

新城雞瘟 TCND 活毒疫苗之研究

(一) 乾燥疫苗之試製及其安全效力試驗

楊揚輝 林進發 陳由昌 劉義雄 黃文徽
江良興 蘇英誌 張康弘 詹益波 陳守仕

緒 言

新城雞瘟為雞病中最可怕之急性傳染病，蔓延極為劇烈，無論大小養雞場均難免遭受發生，為防止本病之侵襲應用品質優良之疫苗徹底實行平時預防注射為不可缺乏之措施，臺灣之養雞事業已進入企業化並甚具規模，故對新城雞瘟之防治極需具有免疫持續期間較長之疫苗。

本省自民國四十七年開始對新城雞瘟之防治一向採用 Formalin 滅毒後之死毒以 Al-Gel (Aluminum Hydroxide Gel) 吸着其有效成份而製成之肌肉注射用死毒至今 (林再春¹、中村稔治等²) 惟其應用於幼齡雞隻較難得到完全的免疫效力，故幼齡雞隻對新城雞瘟之防治均靠進口之弱毒活毒疫苗。

T. C. N. D. Virus (Tissue Culture-Newcastle Disease Virus) 係於1948年由 Bankowski 以 N. D. V. California 11914 株應用組織培養法所建立成之毒株，其病毒型別屬於 Messogenic Type (Bankowski 等³)，由其製成之疫苗因使用異種動物細胞培養而製成，故有避免介卵性傳染病傳播之危險。據日本北里研究所之報告⁽⁴⁾，接種本疫苗後具有高度免疫長期持續性，如以二次接種可持續一年以上，故為明瞭 T. C. N. D. 毒之特性及其疫苗之製造方法與實用上之特點等，於1971年由日本農林省家畜衛生試驗場分讓該種毒供為試驗，茲將所得成績報告於後。

試驗材料與方法

(一) 毒株：

1. T. C. N. D. 株：係於1971年由日本農林省家畜衛生試驗場分讓者。
2. N. D. V. 佐藤株：係本所繼代保存供新城雞瘟疫苗檢定攻擊用毒株。
3. N. D. V 石井株：供 H. I. test 之抗原用係由日本家畜衛生試驗場分讓後在本所以雞胚胎繼代保存。

(二) 供試雞：

1. 無移行抗體雞：係購自供本所新城雞瘟疫苗檢定用之無抗體雞。
2. 移行抗體雞羣：係購自民間養雞場卵用種之小公雞。

(三) 種雞蛋：購自供本所製造新城雞瘟疫苗用 HI 抗體在10倍以下者。

(四) 雞腎細胞：自健康小雞以無菌操作採取之腎臟。

(五) 豬腎細胞：購自中壢地區農戶自產本地種健康初生小豬腎臟製備單層細胞供用。

(六) 健牛血清：採自本所關西疏散處隔離飼養之小黃牛。

(七) 試藥：配製 Earle's 液之各種試藥，Bovine Albumin, Yeast Extract, Glucose, P. V. P. (Polyvinyl Pyrrolidone), Lactose, Skimmilk 等。

(八) 真空冷凍乾燥機：係本所為冷凍乾燥兔化豬瘟疫苗製造用之西德製 Leybold 之 Chamber 型。

(10)

(九) 種毒 (Seed Virus) 之試製：

初生仔豬全放血後以無菌操作採取腎臟剝棄包膜取其皮質部剪碎後經 0.25% Trypsin 消化收集細胞以 Earle's 培養液調製成適當細胞數之懸浮液分裝於角瓶置於 37°C 靜置培養，俟 Monolayer 完全形成後除去培養液並以 P. B. S. 洗滌，留取培養瓶數之 20% 不接種種毒供為對照，其餘予以接種種毒後於室溫內感作一小時再加上 Earle's 維持液繼續在 37°C 培養後將培養液收集遠心並行雜菌檢定及留取少量供力價及毒力測定其餘之培養液於 -90°C 冷凍保存，待供疫苗製造用。

力價測定：

Seed Virus 經培養收集時於每一批留取小量之培養液以 HA Test 並同時進行 EID₅₀, TCID₅₀ 測定其力價。HA Test 採用病毒 2 倍稀釋法及 0.5% 之鷄血球懸浮液。EID₅₀ 之測定時使用孵化 10 日齡之種蛋，病毒以 10 倍稀釋法稀釋每一稀釋階段接種四枚，每枚接種 0.1ml 於尿囊中。TCID₅₀ 測定係使用自健康鷄採取之腎臟以 0.25% Trypsin 消化後收集之細胞以 Earle's 培養液培養於小試管內置 37°C 靜置培養至其 Monolayer 完全形成後病毒以 10 倍稀釋法稀釋，每一稀釋階段接種四支試管，每支接種 0.1ml，觀察 CPE 之發生判定其力價。

毒力試驗：

將收集之 Seed Virus 注射於 4 日齡之雛雞，分腦內注射組及肌肉注射組，觀察其注射後之斃死情形。

試 驗 成 績

(一) 種毒之 HA 力價，EID₅₀ 及 TCID₅₀

於本試驗試製成之 Seed Virus 經力價測定結果 HA 價 $\times 16$ EID₅₀/0.1ml 為 $10^{7.1}$ ，TCID₅₀/0.1ml 為 $10^{7.2}$ ，其毒力經測定肌肉注射 13 隻結果均健存，腦內接種 13 隻結果斃死 11 隻。

(二) TCND 毒以 SK 細胞培養增殖情形

TCND 毒培養於 SK 後之增殖曲線係以 Monolayer 發育完成之 SK 細胞經接種種毒置於 37°C 培養，每隔數小時抽取少量培養液以 TCID₅₀, EID₅₀ 及 HA test 測定以觀察其增殖情形，所得成績如圖 I，其於培養後至 65 小時病毒增殖達最高峰，又 EID₅₀ titer 與 TCID₅₀ titer 相差無幾，以 HA test 測定血球凝集素在接種後第 40 小時開始上昇，至 65 小時昇高峰以後隨時間逐漸下降。

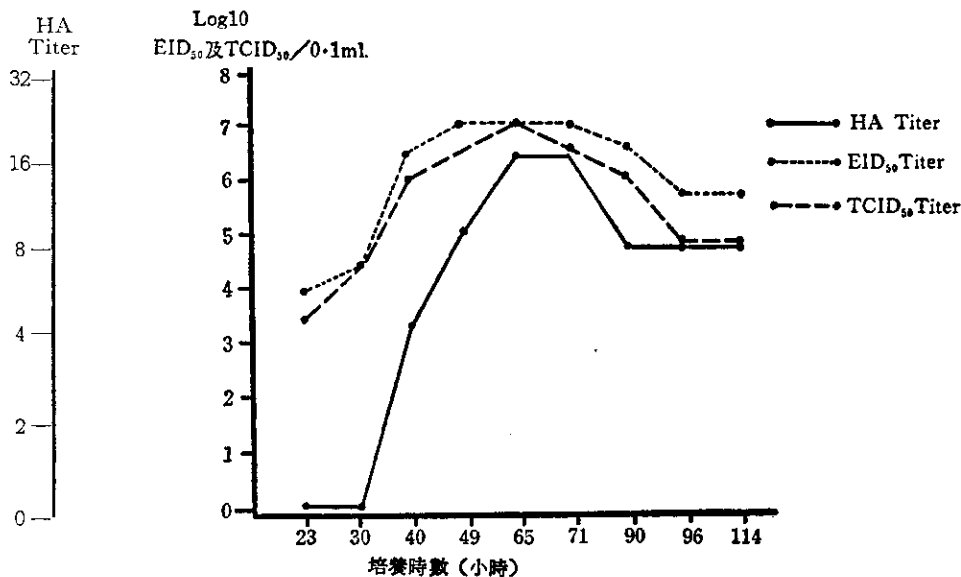


圖 I TCND Virus 於 SK 細胞培養之增殖情形

(三) TCND 疫苗製造試驗

病毒之培養與 Seed Virus 之試製相同，將收集之病毒培養液，經力價測定後以 Earle's 液稀釋，再加等量之乾燥媒劑使成每劑量之病毒含量在 $10^{4.0}$ EID₅₀ 以上，並加抗生素充分混合後分裝於真空瓶內於 -70°C 冷凍櫃內行預備凍結，以 Leybold 乾燥機乾燥並經真空封栓。共試製三批供試。

(1) 對無移行抗體雞之安全效力試驗：

以試製成之疫苗三批，其各批每劑量之病毒含量均在標準以上，對56日齡中雞每隻以一劑量肌肉接種，於接種後10天及取5隻對照以 NDV 佐藤 Strain 腦毒 1,000MLD, I. M. 攻毒且於接種前及攻擊前各採取血清行 HI 抗體測定，經試結果於疫苗接種後均無不良反應，且其攻擊耐過率均為100%，其成績如表 I。

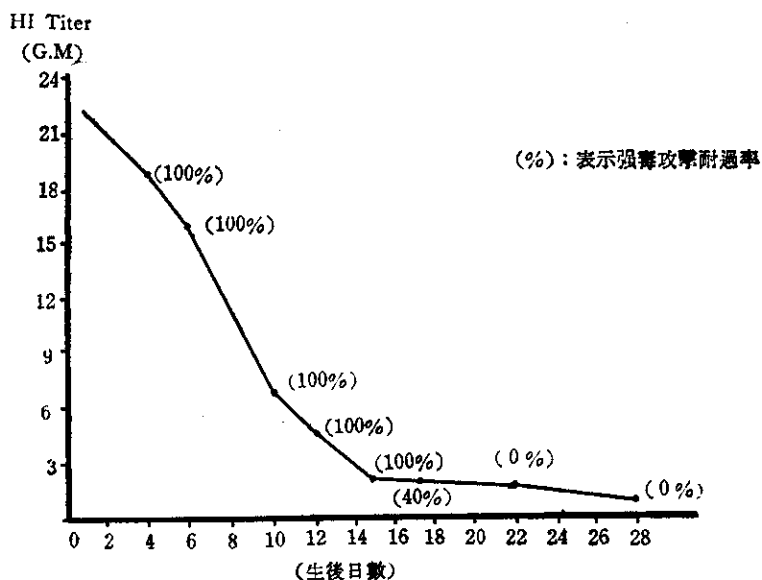
表 I 試製 TCND 疫苗對56日齡中雞之效力試驗成績

疫苗批別	接種量 (1劑量)	供試隻數	H. I 價 (G. M)		攻擊後健存數	耐過率%
			接種前	攻擊前		
1	I. M.	20	0~2 (0.01)	2~64 (8.63)	20	100
2	◇	10	0~4 (0.20)	2~32 (4.49)	10	100
3	◇	9	0~2 (0.21)	4~64 (20.16)	9	100
對照	◇	10	0~2 (0.21)	0~2 (0.01)	0	0

(2) 對移行抗體雞之免疫效力試驗：

(i) 雛雞移行抗體之消長及其防禦能力測定

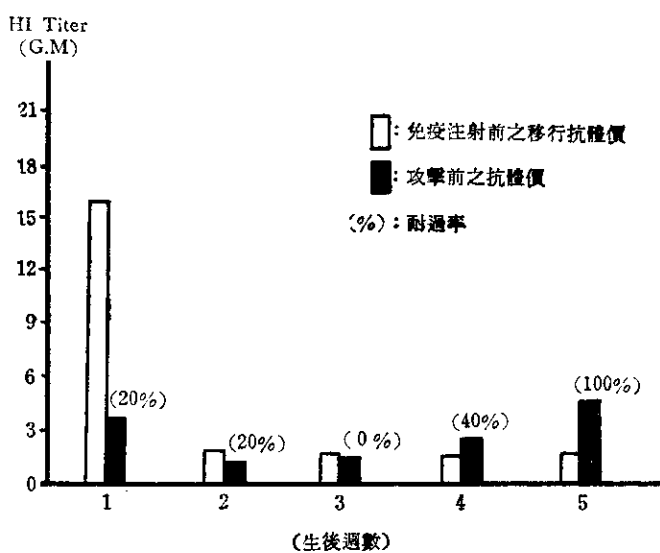
以購自民間養雞場卵用種初生小雛公雞一批，其移行抗體價於每次測定時由雞羣中任意抽出5隻採取血清檢查，防禦能力之測定亦同樣於雞羣中任意抽出5隻供測定，經測定結果於1日齡時其移行抗體 HI 價 GM 22.6 倍，4日齡為 18.3 倍，6日齡為16倍，以後逐漸下降至28日齡時消失。於4、6、10、12日齡時以強毒佐藤株 1,000M. L. D 0.1ml I. M. 及 15日齡以後各日齡均以 1,000M. L. D. 0.125ml, I. M. 攻擊結果其耐過率 100%，17日齡時僅 40%，於21日齡 HI. GM. 1.6 倍及 28日齡時 HI. GM. 1.4 倍時均無法耐過 1,000M. L. D. 0.2ml I. M. 強毒攻擊，其成績如圖 II



圖II 雞 N. D 移行抗體之消長及其防禦能力

(ii) 對移行抗體雞之免疫效力試驗：

本試驗供試雞與上項試驗之供試雞為同一批，將供試雞分成五小批，分別於生後每週齡時各予以注射一批並經十天後任抽 5 隻供 H. I 抗體測定，5 隻予以強毒攻擊（1 至 4 週齡時以 1,000M. L. D. 0.1ml I. M.，5 週齡時 0.2ml I. M.）結果在一週齡及二週齡時注射者，對強毒攻擊耐過率為 20%，3 週齡者 0%，四週齡者 40%，五週齡者 100%，其成績如圖 III。



圖III 移行抗體雞羣一次疫苗注射之效力

討 論

試製成之 Seed Virus 予以 Virus 力價，測定 HA 價結果 16 倍 $EID_{50}/0.1ml$ 及 $TCID_{50}/0.1ml$ 分別高達 $10^{-7.1}$ 及 $10^{-7.2}$ ，足以證實本試驗中所使用細胞及培養液等極適宜 TCND 毒之繁殖。

TCND Virus 經以 4 日齡雛雞行毒力測定結果肌肉接種組均健存，而腦內斃死率高達 84.6% 因 TCND Virus 之病毒型別屬於 Mesogenic Type，故以腦內接種時可致死雛雞。

TCND Virus 於 SK 細胞培養之增殖情形，經測定 $TCID_{50}$ 之 titer 較 EID_{50} 為高，而血球凝集素之產生較低，故 TCND Virus 之力價測定以 $TCID_{50}$ 或 EID_{50} 實施較可信賴，又其增殖之最高峰以三種不同測定法所顯示均為培養後 65~75 小時之間。

試製成之疫苗三批以 56 日齡之檢定用雞行安全及效力試驗時所得結果甚優，足以證實注射此種疫苗後 10 天即有堅強之感染防禦能力，其確實之免疫發生時間與持續期間及對較幼齡雞隻之免疫效力等需待繼續進行試驗。

實施疫苗對移行抗體雛雞免疫效力試驗之前，為明瞭接種疫苗後之防禦能力是否由疫苗所產生？而先行移行抗體之消長及其防禦能力測定，經試驗所得結果其防禦能力僅在出生後 15 日以內，而移行抗體於 28 日即消失殆盡，與呂榮修等之報告⁽²⁰⁾ 極為相近。

移行抗體雛雞於出生後每週齡時各予以接種疫苗時，由成績所示 1、2 週之防禦率似是殘留之移行抗體所屬，於 4、5 週時之防禦率顯似疫苗所產生者。又移行抗體於接種疫苗後較之自然消失為快，北里研究所亦報告且較 B_1 為快，此正可利用為早期接種疫苗使移行抗體盡速消失，俾利以疫苗再接種時獲得堅強之防禦能力。但二次注射之實際效力尚待繼續進行。

結 論

1. 試製成之種毒經使用 EID_{50} , $TCID_{50}$ 及 HA 價測定其力價結果為 $EID_{50}/0.1ml 10^{7.1}$, $TCID_{50}/0.1ml 10^{7.2}$ H. A 價為 $\times 16$ 。其腦內接種 13 隻結果斃死率為 84.6%。
2. 由試製成之 Seed Virus 試製成疫苗三批，對 56 日齡中雞之安全性試驗共接種 39 隻，結果接種後均無任何反應，實施效力試驗結果高達 100%。
3. TCND Virus 於 SK 細胞培養其增殖之最高峰為培養後 65~71 小時之間，又 $TCID_{50}$ titer 較 EID_{50} titer 稍高，但 HA. titer 則甚低。
4. 新城雞瘟移行抗體之消失經測定一批 (HI. GM. 22.16 倍)，於出生後 28 天時僅餘 HI. GM. 1.14 倍，而其 100% 之感染防禦率為出生後 15 天內。
5. 試製疫苗對移行抗體雛雞一次注射時需於 5 週齡時實行始能獲得 100% 的感染防禦率。

參 考 文 獻

1. 林再春：肌肉注射用新城雞瘟疫苗製造研究，臺灣省農林廳獸疫血清製造所報告 No.2 (31—37) 1958
2. 呂榮修、謝快樂、李永林、林再春、陳守仕等：新城雞瘟免疫接種計畫之研究。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 8. 1971 (57~67)
3. 中村稔治、宮本猛、長島治男等：水酸化アルミニウム添加ニューカッスル病ワクチンの研究，日本生物科學研究報第一卷。1956, 159
4. 北里研究所：T. C. N. D. ワクチン (ニューカッスル病 T. C. N. D 預防液) に關する試驗成績。北里研究所報告 (1~20) 1972
5. Bankowski, R. A, Corstret, R. E & Fabricant J : A tissue culture-modified Newcastle

disease Virus II. Immunogenicity of the live tissue culture-modified Newcastle disease Virus in chickens. Avian, Dis 2, 227-240 (1958) .

Studies on TCND Live Vaccine

I. Manufacture of Frozen-Dried Vaccine and Safety as well as Potency Test

Y. H. Yang, T. C. Lin, Y. C. Chen, Y. S. Liu, W. C. Hwang.

L. S. Kiang, I. J. Su, K. H. Chang, I. P. Chan, S. S. Chen,

English Summary

TCND was first established by R. A. Bankowski in 1948, who cultivated NDV California 11914 strain on tissue culture. The seed strain belonged to Mesogenic type. Owing to heterotypic cell was adopted for TCND virus multiplication, it could be free from egg-transmission.

To realize the character of TCND virus and the practical procedure of vaccine preparation, a seed strain was introduced from Japan in 1971. The experimental data was summarized as follows:

1. The titers of manufactured TCND seed virus were $10^{7.1}$ EID₅₀/0.1ml, $10^{7.3}$ TCID₅₀/0.1 ml and X16 HA titer. All but nervous inoculation into chickens could induce no fatal reaction.
2. There lots of manufactured vaccine were inoculated into 39 chickens respectively for safety test and no reaction was found. The protection efficiency reached 100% when virus challenge was given.
3. The virus multiplication in SK cells reached the highest titer during 65-75 hours postinoculation. It was found that TCID₅₀ titer was higher than that of EID₅₀, but HA titer was very low.
4. The titer of ND natural antibody in one flock of chicken was surveyed. It showed that the original titer was HI GM x22.16, but decreased to x1.14 when chickens were 28 days old. The protection efficiency could reach 100% when chickens aged within 15 days.
5. The manufactured TCND live vaccine had 100% protection efficiency in one dose when the chickens with natural antibody reached 5 weeks old.