

# 家兔腎臟培養細胞馴化兔化豬瘟毒 (PK-LPC) 之性狀研究

## 2. 馴化毒之病原性及免疫性

楊喜金<sup>1</sup> 田淵清<sup>2</sup> 清水悠紀臣<sup>3</sup>

### 摘 要

家兔腎細胞馴化豬瘟毒 (RK-LPC) 接種家兔之熱型，於病毒接種後 70 小時開始上升，其熱型較接種 LPC-China 株者稍低，發熱時間亦稍遲。試豬病毒接種後之體溫、白血球數均為正常，病毒血症、中性白血球之核左轉為陰性，經豬瘟強毒攻毒後之體溫亦無上升。

RK-LPC 毒於試豬體內之病毒分佈，與 LPC-China 株毒相似，則於接種 4 日後，主在扁桃腺、脾臟及各淋巴節中出現。本病毒接種豬隻之排毒為陰性，病毒血症亦為陰性。

RK-LPC 毒與豬瘟強毒 76 株、慢性豬瘟毒神奈川 / 1974 株、弱毒 GPE<sup>-</sup> 株、LPC-China 株、及牛病毒性傳染性下痢 T 20-5 株等毒之交叉中和免疫反應成立，交叉中和抗體價高，各株互相間之病原性無差異。

本病毒對豬隻之防禦價約為  $10^{-3}$ ，其力價尚不高。本病毒對於移行抗體  $\geq 1:16$  以上豬隻之免疫，其抗體之產生不良。供試豬隻於病毒接種後 5 日，可耐過豬瘟強毒之攻毒。

### 緒 言

在台灣，豬瘟疫苗之使用，隨著時代的進

步，有多種之改變。最早於公元 1929 年前曾使用過 Terakado<sup>(23)</sup> 之蟻醛臟器不活化疫苗，該疫苗之安全性雖佳，惟其免疫效果，尚存許多疑問。故於 1947 年以後全面又改用由 Cale 及 Mc Bryde 改良之結晶紫不活化<sup>(4,16)</sup>。鄭森淵等<sup>(22)</sup>，報告結晶紫不活化疫苗，李崇道<sup>(5)</sup> 等報告結晶紫乙二醇疫苗之效力，雖可在實驗室中證明免疫性，而實際在野外應用結果得悉，產生免疫之期間長，免疫持續期間短，未能獲得充分免疫性為其缺點，致使對台灣豬瘟之防疫，仍無法獲得良好控制<sup>(5,7)</sup>。

基於上述原因，1952 年 12 月紐森博士及李崇道博士<sup>(7)</sup> 從菲律賓獸醫研究所引進兔化豬瘟病毒，繼續以臺灣家兔繼代減毒，此毒命名為 LPC 或 LPC-China 株<sup>(13)</sup>，此兔化豬瘟毒 LPC-China 株，係由美國 Lederle 公司以家兔繼代 200 代之 Rovac 株分讓於該所，引進台灣之種毒，係已在菲律賓繼代至約 250 代者。

兔化豬瘟毒引進台灣後，以台灣家兔從第 1 代起開始繼代，有關病毒性狀，首由鄭森淵<sup>(1)</sup> 檢討，結果認為接種家兔臟器乳劑對豬之防禦價為：脾臟為  $10^5$  / g 以上，淋巴節為 1:5000 以上，肝及血液為 1:500 以上。

其後有關兔化豬瘟病毒之性狀，曾經一系列之試驗及研究。對於排毒之問題，林再春等<sup>(8)</sup> 報告，在台灣繼代第 111 代毒之接種豬仍

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

有排毒，第 814 代之排毒及同居感染已為陰性<sup>(12)</sup>。然對於病毒之復歸，李崇道等<sup>(6)</sup>等報告，第 97 代毒接種豬隻，仍證明病毒之復歸，林再春等<sup>(12)</sup>則報告，第 814 代毒對接種豬隻之復歸已為陰性。

兔化豬瘟毒自從 1953 年至 1958 年間，經多年地域性水劑疫苗之田間試驗<sup>(4)</sup>，對本疫苗之安全性及免疫性，所獲評價甚高，而從 1958 年以後，台灣全面改用冷凍乾燥疫苗以來，豬瘟發生率至民國 54 年（1965 年）起已降為 0.02%<sup>(24,25)</sup>。

由於生物科技之不斷進步，過去許多以接種動物為製造之活性疫苗，已逐漸改以組織培養方法製造。筆者等基於此，曾以兔化豬瘟毒試以家兔腎細胞之馴化<sup>(26,27)</sup>，就其馴化毒（RK-LPC）之病原性與免疫性等之基礎性狀，進行試驗。

## 材料及試驗方法

### 一、病毒株

1 豬瘟病毒；如第一報所述

- (1) ALD 及 A76
- (2) GPE<sup>-</sup> 株
- (3) LPC - China 株
- (4) RK - LPC 株
- (5) 神奈川 / 1974 株：

供交叉中和試驗用之神奈川 / 1974 株毒係於 1974 年，於日本神奈川縣下，從疑豬瘟病例豬分離之病毒，對於牛病毒性下痢 - 粘膜病毒 T20 - 5 株之抗體呈反應，且其交叉免疫高，屬於豬瘟病毒 B 亞群之病毒<sup>(3,21)</sup>。

本病毒接種於豬隻，其經過雖因豬隻之個體差而異，但多呈亞急性及慢性經過，亦有恢復及不顯性經過者。供本試驗之病毒，係從野外發病豬脾臟及扁桃腺乳劑，接種於豬精巢初代細胞，或 PK - 15 株細胞後分離，再經過豬精巢細胞繼代 5 代，其以豬精巢細胞所測得之病毒價為  $10^5$  TCID<sub>50</sub> / ml。

2 牛病毒性下痢症粘膜病病毒（BVD T20 - 5）：

供中和抗體交差試驗之牛病毒性下痢症粘膜病病毒（Bovine Viral diarrhoea - mucos-

al disease complex），係為日本農林水產省家畜衛生試驗場所保存之 BVD T20 - 5 株，本病毒係從呈現呼吸狀及下痢斃死牛材料中所分離者<sup>(3)</sup>。本病毒對牛精巢初代細胞（BT）及牛腎臟初代培養細胞（BK），呈細胞變性效果（CPE）。

本試驗之供試病毒，係經 BK 細胞繼代 5 代，以 BK 初代細胞所測得之病毒力價為  $10^5$  TCID<sub>50</sub> / ml。

3 新城雞瘟病毒：如第一報所述

- (1) 宮寺株
- (2) TCND 株

### 二、培養細胞

1 豬由來細胞；如第一報所述

- (1) 豬精巢細胞
- (2) SK - H 株細胞
- (3) CPK 株細胞

2 家兔由來細胞；如第一報所述

- (1) 家兔腎細胞
- (2) 家兔精巢細胞

### 三、實驗動物

1 家兔；如第一報所述

2 山羊

在日本市面所購山羊 BVD 抗體陰性，供為豬瘟病毒組織培養之血清，及牛病毒性下痢粘膜病病毒免疫血清之免疫。

3 豬

在日本及在台灣糖業公司畜產試驗所購入無接種豬瘟疫苗之 8 週齡三品種豬瘟中和抗體陰性仔豬。購入後之仔豬，經一週之觀察及供為 LPC - China RK - LPC 株之效力試驗，以及病毒體內分佈試驗之用。

### 四、試驗方法

1 家兔之接種試驗：

家兔之接種試驗，以兔化豬瘟病毒第 820 代繼代家兔之脾臟及腸間膜淋巴節混合乳劑，及 RK - LPC 株繼代 10 代毒，各注射 2 隻家兔耳靜脈，接種家兔每日於一定時間，上下午各測定一次體溫比較熱反應。家兔所接種之病毒倍數為：LPC - China 株第一次以  $10^5$  TCID<sub>50</sub>

/g，第二次以  $2.5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/g。RK-LPC 株第一次以  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml，第二次以  $2.5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml。第一次與第二次注射之間隔為 14 日。

#### 2. 仔豬之接種試驗及繼代：

豬隻之接種試驗及繼代，計有病毒之復歸、接種豬之病毒體內分佈及接種豬之攻毒試驗等，供試豬隻在試驗中，均測定體溫、病毒血症、中和抗體價及計算白血球數等。

病毒接種豬之攻毒試驗，係從接種後 2 至 6 日，每日各選 2 隻接種豬瘟強毒 ALD 株 10,000 MLD 毒血攻毒。而 RK-LPC 病毒在豬體內之增殖試驗，則從病毒接種後第 1 日起至第 10 日，每日各選 2 隻放血後，採取各部臟器，施行病毒分佈測定。供試仔豬各臟器經無菌採取後，以加有 200 ug/ml 之 Penicillin 及 200 ug/ml Streptomycin，50ug/ml Kanamycin 之 Earle's 液製成 1:10 乳劑為原液。然十二指腸、空腸及盲腸等除去腸內容物後，粘膜面以 PBS 洗淨二次，以滅菌濾過紙吸取水分，然後刮取粘膜調製成乳劑。各種臟器乳劑經 3,000 rpm 冷卻離心 15 分鐘，採取上清液分裝於小試管，至使用時一直於  $-80^\circ\text{C}$  處保存。糞便則以 Earle's 液混懸成 1:10 液，經離心後以  $0.4 \mu\text{m}$  之濾過膜過濾，尿液則離心後過濾使用。病毒之復歸試驗，則從第 1 繼代至 10 代，第 1 代接種 RK-LPC 株病毒後第 3 日屠殺 2 隻，採取扁桃腺以 PBS 製成 1:10 乳劑經細菌過濾器過濾後，每代試豬皮下注射 2ml，從第 2 代以後至第 10 代，均以相同方法接種繼代，每代接種豬隻均測定體溫，病毒血症、中和抗體及計算白血球數等。

各臟器之病毒檢出使用 SK-H 株細胞依 Lin<sup>(10)</sup> 之 E<sup>-</sup>二段干涉法測定。即感染臟器乳劑，以 1:10 階段稀釋法稀釋，各稀釋階段乳劑，接種於 5 支 SK-H 株細胞，每支接種 0.1 ml。然後置  $37^\circ\text{C}$  恆溫感作 30 分鐘後，吸棄接種乳劑，以 Earle's 液洗淨，再分注 0.5 ml 之 MEM 增殖培養液 (含 10% 山羊血清或胎牛血清及加入抗生素者)，置  $37^\circ\text{C}$  迴轉培養 5 日。抽棄培養液，各試管接種 5 ml  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml 倍數之 GPE<sup>-</sup> 株毒干涉，置  $37^\circ\text{C}$  中迴轉培養 3 日。然後抽棄培養液，各接種 0.5 ml  $10^3$  TC-

ID<sub>50</sub>/ml 病毒價之 WEE 病毒攻毒，置  $37^\circ\text{C}$  迴轉培養 3 日。然後以鏡檢觀察 CPE 呈現情形。判定之方法為 SK-H 株化細胞呈 CPE 陽性時，則兔化豬瘟病毒為陽性，而依 Behrens Kärber 之方法計算病毒價 (TCID<sub>50</sub>/g 或 TCID<sub>50</sub>/ml)。

豬之繼代試驗如下述方法施行，即以 RK-LPC 株 28 代繼代  $10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub>/ml 濃度病毒，皮下注射約 8 週齡仔豬，並於接種後 3 日撲殺，採取扁桃腺，以 Earle's 液製成 1:10 乳劑經 3,000 r.p.m. 離心 15 分鐘所取之上清液以  $0.45 \mu\text{m}$  之 milipore 過濾膜過濾，濾液 2 ml 接種於次代。試豬接種後第 3 日以相同方法一直繼代至第 10 代，每代接種豬均對體溫、白血球數、白血球像以及尿液之排毒等，施行詳細之試驗。

#### 3. 高度免疫血清之製作及交叉中和試驗：

##### (1) 高度免疫血清：

##### ① 抗豬瘟毒 A76 株病毒山羊免疫血清：

以豬瘟 A76 株， $10^{4.0} \sim 10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 倍病毒液之山羊肌肉內注射，其後於 4 週之間隔，重複免疫 3~4 次。最終免疫後第 14 日經頸動脈放血，分離血清經  $56^\circ\text{C}$  30 分鐘之非働化後，分裝於小試管，至使用時一直保存於  $-20^\circ\text{C}$  處。

##### ② 抗豬瘟毒 GPE<sup>-</sup> 株病毒山羊免疫血清：

以豬瘟 GPE<sup>-</sup> 株  $10^{4.0} \sim 10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 倍病毒液之山羊肌肉內注射，其後於 4 週之間隔，重複免疫 3~4 次。最終免疫後第 14 日經頸動脈放血，分離血清經  $56^\circ\text{C}$  30 分鐘非働化後，分裝於小試管，至使用時一直保存於  $-20^\circ\text{C}$  處。

##### ③ 抗兔化豬瘟 LPC-China 株病毒家兔免疫血清：

以豬瘟病毒 LPC-China 株， $10^5$  TCID<sub>50</sub>/g 倍病毒之脾臟及腸間膜淋巴節混合乳劑，各注射於 2 隻家兔耳靜脈，15 日後再以  $2 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/g 倍之相同病毒行耳靜脈免疫 (參照圖 1)，第二次注射後第 15 日，免疫家兔經心臟採血，分離之混合血清，經  $56^\circ\text{C}$  30 分鐘之非働化後，分裝於小試管，一直保存於  $-20^\circ\text{C}$  處。

##### ④ 抗兔化豬瘟病毒家兔腎臟培養細胞馴

化毒 (RK-LPC) 家兔免疫血清：  
以豬瘟病毒 RK-LPC 株， $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> /ml 倍病毒液，各注射於 2 隻家兔耳靜脈，15 日後再以  $2.5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> /ml 之相同病毒行耳靜脈免疫 (參照圖 1)，第二次注射後第 15 日，免疫家兔經心臟採血，分離之混合血清，經  $56^\circ\text{C}$  30 分鐘之非酶化後分裝於小試管，至使用時一直保存於  $-20^\circ\text{C}$  處。

⑤ 抗牛傳染性下痢 (BVD) T20-5 株病毒山羊免疫血清：

以 BVD 病毒 T20-5 株  $10^4 \sim 10^5$  TCID<sub>50</sub> /ml 倍病毒液之山羊筋肉內注射，其後於 4 週之間隔重複免疫 3-4 次，最終注射後第 14 日，免疫山羊經頸動脈放血，分離血清經  $56^\circ\text{C}$  30 分鐘之非酶化後，分裝於小試管，至使用時一直保存於  $-20^\circ\text{C}$  處。

(2) 交叉中和試驗

豬瘟 A76 株中和力價之測定，係依 Shimizu 等<sup>(19)</sup> 之 END 中和抗體試驗方法為準；豬瘟 GPE<sup>-</sup> 株病毒中和力價之測定，係依 Shimizu 等<sup>(20)</sup> 以 WEE 病毒之干涉法為準；豬瘟 LPC-China 及 RK-LPC 株病毒力價之測定，係依 Lin 等<sup>(10)</sup> 及 Liu<sup>(15)</sup> 等之 E<sup>-</sup> 二段干涉法為準；牛病毒性傳染性下痢粘膜炎病毒 T20-5 株毒中和抗體價之測定，係使用細胞之直接法測定。

中和試驗係以被檢血清施行 1:2 階段法稀釋後，各稀釋倍數血清，加入等量上述  $100$  TCID<sub>50</sub> /ml 倍之病毒混合，置  $37^\circ\text{C}$  恆溫器內感作中和 60 分鐘，取感作之中和液分注於 2 支小試管，每試管分注 0.1 ml，然後再加入細胞浮游液，如使用單層細胞測定者，則將感作中和液 0.1 ml，分注於發育細胞，置  $37^\circ\text{C}$  恆溫器內感作 30-60 分鐘後，分注 0.4 ml 維持培養液，置  $37^\circ\text{C}$  恆溫器內培養 4 日。本項試驗如以 END 法施行時則使用 CPK 株細胞，倘以干涉法及 E<sup>-</sup> 二段干涉法則使用 SK-H 株細胞。上述各項試驗之培養細胞，培養至第 4 日抽棄培養液，END 法則分注  $10^{6.0}$  PFU/ml 倍新城雞瘟病毒液 0.5 ml 攻毒。干涉法則以  $10^3$  TCID<sub>50</sub> /ml 倍西部馬腦脊髓炎病毒 0.5 ml 攻毒，E<sup>-</sup> 二段干涉法除另以  $10^3$  TCID<sub>50</sub> /ml 倍豬瘟弱毒 GPE<sup>-</sup> 株病毒液 0.5 ml 干涉

，置  $37^\circ\text{C}$  培養 3 日外，第 3 日後抽棄培養液，再以  $10^3$  TCID<sub>50</sub> /ml 倍西部馬腦炎病毒液 0.5 ml 攻毒。以上各項試驗經攻毒後置  $37^\circ\text{C}$  迴轉培養 3 日，最後以顯微鏡檢查是否呈 CPE 變性效果而判定。結果 END 法如 CPE 陰性，干涉法 CPE 陽性，E<sup>-</sup> 二段干涉法 CPE 陰性時，為抗體陽性。BVD T20-5 株病毒之中和試驗，如 CPE 陰性時，則判定抗體陽性。

## 試驗成績

### 一、接種家兔之熱反應

LPC-China 株第 820 代毒及 RK-LPC 株第 10 代毒，接種於家兔耳靜脈之熱反應，試驗結果如圖 1。

依圖 1 比較成績所示，LPC-China 病毒之接種家兔，於接種 70 小時以後體溫即上升至  $40^\circ\text{C}$  以上，然經稽留 30-40 小時以後即稍稍下降，然後一直稽留至第 7 日。至 15 日後再接種病毒時，第 8 日後體溫稍為上升，其後恢復為常溫。RK-LPC 株接種家兔之體溫乃呈一過性之上升，其熱型較 LPC-China 株病毒接種家兔稍低，病毒接種 4 日後，體溫一旦下降，但在第 5 日稍見微升，繼續至第 7 日仍有熱之稽留。

### 二、接種豬隻之反應

以 LPC-China 株第 820 代毒  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> /g 及 RK-LPC 株第 15 代毒  $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> /ml 各接種仔豬一頭，第 11 日以豬瘟強毒 ALD 株 1:10 毒血 5 ml (約 50,000 MLD) 皮下注射攻毒，試驗結果示如圖 2。

依圖 2 成績所示，供試豬隻病毒接種以及攻毒期之熱型均無上升，白血球數則 LPC-China 株接種豬於病毒接種後第 5 日時突減低外，其均無呈下降情形，病毒血症則為陰性。

### 三、豬隻體內之病毒增殖

茲為明瞭 RK-LPC 株病毒在豬體內之增殖情形，以  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub> /ml RK-LPC 株 28 代毒各 2 ml 皮下接種於 8 週齡仔豬 20 隻，供試仔豬接種病毒後，每日各殺 2 頭，經無菌

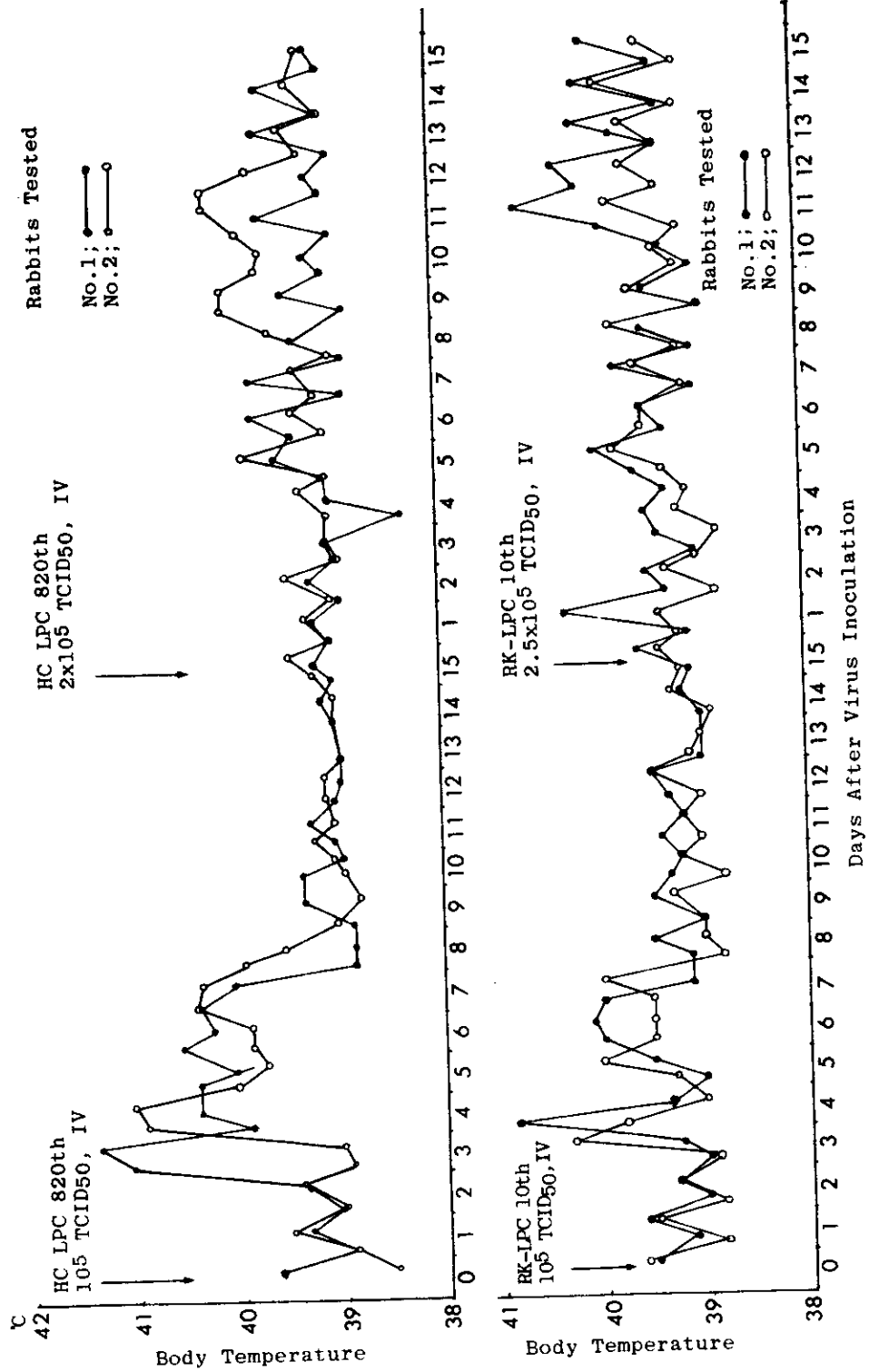
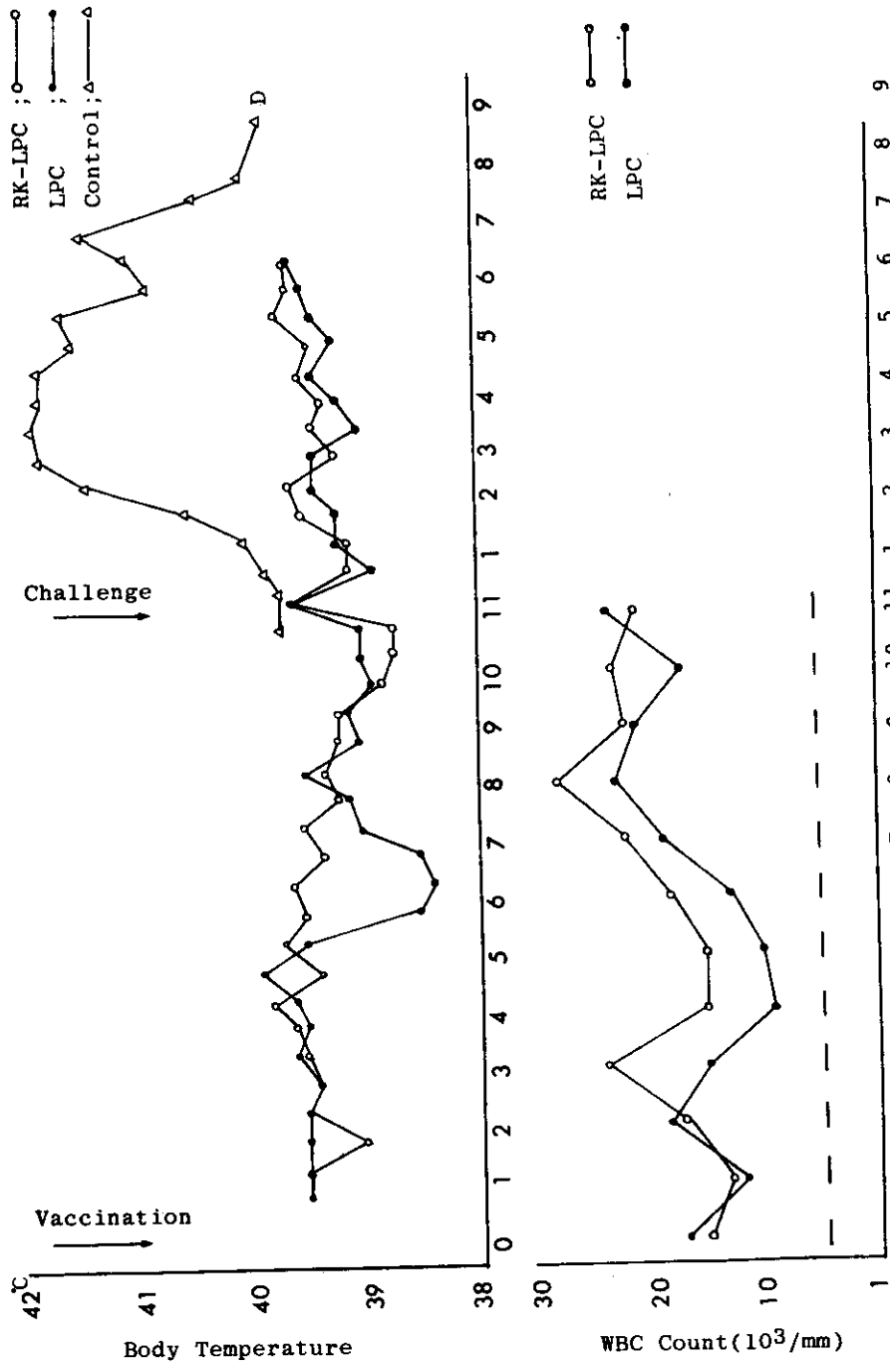


Figure 1. Pyretic Response in the Rabbits Inoculated with Hog Cholera LPC and RK-LPC Viruses.



Days After Vaccination  
 Days After Challenge  
 Figure 2. Pyretic Response and White Blood Cell Count in the Pigs Inoculated with Hog Cholera LPC and RK-LPC Viruses. Vaccinated viruses: LPC; 10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub> of the spleen emulsion of rabbit 820-passaged, RK-LPC; 10<sup>5.5</sup> TCID<sub>50</sub> virus 28-passaged with RK cells. -: Negative of viremia. D: Dipped by Challenge.

採取體內各種臟器、血清、糞便及尿液等21種供試材料，以SK-H株化細胞依E<sup>-</sup>二段干涉法測定病毒價，病毒在體內之分佈情形，試驗結果示如圖3。

如圖3成績所示，供試豬於1-3日內屠殺者，所有供試臟器均未能以E<sup>-</sup>二段干涉法檢出病毒，第4日以後已在扁桃腺、耳下腺、顎下腺、腸間膜淋巴腺及鼠蹊淋巴腺等證明病毒，全例供試豬之扁桃腺從4日至第10日之間，均測出病毒，而所示之最高力價為 $10^3$  TC-ID<sub>50</sub>/g，所有供試豬之體溫，食慾為正常，白血球減少症及核之轉等均為陰性。

#### 四、豬之繼代試驗

以RK-LPC株第28代毒， $10^{5.9}$ TCID<sub>50</sub>/ml皮下注射於8週齡仔豬，於3日間隔採取扁桃腺，再行繼代接種。

供試豬隻經病毒注射後對白血球數、白血球像及尿中病毒排泄等，均詳行測定試驗，試驗所得成績述如圖4。

依圖4成績所示，供試豬隻之體溫、食慾均為正常。血液像並無呈核之左轉及尿中病毒排毒均為陰性。白血球數從第5代以後發現稍為減少，除第9代以外，則無發現顯著之減少變化。

#### 五、中和交叉試驗

茲為探討，RK-LPC株病毒與已知之豬瘟病毒，如A76株、野外分離Kanagawa/74株、LPC-China株、及牛病毒性下痢粘膜病毒T20-5株等高度免疫血清間之交叉試驗，試驗結果述如表1。

如表1成績所述，RK-LPC株與上述已知之豬瘟病毒，及牛病毒性下痢粘膜病毒20-5株間之高度免疫血清，其互相間之交叉中和反應均能成立，無抗原間之差異。

#### 六、中和抗體及感染防禦效果

將RK-LPC株第20代繼代毒以PBS稀釋成 $1.0^{-1} \sim 1.0^{-6}$ ，各稀釋階段之病毒各皮下注射8週齡仔豬，每隻注射2ml。注射後第14日，各以ALD株強毒10,000MLD毒血攻毒，供試豬於試前、注射後1.2及攻毒後1.2

週採血測定中和抗體，試驗結果述如表2。

如表2成績所述，接種後一週血清中之中和抗體價一般均低，攻毒前血清之中和抗體呈1:4及以上者均可耐過豬瘟強毒ALD株10,000MLD毒血攻毒，而1:2或以下者則呈重反應而斃死。表2所示RK-LPC株第20代繼代病毒之防禦價為 $10^{-3.6}$ 。

#### 七、移行抗體對於RK-LPC株毒免疫性之影響

以RK-LPC株28代繼代毒 $10^{5.9}$ TCID<sub>50</sub>/ml 2ml皮下注射於移行抗體陽性仔豬，而探討其免疫性。

移行抗體在1:4以下之試豬，於病毒接種後第2週，則可證明到抗體之上昇，移行抗體在1:8~1:16者，於4-5週後始認為有抗體之上昇，1:32之仔豬則無抗體之上昇，其後中和抗體可維持在18週以上。

#### 八、RK-LPC株毒接種豬之攻毒試驗

RK-LPC株第28代繼代毒，及LPC-China株第820代繼代1:10脾臟乳劑2ml各注射10隻仔豬皮下，然後各10隻分為5組，每組2隻，病毒注射後從2-5日，每日各選一組以豬瘟強毒ALD株10,000MLD毒血攻毒，供試豬隻試驗中每日測定體溫，觀察白血球變化分類，白血球數之計算及病毒血症之檢查等，試驗結果示如圖5-9及表3。

依圖5-9及表3成績所示，LPC-China株毒之供試豬隻，第2日攻毒者全呈重反應而斃死，第3日攻毒者，重反應及輕反應各一隻，第4-5日攻毒者除各一頭輕反應後均生存，第6日者全無反應健存。RK-LPC株毒第2-3日攻毒者，全呈重反應後斃死，第4日攻毒者一隻斃死，一隻重反應後耐過，第5-6日者無反應而耐過。以上兩病毒之供試豬隻，攻毒前之病毒血症及白血球減少等均為陰性。

## 討 論

家兔腎臟細胞馴化28代之RK-LPC株對仔豬之防禦價尚不很高，此種情形認為將與繼

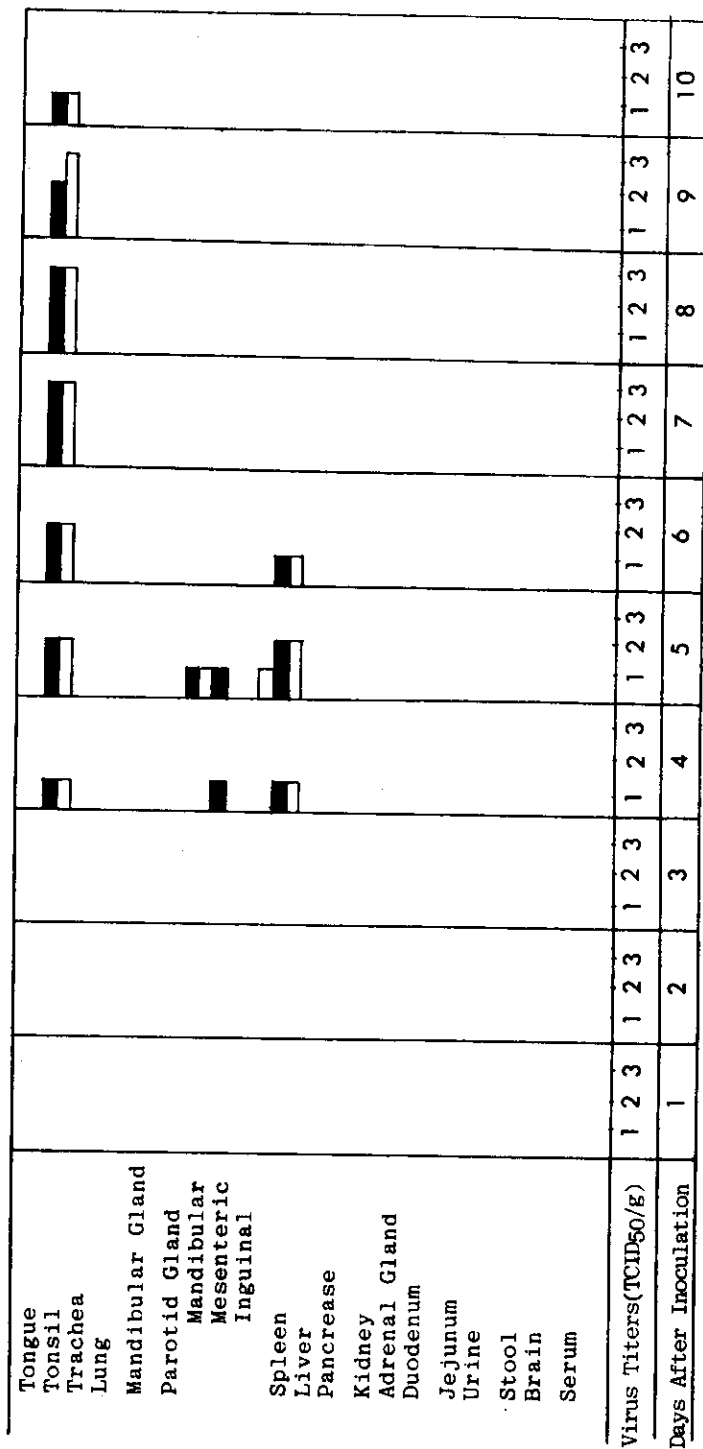


Figure 3. Viral Multiplication in the Organs of Pigs Inoculated with the Hog Cholera RK-LPC Virus 28—Passed with Rabbit Kidney Cells. Two pigs, differentiated with both squares, were investigated every day after the vaccination.



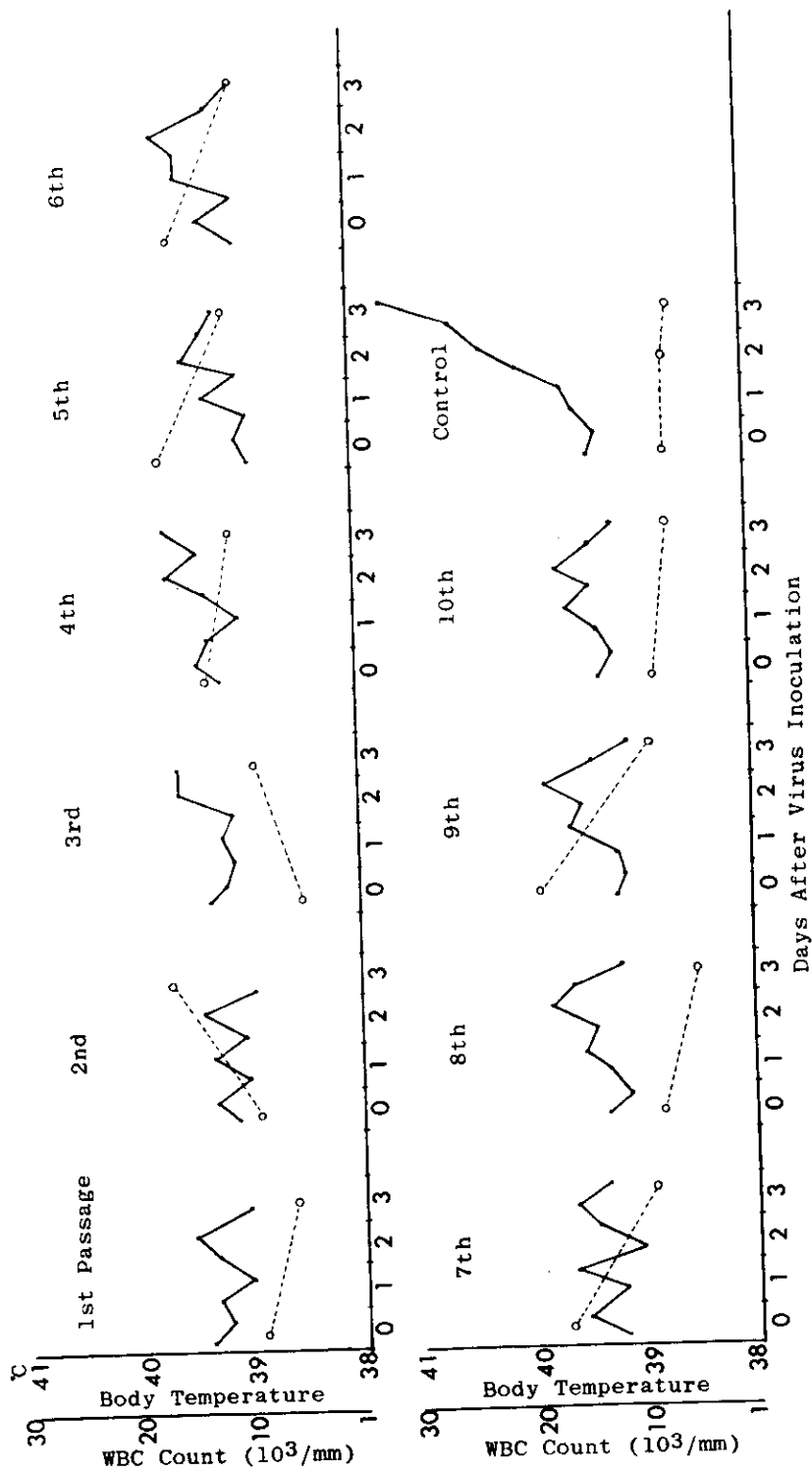


Figure 4. Pyretic Response and White Blood Cell Count in the Pigs Inoculated with the Hog Cholera LPC Viruses Serially Passaged with Rabbit Kidney Cells. —; Body temperature, ····; WBC count.

Table 1  
 Cross Neutralization Test for the Hog Cholera RK-LPC Virus<sup>1)</sup>  
 Using Antisera of Different HC Viruses and Bovine Viral  
 Diarrhea Virus.

Virus Strain	Antiserum			
	A 76 <sup>2)</sup>	LPC <sup>3)</sup>	RK-LPC- <sub>10</sub> <sup>3)</sup>	BVD;T20-5 <sup>2)</sup>
A 76	1:2,048 <sup>4)</sup>	1:1,024	1:1,024	1:128
LPC	1:4,096	1:4,096	1:2,048	1:2,048
RK-LPC- <sub>10</sub>	1:1,024	1:1,024	1:1,024	1:2,048
RK-LPC-12	1:1,024	1:1,024	1:1,024	1:2,048
Kanagawa/'74	1:128	1:1,024	1:1,024	1:8,192
BVD;T20-5	1: 1	1:2,048	1:2,048	1:4,096

- Notes: 1) Ten and 15-passaged with rabbit kidney cells.  
 2) Produced in goats.  
 3) Produced in rabbits.  
 4) Indicated neutralizing antibody titers.

Table 2.  
Immune Response and Challenge Tests in the Piglets Vaccinated with  
Different Virus Doses of the Hog Cholera RK-LPC Virus.

Relative Dose 1) of Virus	Titers of Serum Neutralizing Antibody					Results after Challenge <sup>2)</sup>
	Pre- Vaccination	Weeks after Vaccination		Weeks after Challenge		
		1	2	1	2	
10 <sup>-2</sup>	1:4	1:2	1:8	1:8	1:32	Survived
	1:2	1:2	1:4	1:8	1:32	Survived
10 <sup>-3</sup>	1:2	1:2	1:6	1:8	1:64	Survived
	1:2	1:2	1:8	1:16	1:45	Survived
10 <sup>-4</sup>	1:2	1:2	1:4	1:8	1:64	Survived
	1:2	1:2	1:4	+++ 3)	D <sub>11</sub> <sup>3)</sup>	Died
10 <sup>-5</sup>	1:2	1:2	1:4	+++	D <sub>9</sub>	Died
	1:2	1:2	1:2	+++	D <sub>10</sub>	Died

Notes: 1) 20-Passaged with rabbit kidney cells,  $2 \times 10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

2) Challenged with 10<sup>4</sup> MLD of ALD strain.

3) Challenge reactions; +++:severe reaction, D:death indicates  
in the days post-challenge.

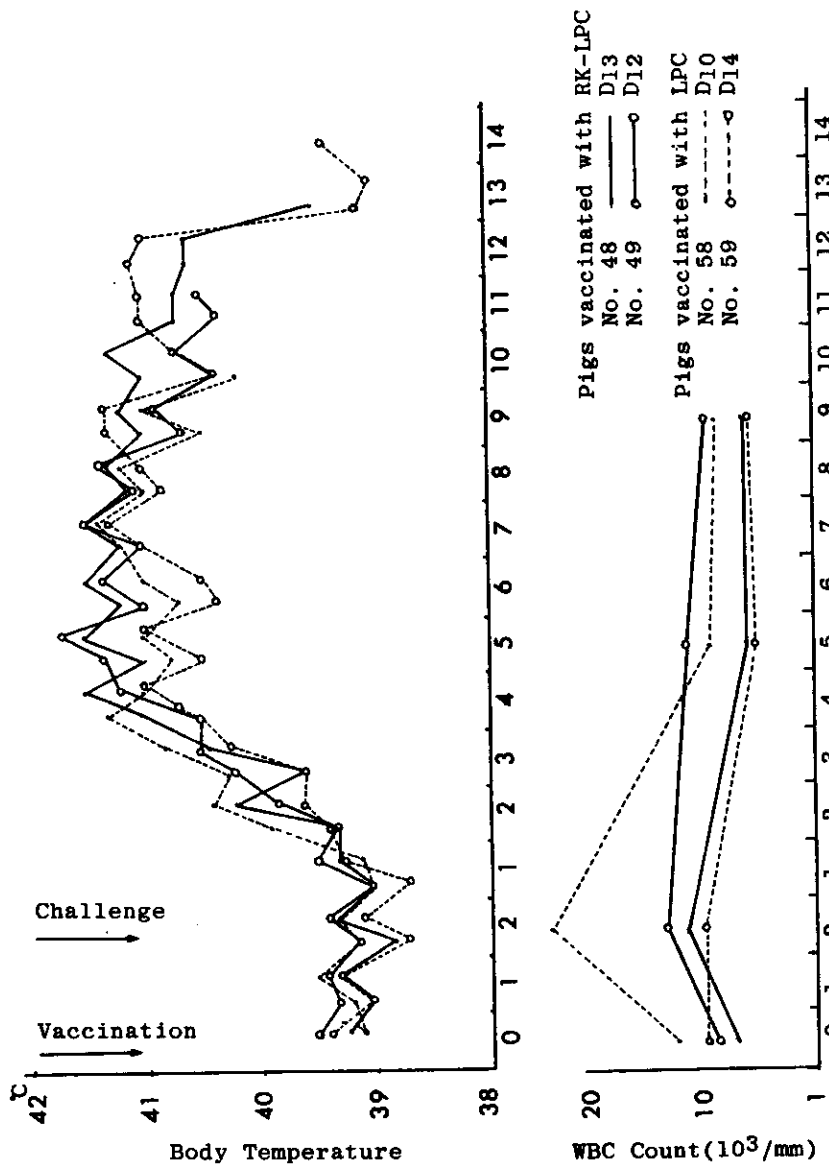


Figure 5. Pyretic Responses and White Blood Cell Counts in the Pigs Vaccinated with the Hog Cholera RK-LPC and LPC Viruses, Challenged 2 Days After the Vaccination: RK-LPC;  $2 \times 10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub> of the 28th RK-passage virus, LPC; The 820th rabbit passage virus (2 ml of 10-fold diluted spleen emulsion), Challenge virus;  $10^4$  MLD of HC ALD strain, D; Died in the indicated days post-challenge.

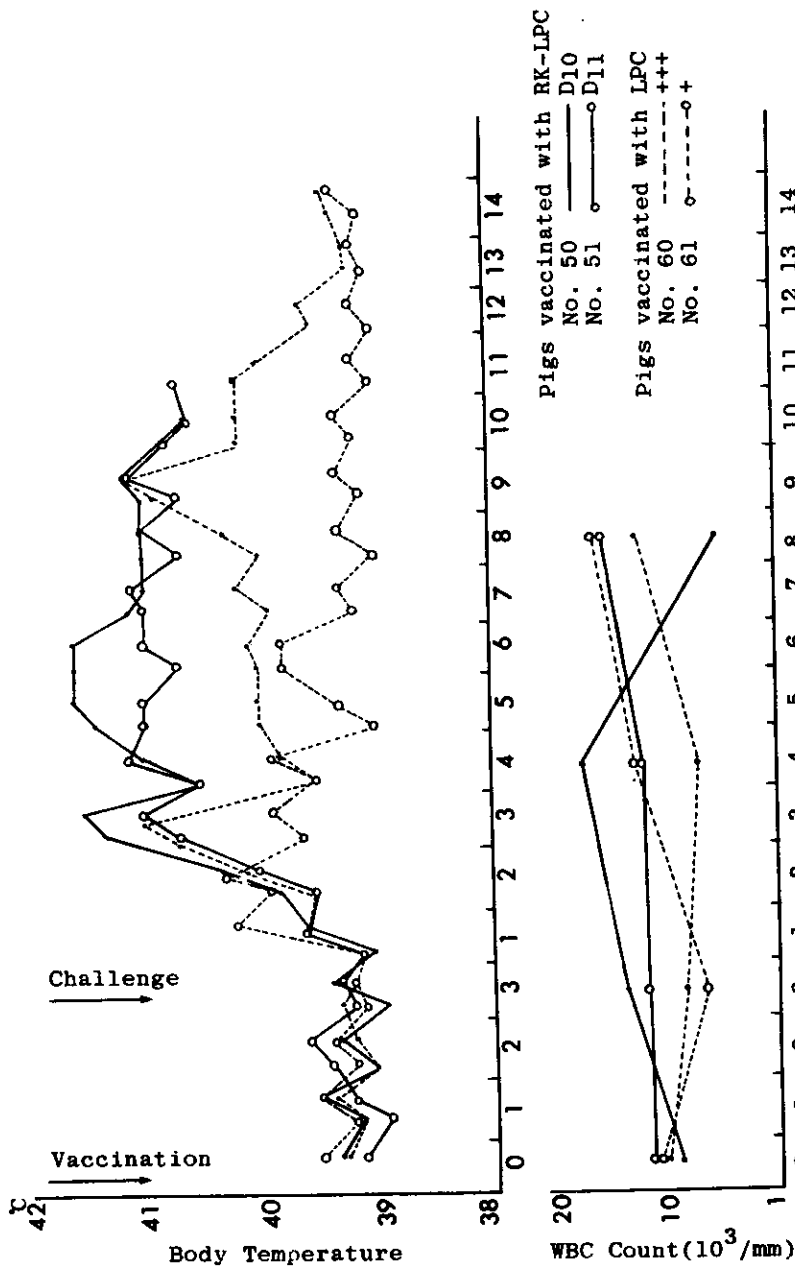


Figure 6. Pyretic Responses and White Blood Cell Counts in the Pigs Vaccinated with the Hog Cholera RK-LPC and LPC Viruses, Challenged 3 days After the Vaccination: RK-LPC;  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> of the 28th RK-passage virus, LPC; The 820th rabbit passage virus (2 ml of 10-fold diluted spleen emulsion), Challenge virus;  $10^4$  MLD of HC ALD strain, D; Died in the indicated days post-challenge, + and +++; Slight and severe challenge reactions in pigs.

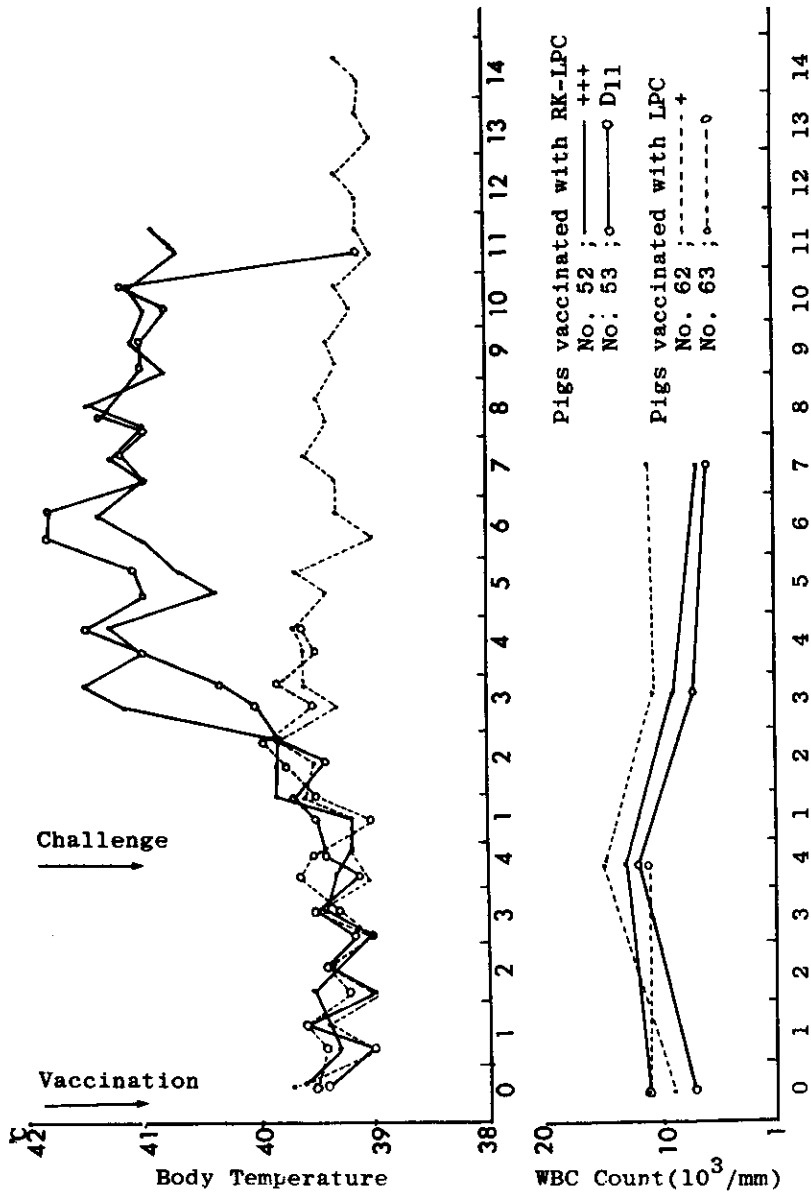
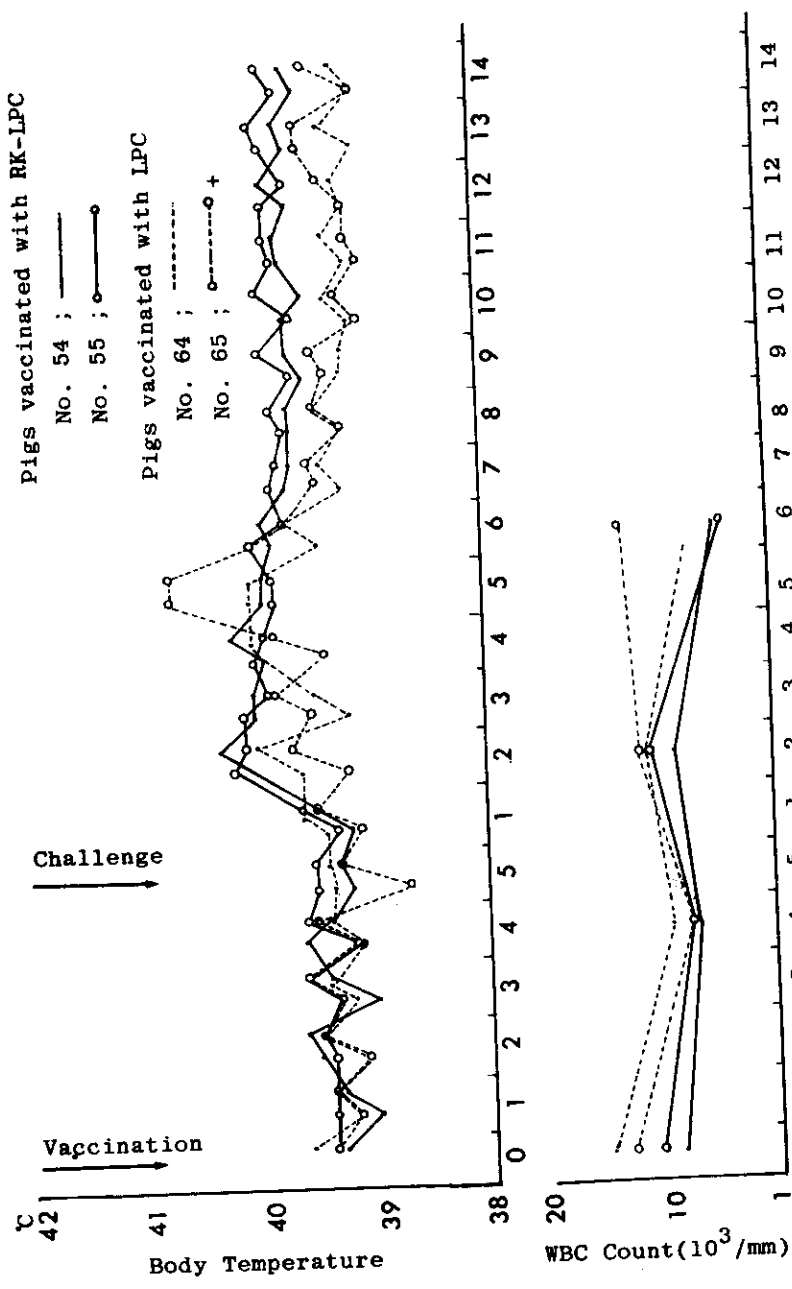


Figure 7. Pyrectic Responses and White Blood Cell Counts in the Pigs Vaccinated with the Hog Cholera RK-LPC and LPC Viruses, Challenged 4 Days After the Vaccination: RK-LPC;  $2 \times 10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub> of the 28th RK-Passage virus, LPC; The 820th rabbit passage virus (2 ml of 10-fold diluted spleen emulsion), Challenge virus;  $10^4$  MLD of HC ALD strain, D; Died in the indicated days post-challenge, + and +++; Slight and severe challenge reactions in pigs.



**Days After Vaccination**      **Days After Challenge**  
 Figure 8. Pyretic Responses and White Blood Cell Counts in the Pigs Vaccinated with the Hog Cholera RK-LPC and LPC Viruses, Challenged 5 Days After the Vaccination: RK-LPC;  $2 \times 10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub> of the 28th RK-passage virus, LPC; The 820th rabbit passage virus (2 ml of 10-fold diluted spleen emulsion), Challenge virus:  $10^4$  MLD of HC ALD strain, +; Slight challenge reaction in a pig.

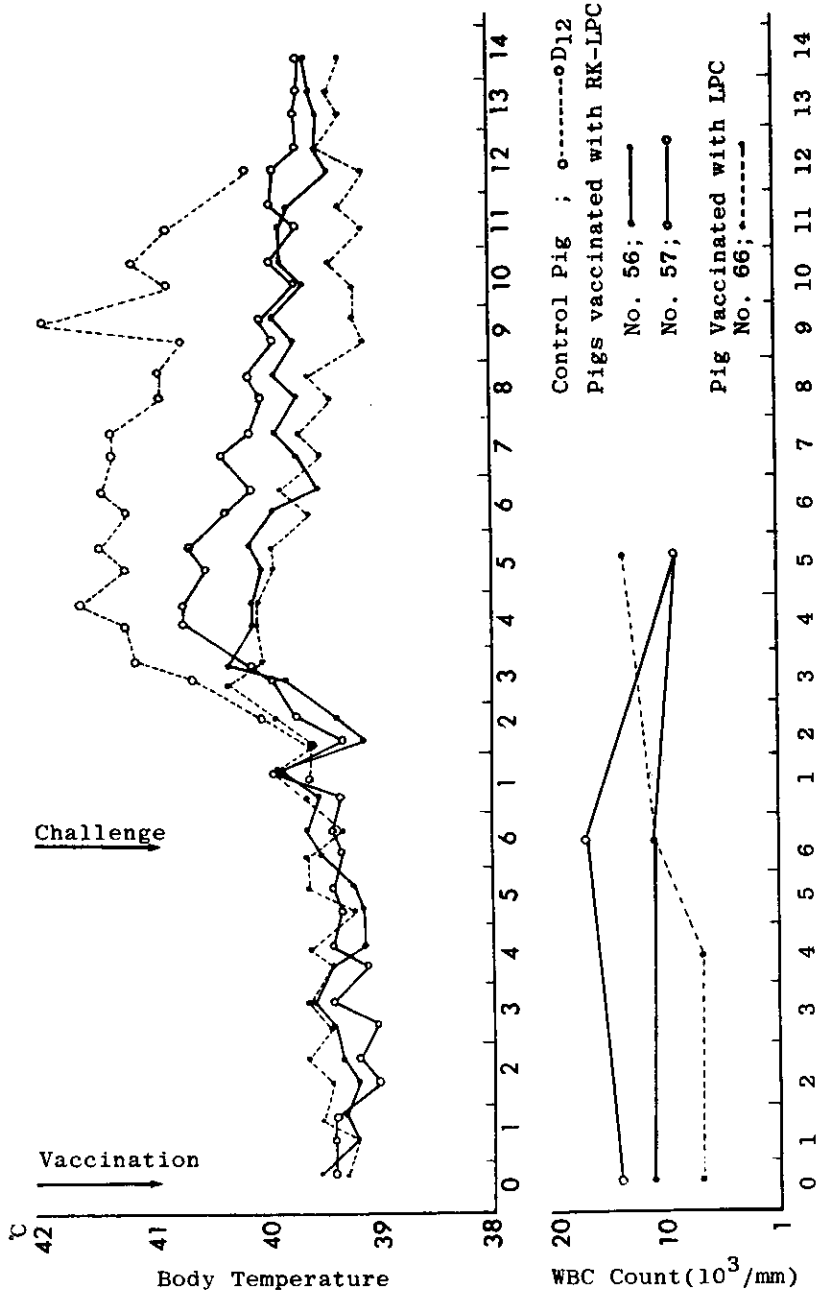


Figure 9. Pyretic Responses and White Blood Cell Counts in the Pigs Vaccinated with the Hog Cholera RK-LPC and LPC Viruses, Challenged 6 days After the Vaccination: RK-LPC;  $2 \times 10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub> of the 28th RK-passage virus, LPC; The 820th rabbit passage virus (2 ml of 10-fold diluted spleen emulsion), Challenge virus; 10<sup>4</sup> MLD of HC ALD strain, D; Died in the indicated day post-challenge.



Table 3  
 Protection Test of Pigs Vaccinated with the Hog Cholera RK-LPC and LPC Viruses  
 Against the Challenge of HC Virulent Virus (ALD Strain).

Virus Vaccinated	Days Challenged with ALD Virus <sup>3)</sup> After Vaccination				
	2	3	4	5	6
RK-LPC <sup>1)</sup>	D <sub>13</sub> & D <sub>12</sub>	D <sub>10</sub> & D <sub>11</sub>	D <sub>11</sub> & +++	- & -	- & - <sup>4)</sup>
LPC <sup>2)</sup>	D <sub>10</sub> & D <sub>14</sub>	+ & +++	+ & -	+ & -	- & -
Control	D <sub>8</sub> & D <sub>12</sub>	.	.	.	.

- Notes: 1) 28-Passaged with rabbit kidney cells,  $2 \times 10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub>.  
 2) 820-Passaged with living rabbits, 2 ml of 10-fold spleen emulsion.  
 3) Challenged with  $10^4$  MLD virus.  
 4) Challenge reactions; -:negative, +:slight, +++:severe, and  
 D:death indicates in the days post-challenge.

代代數有著密切之關連。

本試驗中有關RK-LPC株病毒接種仔豬之抗體持續，與過去研究者之成績約能吻合，(2,9,14,17)。即移行抗體在1:4以下之仔豬，經病毒接種後2週中和抗體上昇，1:8~1:16之試驗例則於3週內之中和抗體稍為下降，4-5週後才見上昇，1:32以上之試豬經病毒注射後之抗體則不見上昇。

Kamizo等<sup>(3)</sup>及清水<sup>(18)</sup>以11株之豬瘟病毒，曾與BDV病毒進行抗原性之檢討，結果得悉，11株之免疫血清，可被BVD病毒交叉分為不易中和之H株及容易中和之B株二種，此種情形尤以BVD T20-5株毒施行反應時，更為明確。

本試驗依表1之成績所述LPC-China株、RK-LPC株10代及15代毒，均能被豬瘟強毒A76以及BVD T20-5株毒免疫血清中和，而LPC-China株毒及RK-LPC株10、15代毒家兔免疫血清，同樣亦中和BVD T20-5毒，且其中和抗體價甚高。由此成績顯示，LPC-China株毒與RK-LPC株毒之間，並無抗原性之差異。

Lin等<sup>(11,13)</sup>，以LPC-China株第816代毒，對接種仔豬病毒之體內分佈及消長試驗結果認為，試豬於病毒接種後從第3日起則可從扁桃腺、脾臟以及淋巴節檢出病毒，病毒價尤在扁桃腺為高，持續時間亦長，其他臟器如肝臟、氣管、腎臟以及各淋巴節等亦可檢出病毒。然GPE<sup>-</sup>株毒與LPC-China株毒，在接種豬隻體內病毒分佈及消長相異之處為，GPE<sup>-</sup>株毒係從脾臟之分離高以及病毒檢出之日為早。

RK-LPC株第28代毒接種供試豬隻之病毒體內分佈及消長情形，經試驗結果與Lin<sup>(11,13)</sup>所得結果約略一致，而扁桃腺於接種後第4日始能檢出病毒，其他臟器之病毒價亦較LPC-China株為低，病毒主分佈於淋巴組織。

## 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。

## 參考文獻

1. Cheng, S.Y. and Lin, T.C. (1953): Experiments on the lapinized hog cholera virus. J. Chinese Agr. Ass., 2, 37-43.
2. Hanaki, T., Ogawa, N., Nakagawa, H., Sawada, H. (1972): Antibody response in pigs holding maternal immunity and inoculated with the GPE<sup>-</sup> strain of attenuated hog cholera virus. Ann. Rep. Natl. Vet. Assay Laboratory, 9, 93-96.
3. Kamijo, Y., Ohkuma, S., Shimizu, M. and Shimizu, Y. (1977): Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.), 17, 133-140.
4. 黃文池 (1975): 台灣的豬瘟防治。家畜家禽衛生，豐年社編印，增訂第四版，201-204.
5. Lee, R.C.-T., Liu, Y.H., Lin, T. T.-C. and Yieh, M.T. (1950): Experiments on crystal-violet hog cholera vaccine production. Taiwan J. Anim. Husb. & Vet. Med., 1, 1-8.
6. Lee, R.C.-T. (1954): Lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. Scientific Agri. (Taiwan), 2, 4-14.
7. Lee, R.C.-T. (1954): A preliminary

- nary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. Chinese-American JCRR, Anim. Indus. Series No. 5.
8. 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.
  9. Lin, T.T. - C., Kang, B.J., Shimizu, Y., Kumagai, T. and Sasahara, J. (1969): Evaluation of the fluorescent antibody cell culture test for detection and titration of hog cholera virus. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.), 9, 10-19.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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, 9, 15-20.
  13. 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.
  14. Liu, J. Y., Yeh, M. T. and Liu, Y.S. (1968): Study on an evaluation of hog cholera antibody. Exp. Rep. Taiwan Prov. Res. Inst. for Anim. Health, 5, 45-52.
  15. 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.
  16. 劉然炎 (1976): 豚コレラの移行抗體と予防接種効果に関する研究・國光血清疫苗製造有限公司・1-47.
  17. 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.
  18. 清水實嗣 (1980): 豚コレラ農林水産省家畜衛生試験場年報・22, 70-74.
  19. Shimizu, T., Kumagai, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. (1964): 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. 3. END neutralization test. Arch. ges. Virusforsch., 14, 215-226.
  20. 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.
  21. Tamoglia, T.W., Tellijohn, A.L., Phillips, C.E. and Wilkinson, F.B. (1965): Further evaluation of hog cholera immunizing agents against

- bovine virus diarrhea and hog cholera vaccine. MLV. TCO. Proc. U.S. Livestock Sanit. Ass., 69, 395.
22. 鄭森淵、林再春、黃榮坤、楊揚輝(1951)：慶鐘疫苗(C.C.V.)之研究—豬瘟疫苗製造之一新法，台灣省政府農林廳獸疫血清製造所報告，1，12-16.
23. Terakado, Y. (1949): Experiments on the hog cholera formalized vaccine. Exp. Rep. Gov. Expl. Sta. Anim. Hyg., 20, 111-156.
24. 楊守紳(1975)：注意養豬衛生減免疫疾病損失，家畜家禽衛生，豐年社編印，增訂四版，181.
25. 楊守紳(1975)：豬瘟；養豬業者的最大威脅，家畜家禽衛生，豐年社編印，增訂四版，205-208.
26. 楊喜金(1981)：兔化豬瘟病毒性狀之研究，第一報，豬腎由來 SK-H 株細胞對豬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。
27. 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.**

*II. Pathogenicity and Immunogenicity of the Rabbit Kidney  
Cell Passaged-Lapinized HC Virus (RK-LPC).*

YANG, S.C.,<sup>1</sup> TABUCHI, K.<sup>2</sup> and SHIMIZU, Y.<sup>3</sup>

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**

In order to know the basic properties of passaged-Lapinized Hog Cholera virus of rabbit kidney cells, the pathogenicity and immunogenicity were studied. The results are as follows:

Pyretic responses were studied in rabbit inoculated intravenously with HC LPC 820th rabbits-passaged and RK-LPC 10th passage viruses. Significant pyretic response was observed 70 hours after inoculation in the rabbits inoculated with RK-LPC virus.

The same viruses were also tested in pigs, but no pyretic response after inoculated with RK-LPC 10th virus or after being challenged with 5ml (1:10) of virulent HC ALD blood virus, was noted their appetites were normal, and there was no leucopenia or shift to the left in the neutrophils on the tested pigs.

Tonsils spleen, mandibular lymph nodes, mesenteric lymph nodes and inguinal lymph nodes were found to be virus positive on day 4 after inoculation. From 4th to 10th days all tests on the tonsils were found to be virus positive. The highest viral titer  $10^{3.0}$  TCID<sub>50</sub>/g, was between the 7th and 8th days.

The results after 10 reverse passages in pigs, revealed no abnormal clinical signs or shift in the neutrophils or virus shedding in urine. However the WBC counts showed slight, but in significant decrease.

The cross neutralization test of HC LPC, RK-LPC 10th and 15th viruses, using the antiserum of homologous and heterologous BVD T20-5 viruses, showed high SN antibody titers able to neutralize several types of Hog Cholera viruses. It also showed the HC A76 virus, HC field isolated chronic group B Kanagawa/74 virus, HC attenuated GPE<sup>-</sup> and HC RK-LPC viruses. Therefore no antigenic difference in the cross immunity was found.

The immunogenicity of RK-LPC 20th passaged virus had a potency of  $10^{-3.5}$  in the test pigs. The pig with serum neutralization (SN) titer, 1:4 resisted the challenge with 10,000 MLD of HC ALD virulent blood virus. Pigs with titers of 1:2, however, died after the challenge.

Pig with maternal antibody titer of 1:4 showed an increase of SN antibody 2 weeks later. However pigs with maternal titers of 1:8 and 1:16 showed an increase at 6 weeks. But the SN antibody titers response was not constant at the titers of 1:32.

The immunized pigs were challenged from 2 to 6 days after immunization. Pigs challenged on the 5th and 6th day after inoculation survived with no abnormal reactions.