

## 猪假性狂犬病次單位疫苗之開發

鍾明華 劉堂輝 詹益波

假性狂犬病毒培養液 PEG 濃縮液與病毒感染細胞，經 NP-40 處理後，以 BEI 不活化之，再以 MEM 培養液將其量恢復至原病毒培養液量之  $\frac{1}{2}$  及  $\frac{1}{4}$ ，再分別製成疫苗，其免疫效力以及小豬及家兔測定結果並不理想。

另以 Triton x-100 處理病毒感染細胞後，分別以  $110,000 \times g$  超高速離心後之上層液及以 BEI 不活化，然後加入 MEM 培養液，將其量恢復至原病毒液量之  $\frac{1}{2}$ ， $\frac{1}{5}$  及  $\frac{1}{10}$ ，再分別製成疫苗免疫家兔，結果超高速離心處理者與 BEI 不活化者之成績幾乎完全相同，即接種  $\frac{1}{10}$  及  $\frac{1}{5}$  原病毒液量之家兔全部可耐過攻毒。

假性狂犬病係多種家畜及野生動物的急性且高度死亡性傳染病。本病首於民國六十年在屏東地區被發現，然後逐漸蔓延至各地，造成嚴重之母豬流死產及仔豬之死亡，損失頗重，由於本病之撲滅極為困難，祇有仰賴疫苗注射以求控制，目前國外有活毒及不活化疫苗可資應用，而本所亦已開發不活化疫苗成功，此等疫苗全係以病毒培養液製造，其實構成疫苗有效病毒抗原來自病毒封套 (envelop) 上的醣蛋白 (glycoproteins)，若能將此有效抗原蛋白溶出 (solublize)，而除去病毒核酸 (nucleocapsid)，即可獲得次單位 (subunit) 疫苗。

利用界面活性劑 (surfactants) 溶出病毒封套蛋白，以製造疫苗之技術早被應用於人的疱疹病毒<sup>(3,7)</sup>、狂犬病、流行性感冒、雞的馬立克病 (Marek's disease)<sup>(8)</sup>、牛之傳染性支氣管鼻炎 (IBR)<sup>(9)</sup> 等疫苗之研製。1981 年 Turner 等<sup>(11)</sup> 曾以 NP-40 研製 PR 次單位疫苗，並稱疫苗免疫小白鼠可耐過強毒攻擊。1983 年 Mares 等<sup>(12)</sup> 亦宣稱以 NP-40 所研製之疫苗，免疫之豬隻不僅可耐過強毒攻擊，且不會排毒。1981 年筆者於普渡大學以此技術研製 PR 次單位疫苗，在家兔引起極為良好的抗體反應，本研究旨在以符合經濟成本之原則，檢討次單位疫苗之效力。

### 試驗材料與方法

#### 1. 病毒：

疫苗製造及攻擊用病毒株為 PRV-TNL 株，係由本所於民國 68 年在發病小豬腦組織中分離者。

#### 2. 細胞：

病毒增殖用細胞為 RK-13 株化細胞。以 Eagle's MEM 培養液，加入 8% 初生小牛血清，標準量之 Penicillin (100 u/ml)，Streptomycin (100 mcg/ml) 及 Fungizone (2.5 mcg/ml) 作為細胞培養液。

#### 3. 病毒增殖：

以鍾氏等法<sup>(1)</sup> 再加修改後實施之，即當上述 RK-13 細胞在  $690 \text{ cm}^2$  迴轉玻璃圓瓶形成單層後，以  $\text{MOI} \div 0.1$  之病毒接種置  $37^\circ\text{C}$ ，60 分鐘以上吸着，然後加入不含血清之 MEM 培養液，每支迴轉瓶加入 50 ml，再送回  $37^\circ\text{C}$  暖房中繼續培養，17-20 小時後收集細胞及病毒液，以  $4,000 \times g$  離心，將上層液及細胞沈渣分開。

## 4. 病毒培養液濃縮：

上述上層液中加入 8% PEG ( MW 6,000 )，在室溫中攪拌 3 小時，後以  $10,000 \times g$  離心 60 分鐘，倒棄上層液，沈渣即為濃縮病毒。

## 5. 醣蛋白溶出：

濃縮病毒及感染細胞沈渣以 2% NP-40 溶液混合之，以超音波處理 30 秒後，在室溫中攪拌 1 小時，又經  $2,000 \times g$  離心 15 分，然後直接加入適量 BEI 不活化，做為次單位疫苗製造用。另外依 Lupton 等<sup>(9)</sup> 法加以修改後，以 0.5% Triton X-100 溶液，直接加入感染細胞沈渣中，以超音波處理 90 秒鐘後，於室溫中攪拌 30 分鐘，經  $2,000 \times g$  離心 15 分鐘，依 Holloway 法<sup>(4)</sup> 將上層液隨即加入以甲醇處理之 Biobeads，繼續攪拌 2 小時，吸除 Triton，然後將其中一半以  $110,000 \times g$  超高速離心 90 分鐘，上層液即做為次單位疫苗製造用；另外一半則加入適量 BEI，予以不活化做為次單位疫苗製造用。

## 6. 疫苗製備：

當上述 2% NP-40 處理，加入適量 BEI 不活化後，以家兔作安全檢定，通過後，以 MEM 培養液分別將處理液恢復至原病毒培養液之  $\frac{1}{4}$  及  $\frac{1}{2}$ ，然後依鍾氏法<sup>(2)</sup> 與葡聚醣混合製成疫苗。

而以 0.5% Triton 處理者，當  $110,000 \times g$  超高速離心上層液及加入適量 BEI 不活化之家兔安全性檢定通過後，亦以 MEM 培養液分別將處理液恢復至原病毒液量之  $\frac{1}{10}$ ， $\frac{1}{5}$  及  $\frac{1}{2}$ ，然後亦與葡聚醣混合製成疫苗。

## 7. NP-40 處理疫苗效力試驗：

## (1) 家兔效力試驗：

23 頭體重 1.5~2.0 公斤家兔分為五組，第一至四組各五頭。第一、二組分別接種  $\frac{1}{2}$  原病毒液疫苗 0.7 ml 及 0.2 ml，第三、四組分別接種  $\frac{1}{4}$  原病毒液疫苗 0.7 ml，及 0.2 ml，二週後再接種同一劑量之疫苗，再二週以  $100 \text{ RLD}_{50} / \text{ml}$  之強毒攻擊之。第五組三頭為未免疫對照組，分別以 10，1，及  $\frac{1}{3} \text{ RLD}_{50} / \text{ml}$  之強毒攻擊，做為測定攻擊用病毒量。

## (2) 小豬抗體反應試驗：

6 頭 4 週齡無抗體小豬分為二組，各有三頭，分別接種  $\frac{1}{2}$  及  $\frac{1}{4}$  原病毒液疫苗 2 ml，二週後再予補強一次。補強注射時及二週後分別採血測定中和抗體力價。

## 8. Triton X-100 處理疫苗家兔效力試驗：

21 頭體重 1.5~2.0 公斤家兔分為七組，每組三頭，前三組分別接種  $110,000 \times g$  超高速離心後再恢復至原病毒液量  $\frac{1}{2}$ ， $\frac{1}{4}$ ，及  $\frac{1}{10}$  疫苗 0.4 ml，二週後再接種一次，再二週，以  $100 \text{ RLD}_{50}$  強毒攻擊之。第七組三頭為未接種對照組，分別以 10，1 及  $\frac{1}{3} \text{ RLD}_{50} / \text{ml}$  之強毒攻擊之，測定攻擊用病毒量。

## 9. 中和抗體測定：

Eagle's MEM 培養液，加入 8% 牛胎兒血清，200 U penicillin/ml，200 mcg streptomycin/ml 及 2.5 mcg fungizone/ml，並以 7.5%  $\text{NaHCO}_3$  調整 PH 後，做為血清稀釋液，病毒稀釋及細胞培養液用。受測血清經  $56^\circ\text{C}$ ，30 分鐘非熱化後，在微量滴盤內，以自動稀釋器行二倍稀釋，然後加入等量 (0.025 ml) 含  $100 \text{ TCID}_{50}$  之病毒液，混合後置於  $37^\circ\text{C}$  感作 60 分鐘，再加入 0.05 ml 含有 250,000/ml RK-13 細胞液，最後以透明膠帶封貼之，移置於  $37^\circ\text{C}$  繼續培養。另外作病毒之反滴定 (backtitration)，以確定病毒使用量。72 小時後以 100% CPE reduction 方法判讀之。

## 結 果

## 1. NP-40 處理疫苗的免疫效力：

## (1) 家兔免疫效力：

當 4 組各 5 頭家兔分別接種 2% NP-40 處理，再恢復至  $\frac{1}{2}$  及  $\frac{1}{4}$  原病毒液量後所製疫苗兩次，然後以 100 RLD<sub>50</sub> 攻毒結果如表 1：第 1 及 2 組接種  $\frac{1}{2}$  原病毒液量者，攻毒後僅有二頭耐過；第 3 及 4 組接種  $\frac{1}{4}$  原病毒液量者，則有 5 頭耐過，對照組三頭均發病斃死。以現行之疫苗檢定標準言，恢復至原病毒液量  $\frac{1}{4}$  後所製疫苗可以通過家兔效力試驗標準，而  $\frac{1}{2}$  者則否。

TABLE 1. Efficacy of The NP-40 Solubilized PRV Subunit Vaccine in Rabbits

No. animal	Concentration	Dosage (ml)		challenge	
		1st	2nd	survival	Death
Group 1 5	$\frac{1}{2}$ of original Viral fluid	0.7	0.7	2	3
Group 2 4	$\frac{1}{2}$ of original Viral fluid	0.2	0.2	0	4
Group 3 4	$\frac{1}{2}$ of original Viral fluid	0.7	0.7	2	2
Group 4 4	$\frac{1}{4}$ of original Viral fluid	0.2	0.2	2	2
Control 3	— —	—	—	0	3

## (2) 小豬免疫效力：

表 2 所示為 6 頭無抗體小豬分別接種  $\frac{1}{2}$  及  $\frac{1}{4}$  原病毒液疫苗後之抗體反應。大部份試驗豬在接種一次疫苗後即可測得 1 : 2 至 1 : 4 之抗體，但第二次接種後，却未見中和抗體顯著上升情形。

Table 2. Serum-Neutralization Titers of Pigs Following Administration of NP-40 Solubilized PRV Subunit Vaccine.

Pig No.	Concentration	SN titer (PVW)			
		0	2	3	4
P 16	$\frac{1}{2}$ of original viral fluid	< 2	× 2	× 2	× 4
P 17		< 2	× 2	× 8	× 4
P 18		< 2	× 2	× 4	× 4
P 19	$\frac{1}{4}$ of original viral fluid	< 2	× 2	× 4	× 4
P 20		< 2	< 2	× 2	× 4
P 21		< 2	× 2	× 4	× 8

2. Triton X-100 處理疫苗效力試驗：

家兔分別接種 TX-100 處理後以 BEI 不活化或以 110,000 × g 超高速離心，再恢復至原病毒液量  $\frac{1}{2}$ ， $\frac{1}{4}$  及  $\frac{1}{10}$  後所製疫苗的效力測定成績如表 3：

Table 3. Efficacy of The TX-100 solubilized PRV Subunit Vaccine in Rabbits.

No. animal	Treatment	Concentration	challenge	
			Survival	Death
3	110,000 × g	$\frac{1}{2}$ of original viral fluid	1	2
3	110,000 × g	$\frac{1}{5}$ of original viral fluid	3	0
3	110,000 × g	$\frac{1}{10}$ of original viral fluid	3	0
2	BEI	$\frac{1}{2}$ of original viral fluid	0	2
3	BEI	$\frac{1}{5}$ of original viral fluid	3	0
3	BEI	$\frac{1}{10}$ of original viral fluid	3	0
3	control		0	3

110,000 × g 與 BEI 處理所得成績幾乎完全一致，接種  $\frac{1}{5}$  及  $\frac{1}{10}$  原病毒液量者全數可耐過攻毒。對照組三頭均發病死亡，此可證明攻擊用病毒量 > 100 RLD<sub>50</sub>。

討 論

由於假性狂犬病毒一旦侵入細胞後，會在細胞質中合成數種醣蛋白，然後再併入細胞核膜上，以備病毒行出芽 ( budding ) 時做為 envelop 之用，因此可知，細胞核膜上具有相當豐富的病毒特异性蛋白質<sup>(6)</sup>。這些蛋白物質若以蛋白酶消化溶出，則可用來製造免疫擴散抗原；若用界面活性劑予以溶出則可用來製造次單位疫苗<sup>(12)</sup>。

感染細胞經過 TX-100 或 NP-40 處理後，須加入 BEI 或以超高速離心方法，將具感染力的病毒顆粒或核酸予以除去不活化。若以肉眼觀之，以 110,000 × g 離心後之上層液清澈若無物，但以此上層液做成疫苗，仍具極為優異之免疫效力，與 BEI 處理者幾乎一致。此結果有趣而又令人迷惑，經過 TX-100 處理所得之可溶性抗原是否為構成有效抗原的主要成份？其次 BEI 處理者除了含有同量之可溶性抗原外，尚含有其他成份，由成績顯示，其他成份似乎無法刺激動物產生更高的抗體，其因何在？

本試驗之目的係以成本經濟為出發點，檢討以界面活性劑所製次單位疫苗之可行性。1981 年 Turner 等，1983 年 Maes 等以及 1981 年筆者於普渡大學所擬之結果，均係以原液未經稀釋之成績。無疑地，以高濃度抗原蛋白所研製之疫苗，其效力定比一般疫苗為優，但其價格亦定比一般疫

苗爲高，並不符合經濟動物的疫苗製造原則。本試驗未嘗試高濃度、未稀釋疫苗的免疫效力，或能達到預防排毒之效果亦未可知。

### 誌 謝

本試驗得到本研究室同仁李金乾、林正男先生之協助，謹致謝忱。

### 參 考 文 獻

1. 鍾明華、賴秀穗：微量免疫擴散與中和試驗對豬假性狂犬病血清抗體測定比較。中華獸醫學會雜誌 5：67-70，1979。
2. 鍾明華、賴秀穗、林榮培：豬假性狂犬病不活化疫苗之免疫效力。省畜衛試研報 15：63-68，1978。
3. Capple, R. : comparison of the humeral and cellular immune responses after immunization with live, UV-inactivated Herpes simplex virus and a subunit vaccine and efficacy of these immunizations. Arch. Virol. 52. 29-35 ( 1976 ).
4. Holloway, P.W. : A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. Anal. Biochem., 53. 304-308 ( 1973 ).
5. Helenius, A. et al : Solubilization of membranes by detergents. Biochimica et Biophysica Acta. 415. 29-79 ( 1975 ).
6. Karplan, A.S. et al : Excretion of specific glycoproteins by cells infected with Herpes simplex virus. Prog. Med. Virol. 21 : 1-12 ( 1975 ).
7. Kiteus, E.N. et al : protection from oral Herpes simplex virus infection by a nucleic acid-free virus vaccine. Infection and Immunity. 16. 955-960 ( 1977 ).
8. Leslik, E. et al : Immunization against Marek's disease using Marek's disease virus-specific antigens free from infectious virus. Int. J. Cancer. 16. 153-163 ( 1975 ).
9. Lupton, H.W. et al : Evaluation of experimental subunit vaccines for Infectious Bovine Rhinotracheitis. A. J. V. R., 41. 383-390 ( 1980 ).
10. Maes, R.K. and J.C. Schutz : Evaluation in swine of a subunit vaccine against pseudorabies. A. J. V. R., 44. 123-125 ( 1983 ).
11. Turner, S.P., C.E. Haryley, A. Buchan, G.B.B. Skinner. Preparation and efficacy of an inactivated subunit vaccine against Aujeszky's disease virus infection. Res. Vet. Sci. 31. 261-263 ( 1981 ).
12. Vernon, S. K. et al : Herpesvirus vaccine development : Studies of virus morphological components. in Voller A. Fredman H. ( ed ). Baltimore. University Park Press. 179-210 ( 1978 ).

## DEVELOPMENT OF THE SUBUNIT VACCINE AGAINST PSEUDORABIES

M. H. Jong, T. H. Liu, I. P. Chan

A BEI-inactivated subunit vaccine against pseudorabies virus was prepared by treating a mixture of the PEG concentrated virus fluid and infected cells with the detergent NP-40 when the volume of the treated mixture was brought up to 1/2 and 1/4 of the original virus fluid with MEM. However, the efficacy of the vaccine was not satisfactory.

Another detergent, Triton X-100, was used to treat the infected cells, half of the mixture was then ultracentrifugated at 110,000 xg and the rest half was inactivated by BEI. Fresh MEM was added into the supernant and the BEI inactivated mixture to bring the volume up to 1/2, 1/5 and 1/10 of the original virus fluid respectively and vaccines were then prepared. Results indicated that rabbits injected with the vaccines of 1/5 and 1/10 of the original virus fluid prepared from the BEI-inactivated and ultracentrifugated antigens survived after challenge.