdR存在下經PK₂細胞馴化及於LTK⁻細胞株選三次後, 獲得胸腺嘧啶激酶(thymidine kinase, TK)陰性變異株, 對6-8週齡Balb/c小白鼠無病原性, 接種小白鼠可耐過強毒攻擊, 亦可阻止強毒之增殖。在試管內(in vitro)十分安定, 未迴歸為TK⁺表型(phenotype)。

猪假性狂犬病(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, 不活化疫苗已商品化, 供應本省種畜場使用。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, 無法根除¹⁾。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^{2, 3)}。但目前歐美地區市售活毒疫苗對小白鼠、家兔、幼齡仔豬等仍具病原性, 為避免此一缺憾, 胸腺嘧啶激化酶(thymidine kinase, TK)變異株(TK⁻)為一可行之路。最近研究報告顯示, PRV病毒TK⁻變異株不僅對小白鼠、家兔、山羊等無病原性外⁴⁾, 更能阻止野外毒株在神經節及呼吸道上皮細胞之殖增⁵⁾。本報告係企圖以通過組織細胞及在BUdR共同培養方式, 將本省野外毒株馴化, 期以開發活毒疫苗, 並檢討其性狀。

材料與方法

供試病毒株:

C2A株係經株選(cloning)後馴化於牛睪丸細胞(BT)者; TK⁻變異株分離用病毒則有P7一係由屏東農專分離撥讓, TNL及C2A等三株; NIA-3為荷蘭CDI研究所使用之標準株, 在本試驗中供小白鼠攻擊用。

供試細胞:

PK₂為第2代仔豬腎臟細胞; LTK⁻為鼠細胞經株選而無TK活性者。PK₂及LTK⁻細胞培養於EMEM加入10%牛胎兒血清, 再加入標準量抗生素後培養之。病毒接種後之維持液則加入3%牛胎兒血清。

TK⁻變異株之分離及株選:

當PK₂細胞單層形成後, 分別接種P7, TNL及C2A株, 經60分鐘吸著後, 即加入含25 mcg/ml BUdR之維持液, 連續五代, 然後將BUdR濃度提高為100 mcg/ml, 連續三代, 最後再將病毒以10倍稀釋, 分別接種LTK⁻單層細胞, 經吸著、洗滌, 再加入含100 mcg/ml BUdR之1% methylcellulose 維持液, 斑灶形成後以彎頭 Pasteur Pipette 選取單獨斑灶, 再接種於LTK⁻細胞增殖之(維持液亦含100 mcg/ml BUdR), 如此重覆三次。

小白鼠接種:

依 van Oirschot 法⁽¹⁰⁾, 將病毒稀釋用液(對照組), TK⁻變異株及野外毒注入6-8週齡Balb/c小白鼠頸部皮下, 每隻10^{6.0} TCID₅₀ / 0.1 ml, 觀察發病情形, 為期二週。

自動放射顯影(Autoradiography):

1. 台灣省家畜衛生試驗所

2. Central Veterinary Institute, Department of Virology, Lelystad, The Netherlands.

依 Tenser (9)，測定變異株之TK活性，將25-100 PFU之變異株接種於PK₂及LTK⁻單層細胞（32 mm直徑/well培養盤），經吸著、洗滌後，加入含100 mcg/ml之1% methyl-cellulose 維持液，三天後將維持液抽棄之，並以EMEM清洗一次，加入含1%抗血清之EMEM，經37°C，1小時感作後抽棄之，再加入相同新鮮含抗PR血清EMEM後，隨即滴入25-50 μ ci/well ³H-thymidine，於37°C，4-6小時作用後抽棄之，再以EMEM清洗四次，然後以amidoblack 染色15分鐘，再以自來水輕輕沖洗，陰乾後滴入10% H₂O及7% DPO (2,5-diphenyloxazole)之acetone (0.5ml/well)，靜置使乾，將培養盤底切開，與底片套合後，置於-70°C冰櫃中，經適當時間後取出沖洗。

TK⁻變異株TK活性迴歸試驗：

為證實TK⁻變異株在試管內之安定性，乃將3次株選過之變異株連續通過PK₂細胞10代（以不含BUdR維持液培養）然後接種小白鼠及自動放射顯影證實之。

中和抗體測定：

依鍾氏法實施之(1)，但將病毒與血清感作時間延長至24小時，然後加入PK₂細胞。

結 果

1.本省分離毒TK⁻變異株對小白鼠之病原性：

本省分離毒P7，TNL及C2A等三株，在25 mcg/ml BUdR存在下，連續通過PK₂細胞五代（P7，TNL，C2A-BUdR₅），然後將BUdR濃度提高為100 mcg/ml後再繼續通過PK₂細胞三代（P7，TNL，C2A-BUdR₃）。此二階段病毒與原毒分別注射10^{6.0} TCID₅₀病毒於Bal b/c小白鼠頸部皮下，結果如表1所示，注射原毒者，皆於注射2-4天內死亡，注射五代者僅有一隻存活（C2A-BUdR₅）；注射P7-BUdR₃者全數死亡，注射TNL-BUdR₃者有一隻存活，而注射C2A-BUdR₃者全數存活。表1所示，P7株最為頑強，C2A株經8代BUdR培養後即喪失病原性。

Table 1. Pathogenicity of three strains of pseudorabies virus at different passages under the presence of BUdR to mice.

Group	Virus	Survive / tested
1	P7	0 / 4
2	TNL	0 / 4
3	C2A	0 / 4
4	p7 - BUdR ₅	0 / 4
5	TNL - BUdR ₅	0 / 4
6	C2A - BUdR ₅	1 / 4
7	p7 - BUdR ₃	0 / 4
8	TNL - BUdR ₃	1 / 4
9	C2A - BUdR ₃	4 / 4
10	control	4 / 4

最後，三株病毒在LTK⁻細胞中經三次株選後（P7，TNL，C2A-LTK₂-C₃），P7，TNL株亦喪失病原性。接種小白鼠在觀察二週後採血處死，採取腦、脾臟實施病毒分離及中和抗體測定，結果顯示（如表2），病毒分離均為陰性，血清中僅於接種P7者測得1:2之低中和

抗體。

Table 2. Pathogenicity, recovery and immunogenicity of three strains of pseudorabies virus after cloning in CTK- cell line to mice.

Group	virus	Survive / tested	virus isolation	SN titer
1	P7-LTK ₇ -C ₃	4 / 4	Neg	1:2
2	TNL-LTK ₇ -C ₃	4 / 4	Neg	Neg
3	C2A-LTK ₇ -C ₃	4 / 4	Neg	Neg
4	TNL	0 / 4	ND	ND
5	Control	4 / 4	Neg	Neg

2. TK- 變異株TK活性迴歸試驗：

三株病毒於LTK-細胞株選三次後，在無BUdR存在下連續通過PK₂細胞10代（P7，TNL，C2A-LTK₇-C₃PK₁₀），分別接種小白鼠二週後，以10^{5.0} PFU之NIA-3病毒攻擊之，結果如表3所示，除了接種TNL原毒小白鼠全數死亡外，餘皆無恙。攻擊後僅有接種TNL及C2A通過PK₂10代者存活，亦無法分離得病毒，血清中僅於接種前者測得1:4之中和抗體。

Table 3. TK reversion and immunogenicity of three TK- mutants after 10 passages in PK₂ cell without BUdR.

Group	Virus	Survive / tested	Challenge	Virus isolation	SN titer
1	P7-LTK ₇ -C ₃ PK ₁₀	4 / 4	killed	ND	ND
2	TNL-LTK ₇ -C ₃ PK ₁₀	4 / 4	survived	Neg	1:4
3	C2A-LTK ₇ -C ₃ PK ₁₀	4 / 4	survived	Neg	Neg
4	TNL-LTK ₇ -C ₃	4 / 4	killed	ND	ND
5	TNL	0 / 4	ND	ND	ND
6	Control	4 / 4	killed	ND	ND

3.自動放射顯影：

P7，TNL，C2A-BUdR₈病毒株之自動放射顯影，在PK₂細胞中均為小而帶黑圈之斑灶；在LTK-細胞中則為大而不帶黑圈者，均無TK⁺表型（phenotype）出現，但接種TNL原毒之PK₂細胞中，可見小而帶黑圈斑灶，此為TNL原毒具有TK活性而攝入³H-thymidine之故（如圖1）。

圖2所示為病毒於LTK-細胞中株選三次（LTK₇-C₃）及連續通過PK₂細胞10代後（LTK₇-C₃PK₁₀）之自動放射顯影，除了原毒外，其餘不論在PK₂或LTK-細胞中均未發現TK⁺表型。由於PK₂細胞TK活性，可攝入³H-thymidine，造成針尖黑點，LTK-細胞則無此現象。

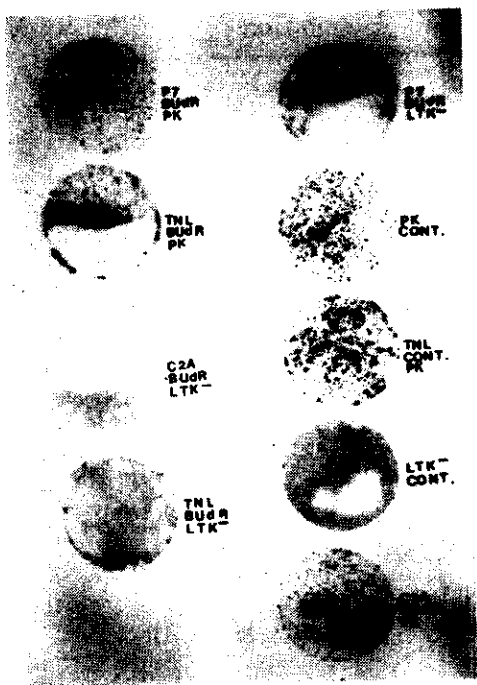
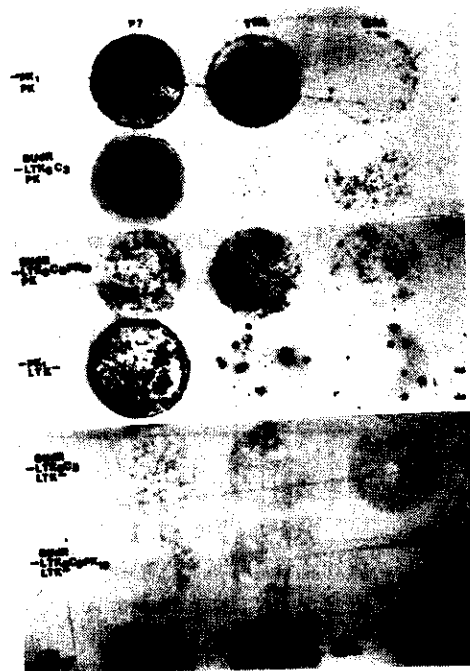


Fig. 1. Autoradiographs of monolayers of PK and LTK⁻ cell cultures infected with 8th passage of PR viruses under the presence of BUdR. TK⁺ PRV-plaques show small dark rims. The TK⁻ phenotype of P7, TNL and C2A viruses are apparent (white spots). Uninfected monolayers (PK CONT. and LTK⁻ CONT.) were used as control.

Fig. 2. Autoradiographs of monolayers of PK and LTK⁻ cell cultures infected with PR viruses cloned 3 times in LTK⁻ cell under the presence of BUdR (LTK₆C₃) and then subpassaged 10 more times in PK cell without BUdR (LTK₆C₃PK₁₀).



討 論

由於不活化疫苗及次單位疫苗均欠缺阻止野外強毒株在神經細胞之增殖，因此無法阻止帶毒豬及感染源之形成，因此也就無法將病毒從豬場中根絕⁽⁹⁾。活毒疫苗則能提供較佳之保護及阻止強毒株之增殖⁽¹⁴⁾，但目前，活毒疫苗株對小白鼠、家兔等仍具病原性，易引起使用者之疑慮，而TK⁻變異株對小白鼠等無病原性⁽¹¹⁾，且可阻止強毒株在神經細胞之增殖^(7,9)。本試驗利用BUdR使本省分離毒產生TK⁻變異株，顯然，25mcg/ml之濃度並不足以產生變異，提高至100mcg/ml後僅能使高度繼代，已馴化至一定程度之C2A株發生變異，此乃由於PK₂細胞具有正常之TK活性，能解救PR病毒，因此也較難達成目標⁽⁹⁾，但在P7, TNL-BUdR₀之自動放射顯影片上，却未能發現TK⁺表型，此乃因自動放射顯影術僅能檢查數量有限之斑灶，尚有漏網之故，此為自動放射顯影之缺失。

經過LTK⁻細胞株選純化後，P7, TNL株亦成為TK⁻變異株，接種小白鼠之腦及脾臟皆無法分離到病毒，且此三株變異病毒在PK₂細胞內甚為安定，連續通過10代亦未迴歸，且可保護小白鼠耐過強毒攻擊，甚至可阻止強毒在體內之增殖，此特性值得重視。本省分離毒TK⁻變異株在試管內(in vitro)之安定性業已獲得證實，但在活體內(in vivo)之安定性如何？排毒情形、對懷孕母豬、幼齡仔豬之影響又如何？皆需予試驗分析。

PR病毒之核酸分子量十分巨大，在自然狀態下極易發生重組(recombination)，此為幾乎每個strain皆有不同之DNA圖譜之原因所在。理論上，使用BUdR所產生之變異多為點狀變異(point mutation)，易發生迴歸，且易因重組產生新而未可知之strain，但經證實TK⁻變異株之性狀十分安定，不易迴歸^(3,9)，即使產生重組情形，產生超過原毒病原性之可能性極微⁽⁴⁾。

誌 謝

本報告承蒙台灣省政府經費資助、台大獸醫系賴秀穗教授及本所邱仕炎所長之推薦與督導下在荷蘭Central Veterinary institute (CDI)完成之一部份工作，謹於此誌萬分謝忱。

參 考 文 獻

1. 鍾明華、賴秀穗：皮內遲發型過敏性反應作為豬假性狂犬病之診斷法，中華民國獸醫學會雜誌 8 : 151-154, 1982。
2. De Leeuw, P.W. and J.T. van Oirschot. Vaccines against Aujeszky's disease : evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. Vet. Quarterly 7 : 191-197, 1985。
3. Dubbs, D.R., and S. Kit. Isolation and properties of Vaccinia mutants deficient in Thymidine kinase-inducing activity. Virology 22 : 214-225, 1964。
4. Gielkens, A.L.J., and J.T. van Oirschot. Personal communication。
5. Gielkens A.L.J., J.T. van Oirschot and A.J.M. Berns. Genome differences among field isolates and vaccine strains of pseudorabies virus. J. gen. Virol. 66 : 69-82, 1985。
6. Kit, S., M. Kit and E.C. Pirtle. Attenuated properties of thymidine kinase-negative deletion mutants of pseudorabies virus. AmJVR 46 : 1359 - 1367, 1985。
7. McGregor, S., B.C. Easterday, A.S. Kaplan and T. Benporat. vaccination of

- swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. Am JVR 46 : 1494-1497, 1985 .
8. Tatarov, G.. Het ontwikkelen van een a virulente mutant van het virus van de ziekte van Aujeszky onder invloed van de inwerking van 5-bromodeoxyuridine. tijdschr Diergeneesk., deel 108, aft 5 : 204-209, 1983 .
9. Tenser, R.B., J.C. Jones, S.T. Ressel and F.A. Fralish. Thymidine plaque autoradiography of thymidine kinase-positive and thymidine kinase-negative herpes viruses. J. Clinic Microbiol. 17 : 122-127, 1983 .
10. Van Oirschot, J.T. and A.L.J. Gielkens. some characteristics of four attenuated vaccine virus strains and a virulent strain of Aujeszky disease virus. Vet. Quarterly 6 : 225-229, 1984 .

Isolation And Characterization of Thymidine Kinase Deficient Mutants of Pseudorabies Virus

Ming-hwa Jong¹ and J.T. van Oirschot²

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Three thymidine kinase-deficient (TK⁻) mutants from each local isolate, named p7, TNL and C2A, were obtained after passaging in PK cell and cloning 3 times in LTK⁻ cell under the presence of BUdR. These TK mutants were safe to 6-8 weeks old Balb/C mice. Inoculated mice could resist challenge exposure with a virulent virus. Neither TK⁻ mutant nor challenge virus was recovered. All mutants did not reverted to the TK-positive phenotype in vitro.

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.
2. Central Veterinary Institute, Department of Virology, Lelystad,
The Netherlands.

