

牛病毒性下痢病毒(BVDV)凍結乾燥 媒劑之選用

劉培柏 黃天祥

摘 要

以10% NZ-Amine, 1% Albumin, 2% Peptone 及 0.3% PVP (Poly vinyl Pyrrolidone) 等四種媒劑試製牛病毒性下痢病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 凍結乾燥疫苗, 就疫苗成品之外觀, 溶解性, 凍結乾燥前後及不同溫度下保存, 其疫苗品質及病毒力價之改變等來比較之, 以期選出最適者, 供予本病毒凍結乾燥疫苗之製造。由結果顯示, 以 0.3% PVP 製造者為最佳。

緒 言

應用牛病毒性下痢病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 之免疫, 根絕豬瘟之研究, 自1974年邀請美國康乃爾大學謝斐博士 (Dr. B. E. Sheffy) 來華, 共同研究及指導, 作一連串之試驗及探討, 初步認定其可行性^{1,3,4,6-8}, 而於1976年4月, 即以 BVDV 疫苗在澎湖作豬瘟防治工作之田間試驗。為要備製大量之疫苗, 供給田間之應用, 首先以林等 (1963)⁵ 認為最佳之製造兔化豬瘟凍結乾燥疫苗之媒劑, 即20%脫脂奶粉和等量之馬血清, 試製 BVDV 凍結乾燥疫苗, 因無法穩定病毒力價而放棄。笹原等 (1966)⁹ 作組織培養豬瘟疫苗, 使用 Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) 及 Lactose 為媒劑, 指出其保存性及溶解性均良好。楊等 (1973)¹⁰ 仿此而以不同濃度之PVP (1%, 0.3%, 0.15%) 及 10% Lactose 作兔化豬瘟疫苗乾燥媒劑之配製, 由病毒力價之穩定, 及其保存性和溶解性等方面來探討, 認為以 0.3% PVP 和 10% Lactose 最為優良。

鑑於本省牛病毒性疫苗仍未開發, 有關此種病毒凍結乾燥疫苗媒劑之資料, 甚感匱乏。因此試以兔化豬瘟疫苗之優良媒劑, 及謝斐博士 (1976) 引薦之牛病毒性疫苗在美之商業成品使用之媒劑多種, 用於試製 BVDV 活毒疫苗。盼能選出最適者, 供為 BVDV 凍結乾燥疫苗之用, 而於將來開發牛病毒性疫苗亦可作為製造之參考也。

材料和方法

1. BVD 病毒: Tobias株, 以牛睪丸細胞組織培養病毒力價為 $10^{5.8}$ TCID₅₀ (Log10)。本毒株為由澳洲發生之慢性病毒性下痢之牛隻脾臟分離而來, 由謝斐博士 (1975) 攜贈本所。
2. 製造 BVDV 凍結乾燥疫苗之媒劑:
 - (1) 楊等 (1973)¹⁰使用於兔化豬瘟疫苗之媒劑, 以 PVP (英製, BDH牌) 3克, 乳糖 100克, 加蒸餾水 500 ml, 高壓蒸汽滅菌7分鐘, 冷卻後置 4°C 保存。
 - (2) 謝斐博士 (1976) 引薦之牛病毒性疫苗商業成品使用之媒劑:
 - (i) 10% NZ-Amine; 以 NZ-Amine 100克, Lactose 100克, K₂HPO₄ 1.35克, KH₂PO₄ 0.45克, Monopotassium L-glutamate 0.956克, 加蒸餾水 500 ml,

- 以微孔膜過濾，於 4°C 保存。
- (ii) 1% Albumin 以 Sucrose 74.62 克， KH_2PO_4 0.517 克， K_2HPO_4 1.254 克，Monopotassium L-glutamate 0.956 克，Albumin (bovine) Fraction V 10 克，加蒸餾水 500ml，以微孔膜過濾，置 4°C 保存。
- (iii) 2% Peptone；以 KH_2PO_4 2.70 克，Bacto-peptone 20 克，Sucrose 200 克，加蒸餾水 500 ml，以微孔膜過濾，於 4°C 保存。
3. 真空冷凍乾燥機：西德製，Leybold GO₄ 之 Chamber 型，其 Chamber 內之最低溫度達 -25°C，最高真空度為 0.001mmHg，Condenser 之最低溫度為 -75°C，以 Diffusion Pump 行最後乾燥。
4. 真空封栓機：美國製 Stokes 牌，Model 506 PM。
5. 疫苗試製：以增殖 4 天之 BVD 病毒牛睪丸組織培養液和等量之上述媒劑混合，分裝於 20ml 容量之真空瓶，每瓶 2ml，置 -70°C 冰櫃中，作 4 小時之預備凍結後，送入冷凍機內，行冷凍乾燥後，再以真空封栓機抽出空氣，使瓶內成為真空後，封蓋橡皮栓及鋁蓋。
6. 以不同媒劑所成品之 BVDV 疫苗，探討：
- (1) 凍結乾燥前後疫苗之病毒活性：每種媒劑試製成之疫苗於凍結乾燥直後，各任意抽出 2 ~ 3 瓶，以稀釋液溶解稀釋為乾燥前之 10% 溶液後，另以 5 倍稀釋法，稀釋至所需倍數，接種於培養 2 日之牛睪丸單層細胞 (BT) 中，作病毒力價之測定。病毒力價之計算如前報。
- (2) 貯存於 4°C，25°C 及 37°C 等不同溫度之下，探討：
- (i) 穩定疫苗抗原性之效力測定：將保存於不同溫度下之各媒劑疫苗，按期每種任意抽取 2 ~ 3 瓶，如(1)方法，測定病毒力價。
- (ii) 於不同溫度貯存，BVDV 凍結乾燥疫苗之物理、化學性變化之觀察；包括疫苗之顏色，外觀，稀釋液加入後溶解速度及有無沉澱產生，PH 值變化等。
- (iii) 不同媒劑所成品之 BVDV 疫苗，對豬隻之安全性：以 3 週齡仔豬接種 10 劑量，仔細觀察其臨床反應。

結 果

1. 凍結乾燥前後疫苗之病毒活性：於凍結乾燥前之組織培養病毒力價為 5.8 TCID₅₀ (Log₁₀)，凍結乾燥後，10% NZ-Amine 媒劑者，病毒力價下降最大，其次為 1% Albumin 者，2% Peptone 和 0.3% PVP 者變化最少。(表 1)。

Table 1. BVD Virus Titers Pre-and Post-lyophilization

Medium	Prelyophilization	Postlyophilization
10% NZ-Amine	5.8*	4.5
1% Albumin	5.8	4.8
2% Peptone	5.8	5.1
0.3% PVP	5.8	5.1

* Log₁₀ Virus titer

2. 於 4°C, 25°C 及 37°C 等不同溫度貯存後之 BVD 疫苗病毒活性：於 37°C 溫度存放，10% NZ-Amine 及 1% Albumin 者，病毒力價下降快速，於 3 個月後，幾降於 0，而另二種媒劑，2% Peptone 及 0.3% PVP 仍分別有 1.8 及 1.1 之病毒活性。10 個月後，四種疫苗已很難測得病毒活性。(表 2)。於 25°C 室溫存放，四種不同媒劑疫苗之病毒力價，下降緩慢，於 3 個月後仍都有 2.1 以上之病毒活性，但 10 個月後，1% Albumin 和 0.3% PVP 者，已很難測得病毒活性，10% NZ-Amine 及 2% Peptone 却仍維持 1.5 及 2.1 之力價。(表 2)。

於 4°C 冰箱中保存，四種不同媒劑製造之疫苗，於 10 個月後，均維持 4.0 以上之力價，尤其是 0.3% PVP 者，似乎和製造初時之力價相同，保存 1 年時，仍有令人滿意之病毒活性(表 2)。

Table 2 Maintenance of BVD Virus Titers of Each Vaccine

Stored at 4°C, 25°C and 37°C

At 37°C				
Storage time	BVD Virus Titer (Log10)			
	10% NZ-Amine	1% Albumin	2% Peptone	0.3% PVP
0 Da.	4.5	4.8	5.1	5.1
5 Da.	4.1	4.1	4.5	4.5
3 4Da.	3.5	3.5	4.1	2.8
3 Mons.	0.5	0.8	1.8	1.1
10 Mons.	0	0	0	0

At 25°C				
Storage Time	BVD Virus titer (Log10)			
	10% NZ-Amine	1% Albumin	2% Peptone	0.3% PVP
0 Da.	4.5	4.8	5.1	5.1
5 Da.	4.1	4.5	4.5	5.1
34 Da.	3.8	4.1	4.5	4.8
3 Mons.	2.1	2.1	2.5	2.1
10 Mons.	1.5	0	2.1	0

At 4°C

Storage Time	BVD Virus Titer (Log10)			
	10% NZ-Amine	1% Albumin	2% Peptone	0.3% PVP
0 Da.	4.5	4.8	5.1	5.1
5 Da.	ND	ND	ND	ND
34 Da.	ND	ND	ND	ND
10 Mons.	4.0	4.5	4.5	5.1
12 Mons.	3.5	4.5	4.5	4.8

ND : Not Done

3. 於不同溫度貯存12個月後，BVDV凍結乾燥疫苗之物理變化：10% NZ-Amine 媒劑製造之疫苗，除外觀顏色變較深外，其餘均無變化。1% Albumin 者，於保存後第5天，就呈粘縮樣，且溶解不易。2% Peptone 者，於第5天起，置 37°C 者呈粘縮狀，置 25°C 及 4°C 則呈硬塊，體積縮小，且溶解不易。0.3%PVP 者，置 37°C 及 25°C 者，於第 9 個月後，略呈硬塊，且體積縮小，溶解變慢，置 4°C 者則無變化。(表3)

Table 3 The Physical Changes of BVDV Vaccines Using Four Stabilizing Mediums Under Various Temperatures after 12 Months Storage

Medium	Storage Temp.	Right after Drying	Storage Tempures.		
			37°C	25°C	4°C
10% NZ-Amine	Color	Pink	light brown	◇	◇
	Appearance	Powdered mass	◇	◇	◇
	Solubility	Easy	◇	◇	◇
1% Albumin	Color	light yellow	yellow	◇	◇
	Appearance	Powdered mass	Mucous mass	◇	◇
	Solubility	Easy	4 mins	4 mins	2-3 mins
2% Peptone	Color	White	yellow	◇	◇
	Appearance	Powdered mass	Mucous mass	Harden mass	◇
	Solubility	Easy	5 mins	2-3mins	1-2mins
0.3% PVP	Color	Pink	Pink	◇	◇
	Appearance	Powdered mass	Harden mass	◇	Powdered mass
	Solubility	Easy	1-2mins	1 min	Easy

4. 於不同溫度貯存12個月後，BVDV 凍結乾燥疫苗之化學性變化：用四種媒劑製造之 BVDV 疫苗，於凍結乾燥直後，其 PH 值均為7.0左右，貯存12個月後；PH 值，於 0.3% PVP 者之變化少，其次為 10% NZ-Amine 及 2% Peptone，1% Albumin 者則呈顯酸性，PH 為 6.2左右。而四種疫苗於稀釋液溶解後均無沉澱產生。
5. 不同媒劑所成品之 BVDV 疫苗，對豬隻之安全性：以不同媒劑成品之 BVDV 疫苗10劑量，接種於 3 週齡仔豬之腹腔及肌肉，每組 1 ~ 2 頭，接種後，其體溫、食慾、精神均無影響，注射部位亦無病變發生。

討 論

10% NZ-Amine, 1% Albumin, 2% Peptone 及 0.3% PVP 用為備製 BVDV 凍結乾燥疫苗之媒劑，對於穩定病毒活性均稱良好。但於貯存上，1% Albumin 及 2% Peptone 雖置於 4°C 中，亦呈粘縮狀，溶解頗為不易，而於使用上甚為不便，且 1% Albumin 者，其 PH 值亦顯着變化。又，曾以林等(1963)⁵ 認為最佳之製造兔化豬瘟凍結乾燥疫苗之媒劑，即20%脫脂奶粉和等量之馬血清，用於 BVDV 凍結乾燥疫苗製造，雖無法穩定病毒力價，其外觀之品質亦頗為良好。因此，對於媒劑之選擇，除穩定病毒活性外，對於貯存後之品質變化亦應重視。

依結果顯示，不論在凍結乾燥前後之病毒，或不同溫度之保存，以及疫苗本身品質之變化上，應以 0.3 PVP 者最為優良。又，雖言凍結乾燥疫苗置 4°C 保存最為良好，但本疫苗偶兒可置室溫 (25°C)，甚或 37°C 之高溫亦可(表 2)。此種媒劑或可用為將來開發牛病毒性疫苗製造之參考也。

1% Albumin 及 2% Peptone 者，置 37°C, 25°C 甚或 4°C 內，疫苗均呈粘縮狀，是否和疫苗之含濕度，真空度或真空瓶，橡皮塞之品質有關，當待進一步來究明。疫苗製造過程之凍結溫度及不同組織培養備製之 BVDV 疫苗亦應再加以探討。

本次研究，對於成品之疫苗，並未探討其對動物體之免疫性，抗體產生情形；是否水劑疫苗和以 0.3% PVP 為媒劑之凍結乾燥疫苗，對豬隻之免疫效果不同，由多次田間試驗結果，更加深此種疑慮(尚未發表)。又鍾等(1974)² 報告豬日本腦炎活毒疫苗之保存試驗，以 0.3% PVP 為穩定劑不理想，而稱 5% monosodium glutamic acid 為佳。因此，對於 BVDV 凍結乾燥媒劑之更進一步探求，當是重要的課題。

誌 謝

承蒙製劑研究系疫苗股楊揚輝股長，劉義雄及張天桂兩位先生及全體同仁之協助，得順利本實驗之進行，衷心感激。

參 考 文 獻

1. Chen, C. S., Huang, T. S., Lin, T. C. and Sheffy, B. E. (1976) : Pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus in pigs ; International pig veterinary society ; 1976 Congress ; June 22-24, 1976, Ames, Iowa, U. S. A ; H. 11
2. Jong, M. H., Lin, K. F., Chan, I. P., Yang, Y. H. and Lee, C. (1974) : Studies on Preparation of Japanese Encephalitis Living Vaccine in Swine ; Taiwan PRIRH Exp. Rep., 11 ; 63~70.
3. Lee, C. T. R., Chen, C. S., Lin, T. C., Liou, P. P. and Sheffy, B. E. (1976) : Use of the hetero-immunogen bovine viral diarrhoea virus in hog cholera control and eradication programs ; International pig veterinary society ; 1976 Congress ; June 22-24, 1976, Ames, Iowa, U. S. A ; H. 14.
4. Lee, C. T. R., Chen, C. S., Lin, T. C., Liou, P. P. and Sheffy, B. E. (1976) : Effect of bovine viral diarrhoea and/or hog cholera maternal antibody on the efficacy of the hog cholera control programs utilizing biologicals consisting of mixtures of hog cholera and bovine viral diarrhoea antigens ; International pig veterinary society ; 1976 Congress ; June 22-24, 1976, Ames, Iowa, U. S. A ; H. 13
5. Lin, T. C., Yang, T. J., Chow, M. S., and Chang, M. L. (1963) : Studies on Lyophilization of Lapinized Hog Cholera Vaccine (First and Second Report) ; Taiwan PRIAH Exp. Rep., 1 ; 1~39.
6. Liou, P. P., Chen, C. S., Sheffy, B. E., Lin, T. C. and Robert, C. T Lee (1975) : Studies on the Relationship between BVD Virus and HC Antibody ; Taiwan PRIAH Exp. Rep., 12 ; 1~12
7. Liou, P. P., Chen, S. S., Lin, T. C., Sheffy, B. E. and Lee, Robert. C. T. (1975) : Evaluation of Four BVD Strains as Immunization Antigens against Hog Cholera ; Taiwan PRIAH Exp. Rep., 12 ; 13~20.
8. Liou, P. P., Chen, C. S., Sheffy, B. E. Hsu, Frank. S. and Koh, F. K. (1975) : Effect of Hog Cholera Maternal Antibody on the Efficacy of Mixtures of Hog Cholera and Bovine Viral Diarrhoea Antigens ; Taiwan PRIAH Exp. Rep., 12 ; 41~45
9. Sasahara, J., Kumagai, T. (1966) : Development of tissue culture living hog cholera vaccine., Jap. Agr. Res. Quart., 1 ; 24~26
10. Yang, Y. H., Liu, Y. S., Chen, Y. C., Hwang, W. C., Lin, C. F., Lin, C. Y., Lin, T. C., Kiang, L. S., Chan, I. P. and Chen, S. S. (1973) : Improvement Studies on the Media for the Lapinized Hog Cholera Vaccine ; Taiwan PRIAH Exp. Rep., 10 ; 15~

Studies on the Lyophilization of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)

P. P. Liou T. S. Huang

Summary

Lyophilized bovine viral diarrhea virus (BVDV) vaccines were Prepared using four recommended stabilizing mediums., 10%NZ-Amine, 1%Albumin, 2%Peptone and 0.3% PVP (Polyvinyl Pyrrolidone) . These four vaccines were compared with each other relative to their suitability for (1) . Appearance and solubility characteristics ; (2) . maintaining virus titers during lyophilization ; (3) . quality of restoration ; (4) . maintaing stable of virus titers and antigenicity under various storage temperatures.

From the results, it may be possible to prepare a more satisfactory vaccine with a medium prepared from components of 0.3%PVP. This may be worthy of investigation at a later date.