

牛腺病毒對於組織培養細胞及 實驗動物之增殖性研究

鍾明華 詹益波 蔡紹前 陳忠松

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

鑒於本省正極力發展畜牧事業，尤以乳肉牛之飼養更足積極不斷地推廣、擴大。養牛事業在本省的希望及遠景是光明無窮的。但，此事業的成功與否，除依良好的飼養管理外，則端賴各種疾病防治之得法與否，不可諱言的，牛隻疾病之中，本省除了繁殖障礙方面之疾病有較深認識外，如各種病毒引起之疾病及其病害則較少為人所注意及研究。

1967年 Yoshio TANAKA¹⁰ 等以小牛腎臟細胞分離 Bovine Adeno—Virus Type Nagano；1968年 Yuji INABA² 等亦以牛睪丸細胞從患急性發熱流鼻涕及下痢之牛隻鼻液，糞便中分離 Fukuroi Strain；1968年 Ewald otte 及 1971年詹益波以血清學反應證實本病毒在本省之存在。

牛腺病毒常使牛隻發生泌乳減少，甚或停止，牛隻發育受損，且又與小牛之肺性腸炎 (Pneumo-enteritis) 有關；牛腺病毒又常與牛病毒性下痢 (Bovine Virus Diarrhea) 病毒共同混合感染，使病情惡化，其所造成之經濟上損失不可謂不輕。

目前雖已知牛腺病毒可增殖於 BK 及 BT 細胞與 Hela Cell line 中，但對於其他各種組織培養細胞及實驗動物之增殖性尚無報告，茲將所得成績報告於後：

試驗材料及方法

(一) 試驗材料：

1. 病毒株：Bovine Adenovirus Type I.
2. 供試細胞：VERO (Green Monkey Kidney)，MK₂ (Monkey Kidney)，HEP-2 (Human Epidermoid cancer of the Larynx)，ESK (Embryonic Swine Kidney) 及 PK-15 等 cell lines (株化細胞) 與 BK (牛腎)、BT (牛睪丸) 及 SK (豬腎) 初代組織培養細胞。
3. 供試小動物：本所自產之哺乳小白鼠、小白鼠及購自民間之天竺鼠。

(二) 試驗方法：

1. 株化細胞培養法：株化細胞 Monolayer 長成之後，抽棄細胞培養液，以 PBS- 洗滌一次，加入 T. V (Trypsin Versence) 把 Monolayer cells 消化脫落之後再注入 Eagle MEM Growth medium，分裝於培養瓶，置於 37°C 孵卵器培養，做為病毒接種用。
2. 豬腎、牛腎及牛睪丸組織細胞培養：依 Youngner¹¹ 之方法製備各組織培養細胞。
3. 血球凝集試驗 (HA Test)：依 Yuji INABA^{2,4} 等方法實施。
4. 病毒對各細胞之增殖力價及增殖曲線測定：各種細胞之單層細胞長成後，以 PBS- 洗滌兩次，再把病毒液接種於細胞上，置於 37°C 孵卵器內感作 1.5 小時，其間每加 30 分鐘流佈病毒液於細胞

面一次，而後加入維持液(Maintenance medium)。再置入 37°C 孵卵器中，每隔12小時觀察CPE，並抽取培養液0.5ml，置入-50°C冰箱凍結保存。試驗結束後再取出解凍，分別作10倍稀釋列，接種於經 PBS-洗滌兩次之 BT細胞，感作之後加入維持液，每天觀察 CPE，最後並以綿羊血球，4°C 冰箱內 Overnight 方法作 HA Test，作為判定之佐證，依 BEHRENS & KARBER⁶法計算其 TCID₅₀。然後以其 Infectivity (TCID₅₀) 為 Y 軸，以時間為 X 軸，並與 CPE 發生情形相配合，繪出病毒之增殖曲線。

5. 哺乳白鼠、小白鼠及天竺鼠之接種實驗：哺乳白鼠分為三組：分別以 0.02ml I. C. (腦內)，0.1ml S. C. (皮下) 及 0.2ml I. P. (腹腔內) 等方式將病毒接種之；小白鼠 (13gm B. W) 分為四組；分別以 0.03ml I. C., 0.2ml I. M., 0.2ml S. C., 0.5ml I. P. 接種之；天竺鼠分為三組，分別以 3.0ml I. P., 1.0ml I. V. (心臟內), 2.0ml S. C. 接種之，以後連續觀察 2 週，採取血清，實施 HI Test。

6. 血球凝集抑制試驗 (HI Test)：依 Rosen¹方法實施。其術式以簡表 1 示之：

Table 1: Procedure of HI Test

Tray	1	2	3	4	5	6	7	8	Cont.
Dilution	1.5	10	20	40	80	160	320	640	
Diluent		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Serum	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Antigen	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
(8Units)	空溫30'								
0.3% sheep R.B.C.	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
4°C Overnight 判定									

試驗成績

(一) Bovine Adenovirus Type I 在 BT 細胞中所形成之 CPE 及其增殖曲線，Type I 病毒接種於 BT 細胞之後 36 小時即出現 Rounding 及 Clumping 之 CPE，是以可發現圓化及聚合之 Grapelike 之細胞變形 (圖 1、2、3)，而於 72 小時後 CPE 達最高峰；其病毒力價與 CPE 成正比上昇，12 小時為 $10^{3.5}$ TCID₅₀，24 小時為 $10^{5.5}$ ，36 小時為 $10^{6.5}$ ，48 小時為 $10^{7.5}$ ，60 小時為 $10^{7.5}$ ，72 小時為 $10^{8.5}$ (圖 4)

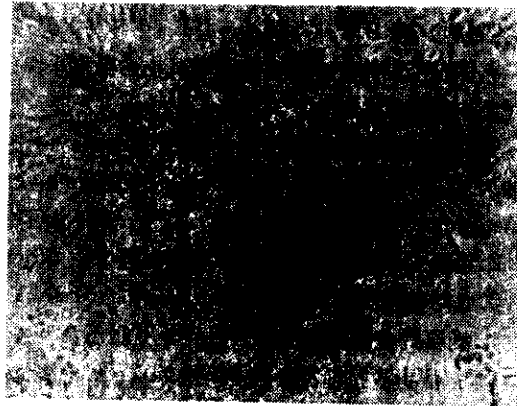


Fig. 1: Normal BT cells

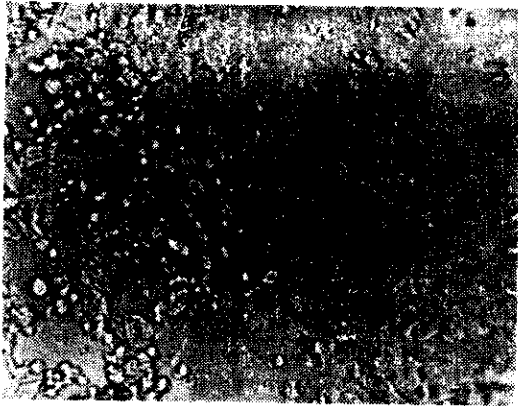


Fig. 2 : CPE Caused by B. Adv. Type I in BT cells

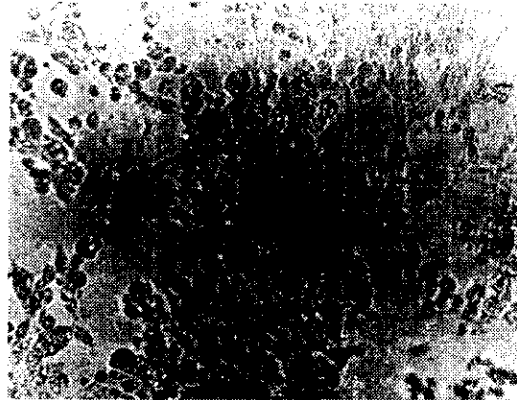


Fig. 3 : CPE Caused by B. Adv. Type I in BT cell

Fig. 4 : Growth Curve of Type I Virus in BT cell

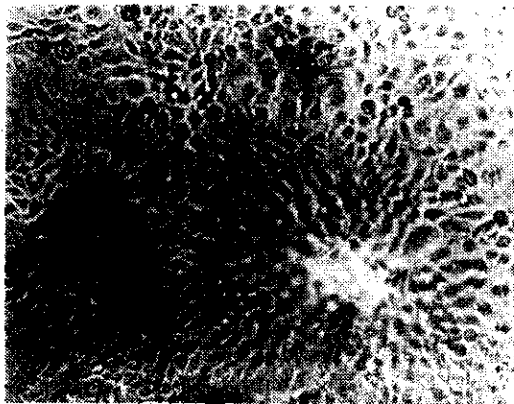
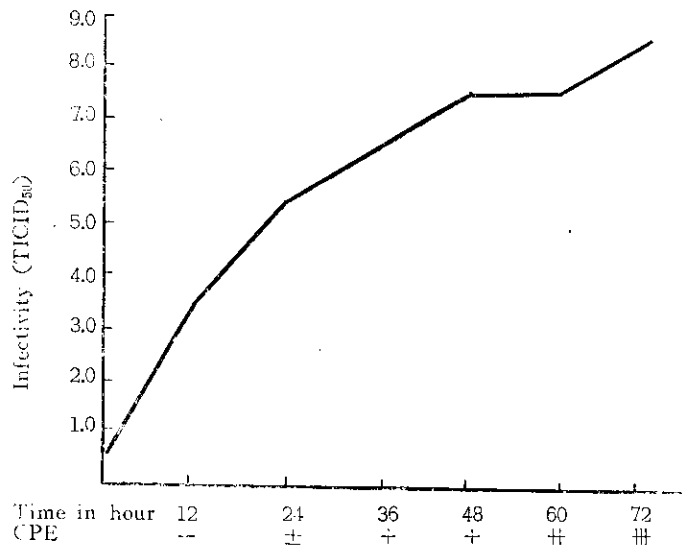


Fig. 5 : Normal MK₂ Cell Line

(二) Bovine Adenovirus Type I 病毒在 VBS (Virus Buffer Saline) 及 0.85% Saline 中之 HA Titer : Type I 病毒以 VBS 及 Saline 為 Diluent 所測得之血球凝集價不一致, 在 Saline 中為 1 : 1024, 在 VBS 中為 1 : 512。

(三) Bovine Adenovirus Type I 病毒在各種細胞之增殖性 :

1. HEP-2, VERO 株化細胞對牛腺病毒均無感受性, 未產生 CPE, 亦未發現增殖病毒, PK-15 株化細胞亦無感受性。

2. Type I 病毒在 MK₂ 株細胞第一代即有明

顯之 CPE 發生 (圖 5、6、7)，其病毒力價為 $10^{3.5}$ TCID₅₀，第二代以後病毒感染力下降而未有 CPE 發生。

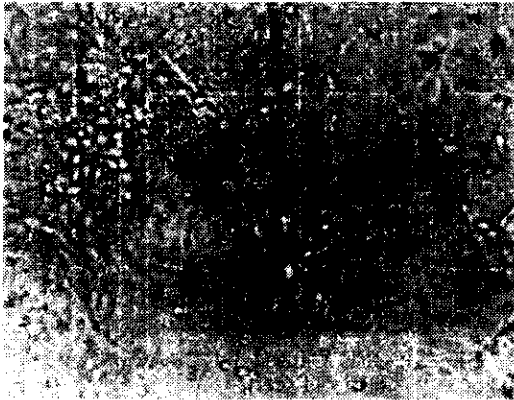


Fig. 6 : CPE of Bovine Adv. Type I in MK₂,
4 days Postinoculation

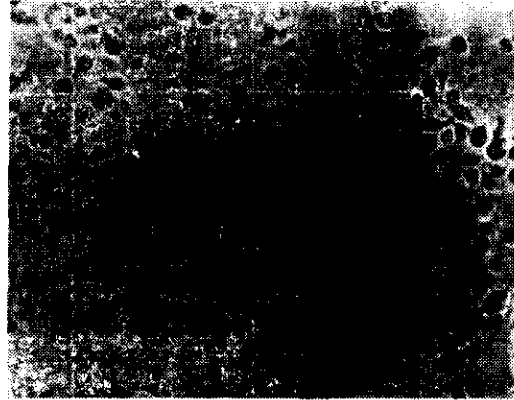


Fig. 7 : CPE of B. Adv. Type I in MK₂,
4 days Postinoculation

3. Type I 病毒對初代 SK 細胞及 ESK 株化細胞均具感染力，而形成 CPE (圖 8、9、10)；在初代 SK 細胞第一至第三代之感染力價均保持 SK10^{3.5-6.5}TCID₅₀；但在 ESK 株化細胞中，祇有第一代發現增殖病毒 10^{4.0}TCID₅₀，以後則未發現。

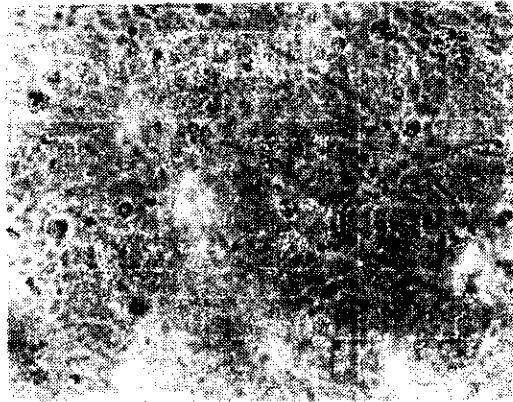


Fig. 8 : Normal ESK Cell Line

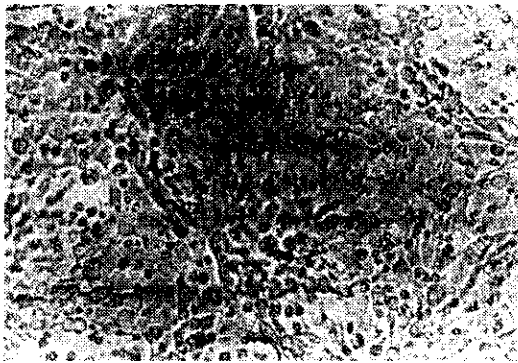


Fig. 9 : CPE Formation Caused by B. Adv.
Type I in ESK, 4 days Postinoculation

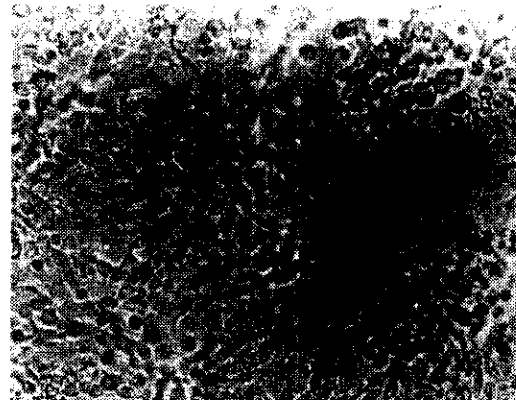


Fig. 10 : CPE Formation Caused by B.
Adv. Type I in ESK, 4 days
Postinoculation

(四) Bovine Adenovirus Type I 在小白鼠及天竺鼠之增殖能力：

Type I 病毒以各種方式接種哺乳白鼠，小白鼠及天竺鼠後二週內，均未見任何症狀，剖檢結果亦未見病灶 (表 2、3、4)。

Table 2 : Responses of Adv. Type I Inoculated Suckling Mice

Route	Dosage (ml)	Status				
I. C	0.02	○	○	○	○	○
S. C	0.01	○	○	○	○	○
I. P	0.1	○	○	○	○	○

Table 3 : Responses of Adv. Type I Inoculated Mice

Route	Dosage (ml)	Status				
I. C	0.03	○	○	○	○	○
S. C	0.2	○	○	○	○	○
I. P	0.5	○	○	○	○	○
I. M	0.2					

Table 4 : Responses of Adv. Type I Inoculated Guinea-pig

Route	Dosage (ml)	Status	
I. C	1	○	○
S. C	2	○	○
I. P	3	○	○

Remark :

○ : Survival

(五) 病毒接種小白鼠及天竺鼠後血清 HI 抗體產生情形：

Type I 病毒接種於小白鼠 2 週後，其 HI 抗體相當高，但 I. M (肌肉內) 接種者則未產生。天竺鼠接種二週後，皆未產生 HI 抗體。(表 5)

Table 5 : HI titers Produced in sera of Mice and Guinea-Pigs with Different Routes

Route	I. C	I. P	S. C	I. M	I. V
Animal					
Mice	1 : 160	80	80	<1 : 5	
G-pigs		<1 : 5	∕	∕	∕

討 論

由於本省屠宰場衛生管理及法規條例尚未走上軌道，是以活力旺盛而潔淨之牛腎臟、睪丸不易獲得，因此在牛病毒之分離、研究等各方面不免有所妨礙與不便。但經筆者實驗得知：Primary SK (初代豬腎) 及 ESK Cell Line 等細胞對牛腺病毒及牛傳染性支氣管鼻炎 (IBR) 病毒之感受性均相當高，將來可用容易獲得之 SK 及 ESK 細胞分離病毒；然者 1972 年 Hitoshi KAWAWURA⁵ 等報告曾由外觀正常之初代豬腎組織培養細胞中分離得與 Type 7 具有共同抗原之 Adenovirus，因之共以 SK 為牛腺病毒分離用細胞時，不可不予注意。

牛腺病毒對實驗動物不具病原性，此為一般學者所認可接受；但小白鼠接種之後可產生相當高之

HI 抗體，不過由於小白鼠血量太少且不易採取，血清量更少。此一新發現在免疫血清及螢光標示抗體等方面之應用上或無多大價值，但在血清學之反應上則不無參考助益。

結 論

1. Bovine Adenovirus Type I 在 BT 細胞中之增殖能力甚為優良 ($10^{7.0-8.5}$ TCID₅₀/ml) 且均形成 Rounding 及 Grape-like CPE 其力價隨 CPE 之增進而遞增。
2. Type I 病毒在 VBS 及 0.85% Saline 等 Diluent 中均有相當高之 HA 價，而且在 Saline 中之 HA 價比 VBS 者高一稀釋階。是以不需配製繁雜之 VBS，而可用配製簡單之 0.85% Saline 代替之。
3. Type I 病毒不能在 VERO, HEP-2 及 PK-15 等株化細胞中增殖。但在 MK₂ 細胞中則有微弱之增殖力。
4. SK 及 ESK 等由豬來源之初代細胞及株化細胞對牛腺病毒具相當高之敏感性，可用以替代 BT 及 BK 細胞來分離病毒。
5. 牛腺病毒 Type I 對天竺鼠，及小白鼠均無病原性，但小白鼠接種後會產生抗體而天竺鼠則否。

誌 謝

本研究之完成得國家科學委員會之補助，並蒙農復會余組長及本所陳所長之懇切指導與鼓勵，謹誌衷心之謝忱。

參 考 文 獻

1. DARBYSHIRE, J. H. : The Pathogenesis and Pathology of Infection Calves with a strain of Bovine Adenovirus Type 3, Res. Vet. Sci, 1966, 7. 81
2. INABA, Y., TANAKA, Y., SATO, K., ITO, H., ITO, Y., OMORI, T., and MATUMOTO, M. : A Serotype, Fukuroi, Recovered from Japanese Cattle
3. 稻葉右ニ：マイワロタイター法によるウシアテツウイルスおよびパラインフルエンザウイルスの赤血球凝集抑制反應の術式。日獸會誌 24 321—325, 1971.
4. 稻葉右ニ：ウシのアラツウイルス感染症およびパラインフルエンザの血清診斷法とくに赤血球凝集抑制反應の術式について。日獸會誌 22 530—532, 1969.
5. KAWAMURA, H. : An Adenovirus Isolation from Kidney Cell culture of Apparently Normal Piglet. Nat. Int. Ani. Hlth. Quart 10, 173—182, 1972
8. MATUMOTO, M., INABA, Y., TANAKA, Y., SATO, K., ITO, H. and OMORI, T. : New Serotype 7 of Bovine Adenovirus. Japan. J. Micro. Vol. 14, 430—431, 1970
7. LENNETTE, H. E. : Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections, 4th Edition, 205—226, 1971
6. KARBNER, G. : Beitrag Zur Kollektivem Behandlung Pkarmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Path. Pharm. 162—480 1931
9. Poseh, L. : A Hemagglutination—Inhibition Technigue for Typing Adenovirus. Amer. J. Hyg. 71, 120—128, 1960

10. TANAEA, Y., INABA, Y., ITO, Y., OMORI, T. and MA TUMOTO, M. : Recovery of a genotype, Nagano, from Japanese Cattle. Japan, J. Microbiol. Vol. 12, 77—95, 1968

11. Youngner, J. S. : Monolayer Culture, I, Preparation and Standardiation of Suspension of Trypsin—Dispersed Monkey Kidney cells Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 202—205, 1954

Studies on Propagation of Bovine Adenovirus in Tissue Cultural Cells and Laboratory Animals

M. H. Jong ; I. P. Chan ; S. C. Tsai ; C. S. Chen

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

In order to find out a highly susceptible cells (for the isolation of Bovine Adenovirus and other viral agents) to substitute the uncomeatable pure BK and BT cell cultures, The author tried to cultivate the Adenovirus on various kinds of cell cultures Attempts were also made to search for a suitable lab. animals for the preparation of hyperimmune serum The results were summarized as follows :

1. Adenovirus type 1 could not proliferate in VERO, HEP—2 and PK—15 cell lines
2. The swine origin cell line, ESK, and primary SK cell culture were highly susceptible to Bovine Adenovirus and IBR virus, and could be used for the isolation of these viruses.
3. No clinical signs were observed in mice and guinea pigs when they were inoculated with Bovine Adenovirus Type 1. Specific antiserum could be detected in the inoculated mice, while none in the inoculated guinea pigs.