

猪假性狂犬病疫苗之研究：臺灣分離株 N_3 及 T_3 於各種細胞株之增殖情形及其馴化後之病原性

林敬覆 邱朝齊 陳守仕

臺灣省家畜衛生試驗所

劉永和

中國農村復興聯合委員會

摘要

將從本省病猪之腦部組織分離所得之假性狂犬病病毒 N_3 及 T_3 株，分別接種於PK-15, ESK, BK, AuBEK, MK-2, VERO, HeLa, KB及RK-13等細胞株內，於每隔一定時間測定其液相及細胞相之病毒增殖情形。結果證明其於RK-13及ESK細胞內增殖情形最佳。其病毒感染力價：於RK-13細胞內在接種後12到24小時，高達 $10^{7.7}$ TCID₅₀/0.1 ml。於ESK細胞內於接種後24到48小時，可達 $10^{7.0-7.5}$ TCID₅₀/0.1ml。若於PK-15, AuBEK, BK, MK-2及KB等細胞內，則需於接種後24到96小時，才能達到 $10^{6.3,6.7}$ TCID₅₀/0.1ml。

供試毒株於分別通過RK-13, ESK, AuBEK及BK等20代後，對家兔之病原性有減弱之趨勢。但其病毒增殖力價略為增高。

緒言

假性狂犬病自1971年七月於本省南部某養猪場首次發生以來^{2,3}。其間歷經多人之研究，^{3,5,6,7}，其成就斐然。惟對於本病疫苗研製之結果，不如理想。細考其原因，無非是未能解決增殖高力價病毒之難題及未能尋覓出可供本病毒馴化減毒之細胞。本所因鑑於此，而從事於本研究。其結果不但提供了研製本病死毒疫苗時，增殖高力價病毒之方法，同時亦啓發了開發本病活毒疫苗之途徑。今茲將其試驗方法，材料及結果，分述於次，敬請指正。

材料及方法

供試病毒：Aujeszky's株，係本病標準株，分讓自屏東農專。本株以PK-15增殖保存。

N_3 株：分離自臺灣南部患猪病例3號小猪之腦部組織。以CE (Chicken Embryo) 增殖保存。

T_3 株：分離自臺灣北部患猪病例3號小猪之腦部組織。以RK-13 (Rabbit Kidney) 增殖保存。

供試細胞：供各株病毒增殖之細胞為PK-15, ESK (Embryonic Swine Kidney), MK-2 (Monkey Kidney), VERO (African green monkey kidney) AuBEK (Bovine Embryonic

Kidney), BK (Bovine Kidney), HeLa, KB (an epideimoid carcinoma of floor of themouth) (分讓自臺大醫學院) 及RK-13等細胞株。

供測病毒力價之細胞為初代SK (Swine Kindey) 細胞。

病毒增殖力價之測定：將供試之毒株分別接種於各個供試細胞株內，連續增殖三代次，每代次於產生CPE之程度++~+++時，連同細胞收存於-40°C，再經二次凍結解凍處理後，以3,500rpm遠心30分鐘。取其上清液保存於-40°C備用。

次將經三次分別增殖於各個供試細胞株之供試病毒株，分別以 0.1ml 10³ TCID₅₀/0.1ml 接種於已形成單層細胞之各原增殖之細胞株試管內，經37°C分鐘感作後，以PBS洗滌三次，再加入 Hank's Maintenance Medium (內含 2% 之 5.5% Bovine albumin fraction V solution) 於各試管內，置於 37°C恆溫箱，並於每隔一定時間，各取出三支試管，以800rpm遠心10分，取其上清液，保存於-40°C，以備供試其液相 (Extracellular Virus) 之病毒力價。再將該經遠心取去上清液後之試管內沉澱細胞物，加入 0.5ml 之Hank's Maintenance Medium後放入 -40°C 凍結之，於其再經凍結解凍處理二次後，以 3,500rpm 遠心 30分鐘，取其上清液保存於-40°C，以備供試其細胞相 (Intracellular Viruses) 之病毒力價。

最後將各供試毒株於各供試細胞株內增殖之各不同間隔收存 (Harvesting) 之液相病毒液及細胞相病毒液，分別以10倍稀釋法稀釋至 10¹⁰稀釋階，再分別將各階稀釋液分別接種於含 SK單層細胞之試管各 4 支，於 37°C 感作 60分鐘後，加入 Hank's Maintenance

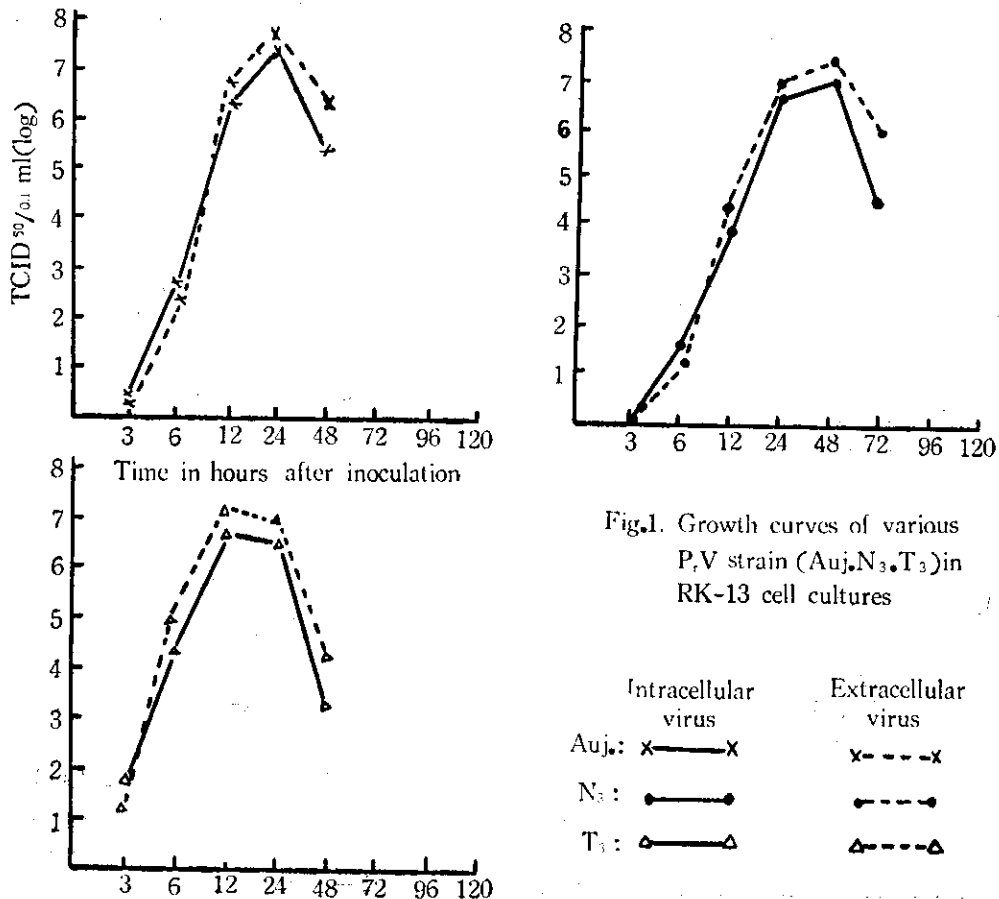


Fig.1. Growth curves of various P.V strain (Auj.N₃.T₃)in RK-13 cell cultures

	Intracellular virus	Extracellular virus
Auj.:	x — x	x - - - x
N ₃ :	● — ●	● - - - ●
T ₃ :	△ — △	△ - - - △

Medium，最後將其置入 37°C 恆溫箱內，由翌日起每天觀察，測定及紀錄至接種後第七日，以測定其病毒感染力價⁴。

馴化病毒之病原性測定：以通過RK-13，ESK，AuBEK及BK等細胞20代之 N₃及 T₃株之病毒，將其稀釋至病毒含量為10^{3.0}TCID₅₀/0.1ml。各以其 2ml分別接種於家兔之腰部皮下各二頭，以觀察其對家兔病原性之增減情形⁴。

結 果

將各供試病毒分別接種於各供試細胞株內，以測定其病毒增殖情形之結果。以其於RK-13及ESK細胞內之增殖情形最佳。其病毒感染力價：於其接種於RK-13細胞12至24小時後，高達10^{7.0}~^{7.7} TCID₅₀/0.1ml。見圖 1。於其接種於ESK細胞24至48小時後，可達 10^{7.0}~^{7.5} TCID₅₀/0.1ml。見圖 2。於其接種於 AuBEK 細胞72小時後，達10^{6.5}~^{6.7} TCID₅₀/0.1ml。見圖 3。於其接種於 BK細胞內72至96小時後，達10^{6.0}~^{6.5} TCID₅₀/0.1ml。於其接種於PK-15細胞內48至72小時後，達 10^{5.7}~^{6.5} TCID₅₀/0.1ml。於其接種於M K-2細胞內24小時後，達10^{6.3}~^{6.5} TCID₅₀/0.1ml。於其接種於 KB細胞內後48小時後，達10^{6.5}~^{6.7} TCID₅₀/0.1ml。至於接種於HeLa及VERO細胞內，其病毒增時間更加延長且其病毒感染力價更低。

將各通過 RK-13，ESK，AuBEK及BK 代之病毒N₃及 T₃ 株，於測定其病毒感染力價後，分別以 2ml (10³ TCID₅₀/0.1ml) 之劑量接種於家兔腰部皮下各二頭，經觀察紀錄之結果發現其發病及死亡時只較接種未經馴化者延後 4 至 6 小時。故擬於其通過60代次時，再進行其病原性之檢討。至於其病毒增殖力價則較未曾馴化前略為提高。

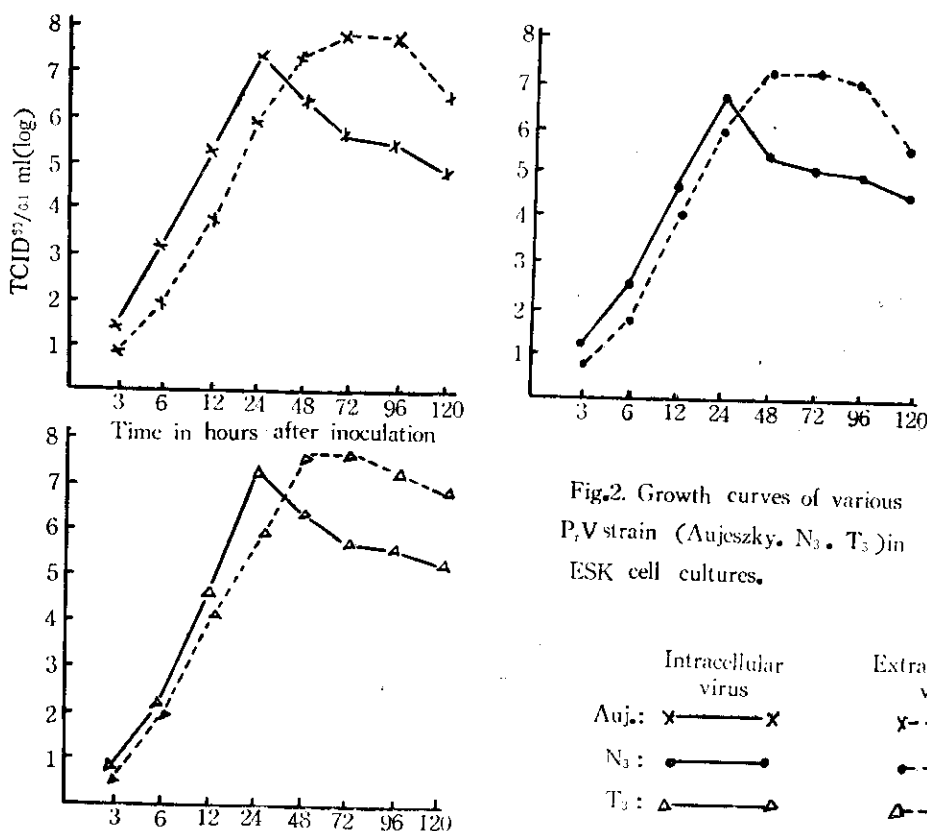


Fig.2. Growth curves of various P.V strain (Aujeszky, N₃, T₃) in ESK cell cultures.

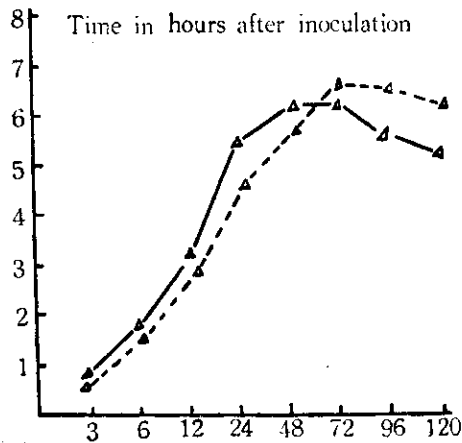
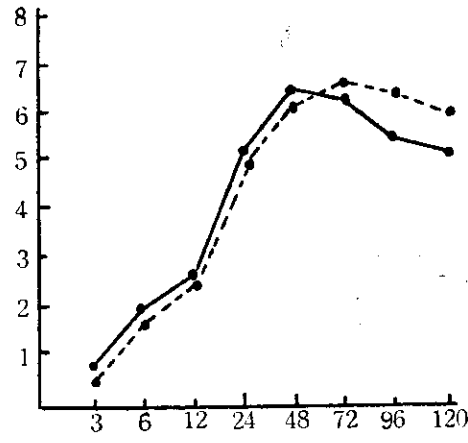
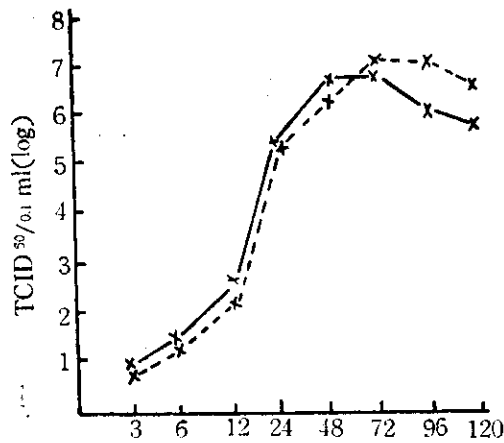


Fig.3. Growth curves of various P.V strain (AuJ, N₃ T₃) in au BEK cell cultures.

	Intracellular virus	Extracellular virus
AuJ:	x—x	x---x
N ₃ :	o—o	o---o
T ₃ :	Δ—Δ	Δ---Δ

討 論

本病於 1902年首度於匈牙利發生以來¹，其對本病疫苗最為深入研究者，乃為東歐諸國，其均採用以雞胚胎 (CE) 及雞胚胎纖維母細胞 (Chick Embryo Fibroblast, CEF)^{2,3} 相互交替繼代，以期馴化減毒本病毒，但其操作過於繁雜且不經濟，同時其經馴化之弱毒株對免疫之效果未臻理想。本省於 1971年七月發生以來，其間歷經多位研究者，罄力從事於本病疫苗之研製，結果均未如理想。詳究其原因，不外是用以增殖本病毒之細胞失當之故。^{2,3,6,7}今若依本試驗結果，改以 RK-13 或 ESK 細胞以增殖，保存或馴化減毒本病毒及從事於本病之其他研究，即經濟且方便而效果良好。

至於經 RK-13, ESK, AuBEK, AuBEK 及 BK 馴化 20 代後之 N₃ 及 T₃ 株，其對家兔之病原性未見有顯著減弱，即基於本病毒之病原性不易藉通過組織培養細胞而被迅速減弱之特性。故擬於其通過 60 代次時，再次檢測其家兔之病原性。

誌 謝

本研究承蒙國科會之補助得以完成，特此申謝。

參考文獻

1. Aujeszky, A : 1902 Ueber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. Zbl. Bart.

- Abt. I., Orig. 32 : 353.
2. James, P. S. Yang, Philip, T. Duraile. Ma., Chich, C. P. & Albent, E. New , : 1972 An Epizootic of Aujeszky's disease in Swine in Taiwan : Virus Isolation, Identification & Seroepidemiological Studies, Chinese Journal of Micrology, 5, 69—75.
 3. Lin, S. C., Tung, M. C., Liu, C. I., Chang, C. F., Huang, W. C., Cheng. C. M. : 1972 An Outbreak of Pseudorabies in Swine in Pingtung. Chinese Journal of Microbiology, 5, 56 —68.
 4. Maramorosch, K. & Koprowski, H. : Methods of Virology, III, 140~163 & IV 481~489.
 5. Shieh, C. M., & Su, J. F. : 1972 Diagnosis of TSC Pingtung swine breeding farm died of Pseudorabies disease. The habitracts presented at the 78th scientific meeting of TAHI.
 6. Su, J. F., Shieh. C. M., Lin, T. C. & chen. S. S. : 1973, Studies on Pseudorabies (Aujeszky's disease) in Swine : II Adaptation of new isolate through chicken-kidney cell monolayer, Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep. 59—66.
 7. Tung, M. C., Liu, C. I., Lee, C. C. & Kwang. H. S. : Studies on Swine Pseudorabies : II viral distribution and histopathology in experimentally infected swine. Taiwan Jour. Vet. Med & Anim. Husb. No. 25, 1—15. 1974.

Studies on the Production of Pseudorabies Vaccine for Swine: Investigation on the Pertinent Cell Line Cultures for Replication of the Isolated Viruses of N₃ and T₃ Strain

K. F. Lin., T. C. Chiu, S. S. Cheng.

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Y. H. Liu.

(Joint Commission on Rural Reconstruction)

Summary

Two isolates, N₃ and T₃ were cultivated in various cell cultures, and the infective titers of extra-cellular virus, intra-cellular virus were determined in every other period of 5 days. From those growth curves of the isolated viruses, We have known the pertinent cell line cultures are RK-13 and ESK. Virus titer reached $10^{7.0-7.7}$ TCID₅₀/0.1ml at 12 to 24 hours postinoculating in RK-13 cell line and $10^{7.0-7.5}$ TCID₅₀/0.1ml at 24 to 48 hours postinoculating in ESK cell line. Virus titer reached around $10^{6.3-6.7}$ TCID₅₀/0.1ml at 24 to 96 hours postinoculating in PK-15, AuBEK, BK, MK₂ and KB cell lines.

The pathogenicity of the two isolates were weakened for rabbit after 20 subpassages in RK-13 and ESK.