

豬日本腦炎活毒疫苗之研製及其免疫效果

鍾明華、林敬覆、蔡紹前、詹益波、楊揚輝、李全

(臺灣省家畜衛生試驗所)

摘要

日本腦炎危害本省受胎母猪為時已久，本所雖曾製用其死毒疫苗，然其田間效力不理想，以致於筆者等以 JEV at 株研製活毒疫苗，其試用於試驗動物及田間未經產母猪，結果其安全性及免疫效果均如理想，實為避免日本腦炎危害受胎母猪而發生死產之一良好活毒疫苗。

緒言

豬日本腦炎流行於本省自春夏之交開始至秋冬交替之間，以感染受胎母猪而使之發生死產，對於養豬生產上所造成之經濟損失頗鉅。本所有鑑於此，對於本病死毒疫苗之研製及深入調查本病於本省豬隻之流行學^{2,3,4}，早已着手進行。1964年林再春等，雖已研製出本病鼠腦水劑疫苗，但於應用時，深感其預防受胎母猪死產之效果不顯著。因此詹益波等乃另行從事本病毒分離並將其分離所得之毒株加以馴化減毒^{3,4}，以期能將此減毒株用於活毒疫苗之製造。結果經馴化減毒之弱毒株，試用於豬隻所產生之免疫效力，未臻理想。於是筆者等乃以由詹益波分別分讓自日本農林省家畜衛生試驗場及日本生物科學研究所之 JEV S 株及 JEV at 株，從事於本病活毒疫苗之研製及其免疫效果試驗，其結果如下。

材料與方法

供試毒株：日本腦炎弱毒 S⁻ 及 at 株，分別分讓自日本家畜衛生試驗場及日本生物科學研究所。製造 HA 抗原之毒株為 Nakayama 株，係早年分讓自日本，一直在本所保存者。

供試動物；小白鼠，哺乳小白鼠及天竺鼠均購自民間。田鼠 (Hamster) 則分讓自美國海軍醫學第二研究所。仔豬係本所 SPF 中心育成之第二代豬隻，其日本腦炎抗體檢查結果均為陰性。

病毒增殖之細胞：病毒增殖之細胞採用初代 SK (Swine Kidney) HK (Hamster Kidney), BK (Bovine Kidney) 等細胞。及株化 ESK (Embryonic Swine Kidney), VERO (African Green Monkey Kidney) 等細胞。

田間試驗母猪：臺北、苗栗二縣各有一養豬場提供去秋出生之約克夏未經產母猪。

細胞培養方法：初代 SK、HK 及 BK 細胞培養，均經無菌株取之腎臟，去腎盂及髓部後，以剪刀剪成碎片，使用含 0.25% Trypsin 之 Hank's Solution 消化之，經收集洗滌細胞後，以 Hank's Growth Medium 作成 0.6~0.8% 之細胞浮游液，分裝培養於 37°C 之恆溫器中。而 ESK 及 VERO 之株化細胞則將上一代之細胞，抽棄培養液後，以 PBS 洗滌一次，加入 TV (Trypsin Versense) 浸泡消化。於細胞層行將脫落之時，抽棄 TV，再以培養液沖溶分散細胞，稀釋成適當濃度後分裝培養於 37°C 之恆溫器內備用。

病毒感染價測定方法：病毒液以 10 進階法稀釋後，將各階病毒稀釋液 0.1ml 接種於 4 支 ESK 單層細胞，經 37°C 30 分鐘感作後，各試管加入 0.9ml 之 Hank's Maintenance Medium 觀察紀錄 CPE，至第 7 日加入等量之 0.33% 鵝血球 VAD 溶液，實施 HIA test，然後以 KARBET 方法計算其 TCID₅₀。

血清 HI 抗體測定法：依 Clarke & Casals 之方法實施⁶⁾。

疫苗製造方法：

1. S⁻株疫苗：依 SAZAWA 等方法培養之⁸⁾。

2. at 株疫苗：將 at 株原毒液接種於 SK 及 ESK 細胞後，於產生十~廿程度之 CPE 時收穫之。

以上二株病毒液於收穫凍結解凍二次，經低溫高速遠心後，各自分別加入保護劑（（1）含10% Lactose 及 0.3% P. V. P. 之 Ad-juvant 或（2）5% monosodium glutamic acid 1份及 10% Lactose 4份。⁹⁾ 分裝凍結真空乾燥保存於 4°C

迷入病毒否定試驗：依 TAKEHARA 等方法實施之^{7,9)}。

安全試驗依動物用生物藥品特殊檢驗標準行之。

疫苗田間試驗設計：將供試未經產母猪逢機抽樣分為三組，依次分一次接種組，二次接種組及未接種之對照組。供試母猪於接種前及接種後每隔二週採血一次，測定其血清 HI 抗體力價。試驗期間母猪之配種、受孕、疾病、分娩及所產仔猪情况均詳細觀察並作紀錄。

結 果

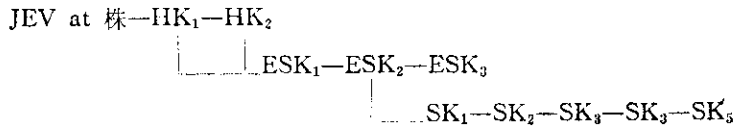
一、JEV S⁻株及 at 株通過於組織培養細胞之情形：

1. S⁻株培養於 BK 細胞第六代，其病毒力價為 10^{4.5}~^{6.0} TCID₅₀/ml。

2. at 株則先培養於 HK細胞二代，然後再通過 ESK 三代，另以 ESK第二代病毒液，連續通過 SK 細胞五代（如圖 1）。其病毒力價均高達 10^{7.0}~^{8.5} TCID₅₀/ml。

圖1. JEV at 株通過於組織培養細胞之情形

Fig 1. Procedure of JEV at strain propagated in cell cultures.



二、at 株在 ESK 及 VERO 細胞中增殖力價之比較：

將at 株培養並繼代於 ESK 及 VERO 株化細胞三代，分別測定其病毒力價，結果以ESK 細胞之增殖力價較優。如表 1。

表1. JEV at 株在 ESK 及 VERO 細胞之增殖力價

Table 1. Virus titer of JEV at strain in different cell culture

JEV Strain	Cell Culture	Virus Titer (TCID ₅₀ /ml)
at strain	ESK ₁	108.0
	ESK ₂	108.5
	ESK ₃	108.5
	VERO ₁	104.5
	VERO ₂	106.0
	VERO ₃	106.0

三、S⁻及 at 株之各種細胞培養毒對 SPF 猪之病原性及其 III 抗體消長情形：

S⁻株之 BK 細胞培養毒及 at 株 HK 細胞培養毒，分別接種於45日齡之 SPF 猪皮下各二頭，並

於接種後第一至第七日每日採血，分離血清，接種於小白鼠腦內以試驗接種豬是否發生 Viremia，結果試驗仔豬無任何異狀。亦未發生 Viremia。而接種 S- 株之小豬，其第四週之 HI 抗體力價僅為 $\times 10$ 。接種 at 株之小豬，其 HI 抗體力價則高達 $\times 80 \sim \times 160$ 之間（如表 2）。另外將 at 株 HK₂ESK₂ 及 HK₂ESK₂SK₅ 之細胞培養毒接種於 42 日齡之 SPF 小豬，結果接種 HK₂ESK₂ 培養毒之小豬，其中一頭於第三日體溫升高至 40.2°C，其餘均正常，亦未發生 Viremia。見圖 2。接種 at 株 HK₂ESK₂ 及 HK₂ESK₂SK₅ 之培養毒之小豬試驗，其 HI 抗體力價於接種後第一~二週均上升至 $\times 40$ ，於第四週時接種 HK₂ESK₂SK₅ 之毒液者上升至 $\times 160$ ，而接種 HK₂ESK₂ 者為 $\times 80$ ，至第七~八週時前者仍維持 $\times 20$ ，而後者已降至 $\times 20$ 以下。如圖 3。

圖 2：at 株 HK₂ESK₂ 及 HK₂ESK₂SK₅ 細胞培養毒對 SPF 仔豬之病原

Fig 2. Responses of SPF Piglet after vaccinating

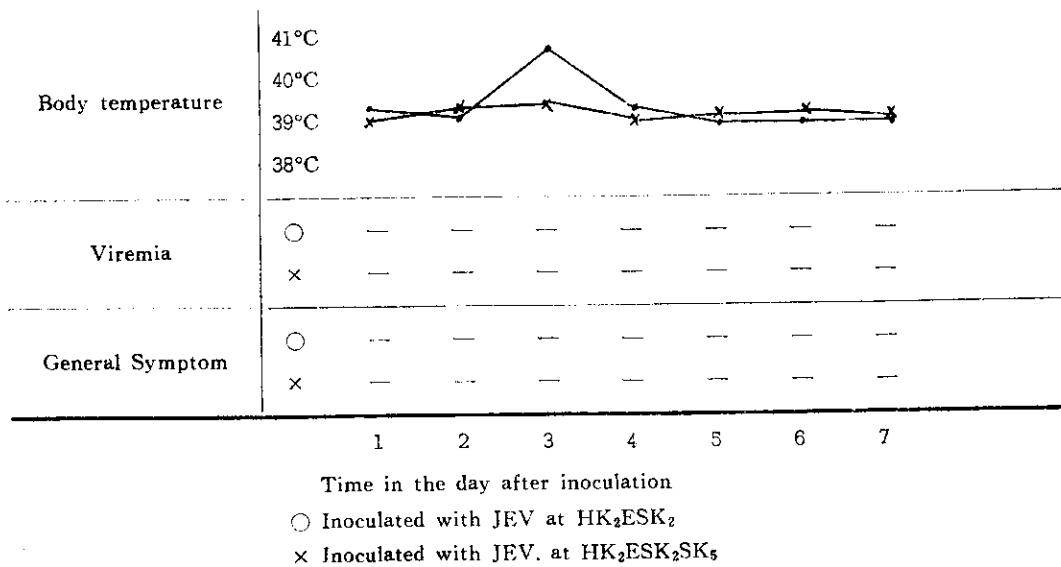
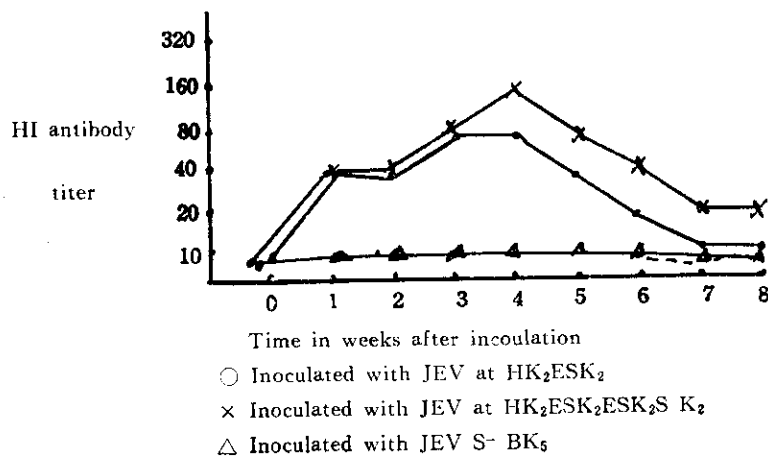


圖 3：at 株 HK₂ESK₂ 及 HK₂ESK₂SK₅ 接種 SPF 仔豬之 HI 抗體消長情形

Fig 3. Curves of HI titer of SPF Piglet after vaccinating.



四、試製 at 株 HK₂ESK₂ 及其 HK₂ESK₂SK₅ 細胞培養毒疫苗之保存試驗：

TEV at 株 HK₂ESK₂ 及 HK₂ESK₂SK₅ 細胞培養毒加入保護劑，經冷凍乾燥後，保存於 4°C 冰箱中，其保護劑為 10% Lactose 及 0.3% P. V. P 者，於一個月內尚保持 10^{7.5}TCID₅₀/ml 之力價，至第六個月仍維持 10^{6.5}TCID₅₀/ml 之力價，但於第九個月後即不降至 10^{4.5}TCID₅₀/ml 力價。其保護劑以 5% monosodium glutamic acid 1 份及 10% Lactose 4 份者，保存一年後其病毒力價未見顯著下降。如表 2。

表 2 試製疫苗之保存試驗

Table 2. Preservation of vaccines at 4°C

adjuvant	vaccine	virus titer, months after stored at 4°C				
		1	3	6	9	13
10% Lactose	JEV at HK ₂ ESK ₂	10 ^{7.5}	10 ^{7.2}	10 ^{6.5}	10 ^{4.5}	—
+						
0.3% P. V. P.	JEV at HK ₂ ESKSK	10 ^{7.5}	10 ^{7.0}	10 ^{6.4}	10 ^{4.3}	—
10% Lactose	JEV at HK ₂ ESK ₂	10 ^{7.5}	10 ^{7.4}	10 ^{7.3}	10 ^{7.0}	10 ^{6.5}
+						
5% monosodium glutamic acid	JEV at HK ₂ ESKSK ₅	10 ^{7.5}	10 ^{7.5}	10 ^{7.3}	10 ^{7.1}	10 ^{6.8}

五、試製疫苗安全試驗：

將本試製疫苗稀釋液使用量以 2.0ml 及 0.2ml 分別皮下接種於 330 公克重之天竺鼠 8 隻及 15 公克重之小白鼠 16 隻，連續觀察二週，其間均無任何不良反應。

六、試製疫苗迷入病毒否定試驗：

取抗日本腦炎，抗豬瘟及抗假性狂犬病等三種血清，實施中和試驗，結果與抗豬瘟血清中和後接種於 ESK 單層細胞之 4 支試管內。均未發生 CPE，其 HA 亦為陰性，但於抗豬瘟血清中發現有高達 160 倍之日本腦炎 HI 抗體存在。與假性狂犬病抗血清中和後，接種於 ESK 單層細胞之 4 支試管內，皆發生 CPE，且其 HA 亦為陽性。

七、試製疫苗田間試驗之未經產母豬之抗體消長情形及其免疫効力：

臺北縣及苗栗縣各一養豬場提供試驗母豬 32 頭，逢抗分一次接種組，二次接種組，其二次接種間隔為二週，及對照組三組。每組於接種前及接種後每隔二週各採血一次至第八週止，測定其血清 HI 抗體力價之消長情形。如表 5 及表 6，且自配種起至分娩間之觀察，未見供試母豬有任何不良反應，於預產期前後分娩之仔豬中，接種組除有數頭似有營養不良狀況外，餘者均正常，至於對照組則不然，分詳列於表 3 及表 4。

表3 苗栗縣場受試新母豬之 HI 抗體消長情形及其分娩仔豬情形

Table 3 Immun-effect of gilts in field test (Chi-tin Pasture)

gilt number	virus titer (TC ID ₅₀)	inoculated times	HI titer					farrowed piglet				HI titer of gilt have farrowed after 1~3 days
			pre-vaccinated	Post-vaccinated				alive	dead	urinal	unusual	
				2	4	6	8					
3102	10 ^{6.0}	1	<×10	× 40	× 80	× 40	× 80	10	0	10	0	<×10
3103	10 ^{6.0}	1	<×10	× 80	× 160	× 40	× 160	7	0	7	0	<×10
3104	10 ^{6.0}	1	<×10	× 40	× 80	× 40	× 160	12	0	12	0	<×10
1305	10 ^{6.0}	1	—	—	—	—	—	5	1	6	0	× 40
1505	10 ^{6.0}	1	—	—	—	—	—	8	0	8	0	<×10
0601	10 ^{6.0}	1	—	—	—	—	—	7	0	7	0	<10
1801	10 ^{6.0}	2	× 320	× 640	× 320	× 40	<×10	9	0	9	0	× 20
2405	10 ^{6.0}	2	× 20	× 40	× 80	× 40	× 40	5	0	3	2*	× 40
2505	10 ^{6.0}	2	<×10	× 40	× 80	× 40	× 80	6	0	6	0	× 10
2401	10 ^{6.0}	2	—	—	—	—	—	12	0	12	0	<×10
2407	10 ^{6.0}	2	—	—	—	—	—	9	0	9	0	<×10
1306	10 ^{6.0}	2	—	—	—	—	—	7	0	7	0	× 10
1501	—	—	<×10	<×10	× 80	× 40	× 10	8	0	8	0	× 10
1702	—	—	<×10	<×10	× 160	× 80	<×10	0	6	0	6	× 20
1705	—	—	× 20	× 40	× 80	× 40	× 320	0	6	0	6	× 80
4105	Control	Control	—	—	—	—	—	0	0	0	5	× 160
1202	—	—	—	—	—	—	—	3	1	3	1*	—
1602	—	—	—	—	—	—	—	7	0	7	0	—
												24
												68

表 4 臺北縣場受試新母豬之 HI 抗體消長情形及其分娩仔豬情形

Table 4. Immuno-effect of gilts in field test (First Pastur Co.)

gilt number	virus titer (TC ID ₅₀)	inoculated times	HI titer						farrowed piglet				HI titer of the gilt have farrowed after 1~3 days	
			pre-vaccinated		post-vaccinated				alive	dead	farrowed piglet			unusual
			2	4	6	8	8	usual						
404	10 ^{6.0}	1	< × 10	× 80	× 160	× 80	× 20	9	0	9	0	0	< × 10	
410	10 ^{6.0}	1	< × 10	× 80	× 160	× 80	× 80	11	0	11	0	0	× 10	
415	10 ^{6.0}	1	< × 10	× 80	× 160	× 160	× 80	11	0	11	0	0	< × 10	
417	10 ^{6.0}	1	< × 10	× 40	× 80	× 160	× 80	12	0	12	0	0	× 20	
418	10 ^{6.0}	1	< × 10	× 40	× 80	× 80	× 40	10	0	10	0	0	× 10	
406	10 ^{6.0}	2	× 320	× 320	× 640	× 320	× 160	—	—	—	—	—	—	
408	10 ^{6.0}	2	< × 10	× 160	× 320	× 160	× 80	7	0	7	0	0	< × 10	
416	10 ^{6.0}	2	× 40	× 80	× 160	× 320	× 160	10	0	7	0	3*	× 40	
372	10 ^{6.0}	2	< × 10	× 40	× 80	× 160	× 80	12	0	12	0	0	< × 10	
395	10 ^{6.0}	2	< × 10	× 40	× 80	× 160	× 80	11	0	11	0	0	< × 10	
401			< × 10	× 40	× 640	× 320	× 160	0	6	0	6	6	× 160	
409			× 80	< × 10	× 160	× 160	× 80	8	1	8	1	1 ^o	× 40	
414	Control	Control	× 40	× 320	× 160	× 160	× 80	7	0	7	0	0	< × 10	
379			× 160	× 320	× 320	× 160	× 40	2	5	2	5	5 ^o	× 40	

註：*營養不良，○黑仔，△後期死胎。

討 論

S- 株之所以於 BK 細胞中之毒力價不高，可能由於培養病毒之 BK 細胞非來自年輕生殖力旺盛之牛腎或於疫苗製造過程中無法將細胞中發育病毒全部釋出之故。

at 株疫苗之製造材料，依 TAKEHARA 報告 HK 細胞乃是非常適合於製造日本腦炎病毒之材料。但本省繁殖之田鼠 (Hamster) 者甚少，其淨潔之田鼠更是難求，祇得以 ESK 細胞代之，而株化 ESK 細胞惟恐有 Oncogenesis 之存在。故以初代 SK 細胞同時製造疫苗，但以初代 SK 細胞製造疫苗，亦感不當，亦恐病毒性疫病之病毒迷入，故 ESK 細胞乃不失為 at 株製造疫苗之一材料。

疫苗保存試驗，以 10% Lactose 加 0.3% PVP 為保護劑者不太理想，宜以 5% monosodium glutamic acid 1 份及 10% Lactose 4 份為保護劑者為佳。

疫苗田間試驗効力，由其結果看來，本試製疫苗之効力筆者等以為頗符合理想，希今後能以此疫苗大量應用，以利豬隻之增產。

誌 謝

本研究承蒙中國農村復興聯合委員會之經費補助及承崎項示範牧場及臺北第一農場提供田間試驗豬隻及協助特此致謝。

參 考 文 獻

1. 林再春、廖述吉、陳清 1966：動物用日本腦炎疫苗之製造試驗，第一報：白鼠腦水劑疫苗之試製及其免疫性試驗。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 3, 9~17。
2. 詹益波、呂清泉、陳茂振、劉燃炎，1967 臺灣家畜日本腦炎之研究：I. 越夏及未越夏日本腦炎 HI 抗體調查。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 4, 1~11。
3. 詹益波、陳茂振、蘇杰夫、劉燃炎、劉永和，1968：臺灣家畜日本腦炎之研究：II. 豬隻日本腦病毒分離及其性狀。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 5, 113~121。
4. 詹益波、蘇杰夫、黃智明、黃瑞禎，1970 家畜日本腦炎免疫用減毒株之研究。臺灣家畜衛生試驗所研究報告 No. 7, 35~44。
5. 落合美和子、內布洋一、山元通孝、市原強、市原鶴雄 (化血研)：第 68 回日本獸醫學會講演要旨 19 (1969)：日本腦炎弱毒株 5 株之保存試驗。
6. Clarke, D. H. and Casals J. 1958：Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-inhibition with Arthropod borne Viruses Amer. J. Trop. Med. Hyg., 7: 561-573.
7. Kissling, R. E. 1957：Growth of Several Arthropod-borne Viruses in Tissue Culture. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96: 290-294.
8. Sazawa H., Sugimori T., Miura Y., Morimoto T. and Waoanabe M. 1969：Response of Swine to Anattenuated Strain of Japanese Encephalitis Virus Oatained by Passage in Bovine Kidney Cell Cultures. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart, 9 (in press).
9. Takehara K., Mitsui M., Nakamura H. and Nakamura J. 1969：Studies on Japanese Encephalitis Live Virus Vaccine. I. Development of an attenuated strain of Virus by Serial Passage in Hamster Kidney Cell Cultures. NIBS Bull. Biol. Res. 8: 11-12
10. Takehara K. Missui M., Nakamura H. and Nakamura J. 1969：Studies on Japanese Encephalitis Live Virus Vaccine. II. Immunization of Pigs with an Attenuated Strain of Virus. NIBS Bull. Biol. Res. 8: 23-37。

Studies on Preparation of Japanese Encephalitis of Living Vaccine in Swine

K. F. Lin, M. H. Jong, I. P. Chan, Y. H. Yang,
Y. S. Lu, C. Lee, T. C. Chiu, S. S. Chen

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

JEV has caused the stillbirth and neonatal death in pregnant sow through Taiwan for a long time. We have produced a killed vaccin for the field use already but the problem has not been resolved. In present study a living vaccin was prepared from JEV at strain. The security, homogeneity, and effectiveness of the vaccin was studied both in laboratory test and field trials. The results indicated that the vaccin was fairly good for the control of Japanese encephalitis in swine.