

鴨病毒性肝炎活毒疫苗之研究

呂榮修、李永林、林再春、黃士則、邱朝齊、楊揚輝

(臺灣省家畜衛生試驗所)

摘 要

以5886雞胚胎滅毒毒株，接種於雞胚胎所得之感染尿液及感染胎兒所製成之病毒材料，加1% Sodium Glutamate (1:1), 20% Lactose (1:1) 及25% Skimmilk (5:1) 做 Adjuvant，所製成之冷凍乾燥疫苗，不僅對小雞安全性甚佳，且製劑之保存性及免疫效力均佳。

如試製疫苗以 $10^{6.0}$ EID₅₀/ml 接種於1日齡小鴨後，其中和抗體於第3日開始上昇，有 log 1.31-1.69，至第6日達1.5~1.75第14日後達1.84~2.36。

試製疫苗在田間應用，共噴霧接種健康小鴨羣 18,300隻，死亡率 1.21%，對已感染羣噴霧接種 8,250隻，死亡率 9.2%。肌肉注射健康小鴨羣 12,230隻，死亡率 3.7%，肌肉注射已感染之小鴨羣 11,100隻，死亡率12%，以點鼻接種健康小鴨羣 1,200隻，死亡率 4.8%，對照未接種羣之死亡率有 24.3~43%。

本疫苗接種後，宜注意防止DVH在抗體未產生前之感染。

緒 言

鴨病毒性肝炎之防治，Levine (1959)¹⁾，Rispen (1966)¹⁰⁾，白坂 (1967)²⁾，以耐過鴨血清或免疫鴨血清作防疫措施，效果尚稱良好，而本省在1971年，各地所發生之鴨病毒性肝炎 (DVH)，經呂等 (1972)³⁾ 以耐過鴨血清，大量供應疫區小鴨羣之緊急防治，雖能及時壓制本病之流行，但經呂等 (1972)³⁾ 調查，本病已污染全省各地，使用血清之防治工作，已非上策，不但因耐過鴨血清取之有限，不合經濟原則，且為要求強固之免疫效力，因此研製疫苗及使用乃當前急務。Asplin (1958)⁸⁾，Zubtsova (1966)¹²⁾，Toth (1966)¹¹⁾，Doroshko (1966)⁵⁾，Rispen (1966)¹⁰⁾，Cherby (1967)⁴⁾ 以及 Hwang-Jen (1965, 1972)¹⁷⁾ 以不同滅毒方式製造之疫苗，再以不同之接種方法，而證明均能獲得良好的免疫效果。

於本研究製造之疫苗，乃以病毒株經雞胚胎滅毒83代以上，再配合各種添加劑及不同之組成而製成，經以各種接種方式而探討其免疫效力，保存性及安全性，以求取良好之免疫方式，盼能成為有效控制及杜絕本病之發生，對臺灣養鴨事業當有所裨益。

材料與方法

1. 供試病毒：製造用毒株，於1971年承蒙美國 University of Pennsylvania 黃任博士贈送之 DHV 5886 Strain，以雞胚胎滅毒83代病毒，對小鴨已喪失病原性。
2. 鴨腎細胞之製備：依照呂等 (1972)³⁾ 實施之方法行之。
3. 供試蛋及製造用蛋：如上述¹⁾。
4. 感染價和中和價之測定：如上述¹⁾。

5. 試驗用小鴨羣：由宜蘭養鴨繁殖中心所提供之無抗體小鴨。
6. 預防接種用小鴨羣：在宜蘭、高雄田間所飼養之小鴨羣，均孵化不久至3日齡以內者。
7. 媒劑之使用：詳如表1。
8. 保存性試驗：在冰室保存之冷凍乾燥疫苗，按月任意抽取兩支，經復原後接種於7日齡雞胚胎，測定其感染價。
9. 安全性試驗：使用無抗體小鴨（1至3日齡）接種並觀察21日有無異樣。
10. 使用5886毒株製造活毒疫苗試驗：5886毒株（CF83th）以 $10^{4.0}$ EID₅₀/0.1 ml 接種於8日齡雞胚胎，經48小時後，陸續死亡之雞胚胎，安置冰室一夜，然後採集尿液及感染胎兒。

結 果

1. 製造用感染尿液之病毒含有量達 $10^{6.0} \sim 10^{7.0}$ EID₅₀，胎兒5倍乳劑有 $10^{7.0} \sim 10^{8.0}$ EID₅₀，胎兒病毒量比尿液病毒量較高，因此本疫苗採用兩者混合為基材之用。

冷凍乾燥疫苗所用媒劑（Adjuvant）之選擇試驗：以各種添加劑及不同之組成進行，其成績如表1。20% Glucose 與1% Glutamate 添加組，乾燥後之乾固狀態不佳，引起發泡及輕浮。單以尿毒為基材再加 Adjuvant 所乾燥者，其乾燥前與乾燥後之病毒含有量相差有 $\log 1.0 \sim 1.5$ EID₅₀ 以上。如以感染尿液與感染胎兒為基材所混合者，其乾燥前與乾燥後之病毒含有量僅差 $\log 0.5 \sim 1.0$ EID₅₀，因此試製疫苗即採用感染尿液加感染胎兒乳劑為疫苗製造用基材。媒劑即採用1% Glutamate (1:1), 20% Lactose (1:1), 25% Skimmilk (5:1)。

2. 冷凍乾燥鴨病毒性肝炎活毒疫苗之保存性試驗：

以1% Sodium Glutamate (1:1), 20% Lactose (1:1) 及 25% Skimmilk (5:1) 為媒劑所冷凍乾燥之疫苗儲存冰室2個月，其病毒力價尚稱穩定，其成績如表2。

表 1. 以各種媒劑備製之鴨病毒性肝炎活毒疫苗之比較

Table 1. Compared of D. V. H Vaccine Prepared by Vavions

materials ND 基 材	Adjuvant Component						配合比率 Component ratio		乾 燥 狀 態 Dry condition	病毒力價 Virus titer (EID ₅₀)	
	PVP	Glut- amate	Gelat- in	Gluc- ose	Lact- ose	Skim- milk	基材	安定劑		乾燥前	乾燥後
1. 尿 毒	—	1%	—	—	20%	—	3	1	良 good	6.0	<4.0
2. 胎兒毒	—	1%	—	—	20%	—	3	1	良 good	7.0	6.0
3. 尿毒、胎兒毒 (3:1)	—	1%	—	—	20%	—	3	1	良 good	≥7.5	5.5
4. 尿 毒	—	1%	—	20%	—	—	3	1	不良 bad	7.0	5.5
5. 尿毒、胎兒毒 (3:1)	—	1%	—	20%	—	—	3	1	不良 bad	6.0	5.5
6. 尿 毒	0.3%	1%	1%	—	10%	—	1	1	良 good	6.5	5.5
7. 尿毒、胎兒毒	0.3%	1%	1%	—	10%	—	1	1	良 good	6.5	5.5
8. 尿 毒	0.3%	1%	—	—	20%	—	1	1	優 excellent	6.0	<4.0
9. 胎兒毒	0.3%	1%	—	—	20%	—	1	1	優 excellent	7.5	5.5
10. 尿 膜	0.3%	1%	—	—	20%	—	1	1	優 excellent	5.5	<4.0
11. 胎兒毒	—	1%	—	—	20%	25%	5	1	良 good	6.5	6.0
12. 尿 膜	—	1%	—	—	20%	25%	5	1	優 excellent	6.5	6.0

表 II 鴨病毒性肝炎活毒疫苗保存試驗

Table II. Conservative experiment of D. V. H Vaccine

Lot	保存方法 method of conserve	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (個月)
1	冰室 Ice box	6.25*	6.25	6.0	6.25	6.25	6.0	5.75	6.0	6.0	5.75	6.0	5.75	5.75
2	冰室 Ice box	6.5	6.5	6.25	6.25	6.0	6.25	6.25	6.25	6.0	6.0	5.75	6.0	6.0

*病毒力價 10EID₅₀ 以log 表示。

Virus titer

3. 試製疫苗之安全性試驗：

試製疫苗之 10^{6.0} EID₅₀/ml, 對 1~3 日齡小鴨, 100 隻分別以注射, 點鼻, 腳蹼穿刺, 飲水, 噴霧等接種, 經觀察 21 日並無發現異樣。

4. 試製疫苗對一日齡小鴨中和抗體上昇情形：試製疫苗 10^{5.0} EID₅₀/ml 以噴霧、注射、點鼻、腳蹼穿刺等方法接種於一日齡小鴨後, 其血中中和抗體於第 3 日後上昇, 由接種前之 log<0.6 昇高至 1.31~1.69, 至第 6 日有 1.07~1.25, 14 日後達 1.84~2.36。成績如圖 1。

5. 試製 DVH 冷凍乾燥疫苗田間應用試驗：

在高雄縣湖內鄉選 9 羣小鴨 18,300 隻, 分別以 250 及 500 劑量噴霧健康小鴨結果死亡 221 隻, 死亡率 1.21%, 在觀察 21 日未見發生 DVH。對已感染羣 8,250 隻, 經噴霧接種, 結果死亡 760 隻, 死亡率平均 9.2%, 其成績如表 III 及 IV。以注射方式經接種健康小鴨 12,230 隻, 斃死 463 隻, 死亡率平均 3.7%, 對發生感染小鴨羣接種 11,100 隻, 死亡 1,335 隻, 死亡率 12.0%, 其成績如表 V。

Log VN

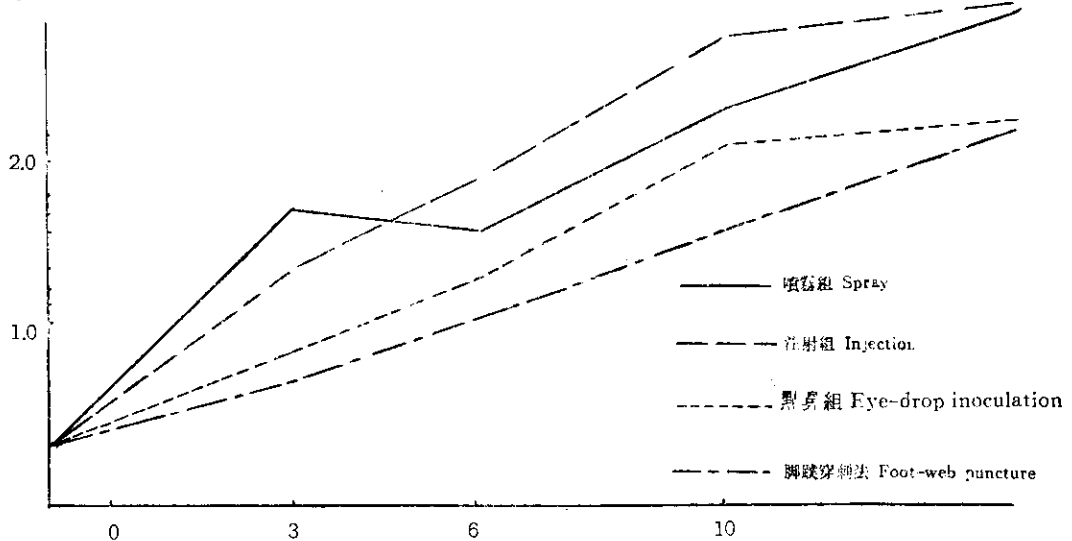


圖 1 DVH 活毒疫苗接種 1 日齡小鴨中和抗體上昇情形。

Fig. 1 Virus-Neutralizing Titers from Duckling Vaccinated with D. V. H. Vaccine at time of one day duckling.

本疫苗點鼻健康小鴨羣 2,750隻，斃死132隻，死亡率4.8%，胸蹠穿刺健康小鴨 2,920隻，死亡196隻，死亡率6.7%，成績如表VI，未經疫苗接種之對照組，在同一環境下自然感染，其死亡率高達24.3~43%，如表VII。

表III DVH 活毒疫苗噴霧健康組

Table III Spray of D. V. H. Vaccine to heathy group

小鴨羣 Duckling group	接種隻數 No. of inoculation	日齡 Age	疫苗使用法 Route of inoculation	疫苗劑量 Dose	接種前發生情形 Before inoculation	死亡隻數(%) No. of Death
1	1,500	3	噴霧 Spray	250	健康 health	4 (0.26)
2	2,200	2	〃	250	〃	29 (1.32)
3	3,400	2	〃	250	〃	50 (1.47)
4	3,000	3	〃	250	〃	61 (2.03)
5	2,000	2	〃	500	〃	48 (2.4)
6	1,600	2	〃	500	〃	0 (0)
7	800	2	〃	500	〃	4 (0.5)
8	1,200	2	〃	500	〃	25 (2.08)
9	2,600	2	〃	500	〃	0 (0)
計 Total	18,300	—	〃			22 (1.21)

表IV DVH 活毒疫苗噴霧感染組

Table IV Spray of D. V. H. Vaccine to infection group

小鴨羣 Duckling group	接種隻數 No. of inoculation	日齡 Age	疫苗使用法 Vaccine duckling according to Nonte of inoculation	疫苗劑量 Dose	接種前發生情形 Before inoculation	死亡隻數(%) No. of Death
1	1,400	4	噴霧 Spray	500	200	88 (7.3)
2	2,200	3	〃	500	180	120 (8.9)
3	2,200	4	〃	500	400	220 (12.2)
4	1,500	3	〃	500	250	95 (7.6)
5	2,600	3	〃	500	470	237 (10.1)
計 Total	9,700	—	〃			760 (9.2)

表 V DVH 活毒疫苗注射健康組及感染組試驗

Table V Injection of D. V. H. Vaccine to healthy group and infection group

小鴨羣 Duckling group	飼養隻數 No. of breeding	接種隻數 No. of inoculation	日齡 Age	疫苗使用法 Route inoculation	疫苗劑量 Dose	接種前死亡情形 N. of Death before inoculation	死亡隻數 (%) No. of Death
健康羣 Healthy group							
1	930	930	2	注射 Injection	250	0	15 (1.6)
2	2,000	2,000	3	◇	250	0	25 (1.2)
3	1,500	1,500	3	◇	250	0	0 (0)
4	2,000	2,000	2	◇	250	0	123 (6.1)
5	3,200	3,200	2	◇	250	0	168 (5.2)
6	2,600	2,600	2	◇	250	0	132 (5.1)
計 Total	12,230	12,230					463 (3.7)
感染羣 Infection group							
A	3,400	3,400	3	◇	250	100	180 (3.6)
B	6,500	6,500	4	◇	250	1,000	900 (16.3)
C	2,600	2,600	3	◇	250	300	246 (10.6)
計 Total	12,500	12,500					1,335 (12.0)

表 VI DVH 活毒疫苗點鼻及腳蹼穿刺組試驗

Table VI Eye-drop inoculation and Foot-web puncture of D. V. H Vaccine

小鴨羣 Duckling group	飼養隻數 No. of breeding	接種隻數 No. of inoculation	日齡 Age	疫苗使用法 Route of inoculation	疫苗劑量 Dose	接種前後發生情形 Before and after inoculation	死亡隻數 (%) No. of Death
1	800	800	3	點鼻 Eye drop	250	健康 Health	36 (4.5)
2	1,000	1,000	2	◇	250	◇	38 (3.8)
3	950	950	2	◇	250	◇	58 (6.7)
計	2,750	2,750	—				132 (4.8)
A	1,200	1,200	3	腳蹼 Foot-web	250	◇	106 (8.8)
B	970	970	2	◇	250	◇	32 (3.2)
C	750	750	2	◇	250	◇	58 (5.1)
計	2,920	2,920	—				196 (6.7)

表VII 對 照 組

Table VII Control group

小鴨羣	飼養隻數	接種隻數	日 齡	疫苗使用法	疫苗劑量	接種前後發生 情 形	死亡隻數 (%)	對照	Control
Duckling group	No. of breeding	No. of inocu- lation	Age	Route of inocu- lation	Dose	Before and after inocula- tion	No. of Death (%)	未接隻數 No. of unvaci- nated.	死亡隻數 No. of Death (%)
1	1,000	500	2	噴霧 Spray inoculation	500	健康 Health	4 (0.8)	500	215 (43)
2	800	400	2	〃	500	〃	5 (1.25)	400	52 (38)
3	3,800	3,570	3	注射 Injection inoculation	500	〃	0 0	230	0 0
4	1,200	600	3	〃	500	〃	19 (3.1)	600	146 (24.3)
計 Total	6,800	5,070	—	—	—	—	—	1,730	—

討 論

有關鴨病毒性肝炎 (DVH) 之防治, Levine⁹⁾ 使用耐過鴨血清, 以肌肉注射 0.5ml 效果甚佳, Rispens¹⁰⁾ 白坂²⁾ 及呂榮修¹⁾ 等相繼以免疫鴨血清或耐過鴨血清, 對本病之防治, 均獲得令人滿意之成績。

對活毒疫苗 Asplin³⁾ 以鴨胚胎減毒之 TN 毒, 免疫種鴨或應用於小鴨之腳蹼內穿刺免疫, 結果堪稱良好, Hwang-Jen⁶⁾ 以強毒免疫 8 個月齡北京鴨, 以 $10^{6.0}$ ID₅₀/ml 毒量分 2、4、6 次每次隔 1 週肌肉注射, 結果在其 28 週免疫期間, 經所孵化之小鴨均能防禦強毒之感染, 其唯一缺點是會排毒達 10 週之久, 因此強毒雖能賦予良好又強固之免疫, 但却難以實地應用, Zubtsova¹²⁾ 以雞胚胎減毒或以小雞馴化毒, 能對 1 日齡之小鴨獲得免疫效果, 又 Joth¹¹⁾ 以雞胚胎減毒之 TN 毒株, 以口服方式免疫種鴨, 結果在其 14 週之免疫期間所孵化之小鴨有抗病力, 其死亡率僅 1.8%, 或改用 1.0 ml 皮下注射後, 再隔 1 個月後, 用 2 ml 皮下注射免疫種鴨, 結果在 28 週之免疫期間所孵化之小鴨均具抗病力, 死亡率僅 1.9%, 對照組有 10.6%。Cherby⁴⁾ 以減毒株免疫孵化後 4~16 小時之小鴨用 1000~5000 EID₅₀/Dose 或用倍量 (2 Dose) 免疫, 結果在 5 週期間能得良好之防禦效果。

Doroshko⁵⁾ 以雞胚胎減毒毒株及火雞胚胎減毒之毒株, 免疫接種 2~3 日齡小鴨, 經過 5~7 日後, 能耐強毒之攻擊, Rispens¹⁰⁾ 以減毒株免疫種鴨 2 次, 間隔為 6 週, 結果在其免疫 9 個月期間, 所孵出之小鴨, 均能抗禦本病之感染。Hwang-Jen^{7, 8)} 以雞胚胎減毒之毒株, 以口服, 點眼、腳蹼穿刺或皮下注射於小鴨, 結果在 3~6 日內可抵禦強毒之感染, 如小鴨以 10^4 ID₅₀ 毒量肌肉免疫注射, 結果在第 4 日可產生抗體, 若以 10^{-4} ID₅₀ 之病毒免疫, 即 7 日後能產生抗體, 並全部耐過強毒之攻擊, 如口服本疫苗 10^4 ID₅₀ 毒量者, 即於第 6 日生效。此毒具有雄厚之免疫效力被證實, 且分讓於本研究疫苗製造之用。

對活毒疫苗之研製, 其病毒之含量及乾燥用媒劑, 直接影響疫苗之真價, 結果在本試驗中得悉,

其中和抗體於第3日開始產生至 $\log 1.31 \sim 1.69$ ，至第6日達 $1.07 \sim 1.75$ ，14日後達 $1.84 \sim 2.36$ ，與 Hwang-Jen 之成績相似，在外國對本疫苗之接種方法，似未見有噴霧接種者，筆者等試探其利用價值，結果與注射、點鼻及腳蹼穿刺法均得同一成績，因此在野外以噴霧接種健康小鴨羣18,300隻，死亡者221隻，死亡率平均1.21%，肌肉注射12,230隻，死亡463隻，平均死亡率3.7%，點鼻接種2,750隻，死亡132隻，死亡率平均4.8%，腳蹼穿刺2,950隻，死亡196隻，死亡率6.7%，未接種疫苗之健康小鴨羣1,730隻，死亡率達24.3~43%。

此次製成供試之 DVH Vaccine 係使用 Hwang-Jen 之毒株，所製成之冷凍乾燥疫苗其應用成績與 Hwang-Jen 所報告者尚能吻合，但實際問題在於免疫抗體尚未產生之階段，即孵化後1~6日感染 DVH 時，將無法抵禦強毒之感染，此期亦即危險期，將如何來彌補將是今後之課題，如果要使 DVH 不致發生，應全面對種鴨採取全面注射，如果在產蛋前能兩次以上預防接種，其所移行於小鴨之抗體，將有效保護小鴨之安全。

誌 謝

本報告之完成，承蒙農復會李主任委員崇道，余組長如桐之竭力贊助，又蒙撥助國科會經費得以完成，且蒙美國 Pennsylvania 大學黃任博士贈送 5886毒株，謹此表示謝意。又本計劃之部份研究由高雄縣家畜疾病防治所，宜蘭縣家畜疾病防治所共同完成。

參考文獻

1. 呂榮修、林再春、李永林、謝快樂、陳忠松、陳守仕；1972：在臺灣鴨病毒性肝炎耐過鴨血清緊急防治試驗，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 9. 87~95
2. 白坂昭治、玉崎幸二、久池井忠男、佐澤弘士；1967：傳染性アヒル肝炎ウイルス中和抗體の持續とヒナへの移行について 日獸會誌 No. 1. 20 No. 3 115~117
3. Aspline, F. D., 1958: An Attenuated Strain of Duck Hepatitis. *Vet. Rec.*, 70:1226-1230.
4. Cherby, J., 1967: Medical Prophylaxis of Duck Virus Hepatitis. *Med. Vet.* 143: 311-325.
5. Doroshko, I. N., Smiyan, Y. P. & Panikar, I. I., 1966: Study of Specific Biologicals Against Virus Hepatitis in Ducklings. *proc 13th Wls's Powlt. Congr.*, Kiev 426-430.
6. Hwang, J., Ash W. J., Dongherty Q. E., 1962: Production of passive Immunity Against Viral Hepatitis in White Pekin Ducklings. *J. A. V. M. A. Vol.* 141: 1474-1476.
7. Hwang, J. 1965: A chicken-Embryo-Lethal Strain of Duck Hepatitis Virus. *Avian Dis.*, 9: 417-422.
8. Hwang, Jen 1972: Active Immunization Against Duck Hepatitis. *Virus Am. J. Vet. Res.*, Vol. 33, No. 12, 2539-2544.
9. Levine, P. P. 1959: Duck Virus Hepatitis. *Disease of Poultry*. 6th ed., P. 622-626, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
10. Rispen, B. H. 1966: The Control of Virus Hepatitis in Ducklings. *Leiden H. E. Stenfelt Kroesse N. V.* 276.
11. To th B., Czovek, L. & Markovits, P, 1966: Role of Active Immunization of Breeding Stock with Attenuated Virus in the Control of Virus Hepatitis of Ducks. *Magy. Allatoru. Lap.* 21: 208-210.
12. Zubtsova, R. A. 1966: Obtaining Attenuated Strains of of Duck Hepatitis Virus. *Veterinarina Moscow* 43. No. 10 21-23.

Study on Duck Virus Hepatitis Attenuated Vaccine

Y. S. Lu., Y. L. Lee., T. C. Lin., T. S. Hwang., T. C. Chiu., Y. H. Yang

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

SUMMARY

1. Infected allantoic fluid and chicken embryo with DHV-5886 strain attenuated in chicken embryo passage were prepared for vaccine product. 1% Sodium Glutamate (1:1), 20% Lactose (1:1) and 25% Skimmilk (5:1) were mixed and used as adjuvant. The tests for safety, potency for ducklings and preservation were shown quite well.
2. One-day aged ducklings received one dose of $10^{5.0}$ EID₅₀/ml would produce neutralization antibody titer ranging from log 1.31-1.69, 3 days post-inoculation and from 1.07-1.75 as well as 1.84-2.36, 6 and 9 days post-inoculation respectively.
3. Field tests were performed with this vaccine. 18,300 ducklings in uninfected farms were vaccinated and mortality was 1.21%, but 8250 ducklings in infected farms were vaccinated with spraying method and mortality was 9.2%. 12,230 healthy ducklings were intramuscularly vaccinated and mortality was 3.7%, but 11,100 ducklings in infected farms were done intramuscularly and mortality was 12%. By nasal inoculation, 1,200 healthy ducklings showed 4.8% of mortality. but unvaccinated control group showed 24.3-43%.
4. After vaccination, it should be noted on the prevention of DHV-infection occurrence before antibody production.
5. The direction of vaccine studys in future would be emphasized on vaccination of breeding duck, application of interferon and further attenuation of virus strain.