

兔化豬瘟疫苗接種豬體內病毒分佈消長試驗

林再春 謝竹茂 蘇杰夫

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

豬瘟病毒之檢出及定量，由於試管內 (In Vitro) 之研究與應用成功^(5,9,11,12,19)，不但在操作上方便，且可節省很多時間與經費，對於豬瘟之研究貢獻至鉅。

為解明豬瘟感染發病之機序，可舉出病毒之侵入門戶、目的臟器及 Viremia 等三項為主要緒端。至豬瘟病毒之侵入門戶，Schwarte 等^(1,3,18) 曾證實氣管及扁桃腺為主要臟器，且於經口感染實驗，如將病毒直接投入胃內時均未能使其感染成立^(1,3)。豬瘟病毒之主要增殖臟器為扁桃腺、脾及淋巴節等^(4,10,13,15,16,17)，尤以扁桃腺似為豬瘟之目的臟器。Viremia 為豬瘟之特徵，強毒豬瘟毒於接種24小時以內出現並逐日上昇而維持高度之病毒價^(2,13,14,16)。筆者 (林) 曾報告⁽¹⁰⁾ 強毒與弱毒豬瘟在豬體內呈現之增殖形態不同，強毒例可大別為淋巴感染相，血液感染相及全身臟器感染相等3相，反之，弱毒例僅呈現淋巴感染相。惟該報告僅使用強毒 ALD 株及弱毒 GPE- 株作為比較，欲求得更明確之解答，需要以病原性不同病毒株實施同樣之試驗。

本省十多年來普遍應用於豬瘟預防之兔化豬瘟毒 (在本省稱為 LPC 株)，其免疫力確實優越^(6,7)。惟該兔化毒因未能以 END 法於 In Vitro 檢出，致過去之有關試驗均需依靠豬隻接種試驗。筆者 (林) 經多年之研究，最近已報告該兔化毒可應用螢光抗體—組織培養二段法 (簡稱 FACCT 二段法) 檢出及定量⁽¹¹⁾，其操作簡便，且可獲得與豬接種試驗同高之成績，可應用於該毒株之研究及疫苗之檢定。

本研究係為期進一步解明豬瘟毒之感染相及其感染與免疫發生之關係，而應用 FACCT 二段法，探究兔化豬瘟毒於接種豬體內之病毒分佈及消長情形，茲將所得成績報告於後：

試驗材料及方法

1. 病毒株：

(1) 兔化豬瘟毒 (LPC 株)：

本株係於民國42年12月農復會李崇道博士 (現任主任委員) 由菲律賓分讓携回，交本所由筆者 (林) 負責再行累代通過本省產家兔，並研製兔化活毒疫苗成功，早已普遍應用於豬瘟預防注射，該毒株在本省累代通過家兔達800餘代 (在本省稱為 LPC 株，於本研究報告內此後簡寫為兔化毒)，現其接種家兔之97%以上呈現典型的熱型，且感染兔脾對豬之感染價為 $10^5/g$ ($10^5PID_{50}/g$) 以上，供本研究用者為816代感染兔之脾臟乳劑。

(2) 豬瘟強毒 (ALD) 株：

本株係於民國38年由 Dr. H. N. Spear 携贈本所供為結晶紫豬瘟疫苗製造之豬瘟強毒，該毒株仍以毛豬繼代保存，供為兔化豬瘟疫苗之效力檢定攻擊及豬瘟之研究等用，本研究所用者係將其接種

註：抽印自中華民國微生物學雜誌第七卷第一期。

於 SPF 小豬 (本所自產)，俟其病至最高度時採血，分離血清後分裝於小試管內，並於零下70°C凍結保存，供為螢光抗體法及中和抗體試驗之對照用。

2. 病毒接種及臟器乳劑之調製：

(1) 供試豬及病毒接種採材：

供試豬為本所生產之 SPF 小豬 7~9 週齡，共 20 頭，其豬瘟中和抗體為陰性，經以兔化毒感染兔脾乳劑 10³PID (係乾燥兔化豬瘟疫苗 1 劑量)，接種於後肢內股皮下，任意附上豬號碼以便檢溫，臨床症狀之觀察記錄，並於接種後再 24 小時按號碼順序放血 2 頭，以無菌操作採取其全身臟器、淋巴腺、血液、空腸、尿 (或膀胱) 等，血液即分離血清，空腸或膀胱於採取後立即以抗生素 (Penicillin 300u/ml, Streptomycin 0.3mg/ml) 之 Earles 液洗淨內容物，每種病材各分於 3 支試管內，置於零下 40°C 凍結保存待病毒檢出之用。

(2) 感染豬臟器乳劑之調製：

每於病毒檢出試驗方由零下 40°C 取出材料，實質臟器及淋巴腺，經充分除去脂肪後，以 Earles 液內加有 GIBCO'S Calf Serum 5%，Penicillin 100u/ml, Streptomycin 100r/ml 之病毒稀釋液製成 10 倍乳劑，經 2000r.p.m. 冷却遠心 (5°C) 15 分鐘之上清液供為病毒檢出。其他氣管，空腸及膀胱等，剝離採取其粘膜後，如上述方法製成乳劑供用。

(3) 螢光抗體一組織培養二段法：

依照筆者 (林) 報告之方法¹¹，本研究係先將上述調製之乳劑或再以十進稀釋法稀釋後分別培養於 3 天之 ST 單層細胞 3 支予以增殖 5 天後採集培養液混合供試，至於螢光抗體法係使用本所自製之豬瘟螢光標示抗體，並以日製品為對照。株化細胞為 PK-15 株，經培養於直徑 3cm 小燒皿內之 18mm×18mm 蓋玻片，16~20 小時後之單層細胞供為上述 ST 培養病毒液之病毒檢出用。將各病毒 ST 培養液 0.5ml 分別接種於 PK-15 單層細胞感作 1 小時後繼續培養 48 小時方取出，以標示抗體染色檢查，且每例使用 2 片，陽性例通常於 PK-15 單層細胞上形成多數之 Plaque 而易於檢出抗原。

(4) 血中 Interferon 之檢出：

將上述接種後第 3、5 天及於放血時採集之血清先經 56°C，30 分非動化後，行倍數稀釋並加等量之豬瘟高度免疫血清 (使用 SPF 豬高度免疫)，在 37°C 感作 1 小時以中和血清中之活性病毒，然後將此不含活性病毒之血清各以 0.2ml 接種於 4 支培養 3 天之 ST 單層細胞，並迴轉培養一夜行感作，次日以 WEE 病毒攻擊，在 37°C 繼續迴轉 2 天後判定有無 CPE。攻擊之 WEE 病毒係 ST 細胞測定其病毒價並使用其 100 單位。

試 驗 成 績

1. 兔化毒接種豬體內病毒之分佈：

供試豬隻於兔化毒接種後至放血前，其體溫、精神、食慾均為正常，其他亦未呈現肉眼所能觀察之症狀，且於接種後第 3、5 天及放血時採血檢查亦未見白血球數之減少或中性白血球之核左轉。供試豬隻按試驗計劃於接種後每 24 小時放血 2 頭，採材以 FACC 二段法檢出病毒，然後將豬號碼之單號及雙號分開為 2 組予以作圖，詳細成績如圖 1；該兔化毒接種豬隻於第 3 天後即可由扁桃腺 2 例，脾臟、顎下及鼠蹊淋巴腺各 1 例檢出病毒，扁桃腺之檢出率最高，第 3 天至第 10 天之全例為陽性。反之，脾及淋巴節等都於第 4~6 天間且為散發性，其他氣管、肺各由 1 例於第 6 天檢出病毒而已。

Viremia 之檢出係以接種後第 3、5 天及於放血時採取之血清；全例實施結果均為陰性，且全例血清經以 END 中和試驗均未能檢出豬瘟中和抗體。

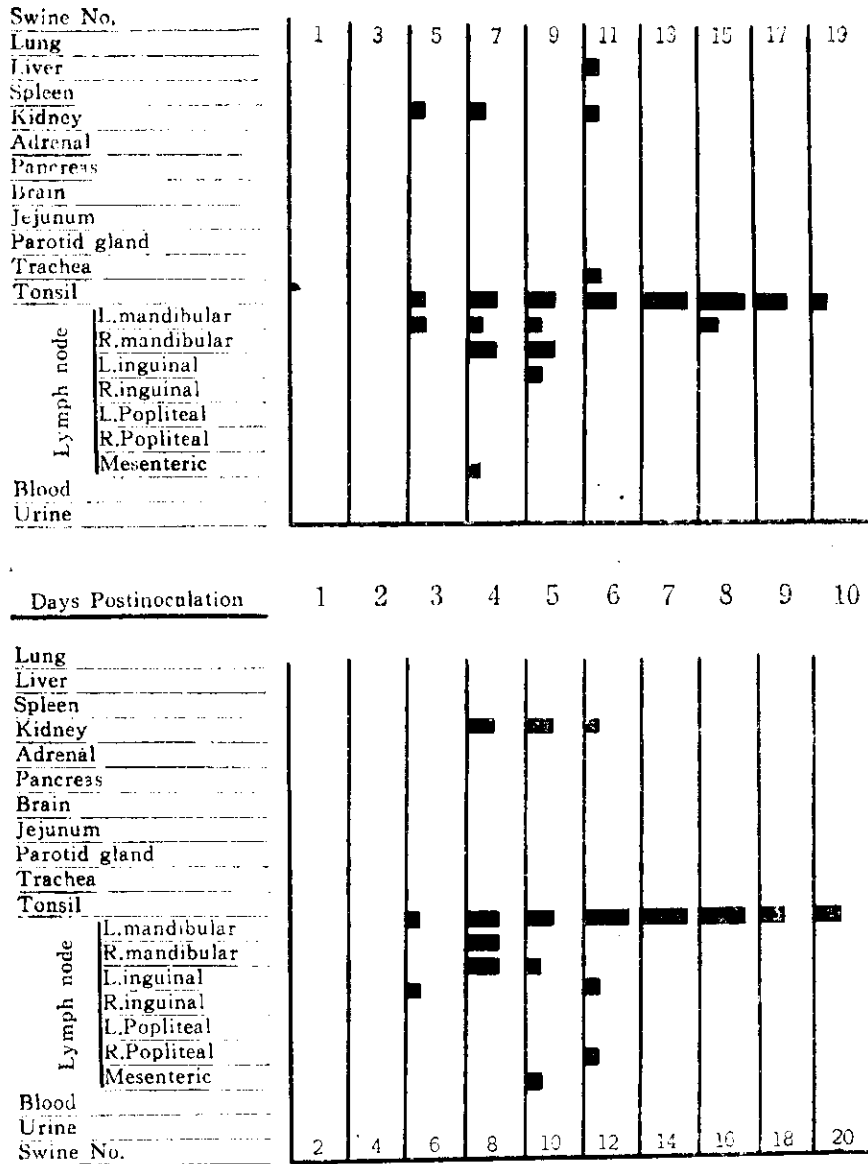


Fig.1. Virus Multiplication in Pigs Inoculated with Lapinized Hog Cholera Vaccine

上述所得成績可知兔化豬瘟毒經接種於豬隻後限於扁桃腺、脾、淋巴腺等增殖，即僅呈現淋巴感染相。此顯示活毒疫苗之免疫產生以淋巴組織佔着極重要之地位。

2. 兔化毒接種豬體內病毒之消長：

上述病毒檢出陽性例，再由零下 45°C 內取出臟器，經製成乳劑後再以十進稀釋法稀釋，然後分別培養 3 支 ST 細胞，使病毒增殖，於 5 天後抽出培養液混合供以 FACCT 二段法測定其病毒價，該兔化毒之增殖與消長詳細成績如圖 2（同一時間放血之豬隻僅 1 例呈陽性者依照其病毒價，如 2 例均呈陽性者即計算其平均病毒價供為作成曲線圖）。

由圖 2 得知，扁桃腺係唯一臟器可繼續檢出病毒，其病毒價於出現後隨即逐日上昇於第 6 至 8 天達最高之 $10^{8.5}$ TCID₅₀/g，然後逐漸下降至第 10 天尚能檢出病毒價 10^3 TCID₅₀/g，即扁桃腺之病毒顯

示曲線之消長，但始終維持最高之病毒價。脾臟於第 3 ~ 6 天間呈陽性，而第 4、5 天之病毒價達最高即 $10^{2.5}$ TCID₅₀/g，第 6 天下降，第 7 天以後全例未能檢出病毒，即亦顯示曲線之消長，各部之淋巴節均以散發性檢出病毒，且除第 8 天頸下淋巴節之 1 例外，均集中於第 3 ~ 6 天間出現。其中仍以頸下淋巴節之檢出率最高，且病毒價亦較其他之淋巴節為高，高者呈 $10^{3.5}$ TCID₅₀/g，且顯示曲線之消長，左右鼠蹊、右膝髌、腸間膜等淋巴節及氣管、肺亦可散發檢出，但其病毒價未見增高，均為 $10^{1.0}$ TCID₅₀/g。

3. 免化毒接種豬之血中 Interferon 檢出試驗：

接種後第 3、5 天及每於放血時採集之血清試子檢出結果全例均呈陰性，如上述，其 Viremia 或中和抗體價亦均呈陰性。

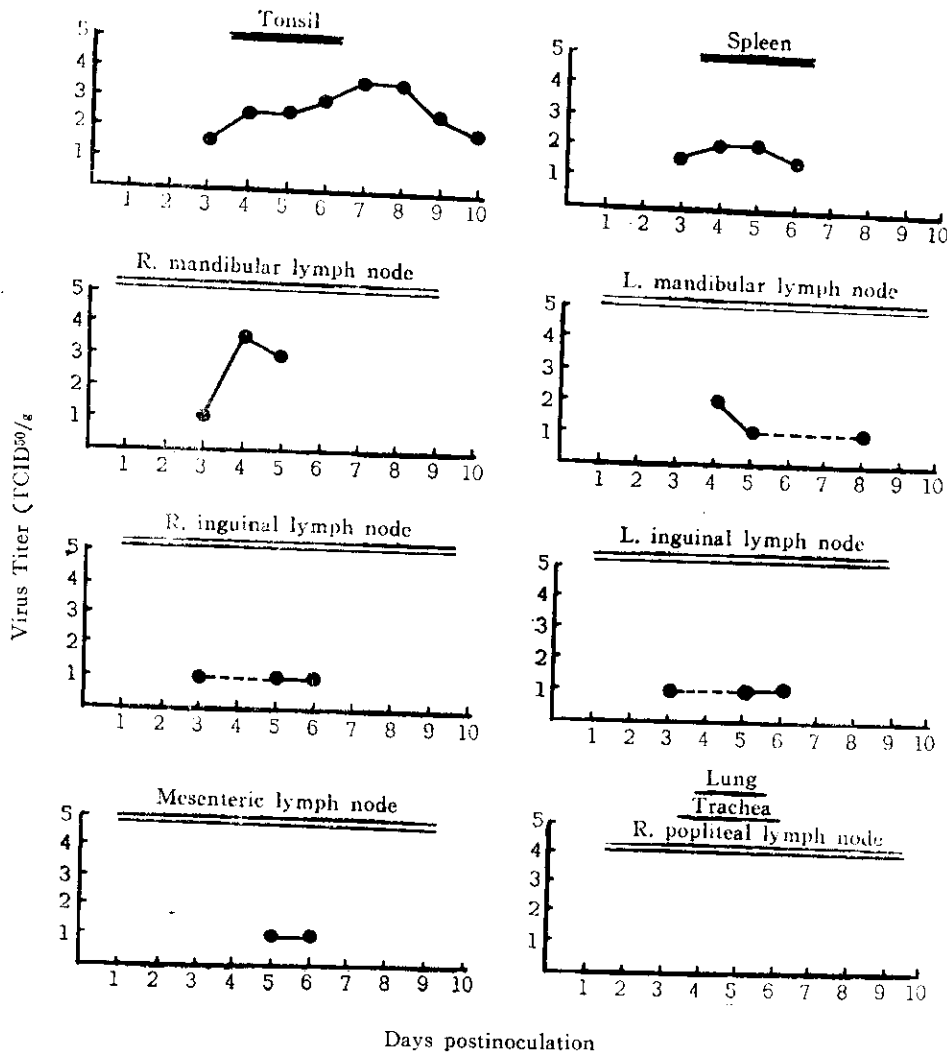


Fig. 2. Virus Multiplication Curves in Pigs Inoculated with Lapinized Hog Cholera Vaccine

討 論

筆者(林)曾報告⁽¹⁰⁾強毒與弱毒豬瘟病毒在豬體內呈現之增殖形態不同，經使用強毒 ALD 株及弱毒 GPE- 株之比較試驗結果，強毒例於接種24小時後即由扁桃腺及脾臟，繼由各處淋巴節檢出病毒，血中病毒亦於出現後始終保持高度之病毒價，然後由此波及全身各臟器。至弱毒例於接種3天後始由扁桃腺且可繼續檢出病毒，顎下淋巴節及耳下腺之檢出率次之，即淋巴組織為弱毒例之主要增場所，而與其免疫產生有密切之關係。

本研究主要為探究兔化豬瘟毒(弱毒)之感染與增殖形態，經試驗結果與 GPE- 毒(弱毒)者略同，呈現淋巴感染相，即於接種3天後始由扁桃腺，或脾臟及淋巴節檢出病毒，尤以扁桃腺可繼續檢出，且始終保持最高之病毒價值得重視，其與 GPE- 例不同之處即兔化毒例由脾臟之檢出率較高，且脾臟及淋巴節之病毒出現較 GPE- 毒為早。

由此豬瘟病毒所呈現之感染形態，筆者(林)於前報告⁽¹⁰⁾認為強毒例可大別為淋巴感染相、血液感染相，及全身臟器感染相等3相，而弱毒例僅呈現淋巴感染相之見解，已由此次之研究予以解明。至於扁桃腺之病毒，無論強毒或弱毒例，其出現最早且病毒價高，認為其為豬瘟感染初期之主要增場所，即為豬瘟之目標臟器之見解，亦由此次研究可予支持。

至本省之兔化豬瘟毒 LPC 株，已累代通過本省產家兔 800 餘代，不但對於家兔之感染性甚高，即接種兔之 97% 以上呈現典型的熱型，且對於豬隻之安全性已達最高度。筆者等曾將其 97 代毒經以豬隻累代繼代至第 6、7 代以後尚能復原⁽⁶⁾，且其 111 代毒之接種豬排泄尿中亦能檢出病毒，則於接種後第 5~14 天排泄之尿以豬接種試驗證明尿中含有病毒⁽⁸⁾。惟最近筆者等再將其 814 代毒累代通過 SPF 小豬 20 代，但未見有病原性復原或增強之可能，且其接種豬排泄之糞尿中亦未能予以檢出病毒(分別於臺灣省畜牧獸醫學會 59 及 60 年度年會宣讀)，本研究將該兔化毒(816 代毒)接種於豬隻後，探究其於豬體內之分佈，結果得知該毒僅限於淋巴組織增殖，此點當可有力支持該兔化毒之安全性甚高，且免疫性可靠。加之，本研究中之病毒檢出係應用筆者報告之 FACCT 二段法⁽¹¹⁾，藉此機會予以檢討該法之實用性。

筆者報告曾由強毒豬瘟毒接種豬之血中檢出 Interferon，該項中干涉物質(Interferon)對於 END 法檢出血中病毒時可阻礙其檢出率或其病毒價，本研究所採取之血清全例未能檢出病毒，但經試予檢出 Interferon 結果均呈陰性。至經兔化疫苗接種 3 天後即可抵抗強毒病毒之感染一節，因同時於第 3 天亦可由扁桃腺及數處淋巴節分離到兔化毒，故仍可以病毒干涉現象(Viral interference)所致予以解明。

結 論

1. 兔化豬瘟毒接種於豬隻 3 天後即可由扁桃腺或脾臟及數處淋巴節檢出病毒。扁桃腺之檢出率為最高，且係唯一臟器可繼續檢出並始終維持最高之病毒價。脾及淋巴節均集中於第 3~6 天間散發的檢出。其他臟器僅由肺及氣管各 1 例檢出病毒而已。由此得知兔化豬瘟毒之感染僅呈現淋巴感染相。
2. 扁桃腺、脾臟及顎淋巴節等病毒之增殖及消長形態均呈現曲線狀，其中扁桃腺之曲線最為顯明，且於接種後第 7、8 天達最高點($10^{8.0}$ TCID₅₀/g)，而脾及顎下淋巴節於接種後第 4、5 天為頂點。其他陽性臟器之病毒價極低，僅為 $10^{1.0}$ TCID₅₀/g。
3. 兔化豬瘟毒接種豬之血中未能檢出 Interferon，全例均呈陰性反應。中和抗體測定試驗結果亦均呈陰性。

誌 謝

本研究之完成，承國家科學委員會及中國農村復興委員會等研究經費之補助，並蒙農復會主任委員李崇道博士、余組長如桐及本所陳所長守仕之指導與鼓勵，謹此敬謝忱。

參 考 文 獻

1. Dunne, H. W., Hokanson, J. F. & Luedke, A. J. : The pathogenesis of hog cholera, I. Route of entrance of the virus into the animal body, *Am. J. Vet. Res.* 20 : 615—618 (1959)。
2. Dunne, H. W., & Luedke, A. J. : The pathogenesis of hog cholera, II. The Virus eclipse phase and Sensitization of the host, *Am. J. Vet. Res.* 20 : 619—624 (1959)。
3. Kernkamp, H. C. H. : The thranteral entrance of the virus in hog cholera, *J. Am. Vet. Med. Ass.* 136 : 149—155 (1960)。
4. 熊谷哲夫：豚コレラウイルスの感染，日本農林省家畜衛生試験場水曜會記事。12：1—4（1963）。
5. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S., and Matumoto, M. : A new in vitro method (END) for detection and measurement of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture I. Establishment of standard procedure. *J. Immunol.* 87. 245—256 (1961)。
6. Lee, Robert C. T. : A Preliminary Report on the Lapinized Hog cholera Vaccine in Taiwan, Chinese—American Joint Commission on Rural Reconstruction, Animal Industry Series, No. 5 (1954)。
7. 林再春、呂榮修、王炳辰、周懋森、李芳棟：兔化豬瘟毒之接種反應及免疫效力，臺灣省農林廳獸疫血清製造所研究報告2（1958）。
8. 林再春、楊揚輝、周懋森：兔化豬瘟毒豬尿中消長狀況，臺灣省農林廳獸疫血清製造所研究報告2（1958）。
9. 林再春：螢光抗體—組織培養法對於豬瘟病毒檢出及定量之研究，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告5：1—22（1968）。
10. 林再春：應用螢光抗體法測定豬瘟病毒感染增殖之研究，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告5：23—24（1968）。
11. 林再春、賴秀總：兔化豬瘟毒之試管內 (In Vitro) 檢出及定量法之研究，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告7：（1970）。
12. Mengeling, W. L. ; Pirtle, E. C & Terrey, J. P. : Identification of hog cholera viral antigen by immunofluorescence ; Application as a diagnostic and assay method. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci* 27 : 249—252 (1963)。
13. Pehl, K. H. & Schulze, W. : Der Virusgehalt Blutfreier Organe beider Schweinepest. *Arch Exp. Vet. Med.* 12 : 861—869 (1958)。
14. Potel, K. & Korn, G. : Experimentelle, Untersuchungen Zum Nachweis des Schweinepest Virus und Seiner Wegspuren in Zentra lnservenstimm. *Arch Exp. Vet. Med.* 10 : 370—376 (1956)。

15. Potel, K. : Experimentella, Untersuchungen Zum Wanderung Sued des Schweinepest Virusnach Seiner Parenteralen Applikation. Arch. Exp. Vet. Med. 10 : 604—614 (1956)。
16. 笹原二郎、熊谷哲夫：豚コレラウイルス學の進展，P. 95~120，京都大學ウイルス 研究所編，京都・日本 (1963)。
17. 澤田實、佐藤卯三郎、花木琢磨、信藤藏：螢光抗體法による豚コレラウイルスの増殖機序に関する研究—豚體內における強毒および弱毒ウイルス増殖像の比較，日本獸醫學雜誌，28 : 473 (1966)。
18. Schwarte., L. H. & Mathews, J. : Transmission of hog cholera via the respiratory tract, North Am. Vet. 35 : 671—672 (1954)。
19. Solorzano, R, F. : An in vitro test for hog cholera, Ph D. Thesis, Pennsylvania State University, University Park (1962)。
20. Torlone, V., Titoli, F. & Gialletti, L. : Circulating interferon Production in Pigs infected with hog cholera virus. Life Sci. A : 1707—1713 (1965)。

VIRUS MULTIPLICATION IN PIGS INOCULATED WITH LAPINIZED HOG CHOLERA LIVE VACCINE.

T. C. Lin C. M. Shieh J. F. Su

Summary

In the study of hog cholera virus multiplication in experimentally inoculated pigs, the writers have already described that the patterns of virulent ALD virus infection can be divided into 3 phases; the lymphatic, viremia and visceral phases. Only the lymphatic phase was present in the infection with attenuated GPE⁻virus.

In this paper, infection of lapinized hog cholera virus in vaccinated 20 SPF pigs, 2 pigs killed daily over a period from the first through 10th day postinoculation, was carefully studied by the FACCT 2—step method. The classification of patterns of hog cholera infection as well as the immunization mechanism of the attenuated virus vaccine was further elucidated. The data are summarized as follows :

1. The lapinized hog cholera virus was initially detected from the tonsils, or spleen, mandibular lymph nodes on the 3rd day postinoculation. Tonsil was the only organ, from which the virus was constantly isolated and exhibited the highest virus titer among the virus—positive organs. Spleen and various lymph nodes showed inconsistently positive virus isolation from 3rd day through 8th day postinoculation. The rest except lung and trachea, each positive case, were all negative virus detection.

Thus, only the lymphatic phase was present in the infection with the lapinized virus. The establishment of immunity in vaccinated pigs with the attenuated hog cholera virus must be completed mainly at the lymphatic phase of infection.

2. The forms of multiplication of the lapinized virus in tonsils, spleen and mandibular lymph nodes indicated distinct curve shapes. Of them, the curve of tonsils was the most distinct and reached to the highest virus titer of $10^{3.5}$ TCID₅₀/g on the 7—8th day postinoculation while spleen and mandibular lymph nodes reached the highest virus of $10^{3.5}$ TCID₅₀/g on the 4th or 5th day postinoculation. The other positive ones showed low titer of 10^1 TCID₅₀/g.

3. Interferon and neutralization antibody were not demonstrated from the serum of pigs inoculated with the lapinized live vaccine in all cases of this experiment. (In the previous experiment, the neutralization antibody was demonstrated as early as 10 days after vaccination in some cases.)

Note : The paper was read at the Fifth Scientific Meeting of the Chinese Society of Microbiology held in December 1972.