

家兔腎臟培養細胞馴化兔化豬瘟毒 (PK-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

楊喜金¹ 田淵清² 清水悠紀臣³

摘 要

豬腎臟由來SK-H及其純系複製(clone)之CPK株細胞,可代替豬精巢初代細胞(ST),以E⁻二段干涉法,檢出兔化豬瘟病毒(HC LPC-China株),及其家兔腎臟組織培養馴化毒(RK-LPC株)。對於E⁻及E⁻二段干涉法之病毒檢出,以SK-H株細胞較CPK株細胞為優,而以END法檢出病毒時,則以CPK株細胞為優。

LPC-China株毒可在家兔腎臟組織培養細胞(RK)馴化增殖,其初代RK細胞增殖之病毒價,較第二代RK細胞為高。RK初代細胞增殖之病毒價,較接種LPC-China株毒家兔,直接培養之腎臟及精巢細胞者稍高。未經組織培養細胞繼代之接種家兔脾臟及淋巴節乳劑,以試管法不能測出END陽性病毒,但該乳劑只經一代之RK或ST細胞之繼代培養,END陽性病毒就可在增殖液中檢出,這顯示着,凡以組織培養細胞馴化,供為豬瘟活性弱毒疫苗為目的之毒株,須經純系複製之病毒分離。

以RK或ST培養細胞繼代之RK-LPC及ST-LPC病毒,所檢出之E⁻二段干涉及END病毒價,隨着繼代代數之增加而升高。RK-LPC毒之最高曲線,以第一代繼代者,於培養後第6—8日為最高,繼代第五代以後

者,於培養後第4—5日為最高。LPC-China株及RK-LPC毒,以水疱性口炎病毒(VSV),使用CPK株細胞,施行負斑點之試驗結果均為陰性,而供為對照之HC GPE⁻株病毒為陽性,其病毒價為 10^{-6} TCID₅₀/ml,豬瘟強毒A76株毒則在 10^{-4} 稀釋倍數為陽性,從試驗中獲悉,豬瘟強毒中,可能原來就有不同性狀之複製病毒存在。

緒 言

有關豬瘟病毒之定量法,以END法⁽¹⁷⁾及螢光抗體法⁽⁴⁰⁾為一般所廣用,惟豬瘟病毒中,如在日本供為活性疫苗製造用之GPE⁻株毒,因其病毒不能以END法測出而開發了干涉法⁽⁴⁵⁾。然而螢光抗體法對豬瘟病毒之測定,雖最被各國廣用⁽⁴⁷⁾,但依染色之差異,術者判定上之偏差,多數檢體應用時之不便,以及由於毒株間之不同,發光程度有別等之技術難點^(28,49),仍受到檢驗多數檢體時應用上之限制。

最被各國廣用,供為活性疫苗製造用兔化豬瘟LPC-China株毒,因病毒既不能以END,又不能以干涉法測出,同時其在培養細胞之增殖不易等理由,而使細胞之定量法一時感到困惑, Lin⁽³¹⁾等及 Liu⁽³⁵⁾,應用以豬瘟

註:本報告係蒙 行政院六十八年度公教人員出國進修暨專題研究經費,於六十九年奉派赴日本

研習之報告,論文摘要,曾於七十年台灣省畜牧獸醫學會大會宣讀。

1. 台灣省家畜衛生試驗所

2. 日本麻布大學獸醫學部

3. 日本農林水產省家畜衛生試驗場

毒不同株間之干涉作用原理，以活毒疫苗弱毒 GPE⁻ 株之干涉，而開發所謂 E⁻ 二段干涉法 (E⁻ 2 Step Interference Method)，供為免化豬瘟病毒之定量。此後免化豬瘟病毒，即能以試管內之方法施行病毒力價之測定。

對於豬瘟病毒螢光抗體法之測定，雖可使用 PK-15 株化細胞為材料，但如 END 干涉法以及 E⁻ 二段干涉法等，過去均認為必須使用豬精巢初代細胞。初代之豬精巢細胞，對於材料之採取，材料來源之不一，及細胞之處理等，仍有諸多不便。1981 年 Komaniwa 等⁽¹⁵⁾ 報告，豬腎臟由來之 CPK 株化細胞，可以 END 及干涉法等，成功檢出豬瘟病毒。

著者在本試驗中乃使用豬腎臟細胞由來之 SK-H 及 CPK 株化細胞，依 E⁻ 二段干涉法檢討免化豬瘟病毒之測定，並擬定病毒檢出方法。

免化豬瘟病毒自 1952 年從菲律賓引進台灣後^(21,22)，以台灣產之家兔施行累代繼代，並進行一系列之試驗研究^(5,14,21,22,23,24,26,27,33,34)，而自 1953 年至 1958 年間，經多年地域性之水劑疫苗田間試驗⁽¹⁴⁾，對本疫苗之安全性及免疫性，所獲評價甚高，故從 1958 年以後，臺灣全面改用冷凍乾燥疫苗以來，豬瘟發生率至民國 54 年起已降為 0.02 %。

免化豬瘟疫苗，除在台灣使用外，在歐洲及亞洲等諸多國家亦被廣用，然其製法，仍以接種家兔之脾臟及淋巴節為主，或使用其他動物來製造，在製造過程論之，除需使用多隻數之動物不經濟外，而且還須考慮供製材料動物之病毒迷入問題，故遲早有待改製組織培養疫苗之必要，基於上述免化豬瘟 LPC-China 株毒之安全性及免疫性均優^(23,24)，故本研究以該毒株為出發，馴化繼代於家兔腎臟組織培養初代細胞對疫苗開發之可行性進行檢討^(52,53)。

材料及試驗方法

(一) 病毒株

本試驗供試之病毒株，均以少量分裝於小試管，至使用時仍一直保存於 -80°C 者。

1. 豬瘟病毒

供試之豬瘟病毒計有強毒 A76 株，弱毒有 GEE⁻ 株 (天竺鼠腎細胞馴化毒株)，免化豬

瘟病毒 LPC-China 株，免化豬瘟病毒家兔腎臟培養細胞馴化毒 RK-LPC 株等。

(1) ALD 及 A76 株：

供強毒攻毒用之 ALD 株毒，係於 1950 年國際糧農組織。K. L. V. Kesteven 博士，贈日本農林水產省家畜衛生試驗場，用為結晶紫豬瘟疫苗製造用毒株。供 END 法試驗用之 A76 株毒，則以豬瘟強毒 ALD 株，以豬精巢初代細胞繼代 22 代者^(17,20,35,42)，以上 ALD 株毒接種毒血，及 A76 株毒細胞培養病毒液，均分裝於小試管，至使用時一直保存於 -80°C 者。供本試驗之 A76 株毒，以 SK-H 株細胞測得之力價為 10^{7.0} TCID₅₀/ml。

(2) GPE⁻ 株

供干涉法及 E⁻ 二段干涉法用之 GPE⁻ 株毒，為日本農林水產省家畜衛生試驗場所開發，用為豬瘟活性弱毒疫苗製造用之毒株。本毒株之來源，係為豬瘟強毒 ALD 株接種豬之血清，經豬精巢組織片繼代 28 代，再以初代豬精巢培養細胞繼代 114 代後，以界限稀釋經 3 次純系複製 (Cloning) 之 B 株，改以天竺鼠腎臟初代培養細胞繼代 32 代之 GP 株，經以 END 法測定時，分離到 END 陽性 (E⁺) 及變異之 END 陰性 (E⁻) 毒二種^(45,46)，E⁻ 之變異毒對豬隻雖已不呈病原性，但具有甚高之免疫原性。所謂 E⁺ 者乃培養於豬精巢初代細胞後，再以新城雞瘟病毒感染時為陽性，而變異之 E⁻ 病毒，則 END 為陰性，而被命名為 GPE⁻ 株 (GP 株、END 陰性) 者。

本試驗供試 GPE⁻ 株毒，以 SK-H 株細胞測得之病毒價為 10^{6.1} TCID₅₀/ml。

(3) LPC-China 株：

供馴化用之 LPC-China 株毒，為美國立達公司 (Lederle Laboratories)，以豬瘟病毒繼代於家兔 200 代馴化而成之弱毒，係供為豬瘟活性弱毒疫苗製造命名為 Rovac 之毒株。此病毒後來贈予菲律賓國立獸醫研究所繼續繼代至 250 代。1952 年 12 月由農發會美國顧問紐森博士 (Dr. Newson) 及李崇道博士由菲律賓分讓後惠贈台灣省家畜衛生試驗所，供豬瘟活性弱毒疫苗製造之種株⁽³⁶⁾，此毒株自從 1952 年引進臺灣後，即以臺灣產家兔累代接種繼代，至 820 代即以 Seed lot system 之方式

繼代，其對豬隻之病原性，已顯較 Rovac 株為低。

本試驗供試第 820 代繼代家兔之脾臟及腸間膜淋巴乳劑，以 SK-H 株細胞測得之病毒價為 $10^{5.5}$ TCID₅₀/g。

(4) RK-LPC 株：

供性狀試驗用之 RK-LPC 株毒，為兔化豬瘟病毒，第 820 代接種家兔脾臟及腸間膜淋巴節乳劑，繼代馴化於家兔初代腎臟培養細胞者。培養方法乃以健康家兔培養 6 日之初代腎臟細胞，抽棄舊培養液，然後接種兔化豬瘟毒，感染家兔第 4 日之 1:10 脾臟及淋巴腺乳劑，置 37°C 中感作 60 分鐘後，抽棄接種液，再用 Earle's 液洗淨二次，加入新培養液培養，培養液使用 Minimum essential medium (MEM)，培養液中所含血清量為 10% (經 56°C 非働化，牛病毒性傳染性下痢症抗體陰性山羊血清)，培養日數從初代至第 10 代為 6-8 日，第 11 至 20 代為 4-5 日。病毒價以 SK-H 株細胞依 E⁻ 二段干涉法，測得第 1-10 代之病毒價為 $10^{3.1} \sim 10^{4.5}$ TCID₅₀/ml^(52,53)。本供試毒株從第 2 代起，與接種兔化豬瘟病毒家兔腎臟直接培養之病毒，等量混合後繼續繼代。

2. 西部馬腦脊髓炎病毒 (WEE)：

供干涉法 E⁻ 二段干涉法用之 WEE 毒，係於 1953 年，日本農林水產省家畜衛生試驗場，向美國辛辛那大學醫學部 A. B. Sabin 博士所分讓之西部馬腦脊髓炎病毒 (Western equine encephalomyelitis virus, WEE)⁽⁴⁴⁾，本病毒經小白鼠腦繼代 12 代，然後經雞胚胎細胞繼代 4 代之病毒，病毒液分裝於小試管，直至使用時，於 -80°C 保存者，本病毒以豬精巢細胞所測之病毒價為 $10^{7.3}$ TCID₅₀/ml，豬腎 SK-H 株化細胞為 $10^{7.7}$ TCID₅₀/ml。

3. 新城雞瘟病毒 (NDV)

(1) 宮寺株：

供 END 法試驗之宮寺株毒，係 1951 年川島等⁽¹²⁾，從自然感染雞之病材接種於雞胚胎所分離，然再以雞胚胎繼代之病毒，本試驗供試病毒，係以雞胚胎繼代約 100 代之病毒⁽¹⁰⁾，其以雞胚胎纖維芽細胞所測得之病毒價為 $10^{8.0}$ PFU/ml。

(2) TCND 株：

供 END 法試驗之 TCND 株毒，係於 1962 年日本農林水產省家畜衛生試驗場，由美國加州大學獸醫學系 R. A. Bankowski 博士所分讓，供為新城雞瘟 TCND 活性弱毒疫苗製造用之毒株⁽³⁵⁾。本病毒係以 Hela 株細胞及豬腎臟初代培養細胞馴化繼代，本試驗供試病毒，係接種於發育雞胚胎尿囊腔增殖者。病毒價為 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 以上。

4. 水疱性口炎病毒 (VSV)：

供負斑點 (Reversal plaque) 使用之水疱性口炎病毒 (Vesicular stomatitis virus, VSV) 係為日本農林水產省家畜衛生試驗場所保存之 New Jersey 株^(7,8)，本試驗供試病毒係經豬腎初代細胞繼代一代者，本病毒以豬精巢初代細胞所測得之病毒價為 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml。

(二) 培養細胞

1. 豬由來細胞

(1) 豬精巢細胞

係從 6-9 週齡 SPF 或健康之仔豬，以外科去勢術，連同總鞘膜無菌操作摘出之睪丸，放入滅菌燒杯或玻璃皿中表面以 70% 酒精消毒剝離白膜取出實質，移入另一滅菌玻璃皿，以滅菌利剪細切，細切組織以冷卻 PBS 洗淨一次，然後放入消化瓶中，每粒睪丸約加入 80 ml 之 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin, Difco 製 1:250)，而在 30°C 溫水槽內以磁性攪拌器攪拌消化。約經 120~180 分鐘消化後，將攪拌分散細胞，以 150/cm² 網眼之不銹鋼濾過，濾液經 1,000 r. p. m 5 分鐘離心後，所得沈澱細胞，以 Earle's 培養液浮游成 1.8×10^6 /ml 之細胞數⁽¹⁸⁾，培養液為 Earle's 液中，含有 5% 之乳蛋白水解物 (Lactalbumine hydrolyste, 20% 經 56°C 非働化 BDV 抗體陰性山羊血清，7% 之碳酸氫鈉 0.6% 及 50 ug/ml 之 gentamycin。本試驗所使用之山羊血清皆為牛病毒性下痢粘膜炎抗體陰性，而且經 56°C 非働化者。

(2) SK-H 株細胞

本細胞為日本農林水產省家畜衛生試驗場，向日本農林水產省動物醫藥品檢查所分讓之

豬腎臟由來細胞，本細胞在分讓前已在原所，繼代培養600代以上之株細胞⁽¹⁵⁾。

細胞之繼代為單層細胞以PBS洗淨1-2次，然後加TV液(0.05% tryrsin與0.02% EDTA等量混合液)輕洗細胞面，然後再加少量之TV液(通常為培養液量1/20量)，於37°C中放置5-10分鐘使細胞分散分離，分離細胞集於沈澱管，經1,000 r. p. m. 5分鐘離心之沈澱細胞，以培養液浮游成 12×10^5 /ml之細胞混懸液，使用之培養液為MEM(日本製品)液中，含有10%之山羊血清，PH以7%碳酸氫鈉(NaHCO₃)調整為7.2-7.4，gentamycin為25 ug/ml。

(3)CPK株細胞

係為豬腎臟細胞由來之SK-H株細胞，再經純系複製培養3代之細胞^(8,15)，本試驗所使用之CPK株細胞，係SK-H株細胞界限純化後繼代約100代者，CPK株細胞之培養方法如SK-H株細胞培養方法相同。

2.家兔由來細胞

(1)家兔腎臟細胞(RK)

體重約一公斤之白色健康家兔，經放血後無菌操作摘出腎臟，然置滅菌之玻璃皿或燒杯內，剝離被膜，採取皮質，經滅菌利剪剪碎後，組織片放入消化瓶中，以PBS洗淨二次，然後二枚腎臟之組織片約加入300 ml 0.2% 胰蛋白酶，置30°C溫水槽中加溫磁性攪拌消化，每30分鐘內所集之分散細胞，以150/cm²網眼之不銹鋼網過濾，濾液經1,000 r. p. m. 10分鐘離心，沈澱細胞再以Earle's液洗淨二次後，以MEM培養液浮游成0.6%之細胞數，培養液為MEM中，含有10%之山羊血清，gentamycin 25ug/ml，及7%之碳酸氫鈉0.5%。以200ml容量之培養瓶中分注15ml之細胞浮遊液，置37°C中靜置培養6日，形成單層細胞後使用。接種免化豬瘟病毒家兔腎臟細胞，亦以相同方法處理培養，唯培養後7-8日收穫病毒液。RK第二代細胞之繼代，與SK-H株細胞之繼代法相同。

(2)家兔精巢細胞(RT)

體重約一公斤之白色健康家兔，以外科去勢術，連同總鞘膜無菌操作採取之睪丸，依照豬精巢細胞之處理方法施行消化，所得細胞以Earle's培養液浮游成 $2.0 \times 10^{6.0}$ /ml之細

胞數⁽¹⁸⁾，培養液為Earle's含有20%之山羊血清，7%之碳酸氫鈉1%以及20ug/ml之gentamycin，以200ml容量之培養瓶中分注15ml之細胞浮遊液，置37°C中靜置培養5日。接種免化豬瘟病毒家兔精巢細胞，亦以相同方法處理培養，唯培養後5-6日收穫病毒液。

(三)實驗動物

1.家兔

在日本及臺灣市面購買雜種白色家兔，體重約為1公斤，購入後在試驗動物舍飼養，供為腎臟、精巢細胞之培養，免化豬瘟毒之接種，免化豬瘟毒以及RK-LPC毒免疫血清之免疫等。

(四)豬瘟病毒之檢出定量法

下述之END干涉及E⁻二段干涉等方法，可分為被檢病毒與細胞之同時培養及單層細胞發育後之培養二種。

1.END法

依據Kumagai等⁽¹⁷⁾之標準所試驗。即被檢豬瘟病毒經1:10稀釋後，各稀釋階段病毒液，接種於4-8支小試管，每支試管接種0.1ml，然後每支小試管再接種0.4ml細胞浮遊液並充分混合，置37°C靜置培養5日後，抽棄培養液，各試管分注 $10^{6.0}$ PFU/ml倍數之新城雞瘟病毒培養液0.5ml攻毒，置37°C迴轉培養3日，以顯微鏡檢查有無CPE供為判定，結果CPE陽性時被檢病毒則為陽性。

2.干涉法

依據Shimizu等⁽⁴⁵⁾以豬瘟弱毒GPE⁻株干涉定量法之標準試驗。即被檢豬瘟病毒經1:10稀釋後，各稀釋階段病毒液，接種於4-8支小試管，每支試管接種0.1ml，然後每支小試管再分注0.4ml細胞浮遊液並充分混合，置37°C靜置培養5日後，抽棄培養液，各試管分注 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml倍數之西部馬腦脊髓炎病毒培養液0.5ml攻毒，置37°C迴轉培養3日，以顯微鏡檢查有無CPE供為判定，結果CPE陰性時被檢病毒則為陽性。

3.E⁻二段干涉法

依據Lin及Lai等⁽³¹⁾之免化豬瘟病毒LPC-China株定量法試驗。即為LPC-China株毒培養後，以同類GPE⁻毒之干涉，再以WEE毒之二段干涉檢出法。試驗時被檢豬

瘟病毒經 1:10 稀釋，各稀釋階段病毒液，接種 5 支小試管，每支試管接種 0.1 ml，然後每支小試管再分注 0.4 ml 細胞浮遊液並充分混合。置 37°C 培養 5 日後抽棄培養液，各試管分注 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之同類豬瘟弱毒 GPE⁻ 株病毒培養液 0.5 ml 干涉，置迴轉培養 3 日後抽棄培養液，每試管再分注 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之西部馬腦脊髓炎病毒之培養液 0.5 ml 攻毒，置 37°C 迴轉培養 3 日，以顯微鏡檢查有無 CPE 供為判定。結果如被檢病毒在接種豬精巢細胞發育增殖時，同類豬瘟 GPE⁻ 株病毒則被干涉不增殖，再以西部馬腦炎病毒攻毒時，LPC-China 株毒不被 WEE 病毒干涉，而呈 CPE 效果。反之如兔化豬瘟病毒陰性時，同類豬瘟 GPE⁻ 株病毒則不被干涉而發育增殖，然攻擊之西部馬腦脊髓炎病毒而被 GPE⁻ 株毒干涉，結果細胞不呈 CPE 效果。

有關兔化豬瘟病毒之檢出，係依上述 E⁻ 二段干涉法為基礎，但在本試驗中，對於使用細胞之種類、病毒接種後於不同日數（3-9 日）間之 GPE⁻ 病毒干涉、西部馬腦脊髓炎不同倍數病毒之攻毒及攻毒時不同血清濃度對於病毒價之影響等，亦進行詳細之檢討。

4. 負斑點法 (Reverse plaque)

依據 Fukusho 等^(7,8) 方法施行試驗。即 SK-H 或 CPK 株化細胞以 MEM 培養液（含有 10% 非働化山羊血清，25 ug/ml gentamycin 及 7% 之 NaHCO₃ 5%），混懸成 10^4 /ml 個細胞浮遊液，5 ml 分注培養於直徑 5 cm 塑膠玻璃皿，置 37°C 5% CO₂ 恆溫器中靜置培養 4 日，俟細胞完全形成單層細胞後，抽棄培養液，分別接種下述供試，各以 Earle's 液 1:10 階段稀釋豬瘟病毒 A 76、LPC-China、GPE⁻ 及 RK-LPC 株等病毒，各階段之病毒稀釋液各培養於 4 枚發育細胞，每枚接種 1 ml，然後置 37°C 5% CO₂ 之恆溫器中感作 60 分鐘，抽棄接種病毒液，並以 Earle's 液輕洗二次，然後每枚接種病毒細胞及對照細胞各加入 1.5% methylcellulose MEM 5 ml 培養基行第一次之重層 (Overlay) 置 37°C 5% CO₂ 恆溫器中靜置培養 4 日後，置暖室中（約 30°C）以真空幫浦抽棄第一次重層之培養基，而細胞面再輕沿皿壁加入 5 ml 之 Earle's 液

輕洗三次後，試驗細胞及對照細胞，各接種 2 PFU/ml 倍數之水疱性口炎病毒液 1 ml，置 37°C 5% CO₂ 之恆溫器中感作 60 分鐘後抽棄，然後分注 1% methylcellulose MEM 5 ml 培養基行第二次重層，置 37°C 5% CO₂ 恆溫器中靜置培養 24 小時，抽棄 methylcellulose 後，以 5% 福馬林液固定 30 分鐘，再以 Giemsa 氏液染色，而計算被青染之斑點數。

重層培養液之配製法為：A 液，經過滅菌之 1:2 MEM 50 ml（內加有非働化山羊血清 20%，gentamycin 2 ug/ml，10% 之 NaHCO₃ 4%）。B 液，500 ml 之三角燒瓶分裝以精製水配製 3% methylcellulose 50 ml（第二次重層為 2%），並放入磁性攪拌子一粒，經 120°C 高壓滅菌 15 分鐘，俟冷卻後置冷藏庫內磁性攪拌溶解，使用前 A 液與 B 液等量混合，再以磁性攪拌使其成為流動性糊狀液，使用時以尖端大孔之吸管或注射筒，依規定量沿皿壁輕輕分裝。

(五) 家兔腎臟培養細胞接種兔化豬瘟病毒之繼代法

以 LPC-China 株毒，接種家兔之脾臟及淋巴節混合乳劑材料為出發點，而繼代於家兔腎臟培養細胞。

即家兔腎臟細胞發育成單層及抽棄培養液，將接種臟器乳劑 1 ml 接種擴散於細胞面，置 37°C 吸收感作 60 分鐘後，抽棄原接種臟器乳劑，細胞面並以 Earle's 液輕洗二次，然後分注 MEM 培養液（培養液含 10% 非働化山羊血清，25 ug/ml Gentamycin 及 7% 之 NaHCO₃ 1% 之 MEM 培養液），置 37°C 恆溫器靜置培養，然後以相同方法連續接種繼代，培養日數從初代及第 10 代為 6-8 日，從 11-20 代培養 4-5 日。各代所收集之病毒增殖液，分裝於小試管，保存於 -80°C 處，然後各代以 SK-H 細胞分別依 E⁻ 二段干涉法測定 E⁻ 二段干涉及 END 之病毒力價。本供試毒從第 2 代起，與接種兔化豬瘟病毒家兔腎臟直接培養之病毒，等量混合後繼代。

試驗成績

(一) 兔化豬瘟病毒 LPC-China 株病毒價測定為目的之基礎試驗

1. E⁻ 二段干涉法供試豬瘟病毒 GPE⁻ 株及西部馬腦炎病毒以豬由來各種細胞之定量比較：豬瘟病毒 GPE⁻ 株毒及西部馬腦脊髓炎病

毒，分別以豬精巢初代細胞，豬腎臟 SK-H 及 CPK 株化細胞測定比較病毒價，試驗結果述如表 1。

Table 1. Multiplication of Hog Cholera Attenuated Virus (GPE⁻) and Western Equine Encephalitis Virus in Swine Cell Cultures.

| Cell Cultured | Comparative Virus Titers | |
|--------------------------------|---------------------------|-----------|
| | HC GPE ⁻ Virus | WEE Virus |
| Primary Swine Testicle Cell ST | 6.1 | 7.3 |
| Established Swine Kidney Cell: | SK-H | 7.7 |
| | CPK | 6.9 |

Note: Virus titers; Log TCID₅₀/ml

如表 1 成績所述，GPE⁻ 株病毒，以初代 ST 細胞及 SK-H 株細胞測得之病毒價相同，而以 CPK 株細胞測得病毒價稍低。WEE 測得之病毒價分別為 ST 初代細胞 10^{7.3} TCID₅₀/ml、SK-H 株細胞 10^{7.7} TCID₅₀/ml 為較高，但 CPK 株細胞則為 10^{6.9} TCID₅₀/ml 較低。

2. 豬由來各種細胞依 E⁻ 二段干涉法對兔化豬瘟病毒 LPC-China 株之病毒定量：LPC-

China 株病毒接種於細胞後，不同培養日次之定量。即自培養後第 3~9 日間之病毒價消長，係使用 ST 初代細胞，SK-H 及 CPK 株化細胞，以上述之 E⁻ 二段干涉法，分為單層細胞形成後以及同時培養二種進行檢討。LPC-China 株病毒接種後，從第 3 日起至第 9 日止，每日取一組以 GPE⁻ 株病毒干涉試驗，試驗結果述如表 2。

Table 2. Comparison of Viral Titers of HC LPC Virus multiplied, in Various Swine Cell Cultures, Assayed by the Two Step E⁻ Interference Method.

| Inoculation Time | Cell Cultured | Days Interfered with HC GPE ⁻ Virus After HC LPC Virus Inoculation | | | | | | |
|----------------------------|------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Before Monolayer Formation | Primary Cell: ST | . | 2.5 | 2.7 | 3.3 | 3.3 | 3.7 | 3.5 |
| | Established Cell: SK-H | . | 4.9 | 5.5 | 5.5 | 6.1 | 5.9 | 5.9 |
| | CPK | . | 1.0 | 2.5 | 3.5 | 3.5 | 3.7 | 4.1 |
| After Monolayer Formation | Primary Cell: ST | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | . |
| | Established Cell: SK-H | 3.7 | 4.5 | 4.3 | 4.3 | 4.3 | 4.5 | . |
| | CPK | 3.5 | 3.5 | 3.9 | 4.5 | 4.3 | 4.1 | . |

Note: Virus titers; Log TCID₅₀/ml

如表 2 成績所述，LPC-China 株病毒之單層細胞形成後，以及細胞同時培養間之病毒價，雖無特別顯著之差異，但以細胞別論之，以 SK-H 株細胞之病毒價為高，以培養別論之，則同時培養之病毒價為高。

被檢病毒接種後，不同培養日次別之病毒價，以 SK-H 株細胞之成績為，單層細胞者，從第 4 日以後，同時培養者從第 5 日以後，均無特別顯著之差異。

3. SK-H 株細胞依 E⁻ 二段干涉法對兔化豬痘病毒 LPC-China 株之病毒檢出基礎試驗：

(1) 不同細胞數對病毒價之影響：

SK-H 株細胞以 MEM 培養液調整成 30×10^4 、 20×10^4 、 10×10^4 、 8×10^4 、 6×10^4 、 4×10^4 、 2×10^4 、 1×10^4 個/ml 之各不同細胞數，以 RK-LPC 5 代毒之同時接種，測得之病毒價，試驗結果述如表 3。

Table 3.
Comparison of Viral Titers of the Hog Cholera LPC Virus Five-Passaged with Rabbit Kidney Cell, Multiplied in Various Population of SK-H Cell.

| Cell Population (10^4 /ml) | Virus Titer |
|----------------------------------|-------------|
| 30 | 6.5 |
| 20 | 6.3 |
| 10 | 6.1 |
| 8 | 6.3 |
| 6 | 6.3 |
| 4 | 6.5 |
| 2 | 4.1 |
| 1 | 4.9 |

Note: Virus titers; Log TCID₅₀/ml

如表 3 成績所述， $30 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ /ml 細胞數間之病毒價殆無差異，但在 2×10^4 /ml 以下之細胞數者，則顯有意義之差異（降低）。由此試驗成績得悉，以後對本病毒之定量試驗，應使用 $8 \times 10^4 \sim 12 \times 10^4$ /ml 之細胞數。

(2) 豬痘病毒 GPE⁻ 株不同病毒倍數之干涉

對 LPC-China 病毒價之影響：

為了檢討豬痘病毒 GPE⁻ 株不同病毒倍數之干涉，是否對 LPC-China 病毒價有所影響，而縮短病毒定量日數，茲將 LPC-China 株病毒接種於 SK-H 株細胞後第 5 日，分別以 $10^{6.0}$ 、 $10^{5.0}$ 、 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 等不同倍數之 GPE⁻ 病毒分別干涉，然後以 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之西部腦脊髓炎病毒攻毒。攻毒日數為；以 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml GPE⁻ 干涉者為第一日， $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 為第二日， $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 為第三日，試驗結果述如表 4。

Table 4.
Influence of Viral Titers of GPE⁻ Virus on Titration of LPC Virus by the Two Step E⁻ Interference Method.

| Days Challenged with WEE Virus After GPE ⁻ Virus Inoculation | Virus Titer | |
|--|------------------------|--------------|
| | GPE ⁻ Virus | HC LPC Virus |
| 1 | 6.0 | 5.1 |
| 2 | 5.0 | 5.1 |
| 3 | 3.0 | 5.1 |

Note: Virus titers; Log TCID₅₀/ml

依表 4 成績所述，三者之成績完全一致，即 LPC-China 株病毒接種細胞，於 GPE⁻ 病毒干涉後，須於第一日以 WEE 病毒攻毒時，即須使用 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 倍數之 GPE⁻ 病毒干涉，第二日者則為 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，第三日時則為 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml。

(3) 西部腦脊髓炎病毒攻毒時，病毒液中不同血清濃度對 LPC-China 株病毒價之影響

為了檢討攻毒培養液中，血清濃度對 LPC-China 株毒力價之影響，分別以 10、5、2 及 0% 之血清濃度施行試驗，試驗結果述如表 5。

依表 5 成績所述，雖無顯著之差異，但無含血清之成績，其病毒價則較低。

從以上基礎試驗中得悉，對於 LPC-China 株病毒之定量，以 ST 初代細胞及豬腎由

Table 5.
Influence of Different Serum Concentrations Contained in WEE Challenge Virus Suspension on Titration of LPC Virus by the Two Step E⁻ Interference Method.

| Serum Concentration (%) | Virus Titer |
|-------------------------|-------------|
| 10 | 4.9 |
| 5 | 5.1 |
| 2 | 5.3 |
| 0 | 4.7 |

Note: Virus titers; Log TCID₅₀/ml
來之SK-H及CPK株細胞間比較結果，以SK-H株細胞之感受性最高。試驗中以8-12×

10⁴/ml之細胞數，10⁵ TCID₅₀/ml以上倍數GPE⁻株病毒之干涉，以及5%血清MEM配成，10⁴ TCID₅₀/ml倍數西部馬腦炎病毒攻毒等之條件下，獲得之病毒價最為安定。綜合以上各項基礎試驗結果，訂定如表6所述E⁻二段干涉之病毒定量標準術式。

(二) 兔化豬霍亂病毒 LPC-China 株化兔腎臟細胞 (RK) 之繼代馴化：

1家兔腎臟培養細胞繼代 (RK-LPC) 不同培養日數之病毒價比較：

茲為檢討RK-LPC株病毒，是否適於上述SK-H株細胞，依E⁻二段干涉法之病毒定量，曾使用RK-LPC株5代毒如表6方法測定。病毒分別以單層細胞及同時培養二法接種，被試病毒接種後，從第3-8日，每日分別以GPE⁻株病毒干涉後測定病毒價，試驗結果述如表7。

Table 6.
The Standard Assay Procedure for Hog Cholera LPC and RK-LPC Viruses using the Swine Kidney Cell Line (SK-H) by the Two Step E⁻ Interference Method.

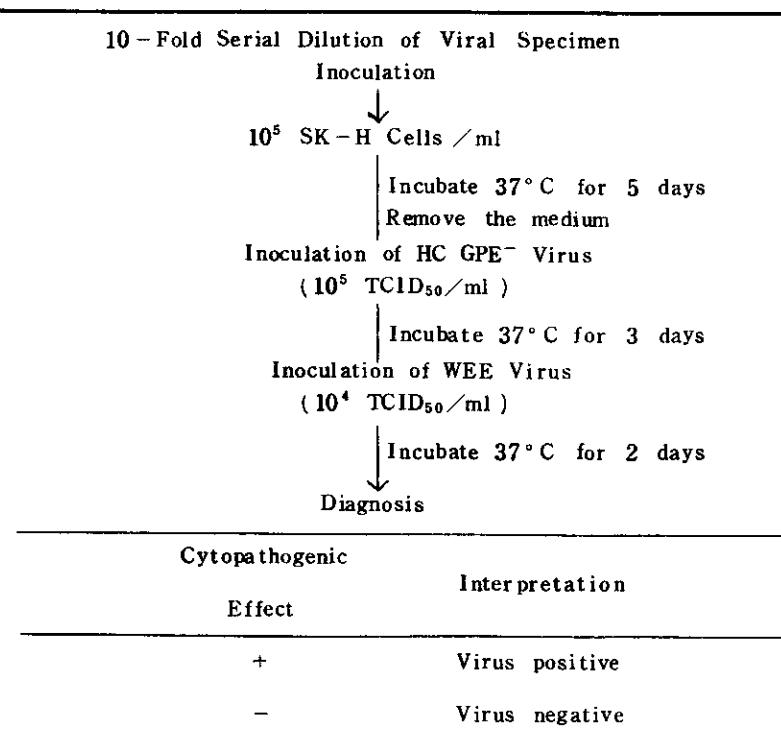


Table 7. Titration of the Hog Cholera LPC Virus Five-Passaged with Rabbit Kidney Cells, by the Two Step E⁻ Interference Method.

| Established Cell Line | Inoculation Time | Days Interfered with HC GPE ⁻ Virus After HC LPC Virus Inoculation | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 |
| SK-H | Before Monolayer Formation | 4.5 | 4.9 | 4.9 | 4.7 | 4.9 | 4.9 |
| | After Monolayer Formation | 3.9 | 4.9 | 4.9 | 4.9 | 4.5 | 4.7 |

Note: Virus Titers; Log TCID₅₀/ml

如表 7 成績所述，以接種方法別論之，經培養細胞馴化之病毒，以單層細胞及同時培養法測得之病毒價並無顯著差異。從本試驗得悉，經培養細胞馴化之病毒，可以使用單層細胞及同時培養方法供為病毒之繼代及定量。

(2) 家兔腎臟培養細胞繼代各代之病毒價：茲為瞭解 RK-LPC 株從第 1 代至 20 代繼代毒之 E⁻ 二段干涉及 END 病毒價，並與豬精巢 (ST) 初代細胞繼代毒 (ST-LPC) 供為比較，所得結果如表 8。

Table 8. Viral Titers of the Hog Cholera LPC Viruses Serial Passage with Rabbit Kidney and Swine Testicle Cells, Assay by the Two Step E⁻ Interference and END Methods.

| Number of Virus Passage | Cells Used in Passage | | | |
|-------------------------|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|
| | Rabbit Kinney | | Swine Testicle | |
| | Two Step E ⁻ Interference | END | Two Step E ⁻ Interference | END |
| 1 | 3.7 | 3.1 | 3.9 | |
| 2 | 3.9 | 3.5 | 3.7 | |
| 3 | 3.5 | 4.1 | 3.7 | |
| 4 | 4.9 | 3.9 | 3.9 | |
| 5 | 4.7 | 3.9 | 4.3 | |
| 6 | 4.9 | 3.7 | 4.1 | 4.7 |
| 7 | 4.9 | 3.9 | 5.3 | 5.5 |
| 8 | 4.9 | 4.3 | 4.9 | 5.5 |
| 9 | 5.1 | 4.5 | 5.1 | 5.5 |
| 10 | 5.1 | 4.3 | 5.9 | 5.3 |
| 11 | 5.3 | 4.3 | 5.3 | 5.5 |
| 12 | 4.7 | 4.3 | 4.5 | 5.3 |
| 13 | 4.7 | 4.1 | 6.3 | 5.5 |
| 14 | 4.7 | 3.7 | 5.1 | 6.1 |
| 15 | 5.5 | 4.9 | 5.7 | 5.7 |
| 16 | 5.1 | 4.5 | 5.3 | 5.7 |
| 17 | 5.9 | 4.5 | 6.1 | 5.5 |
| 18 | 5.9 | 4.7 | 5.7 | |
| 19 | 5.7 | 4.5 | 5.5 | |
| 20 | 5.7 | 4.5 | 5.7 | |

Note: Virus titers; Log TCID₅₀/ml

依表 8 成績所述，RK-LPC 毒繼代初代時（1-3 代）之病毒價較低，而分佈在 $10^{3.5} \sim 10^{3.9}$ TCID₅₀/ml 之間，從 4 代以後，所有之病毒價均為 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 以上，然至第 17 代以後已逐漸增高至 $10^{5.7} \sim 10^{5.9}$ TCID₅₀/ml，由以上試驗知悉病毒價乃隨著繼代代數之增加而升高。而 ST-LPC 繼代毒之結果，也與 RK-LPC 毒之情形一樣，惟其病毒價較 RK-LPC 之病毒價稍高。

至於 END 之病毒價，亦如表 8 成績所述，與 E⁻ 二段干涉病毒價一樣，隨著繼代代數之增加而升高，則在繼代 8 代前，病毒價分佈在 $10^{3.1} \sim 10^{3.9}$ TCID₅₀/ml 之間，第 9-20 代已逐漸升高至 $10^{4.1} \sim 10^{4.9}$ TCID₅₀/ml 之間。而以 ST 細胞繼代者其 END 病毒價亦較 RK 繼代者為高。

(3) 家兔腎臟培養細胞繼代毒之病毒增殖曲線：

茲為明瞭 RK-LPC 毒在家兔腎臟初代培養細胞之病毒增殖曲線，分別使用未經組織培養細胞繼代病毒，以及 RK-LPC 株細胞繼代第 5 及第 10 代毒，以 SK-H 株細胞，所測得之 E⁻ 二段干涉及 END 病毒增殖曲線，試驗結果示如圖 1、2 及 3。

依圖 1 之成績所示，E⁻ 二段干涉病毒增殖之最高曲線為，初代者（即乳劑之第一代培養），於培養第 6 日以後至第 8 日之間，其病毒價為 $10^{3.7}$ TCID₅₀/ml。第 5 代繼代者於培養後第 4 日，其病毒價為 $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml。第 10 代繼代者，於培養後第 4 日，其病毒價為 $10^{5.7}$ TCID₅₀/ml。由此項試驗得悉，本病毒之力價，乃隨著繼代代數而升高。

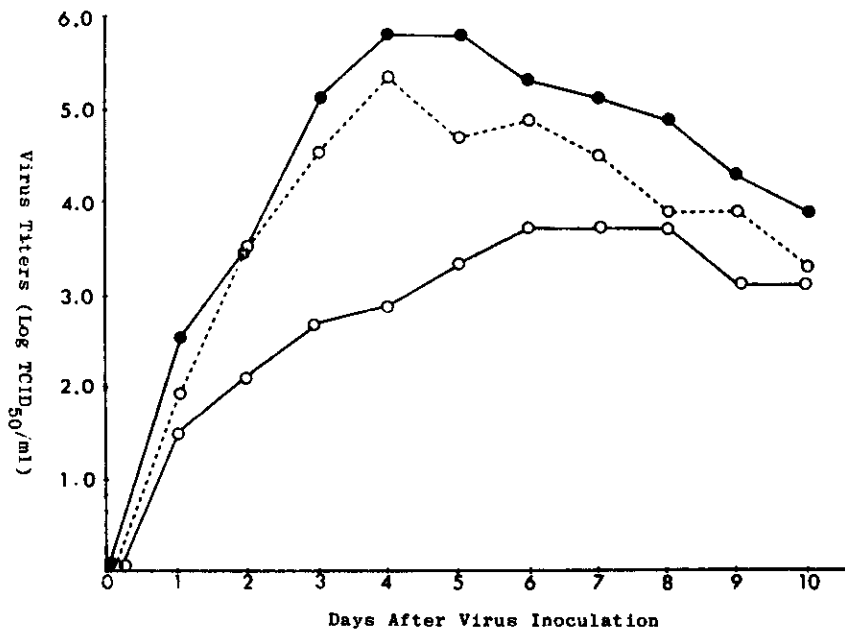


Figure 1. Growth Curve of Various Passage Hog Cholera LPC Viruses in Rabbit Kidney Cells, Assayed by the Two Step E⁻ Interference Method.

—○— ; HC LPC virus of the infected rabbit tissue emulsion, ○- - -○- ; HC LPC virus five-passaged with RK cell, ●—●— ; RK-LPC virus ten-passaged with RK cells.

至於 RK-LPC 毒之 END 病毒增殖最高曲線，如圖 2 所示，初代者（即乳劑之第一代培養）於培養後第 6 日為最高，其病毒價為 $10^{2.3}$ TCID₅₀/

ml。第 5 代為於培養後第 4 至 6 日之間，其病毒價為 $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml。第 10 代於培養後第 4 至 5 日，其病毒價為 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml。

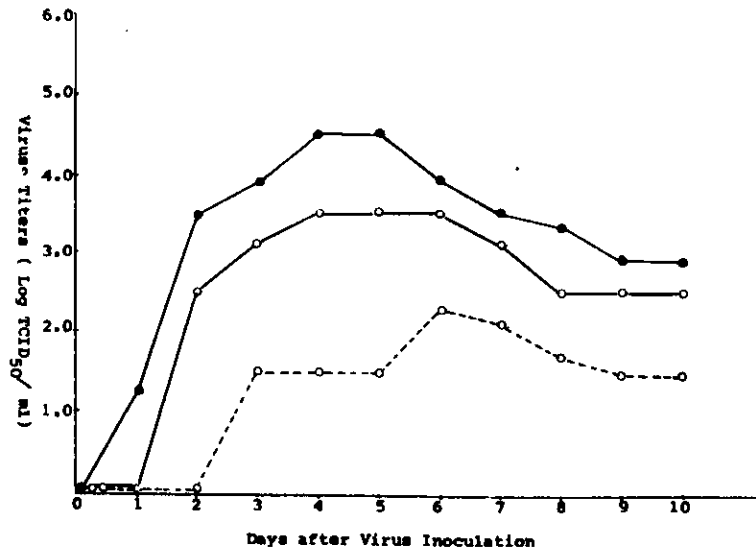


Figure 2. Growth Curve of Various Passage Hog Cholera LPC Viruses in Rabbit Kidney Cells, Assay by the END Method.

-----○; HC LPC Virus of the infected rabbit tissue emulsion.

—○; HC LPC Virus five-passaged with RK cells.

—●; RK-LPC Viruse ten-passaged with RK cells.

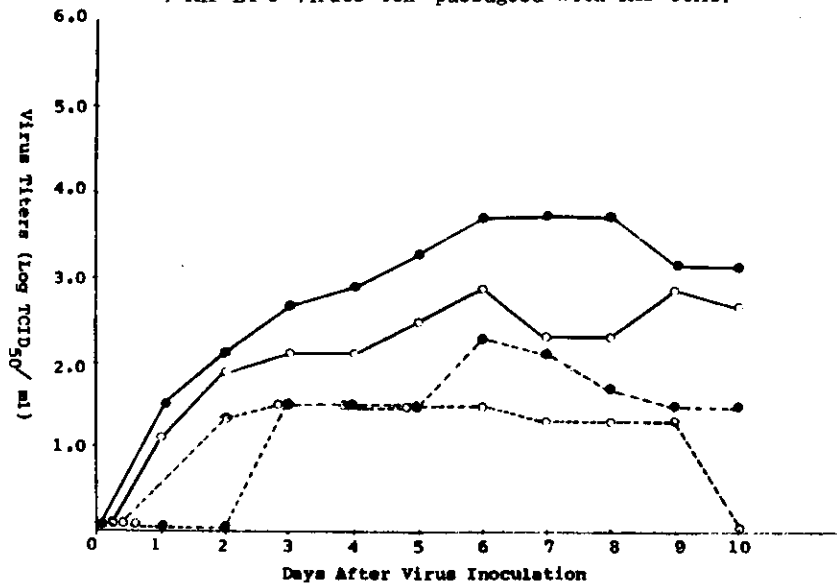


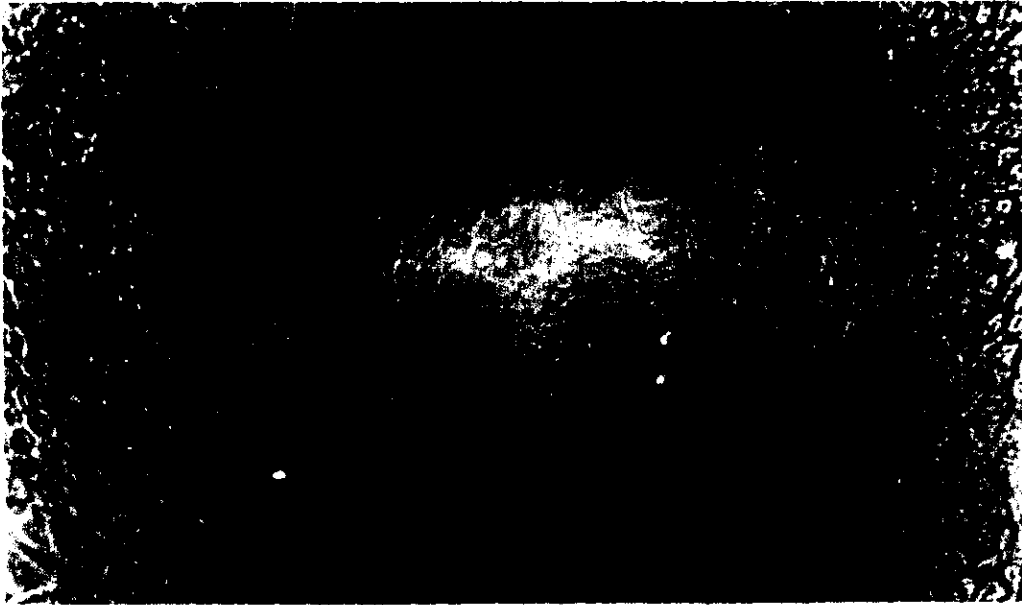
Figure 3. Growth Curve of the HC LPC Virus Infected Rabbit Tissue Emulsion in Rabbit Primary and Secondary Kidney Cells, Assay by the Two Step E⁻ Interference and END Methods.

—●; TWO step E⁻ interference titers in primary cells.

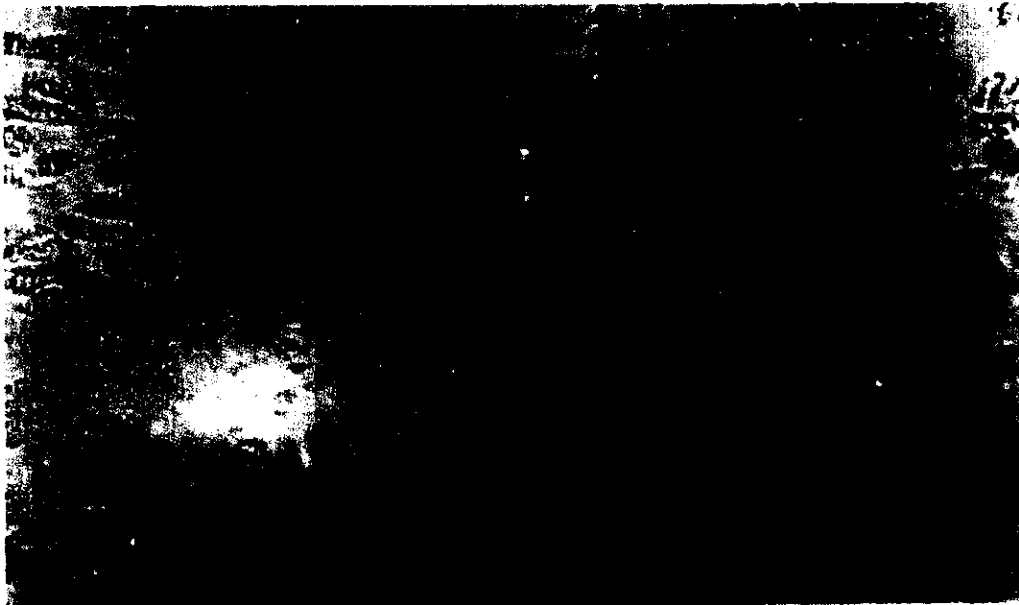
—○; END titers in primary cells.

—○; TWO step E⁻ interference titers in secondary cells.

-----○; END titers in secondary cells.



1) Normal Monolayer Sheet of SK-H Cell Line, Nine Days Old Culture in a ME Medium.

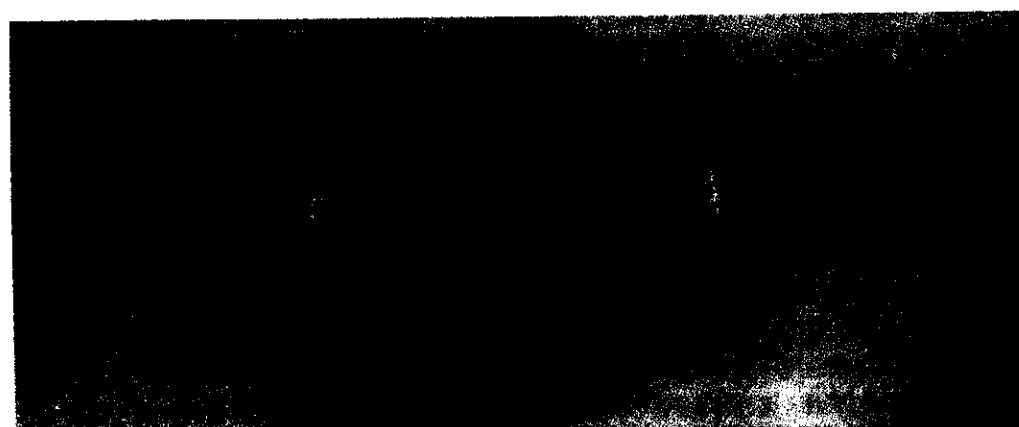


2) Cytopathogenic Effect on SK-H Cell, Three Days Post-Challenge of WEE Virus.

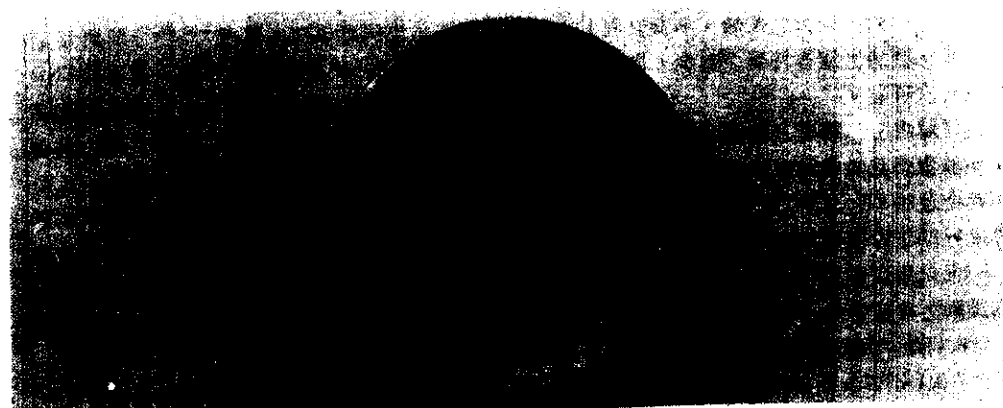
Photo 1.
SK-H Cell Line and Its Cytopathogenic Effect Caused by Western Equine Encephalitis Virus.



1) Control CPK Cell Sheet.



2) Reverse Plaque Formation for HC GPE⁻ Virus on CPK Cell Sheet, Induced by Challenge of VS Virus.



3) Reverse Plaque Formation for HC A76 Virus on CPK Cell Sheet, Induced by Challenge of VS Virus.

Photo 2.

Reverse Plaque Formation for Hog Cholera Viruses on CPK Cell Sheet, Induced by Challenge of Vesicular Stomatitis Virus.

然RK初代及第2代細胞，對病毒增殖比較結果，E⁻二段干涉及END病毒價，均以初代細胞者為高，如圖3所示。

2. 兔化豬瘟病毒LPC-China株及RK-LPC株之負斑點：

兔化豬瘟病毒LPC-China株第821代毒與RK-LPC株第18代毒，以負斑點(Reverse Plaque)測定病毒價結果，對水疱性口炎病毒之干涉均為陰性。但供為對照之A76株毒則 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ /ml之稀釋倍數為陽性，GPE⁻株毒 10^{-6} /ml為陽性，神奈川/1974株，同LPC-China株及RK-LPC株均為陰性(照片2)。

討 論

兔化豬瘟病毒自被開發成功以來^(2,35)，兔化豬瘟疫苗除在台灣使用外，世界各國亦被廣用^(1,3,6,41,50,51)。在台灣，本病毒自1952年從菲律賓導入後，經30年漫長歲月，就病毒之性狀，對豬隻之安全性、抗原性等，一直不斷的從事系統性之探討，迄今本LPC-China株毒所製成之疫苗，經多年之研究已證實為世界上最優良之疫苗之一^(23,24,32)。然本疫苗仍一直沿用過去以接種家兔為主之製法，此對材料家兔之供給、疫苗之查驗、品質管理上之難點尚多，製造上隨著科學之進步，極待改為組織培養來研製。

為了解決上述製造上諸種問題，本試驗對兔化豬瘟毒馴化於家兔腎臟細胞之病毒增殖性，病毒定量法RK-LPC株之病原性以及免疫性等進行以下詳細之檢討。

(一)兔化豬瘟病毒LPC-China株以家兔腎臟培養細胞之增殖繼代馴化及其定量法：

豬瘟病毒，由於對各種組織培養細胞不呈細胞變性效果(CPE)，而各國對豬瘟病毒之研究者，均致力於開發病毒之定量方法。遂於1958年Kumagi等^(16,17)，經不斷研究得悉，接種豬瘟病毒之ST細胞，引起新城雞瘟病毒之增強而呈CPE，而開發END法(Exaltation of ND Virus)，成為有可能以試管方法定量豬瘟強毒病毒，及抗體之中和試驗⁽¹⁰⁾。其後Shimizu等⁽⁴⁵⁾又發現接種豬瘟弱毒之ST細胞，以西部

馬腦炎病毒之攻毒干涉，開發干涉方法。另一方面，對於豬瘟病毒之定量除上述之END及干涉法之外，Mengeling等^(36,37,38,39)、Solorzano等⁽⁴⁶⁾、Carbrey等⁽⁴⁾，開發螢光抗體法之病毒抗原，以及中和抗體之證明方法等。然而兔化豬瘟病毒，仍不能以END法又不以干涉等法定量病毒。

Mengeling等⁽⁴⁰⁾及Lin^(29,30,31)曾報告以組織培養螢光抗體法(FACCT 2 Step Method)檢出兔化豬瘟病毒。Shimizu等^(43,44)發現豬腎臟株化細胞PK-2a可以持續感染豬瘟弱性病毒，然此病毒並可干涉豬瘟強毒。而Shimizu等⁽⁴³⁾還發現到豬瘟病毒LOM株存有既不以END又不以干涉法檢出之Clone，此Clone已被證明可以干涉豬瘟病毒，基於此種原理，林等⁽³¹⁾、Liu⁽³⁵⁾曾報告，接種兔化豬瘟病毒LPC-China株之ST細胞，於第5日以 10^3 TCID₅₀/ml倍數GPE⁻病毒之接種干涉，再於3日後復以 10^3 TCID₅₀/ml倍數之WEE病毒攻毒時，開發所謂E⁻二段干涉之病毒檢出方法。

上述前後被開發，對豬瘟病毒試管內定量之END干涉以及E⁻二段干涉法，均使用ST初代細胞為供試材料。然Komaniwa等⁽¹⁵⁾則報告，以豬腎臟由來之CPK株化細胞，以END法測定豬瘟病毒成功。著者^(52,53)則將豬腎臟由來之SK-H及CPK株細胞，檢討以END、干涉以及E⁻二段干涉法等法，檢討兔化豬瘟病毒LPC-China株及RK-LPC株之病毒定量。結果證實豬腎臟細胞由來之SK-H及CPK株細胞均可以代替ST初代細胞之病毒檢出，並可解決由於ST細胞材料採取及培養操作等不便之諸種問題。同時亦得悉LPC-China株病毒之定量，以SK-H株化細胞之敏感性較CPK株細胞為高。

(二)有關兔化豬瘟病毒之組織培養法，Keible等⁽¹³⁾、Lefteriotis等⁽²⁵⁾、Garet等⁽⁹⁾曾報告，家兔腎臟細胞或羊腎臟細胞可以增殖病毒，但Liu⁽³⁵⁾及Lai⁽¹⁹⁾等曾報告RK初代細胞則不易增殖病毒。但SU等⁽⁴⁸⁾曾以ST初代細胞以及RK初代細胞之交互培養，以RK細胞增殖病毒。但著者^(52,43)則以RK初代細胞培養增殖病毒，初代培養7-8日

之病毒價以 SK-H 細胞測定之病毒價為 $10^{3.7}$ TCID₅₀/ml，繼代 10 代之病毒價已達 $10^{5.7}$ TCID₅₀/ml。

(三) 豬瘟強毒 ALD 株病毒雖以 END 法可以檢出，然以干涉法不能測出之事實早已被證實，但豬瘟強毒利用水疱性口炎病毒 (VSV) 干涉之負斑點試驗時，在 10^{-4} 之稀釋倍數呈負斑點陽性，(相片 1)，因此在豬瘟強毒 ALD 株中，認為存有不同性質之複製病毒。

從來在台灣使用之 LPC-China 株，係經過家兔 800 代以上之連續繼代，而其病毒已不能以 END 法檢出，但 LPC-China 株病毒，只通過一代之 ST、RK 或其他細胞之培養，即又再出現 END 陽性病毒，Liu⁽³⁵⁾、楊⁽⁵²⁾、橋口⁽¹¹⁾ 等曾報告，且強調如以組織培養馴化，製作弱病原性之豬瘟病毒時，因混有性狀變異之病毒，故須行純系複製之必要。Shimizu 等⁽⁴⁵⁾ 報告，以 END 法檢出純系複製之病原性，較 END 陰性病毒之病原性為高。因此以 RK

細胞馴化之 RK-LPC 株豬瘟病毒，必須經過複製，分離純狀性質之病毒，詳行檢討其性狀後，始能供為組織培養疫苗製造之毒株。

誌 謝

本研究之完成，謹向賜給研究機會之麻布大學學長越智勇一博士，同獸醫學部教授清水武彥博士，農林省家畜衛生試驗場場長佐澤弘士博士、化學及血清療法研究所長六反田藤吉博士，株式會社化學及血清療法金澤昇氏。台灣省家畜衛生試驗所前任所長陳守仕博士，邱仕炎氏及傅祖慧博士，同藥品檢定系主任詹益波氏等表最高謝忱。

惠賜校閱本報告之麻布大學大學院教授板垣博博士，同大學田中享一博士。協助試驗之日本農林水產省家畜衛生試驗場，福所秋雄博士，清水實嗣博士，省家畜衛生試驗所劉敏主及彭衍初先生等，謹表謝忱。

参考文献

1. Aynaud, J.M. and Asso, J. (1970) : La souche lapinisée dite [chinoise] du virus de la peste porcine classique. *Rec. Méd. Vét.*, 146, 119-139.
2. Baker, J.A. (1946) : Serial passage of hog cholera virus in rabbits. *Proc. Soc. expl. Biol. Med.*, 63, 183-187.
3. Barth, R., Dickel, H., Hirschert, R., Jaeger, O., Schneider, B. und Steinhoff, H. (1976) : Zur Wirksamkeitsprüfung von lapinisierten Schweinepestlebendvaccinen. *Zbl. Vet.-Med.*, B23, 840-853.
4. Carbrey, E.A., Stewart, W.C., Kresse, J.I. and Lee, L.R. (1965) : Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique. *Proc. 69th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Ass.*, 487-500.
5. Cheng, S.Y. and Lin, T.C. (1953) : Experiments on the lapinized hog cholera virus. *J. Chinese Agr. Ass.*, 2, 37-43.
6. Desmecht, M., Charlier, G., Van Lierde, H. et Leunen, J. (1977) : Contrôle d'activité du vaccin lapinsé de la peste porcine. *Ann. Méd. Vét.*, 121, 567-572.
7. Fukusho, A., Ogawa, N., Yamamoto, H., Sawada, M. and Sazawa, H. (1975) : Interference method with vesicular stomatitis virus for detection of GPE⁻ strain of hog cholera virus. *Ann. Rep. Natl. Vet. Assay Laboratory*, 12, 9-14.
8. Fukusho, A., Ogawa, N., Yamamoto, H., Sawada, M. and Sazawa, H. (1976) : Reverse plaque formation by hog cholera virus of GPE⁻ strain inducing heterologous interference. *Infect. Immun.*, 14, 332-336.
9. Goret, P., Précausta, P. et Perrenot, F. (1971) : Etude d'un virus vaccinal modifié contre la peste porcine classique préparé à partir d'une souche [Chinoise] (CL) adaptée à la culture de cellules rénales d'Angneau. Emploi dans les conditions de la pratique. *Bull. Acad. Vét.*, 44, 257-262.
10. Hanaki, T., Ogawa, N., Kakagawa, H., Sawada, M. and Sazawa, H. (1972) : Antibody response in pigs holding maternal immunity and inoculated with the GPE⁻ strain of attenuated hog cholera virus. *Ann. Rep. Natl. Vet. Assay Laboratory*, 9, 93-96.
11. 橋口裕治 (1961、1962) : 豚コレラ、農林家畜試験場年報4, 25-39.
12. 川島秀雄、佐藤多津雄、花木琢磨 (1957) : 新に発生したニューカッスル病に就いて家畜試研究報告、27, 151-167.
13. Keeble, S.A., Done, T.T. and Darbyshire, J.H. (1966) : Study on an attenuated swine fever vaccine. *Brit. Vet. J.*, 122, 190-195.
14. 黄文池 (1975) : 台湾的猪瘟防治, 家畜家禽衛生, 豐年社編印, 增訂第四版, 201-204.
15. Komaniwa, H., Fukusho, A. and Shimizu, Y. (1981) : Micromethod for performing titration and neutralization test of hog cholera virus using established porcine kidney cell strain. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Jpn.)*, 21, 153-158.
16. Kumagai, T., Shimizu, T. and Matsumoto, M. (1958) : Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture. *Science*, 128, 396.
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. 1. Establishment of standard procedure. *J. Immunol.*, 87, 245 - 256.
18. Kumagai, T., Ikeda, S. and Shimizu, T. (1962): Attenuation of hog cholera virus by serial passage in cultures of swine and bovine testicle cells. *Jap. J. Vet. Sci.*, (Suppl.), 24, 373.
 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, LPG-China strain in various cell cultures. *Taiwan J. Vet. Husbandry*, 37, 1-5.
 20. Langer, P.H. (1963): Development of heterotypic bovine virus diarrhea (BVD) vaccine against hog cholera. *Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass.*, 67, 358-365.
 21. Lee, R.C.-T. (1954): Lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. *Scientific Agri. (Taiwan)*, 2, 4-14.
 22. Lee, R.C.-T. (1954): A preliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. *Chinese-American JCRR, Anim. Indus. Series No. 5*.
 23. Lee, R.C.-T. and Lin, T.T.-C. (1974): Hog cholera research in Taiwan. Summaries of presentations, U.S.-ROC Seminar on Swine Science. November 18-22, 1974.
 24. Lee, R.C.-T. and Lin, T.T.-C. (1976): A potent and safe strain of lapinized hog cholera virus used for hog cholera control in Taiwan. *Proceedings, 1976. I.P.V.S. Congress, H.4*.
 25. Leftheriotis, E., Precausta, P. et Caillere, F. (1971): Etude d'une souche modifiée de virus de la peste porcine adaptée à la culture cellulaire de rein de mouton et son utilisation comme virus-vaccin. *Rec. Med. Vet.*, 122, 33-44.
 26. Lin, T.T.-C., Liu, J.S., Wang, C.C., Chow, M.S. and Lee, H.T. (1958): Studies on potency and post-vaccinal reactions of lapinized hog cholera virus. *Taiwan Vet. Serum Inst. Exp. Rep.*, 2, 10-19.
 27. Lin, T.T.-C., Yang, Y. H. and Chow, M.S. (1958): The duration of virus transfer in urine from pigs vaccinated with lapinized hog cholera virus. *Taiwan Prov. Serum Inst. Exp. Rep.*, 2, 23-24.
 28. Lin, T.T.-C. (1968): Evaluation of the fluorescent antibody cell culture test for detection and titration of hog cholera virus. *Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. for anim. Health*, 5, 1-22.
 29. Lin, T.T.-C., Shieh, C.M., Chen, Y.C., Chen, C.C., Lee, C.S. and Lai, S.S. (1969): The distribution of colostral antibody titers of piglets in taiwan and the relationship between colostral antibody and the immunity acquired from hog cholera live vaccine. *Exp. Rep. Taiwan. Prov. Res. Inst. for Anim. Health*, 6, 11.
 30. Lin, T.T.-C., Shimizu, Y., Kumagai, T. and Sasahara, J. (1969): Pathogenesis of hog cholera virus infection in experimentally infected swine. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 9, 20-27.

31. Lin, T.T. -C. and Lai, S.S. (1970): Detection and titration of lapinized hog cholera virus by means of tissue culture technique. Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. for Anim. Health, 7, 1-12.
32. Lin, T.T. -C., Shieh, C.M., Su, J.F. and Chen, C.C. (1972): Pathogenicity of the hog cholera live vaccine by reverse passage through SPF pigs. Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. for Anim. Health, 9, 1-5.
33. Lin, T.T. -C., Shieh, C.M., Su, J.F. and Cheng, C.S. (1972): Virus excretion from pigs inoculated with the hog cholera live vaccine. Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. for Anim. Health, 15-20.
34. 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.
35. Liu, Y.H. (1976): Properties in tissue cultures of lapinized hog cholera virus and distribution of the virus in the body of infected rabbit. Bull. Azabu Vet. Coll., 31, 103-132.
36. Mengeling, W.L., Gutekunst, D.E., Fernelius, A.L. and Pirtle, E.C. (1963): Demonstration of an antigenic relationship between hog cholera and bovine viral diarrhea viruses by immunofluorescence. Can. J. Comp. Vet. Sci., 27, 162-164.
37. Mengeling, W.L., Pirtle, E. C. and Torrey, J.P. (1963): Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence. Can. J. Comp. Vet. Sci., 27, 246-252.
38. Mengeling, W.L. (1964): Field evaluation of the fluorescent-antibody tissue cultures test for diagnosis of hog cholera. Proc. Book., 10 1st Ann. Meet. Amer. Vet. Med. Ass., 274-275.
39. Mengeling, W.L. and Torrey, J.P. (1965): The diagnosis of hog cholera by the fluorescent-antibody technique. Rep. FAO/OIE Intern. Meet. Hog cholera and African swine fever. Italy, May 31-June 5.
40. Mengeling, W.L. and Torrey, J.P. (1967): Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for hog cholera diagnosis. Amer. J. Vet. Res., 28, 1653-1659.
41. Precausta, P., Kato, F., Brun, A. et Marcon, Ch. (1977): Peste porcine classique duree de l'immunité conferee par la souche chinoise CL. Rec. Med. Vet., 128, 653-660.
42. 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.
43. 清水悠紀臣, 古内進, 熊谷哲夫, 笹原二郎 (1968): 弱毒豚コレラウイルス LOM 株の 2.3 の性状, 日本獣医学雑誌, 附録, 30, 162.
44. Shimizu, Y., Furuuchi, S., Hayashi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J. (1969): Porcine Kidney cell line persistently contaminated with avirulent swine fever virus. J. Gen. Virol., 4, 625-628.
45. Shimizu, Y., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J. (1970): A mutant of hog cholera virus inducing

- interference in swine testicle cell culture. Amer. J. Vet. Res., 31, 1787-1794.
46. Solorzano, R.F. (1962): An in vitro test for hog cholera. Ph. D. thesis, Pennsylvania State University, University, park.
47. Stair, E.L., Rhodes, M. S., Grace, O. D. and Aiken, J.M. (1964): Fluorescent antibody for diagnosis of hog cholera. Proc. 67th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Ass., 559-606.
48. Su, J.F. and Lin, T.T.-C. (1971): Adaptation of lapinized hog cholera virus in rabbit kidney cell culture by passing through the bridging cell and swine testis cell. Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. for anim. Health, 8, 11-17.
49. Teebken, D.L., Aiken, J.M. and Twiehaus, M. J. (1967): Differentiation of virulent, attenuated and inactivated hog cholera viruses by immunofluorescent-antibody technique. J. Amer. Vet. Med. Ass., 150, 53-58.
50. Terpstra, C. and Robijns, K.G. (1976): Experience with regional vaccination against swine fever in enzootic areas for limited periods using C-strain virus. Agr. Res. Seminar, Hog cholera / Classical swine fever and African swine fever, Hannover, Germany, Europ., 5904, 106-112.
51. Terpstra, C. and Tielen, M. J. M. (1976): Antibody response against swine fever following vaccination with C-strain virus. Zbl. Vet.-Med., B23, 809-821.
52. 楊喜金 (1981): 兔化豬瘟病毒性狀之研究; 第一報, 豬腎由來
瘟病毒之試管定量應用。七十年
度台灣省畜牧獸醫學會宣讀論
文摘要。
53. 楊喜金 (1981): 兔化豬瘟病毒性狀之研究; 第二報。家兔腎細胞馴化兔化豬瘟病毒之性狀, 七十年台灣省畜牧獸醫學會宣讀論文摘要。

**Studies on the Viral Properties of Passaged - Lapinized
Hog Cholera Virus (RK-LPC) in Rabbit Kidney Cells**

1. *Detection of HC LPC - China Strain Virus with SK Cell
Line and its Propagation in Cultured RK Cell*

YANG, S.C.,¹ TABUCHI, K.² and SHIMIZU, Y.³

1. Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health
2. School of the Veterinary Medicine, Azabu University, Japan
3. National Institute of Animal Health, Japan

SUMMARY

To develop live cell culture HC virus vaccine, rabbit cell passage of Lapinized Hog Cholera (HC) virus (HC RK-LPC) was used. Detection and assay of the LPC virus by means of the two step E⁻ interference method with swine kidney cell line SK-H and its clone CPK strain were studied. The results are as follows:

The sensitivities of ST primary cells, SK-H and CPK swine kidney cell lines in growing LPC virus were compared using Viral titers. The SK-H cell line was found to be the most sensitive.

The HC LPC-China virus can grow and propagate in RK cells. The viral titers in primary cells are higher than in secondary cells, and also higher than directly cultured Kidney and testical cell from rabbits inoculated with LPC-China virus.

The virus growth curve in LPC virus inoculated rabbit was studied by comparing the growth in tissue emulsion with the 5th and 10th passages of RK-LPC virus. The peak viral titers were $10^{3.7}$ TCID₅₀/ml in tissue emulsion (on the 6th day after incubation), $10^{5.3}$ TCID₅₀/ml in the 5th RK-LPC passage (on the 5th day of incubation) and $10^{5.7}$ TCID₅₀/ml in the 10th RK-LPC passage (on the 4th day of incubation).

The original tissue emulsion (spleen and lymph node) of LPC virus inoculated rabbits was END negative, but was END positive after only one passage in RK and ST cells or other kinds of cells. The END virus growth curve using the two step E⁻ interference virus was the same as mentioned above. Thus the viral titers also increase following the addition of passage number.

On the other hand when LPC-China 820th, RK-LPC 18th and the field isolated Kanagawa/1974 viruses were inoculated into the CPK cell line and challenged by the vesicular stomatitis virus, the reverse plaque formation was

negative. However the reverse plaque formation was positive using the control viruses HC A₇₆ and HC attenuated GPE⁻ virus. Thus the virulent Hog cholera A₇₆ strain may contain more than one strain of virus.