

猪假性狂犬病活毒疫苗之研製

I、野外毒之馴化及其性狀探討

鍾明華 劉堂輝 詹益波 邱資峰 曾正文

猪假性狂犬病本省分離毒 PRV-TNL 株先於 BHK 細胞中以斑灶形成方法予以株選兩次，再繼續通過 SKH 細胞 59 代，再分別通過 BT (牛睪丸) 及 CPK 細胞，並取 BT 10 代及 CPK 11 代病毒，以 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 病毒量肌肉注射於五週齡無抗體小豬各二頭，另一頭作為同居對照。

接種 BT 細胞馴化病毒小豬未顯現任何症狀，體溫正常，扁桃腺棉拭 (swabs) 中無法分離到病毒，亦無病毒血症；接種 CPK 細胞馴化病毒小豬，在接種五天後體溫均上昇至 40.8°C 左右，其中有一頭在接種七天後，從扁桃腺棉拭中分離到病毒，但均未發生病毒血症；同居對照小豬則一直維持正常，無排毒、無病毒血症，無中和抗體。馴化病毒接種小豬在接種七天後可測得微量中和抗體，隨後抗體即逐漸上昇。28 天後上昇至頂點，56 天後仍維持 1:16 ~ 32 之抗體力價。所有試驗小豬連續注射 Dexamethasone 四天，並未造成排毒。

本省猪假性狂犬病自民國 60 年發生以來，已成為威脅本省養猪事業之主要傳染病之一，造成嚴重的經濟損失。鑑於本省養猪型態趨於密集，經營方式亦趨企業化，本病一旦侵入，甚難加以控制，除採取嚴厲之撲殺政策外唯有仰賴疫苗注射方能奏功。本所經多年研究，效力優良的不活化疫苗業已開發成功，且已商品化製造供應。活毒疫苗之開發研究，在歐美各國早就極力進行，活毒疫苗之使用，在歐美各國亦十分普遍。基於安全理由，政府一直未開放使用，但若開發不排毒及不造成病毒血症之馴化弱毒株，則病毒毒力不虞再迴歸，此時此際應可考慮使用，並可拓展外銷爭取外匯。本報告係企圖以累代通過組織細胞方式，將本省野外毒株馴化而期以開發弱毒疫苗之初步成績，旨在了解馴化方式之可行性及所得馴化株對小豬之病原性及免疫性。

試驗材料與方法

1. 供試毒株：馴化用病毒，為 PRV-TNL 株，係於 1978 年由小豬病例腦組織中以 MVPK 細胞分離者。
2. 供試細胞：BHK (田鼠腎)，SK-H，CPK (猪腎) 細胞皆為株化細胞，BT 為小牛睪丸細胞，為筆者多年前培養之初代細胞。所有供試細胞均以含非必需氨基酸之 Eagle's MEM 加上 4% 牛胎兒血清及 4% 初生小牛血清、100 u/ml penicillin、100 mcg/ml streptomycin 後培養之。
3. 毒株馴化：PRV-TNL 株先以 BHK 培養 35 代，其間以斑灶選別方法 (plaque selection method) 株選 (cloning) 兩次，然後改通過 SK-H 細胞 59 代，然後再分別通過 BT 及 CPK 細胞。在病毒接種前，單層細胞以 MEM 溶液洗滌兩次，病毒接種細胞後置於 37°C 暖房內使其吸著 60 分鐘，然後將病毒液抽棄之，再以 MEM 溶液洗滌至少四次，務使未吸著之病毒洗盡，再加入含 3% 牛胎兒血清 (56°C，30 分鐘非熱化) 之 MEM 維持液，送回 37°C 暖房繼續培養，48 小時後換新維持液。
4. 病毒株選：先將病毒以 10 倍稀釋法做成 10 倍稀釋階，分別接種 0.2 ml 病毒液於 25 cm² BHK 單層細胞，於 37°C，經 60 分鐘吸著後，以 MEM 溶液清洗四次，隨即加入 1.4% Agar-

- ose (溶於 DDW), $2 \times \text{MEM}$ 各佔 48%, 再加入牛胎兒血清 4% 之溶液予以固定, 32 小時後再加入 0.02% 中性紅 (溶於 PBS), 每隻角瓶 1ml, 42 小時後觀察斑灶形態並予以株選。
5. 馴化病毒對小豬之病原性、免疫性及排毒試驗: 五頭五週齡無抗體小豬分為三組: 第一組二頭, 肌肉接種 BT 細胞馴化病毒; 第二組二頭肌肉接種 CPK 細胞馴化病毒。二組接種劑量均為 $10^{5.0} \text{TCID}_{50}$; 第三組一頭為同居對照豬。試驗豬於接種之日起每天測量體溫並觀察症狀, 為期 9 天, 同居對照豬則延長為 13 天。試驗豬並於接種當天及接種後 (post-inoculation-day, PID) 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14 天採取血液及扁桃腺棉拭實施病毒分離。另外再取 PID 0, 4, 7, 10, 14, 28, 42, 56 天之血清測定中和抗體。
6. 扁桃腺棉拭及血清之病毒分離: 棉拭經高壓滅菌後, 伸入試驗豬扁桃腺沾取粘液後直接浸泡於含 3% 牛胎兒血清及 3 倍量抗生素之 MEM 溶液中, 保存於 -70°C 冰櫃, 解凍後, 將棉球擠乾, 經 $2,500 \times g$ 離心, 上清液留存。血液採取後使析出血清, 經 $2,000 \times g$ 離心, 留取血清。每一血清及扁桃腺棉拭離心上清液接種 4 支培養於試管內之 RK-13 細胞, 觀察 CPE。
7. 血清中和抗體測定: 依鍾氏等⁽²⁾法實施之。
8. 腎上腺皮質類固醇注射處理: 依 Oirschot 等法⁽⁷⁾, 連續四天肌肉注射 $1.5 \text{mg} / \text{kg}$ 之 Dexamethasone, 同時採取扁桃腺棉拭測量體溫。

結 果

1. 馴化病毒對小豬之病原性。

五頭試驗小豬包括未接種同居對照小豬在內, 在試驗觀察期間均未顯現任何臨床症狀。體溫反應方面, 接種 BT 細胞馴化病毒之小豬均正常 (40°C 以下), 而接種 CPK 細胞馴化病毒者則在接種 4, 5 天後有發燒現象 (40.8°C)。同居對照小豬則無變化。病毒血症及排毒方面, 接種 BT 細胞馴化之病毒者未發現病毒血症, 並未排毒而接種 CPK 細胞馴化之病毒者中, 則有一頭於 7 天後, 在扁桃腺棉拭中檢出病毒, 但無病毒血症。同居對照小豬一切正常, 既無排毒亦無病毒血症 (如圖 1)。

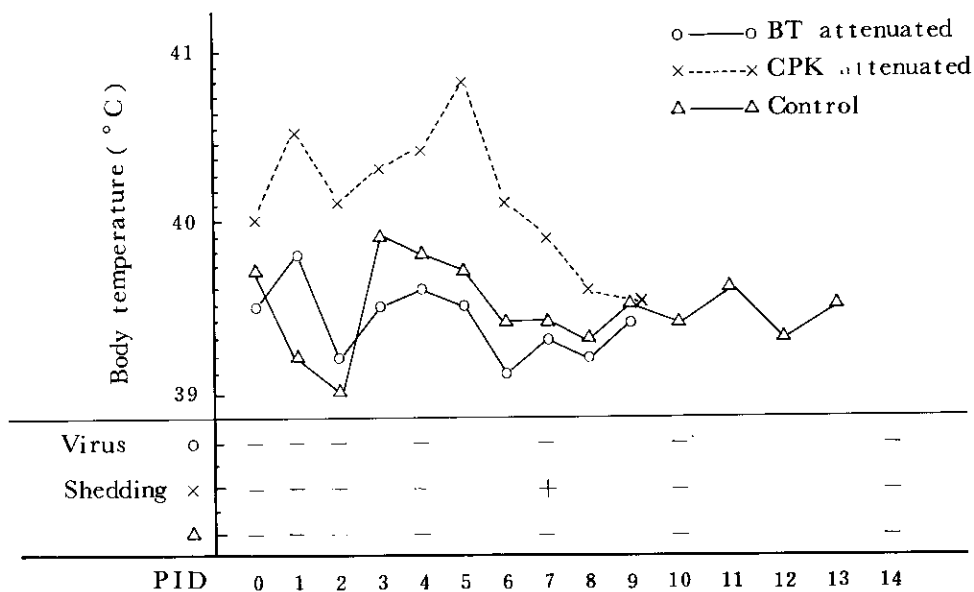


Fig 1 The pathogenicity of BT-and CPK-attenuated PRV-TNL Strains in pigs.

2. 馴化病毒對小豬之免疫性：

第一組兩頭小豬在接種BT細胞馴化之病毒7天後，即可測得微量（1：2）之中和抗體。第二組中之一頭在7天後亦可測得1：4之抗體。隨後中和抗體即逐漸上昇，至28天後達頂點，56天後仍維持1：16~32之抗體力價。同居對照小豬則始終無法測得中和抗體存在（如表1）。馴化病毒接種後是否會引起潛伏性感染？對幼齡哺乳仔豬之病原性如何？對懷孕母豬是否會造成流死產等等問題，皆有待試驗究明。

Table 1 Immune Response of Pigs Inoculated with BT- and-CPK-Attenuated PRV-TNL-Strains.

Pig No.	Virus	SNT (PID)							
		0	4	7	10	14	28	42	56
PP 1	PRV-BT ₁₀	< 2	< 2	× 2	× 8	× 16	× 16	× 32	× 16
PP 2	PRV-BT ₁₀	< 2	< 2	× 2	× 16	× 16	× 32	× 16	× 16
PP 3	PRV-CPK ₁₁	< 2	< 2	< 2	× 16	× 16	× 32	× 16	× 32
PP 4	PRV-CPK ₁₁	< 2	< 2	× 4	× 16	× 16	≥ × 64	≥ × 64	× 16
PP 5	Control	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

3. Dexamethasone 注射處理對排毒之影響：

三組共五頭小豬於病毒注射3個月後連續肌肉注射四天Dexamethasone（1.5mg/kg），每頭小豬（包括對照小豬）之體溫均上昇至40°C左右，注射CPK馴化病毒小豬中一頭之體溫升高至41.4°C，但均未能從扁桃腺棉拭中檢出病毒。

討 論

PR強毒馴化是一件繁瑣而需要運氣的工作，而其馴化過程中使用的細胞或方法亦因人而異，無一定法則可循。1962年Kojnok及Bartha⁽⁵⁾，1964年Skoda^(9,10)均曾將野外強毒通過雞胚胎纖維芽細胞（CEF）分別獲得著名的K strain及BUK strain，但其免疫性均不佳。1973年本所蘇杰夫等⁽²⁾曾以PK-15及CK細胞交互通過方式開發活毒疫苗，結果亦因免疫性不佳而作罷。1975年McFerran等⁽⁶⁾將K strain通過Vero細胞，1977年Norden實驗室之Bass將BUK strain通過豬腎細胞，皆發展出免疫性良好的活毒疫苗。1977年本所林敬覆⁽¹⁾曾將野外毒通過ESK及BK等細胞馴化至同居感染不成立，且仍具免疫效果之弱毒株。由此觀之，馴化過程中所使用的細胞影響病毒之病原性及免疫性至鉅。有鑑於此，筆者等即選擇豬腎來源之SK-H及CPK與牛睪丸來源之BT細胞作為馴化的工具。PRV-TNL株在此兩種來源的細胞所產生CPE完全不同：在BT中為單個而小的CPE，在CPK中為大而融合性的CPE。經兩者馴化之病毒接種小豬之反應亦不同：接種BT馴化者一切正常，接種CPK馴化病毒者有發燒現象，且有短暫的排毒情形。更由Dexamethasone注射造成之緊迫並未能引起排毒，尤其是未能引起接種CPK馴化病毒而有排毒之小豬再度發生排毒之情況觀之，此二馴化株可能不會引起潛伏性感染（latent infection）。此特性在疫苗開發上極為重要，而且對免疫後是否會與野外毒在豬體內發生病毒核酸之重組變異之憂慮即可不虞。

本報告為馴化病毒之初步成績報告，其結果堪稱滿意，以各種表現衡量，應以BT馴化者較具開發的價值及潛力。

誌 謝

本研究室李金乾、陳由昌、林正男、許益嘉等先生對本試驗之完成所提供之協助，謹申謝忱。

參 考 文 獻

1. 林敬覆：豬假性狂犬病疫苗之研究：分離毒N₁株於通過牛腎細胞 120 代之病原性及對四週齡仔豬之免疫效力。省家畜試研報，14：81-92，1977。
2. 鍾明華、劉堂輝、詹益波：豬假性狂犬病次單位疫苗之開發。未發表。
3. 蘇杰夫、謝竹茂、林再春、陳守仕：假性狂犬病之研究：II 台灣分離毒株之鵝腎細胞馴化試驗。省家畜試研報 10：57-66，1973。
4. Bass, E. P. : Immunization of swine with a modified live-virus pseudorabies vaccine. Norden Laboratories. 1977.
5. Kojnok, J & Bartha, A. : Immunization experiments with attenuated Aujeszky's disease Virus. Magy. Allatorv. Lap. 17, Suppl. PP. 19-20, 1962.
6. McFerran, J. B. & Dow, C. : Studies on immunization of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 19 : 17-22, 1975.
7. Oirschot, J. T. van and A.L. J. Gielkens : In vivo and in vitro reactivation of latent pseudorabies virus in pigs born to Vaccinated Sows Am JVR. 45 : 567-571, 1984.
8. Sharpee, R. L. : Control of Aujeszky's disease in Europe by vaccination. Norden Laboratories. 1977.
9. Skoda, R., Brauner, I., Sadecky, E. & Mayer, V. : Immunisation against Aujeszky's disease with live vaccine. I. Attenuation of virus and some properties of attenuated strains. Acta virol., Prague 8 : 1-9. 1964 a
10. Skoda, R., Brauner, I., Sadecky, E. & Somogyiova, J. : Immunisation against Aujeszky's disease with live vaccine II. Immunisation of pigs under laboratory conditions. Acta virol., Prague 8 : 123-134. 1964 B

DEVELOPMENT OF LIVE PSEUDORABIES VIRUS VACCINE

I. Attenuation of the wild strain and its characterization

M. H. Jong, T. H. Liu, I. P. Chan, T. F. Chiu, and C. W. Tseng

A local isolate of pseudorabies virus named PRV-TNL has been cloned twice in BHK cell line by plaque selection method. Before being passed in CPK and BT cells, the cloned virus had been passaged in SK-H cell line for 59 times. Both the 10th BT-passaged and the 11th CPK-passaged viruses with the titer of $10^{5.0}$ TCID₅₀ were injected into two 5-week-old pigs respectively.

Pigs injected with BT-passaged virus did not show any sign of infection, e.g. no viremia and no virus shedding from tonsils; The body temperature of the pigs injected with CPK-passaged virus rose to 40.8°C at 5 PID, virus shedding, but no viremia, was detected from one of the the pigs at 7 PID. The sentinel pig kept normal through the experimental period, no viremia, no virus shedding and no antibody were detected. Low level of neutralizing antibody against PRV could be detected in all injected pigs at 7 PID, the titer climbed gradually since, and up to the peak at 28 PID. The antibodies remained in the titer of 1:16 to 1:32 in all of the virus-injected pigs at 56 PID. Consecutive treatment of dexamethasone did not cause virus shedding from all pigs.

