

猪瘟血清製造猪遺留病毒之檢索

陳清 林再春 謝竹茂 李進海 林地發

(臺灣省家畜衛生試驗所)

一、緒 言

關於猪瘟病毒之研究，中外學者之報告甚多，無論是基礎科學之探討或應用科學之研究，均有長足之進步。1908年 Dorset 等首次應用免疫血清。繼之於1934年 Dorset 等復完成自動免疫之結晶紫疫苗。1946年 J. A. Baker & Koprowski 等以猪瘟病毒通過家兔獲得成功，在獸醫學上誠為一劃時代之貢獻。

本省於1921年起即已製造此項血清供為猪瘟防治之需，以迄於今。至於疫苗之使用則首先應用福馬林臟器疫苗，結晶紫疫苗³⁾，後改用兔化猪瘟疫苗^{4,6)}。該兔化疫苗之種株係民國41(1952)年由農復會李崇道博士自菲律賓分讓攜回交由本所試驗，證實該病毒可適應於省產家兔，並以其應用於預防猪瘟之發生效果極佳。由於該疫苗之普遍應用，猪瘟之發生由8%以上驟降至0.02%。惟緊急預防之措施，則仍有賴於猪瘟血清。

1967年 Izawa 等¹⁾ 報告組織培養細胞外之病毒於培養液中如含有猪瘟抗體則無法檢出。但細胞內之 Virus 可應用凍結及溶解法處理後使其游離。1969年林再春等¹⁰⁾ 報告猪瘟病毒人工感染猪其 Virus 之檢出，首先出現於扁桃腺及脾臟等，爾後漸及於其他器官或腺體。且扁桃腺及脾臟其病毒持續期間亦最長。

至於猪瘟免疫血清製造猪遺留 Virus 之檢索，學者之報告不多，但兔化猪瘟病毒(第111代毒)接種猪，於第5~14日內所採集之尿液接種於健康猪，可使其獲得免疫，則已被證實⁵⁾。惟又據林再春等之研究，使用同樣種株第814代毒接種於 SPF 小豬並採集糞尿，將其濾過後之濾液接種於 SPF 小豬及 ST 細胞以 END 法二段法檢查之結果，兩者均為陰性(尚未發表)。

近年來由於猪瘟病毒試驗管內檢查方法如 END 法(Kumagai, et al 1961)²⁾ FACCT (Meninging, et al. 1963)¹³⁾ 等之發現及應用以來^{9, 11, 12, 15, 16)}，對於猪瘟病毒之研究助益甚大。茲為明瞭免疫血清製造用猪屠體臟器中是否尚有猪瘟病毒之遺留，病毒與抗體共存問題，以及可否供為加工利用而無病毒散佈之虞，乃進行本專題之研究，茲謹將所得成績報告於後，敬請指正。

二、試驗材料與方法

(一) 試驗材料

1. 供試猪隻

- 1) 猪瘟免疫血清 (No. 87) 製造用毛猪 45 頭中任取 25 頭。其體重均在 72~90 公斤之間，係向臺糖公司種畜場選購供用。
- 2) SPF 中猪 2 頭：供為毒血製造用，其體重在 60~70 公斤之間。猪瘟中和抗體測定陰性者。
- 3) SPF 小豬 10 頭：本所自產之第 29 胎次，9 週齡之初代小豬，其體重在 8~9 公斤之間，猪瘟中和抗體測定陰性，供為遺留 Virus 測定及不同來源抗原免疫血清共同免疫檢定之用。

2. 供試毒株

- 1) 猪瘟病毒 ALD 株：本所繼代保存之猪瘟強毒 (115th)，供猪瘟免疫血清製造，研究

(2)

，死化豬瘟疫苗檢定等用，其通過 ST 細胞者稱之為 T-ALD 毒。

2) 新城雞瘟病毒 (NDV) : (Miyadera) 使用宮寺株其感染尿液供為試管內 END 法及血清中和試驗之攻擊毒。

3) 豬瘟病毒 LOA 株 : 係向日本農林省動物用醫藥品檢查所分讓在本所繼代保存之毒株，其 Virus titer TCID₅₀ 為 10⁷ 供免疫血清中和試驗用。

3. 供用小豬睪丸 (ST) 細胞

係採自本所 SPF 中心生產 4 ~ 6 週齡之初代或第二代 SPF 小豬，均以無菌操作採取，經細胞消化後以細胞增殖培養液 (Earle 氏液 GS 為 20% 及添加抗生素) 調製為 250 萬個/ml，供為組織培養病毒組免疫用抗原之製造，END 法及血清中和試驗之用。

4. 山羊血清 (GS)

本省產黑色雜交山羊，經豬瘟抗體測定為陰性者，並經 56°C 30 分鐘非働化後分裝凍結保存於 -20°C 供用。

5. 遺留 Virus 檢索用材料乳劑

係分別由終期免疫注射後之第 10、14、21 及 28 天等不同日數行全放血後採取之臟器、腺體、尿液及骨髓等材料，除尿液外，其餘分別以 Earle 氏液作成 5 倍乳劑，低速遠心分離其血清液凍結保存供試。

6. 中和抗體測定用免疫血清

各供試豬隻及不同來源抗原免疫組，於每一階段免疫後次一刺激注射直前採血，分離血清及於終期免疫後不同日數全放血時，採血分離所得之血清，分別經 56°C 30 分鐘非働化後凍結保存於 -20°C 供試。

(二) 試驗方法

1. 豬瘟免疫血清之製造過程 :

1) 免疫用抗原之製備 : 供本次豬瘟血清製造免疫用抗原之來源有二種，一種為利用 ST 細胞組織培養製成之 T-ALD 病毒液。另一種為利用 SPF 中豬 (豬瘟抗體陰性) 接種豬瘟病毒 ALD 株毒血，使其發生典型症狀後放血採取之脫纖毒血。

2) 免疫血清製造之過程 : 由臺糖公司種畜場購回之毛豬，部份供試豬隻先行採血分離血清，然後全部實施死化疫苗之基礎免疫 (各注射 1 dose) 經 14 天後再以脫纖毒血 5c.c. 行刺激注射，經一週後再注射 50c.c. 再經 9 天後再以 250c.c. 毒血腹腔內行終期免疫刺激注射。

另一組係以組織培養所得之豬瘟病毒液行免疫者，其方法及過程與毒血免疫組者同。惟兩組供試豬隻均於每階段刺激注射直前採血，分離血清供試。經過終期免疫注射後之豬隻分別於第 10、14、21，及 28 天行全放血，分離血清，抽取供試樣本，其餘者添加防腐劑後冷藏二週，濾過分裝然後送請檢定。

2. 遺留 Virus 之檢索

材料之採取與乳劑之製作 : 已如前述，將上述之材料應用 END 法及動物接種法分別檢索豬瘟病毒之留存與否，參照 Kumagai 等之方法及 SPF 小豬之接種試驗加以研究。

3. 豬瘟免疫血清中和抗體價之測定 :

為明瞭豬瘟血清製造豬屠體內病毒之存留與否，與不同來源抗原免疫所得血清力價之關係，以及終期免疫後不同時期放血採得血清中和抗體價高低等是否有關，對於採得之血清樣本均經 56°C 30 分鐘非働化後，參照 Kumagai 等報告之 END 中和試驗法及林再春等^{7,8)} 對於本省小豬移行抗體分佈情形調查之方法採用之二倍稀釋法將被檢血清加以稀釋，稀釋後之血清各加入等量含 100TCID₅₀ 之 LOA 株病毒後充分混合並於 37°C 孵卵器感作 1 小時後

，各稀釋液分別分注 0.1ml 於小試管 2 支，然後分別加入 0.4ml 之 ST 細胞液，置於 37°C 培養 4 天後抽去培養液，而後攻擊接種含 1 HA 力價之 NDV 病毒液，繼續培養三天後，判定有無細胞變性現象 (CPE)。如 CPE 陰性者即表示豬瘟中和抗體陽性。致 END 現象為陰性。且以中和試驗陽性最高稀釋倍數為中和抗體價。

4. 豬瘟血清效力檢定

除以不同來源之抗原免疫所得血清，分別以 SPF 小豬行效力檢定，及供豬瘟血清製造豬遺留 Virus 被檢材料混合乳劑動物接種試驗作為陽性血清對照外，其餘成品係按現行法令依 55、8、26 省府公報秋字第 49 期修正動物用生物藥品檢定標準，由檢定單位實施檢定。

三、試驗成績

1. 豬瘟血清製造豬遺留 Virus 檢索之成績：

前項供遺留 Virus 檢索採得之材料，分別依照 Kumagai 等 END 法測定之結果，所得成績詳如表 I。由該表得知，終期免疫後，無論是第 10、14、21 或 28 天所採取之材料，經測定之結果，均未發現有豬瘟病毒之遺留。又將該等材料乳劑分別使用 SPF 小豬 (豬瘟抗體陰性) 行接種試驗之結果，亦均未發生任何症狀，而於攻毒後 14 天以內呈現典型豬瘟斃死。證實供試材料無 Virus 之遺留，且接種後亦無豬瘟抗體之產生，詳如表 II 成績。

表 I、豬瘟血清製造豬被檢材料遺留病毒測定成績

Table 1. Results of the Residual virus detection test from pigs used for hog cholera anti-serum production by END method.

Tested pigs			Materials taken after immunization (day)	Materials & Results						Remarks
Number	Sex	B.W. (Kg)		Brain	Tonsil	Lymph node	Liver	Spleen	Urine	
3	Female	84	10	—	—	—	—	—	—	Materials collected on June 29, 1970
4	Female	89	10	—	—	—	—	—	—	
5	Female	81	10	—	—	—	—	—	—	
6	Female	87	10	—	—	—	—	—	—	
7	Male	82	10	—	—	—	—	—	—	
38	Male	82	14	—	—	—	—	—	—	July 3, 1970 Ovary: —
39	Male	81	14	—	—	—	—	—	—	
40	Female	77	14	—	—	—	—	—	—	
41	Male	78	14	—	—	—	—	—	—	
42	Female	77	14	—	—	—	—	—	—	
43	Male	80	14	—	—	—	—	—	—	T-ALD antigen immunized July 3, 1970
44	Female	72	14	—	—	—	—	—	—	
45	Female	82	14	—	—	—	—	—	—	
46	Female	72	14	—	—	—	—	—	—	
47	Male	75	14	—	—	—	—	—	—	

18	Male	78	21	---	---	---	---	---	---	---	July 10, 1970
19	Male	76	21	---	---	---	---	---	---	---	
20	Female	79	21	---	---	---	---	---	---	---	
21	Male	83	21	---	---	---	---	---	---	---	
22	Male	80	21	---	---	---	---	---	---	---	
28	Male	76	28	---	---	---	---	---	---	---	July 17, 1970
29	Male	82	28	---	---	---	---	---	---	---	
30	Male	91	28	---	---	---	---	---	---	---	
31	Male	83	28	---	---	---	---	---	---	---	
32	Male	72	28	---	---	---	---	---	---	---	

Note : --- Hog cholera virus negative.

表 II、猪瘟血清製造猪被檢材料混合乳劑猪隻接種試驗成績

Table 2. Results of the pigs inoculated with mixed emulsion of specimen from anti-hog cholera serum production pig-carcass.

Tested pigs					Experimental treatment						Remarks
Exp. date	No.	Sex	B.W. (Kg)	H.C. antibody titer before use	Materials	Dose	Reactions	The H. C. antibody titer at 14 days after inoculated	Challenge date	Challenge results	
May 27, 1971	368	M.	8.2	Negative	10th day visceral organ mixed emulsion after H. C. V. terminate immunized	X5, 2ml	---	Negative	June 10, 1971	D ₉	Typical hog cholera Lesion
〃	369	F.	8.5	〃	〃	〃	---	〃	〃	D ₁₀	〃
〃	364	M.	8.9	〃	14th day visceral organ mixed emulsion after H. C. V. terminate immunized	〃	---	〃	〃	D ₁₀	
〃	366	M.	8.5	〃	〃	〃	---	〃	〃	D ₁₂	
〃	374	F.	8.5	〃	*14th day visceral organ mixed emulsion after H. C. V. terminate immunized	〃	---	〃	〃	D ₈	T-ALD group
〃	373	F.	8.6	〃	21st day visceral organ mixed emulsion after H. C. V. terminate immunized	〃	---	〃	〃	D ₉	
〃	365	F.	8.6	〃	28th day visceral organ mixed emulsion after H. C. V. terminate immunized	〃	---	〃	〃	D ₁₁	
〃	371	M.	8.0	〃	ALD Virulent blood	ALD×200 2ml.	D ₁₁				H. C. virus control

May 27, 1971	370	M.	9.0	∕	Virulent blood immunized serum	immunized serum 9c.c. ALD×200 2ml.	—	× 512	∕	○	Positive antise- rum for survival control & potency test.
∕	372	F.	8.0	∕	T—ALD fluid immunized serum	immunized serum 8c.c. ALD×200 2ml.	—	× 512	∕	○	∕

Note : 1. Tested pigs were used from 29th litter of SPF pigs. 8 weeks old age.

2. — : No symptoms observed including fever & leucopenia.

3. ○ : survival.

Dn : Dead, n indicate the days of death after challenge.

4. M. : Male, F. : Female.

2. 不同來源抗原免疫所得血清中和抗體測定成績

由不同來源抗原供豬瘟血清製造時，雖未能由其屠體檢出證明豬瘟病毒之遺留。但其免疫所得之血清中和抗體價如何，乃須加以究明，因此由供試豬隻於免疫直前採取之血清，及各段階免疫後採得之血清，經中和抗體價測定之結果，其詳細成績如表Ⅲ及圖一，由表Ⅲ得知兩組不同來源之抗原免疫所得之血清，其抗體價並無差異。又由圖一得知終期免疫後不同口數放血所得之血清，其中和抗體價亦無顯著高低之別。

表Ⅲ、不同來源抗原免疫所得血清之中和抗體價

Table3. The neutralization antibody titer of the sera immunized with different source of hog cholera antigen

No. of tested pigs	Treatment N.T. titer	Immunization & antibody titer					Remarks
		Before booster immunization May 21, 1971.	14th days after booster immunization June 3, 1971.	7th day after 5c.c. virus fluid inoculation June 10, 1971.	9th days after 5c.c. virus fluid inoculation June 19, 1971.	14th days after 25c.c. virus fluid inoculation July 3, 1971.	
Defibrinated virulent blood	# 38	1,024	1,024	1,024	1,024	4,096	
	# 39	1,024	512	512	512	4,096	
	# 40	2,048	1,024	1,024	1,024	4,096	
	# 41	1,024	512	512	2,048	8,192	
	# 42	1,024	512	1,024	1,024	4,096	
T—ALD fluid	# 43	1,024	256	1,024	1,024	4,096	
	# 44	—	128	1,024	2,048	4,096	
	# 45	1,024	2,048	4,096	4,096	8,192	
	# 46	1,024	512	1,024	1,024	4,096	
	# 47	1,024	1,024	512	1,024	4,096	

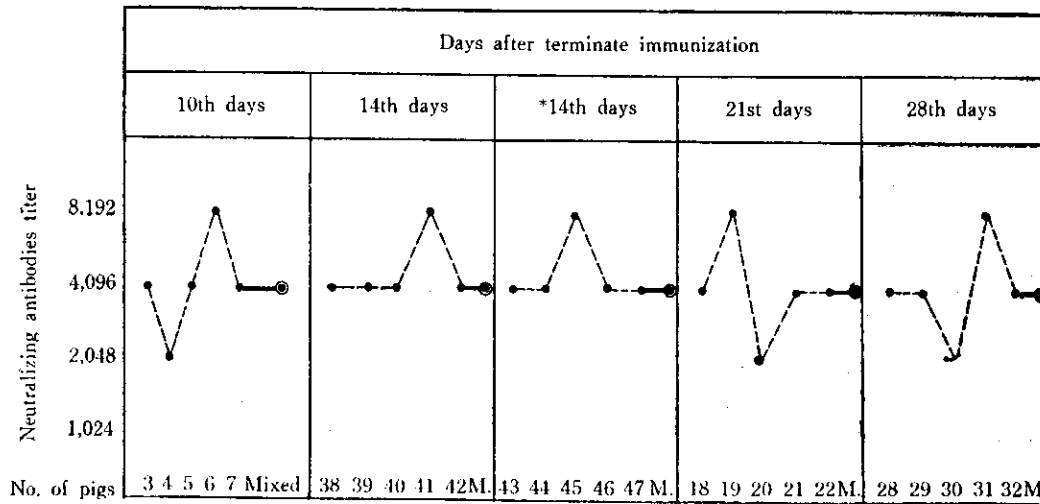
Note : (1) The tested pigs were produced & Hog cholera vaccinated at January 22, 1970 by TSC.

(2) The T—ALD fluid virus titer $10^{4.0}$ TCID₅₀/0.1ml.

(3) The defibrinated blood Serum virus titer $10^{5.0}$ TCID₅₀/0.1ml.

圖一、豬瘟血清製造豬終期免疫後不同時期放血採得血清之中和抗體價

Fig. 1. The neutralizing antibodies titer at the different period after terminate immunization



Note : ●----- : Neutralizing antibodies titer of individual serum.

—● : N. T. titer of five pigs sera mixed equally.

* : T-ALD fluid immunized group.

3. 豬瘟血清 No.87 之效力檢定成績

供本專題研究之豬瘟血清 No.87，於製成後依規定送請檢定單位抽樣檢定，除色調、性狀及無菌等符合規定外，其效力檢定結果成績甚佳，詳如表IV。又由表II所列# 370及372二頭供陽性血清對照及檢定試驗成績得知，本批血清力價相當高。供共同免疫試驗檢定結果，無論是 SPF 小豬或中豬，均無任何反應耐過健存。而對照豬則呈典型豬瘟症狀斃死（# 371）及豬瘟病殺採血留毒（# 203）。

表IV、豬瘟免疫血清 No. 87 之效力檢定成績

Table4. The potency test of the anti-hog cholera serum from Lot # 87

No. of tested pigs	B.W. (Kg)	Tested materials		Challenge materials		Reac-tions	Days of observation	Bact. culture	Summarized
		doses	date	doses	date				
# 201	45	45ml.	Sept. 14, 1970	ALD virulent blood 10 ⁻¹ 1ml.	Sept. 14, 1970	---	14	---	Survival
# 202	59.6	60ml.	Sept. 14, 1970	ALD virulent blood 10 ⁻¹ 1ml.	Sept. 14, 1970	---	14	---	Survival
# 203	55.4	Control	—	ALD virulent blood 10 ⁻¹ 1ml.	Sept. 14, 1970	Hog cholera symptom	7	Negative	Typical hog cholera lesion

四、討 論

以往因豬瘟病毒試管內診斷法之未被發明，因此在病毒之證明方面須靠材料豬隻之接種試驗，頗不經濟，致對於豬瘟血清製造豬之屠體是否尚有豬瘟病毒遺留之研究似尚無報告。近年來由於試管內檢查技術之進步，該項病毒之檢出至為簡便且可靠。筆者等在製造豬瘟免疫血清時，於終期免疫後全放血直後之屠體解剖檢查時，屢發現有少量毒血凝塊殘存於腹腔，或於某臟器發現尚遺留某些病變。即本批 (No. 87) 免疫血清製造之毒血免疫組第14天放血者之中亦有一例 (≡42號豬) 於卵巢發現數個出血斑。但經 Virus 測定之結果，並無豬瘟病毒之存留。且即使是終期免疫後第10天所採取之臟器乳劑，經測定之結果亦均未發現有豬瘟病毒之存留。

1969年 Okaniwa 等¹⁴⁾ 曾報告，弱毒豬瘟病毒之動物接種試驗於脾臟及淋巴腺等臟器仍會有病變之發生，因此強毒病毒 (ALD) 之免疫雖經一段時期，但某些豬隻臟器病變之尚未完全恢復，似仍不可缺之現象之一。

供 END 法測定之材料，其各不同時期採得之混合乳劑以 SPF 小豬 (豬瘟抗體陰性) 行接種試驗之結果，亦均未呈現任何症狀，且於乳劑接種後第14天採血，分離血清，測定其中和抗體之結果，亦無陽轉現象。而攻毒結果則均呈典型之豬瘟症狀於二週內斃死。因此該等被檢材料無豬瘟病毒之遺留頗堪確定。

又以本批供血清製造豬隻，於免疫直前採血測定其中和抗體價證實均在512~1,024之間，因此雖再施以基礎免疫後第14天及 5c.c. 毒血刺激注射後第7天採取之血清，其中和抗體價不但沒有提高，而反見下降，此一現象與林再春等⁹⁾ 之報告移行抗體與活毒疫苗接種後免疫抗體產生關係之結果頗為吻合，此一事實足供今後免疫血清製造改進之重要參考。

摘 要

關於豬瘟血清製造豬遺留病毒之檢索，由第87批血清製造豬45頭中任取25頭加以研究檢索之結果摘要如下：

1. 豬瘟血清製造豬於終期免疫注射後之第10、14、21及28天分別實施全放血直後採取其臟器，淋巴腺、骨髓、血清及尿液等材料應用 END 法及 SPF 小豬 (豬瘟抗體陰性) 之接種試驗結果，均未發現有豬瘟病毒之遺留。
2. 不同來源之豬瘟病毒液 (ALD 毒血組及其 ST 培養液之 T-ALD 組) 為抗原免疫之豬隻，由其屠體採得之材料經測定之結果，該兩免疫組均未發現有豬瘟病毒之存在。且免疫所得血清之中和抗體價及 SPF 豬隻共同免疫效力測定結果，兩組之成績亦無差異。
3. 由本試驗結果得知具有高倍中和抗體價之材料豬隻，供為豬瘟血清製造時，其豬瘟疫苗之基礎免疫及少量 5c.c. 毒血之刺激注射，無法增強免疫血清之力價。因此該等免疫過程得以省略，藉以縮短免疫期間。

誌 謝

本試驗之完成，承蒙國家科學委員會之經費補助，並蒙本所陳所長守仕之指導與鼓勵，豬瘟研究股蘇杰夫及鄭建盛兩位先生之提供 ST 細胞，於此併致萬分謝忱。

參考文獻

1. Izawa, H. & Soekawa, M. : Attenuation of Hog Cholera Virus in the Carrier Cell

- Strains Established from Kidneys of pigs Experimentally Infected with the Virulent Virus. *Am. J. Vet. Res.* Vol 28. No.127 1662—1669 (1967) .
2. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. & Matsumoto, M. : A New in vitro Method (END) for Detection and Measurement of Hog Cholera Virus and its Antibody by means of Effect of Hog Cholera Virus on Newcastle Disease Virus in Swine Tissue Culture. I. Establishment of Standard Procedure. *J. Immunol.* 87, 245—256 (1961) .
 3. 李崇道、劉永和、林再春、葉明得：結晶紫豬瘟疫苗製造之研究，農林廳獸疫血清製造所研究報告 P17—25 (1951) 。
 4. 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)
 5. 林再春、楊揚輝、周懋森：兔化豬瘟毒在豬尿中消長狀況，農林廳獸疫血清製造所研究報告 No. 2, P23—24, (1958)
 6. 林再春、楊子儒、周懋森、張茂林：兔化豬瘟毒冷凍乾燥之研究第一報、第二報、臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No.1, P1—43, (1963)
 7. 林再春、謝竹茂、陳由昌、賴秀穗、李正雄、陳正吉、陳守仕：豬瘟 GP 組織培養疫苗之安全性及免疫效力，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No.6, P1—10 (1969) 。
 8. 林再春、謝竹茂、陳由昌、陳正吉、李正雄、賴秀穗：本省小豬之豬瘟移行抗體分佈情形及移行抗體與活毒疫苗接種後免疫產生之關係，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No.6, P11—23 (1969) 。
 9. Lin, T.C., Kang, B.J., Shimizu, Y., Kumagai, T. & Sasahara, J. : Evaluation of the Fluorescent Antibody Cell Culture Test for Detection and Titration of Hog Cholera Virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 9 : 10—19 (1969) .
 10. Lin, T.C., Shimizu, Y., Kumagai, T. and Sasahara, J. : Pathogenesis of Hog Cholera Virus Infection in Experimentally Inoculated Swine. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* 9 : 20—27, (1969) .
 11. Loan, R. W. : Increased Sensitivity of the END (Exaltation of Newcastle Disease Virus) Test for Hog Cholera Virus. *Am. J. Vet. Res.* 26 : 1110—1113 (1965) .
 12. 劉燃炎、葉明得、賴俊雄、劉義雄：組織培養豬瘟病毒代替毒血為免疫用抗元試驗：臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No.5, P53—57 (1968) 。
 13. Mengeling, W. L., Pirtle, E.C. and Torrey, J.P. : Identification of hog Cholera viral antigen by immunofluorescence : Application as a diagnostic and assay method. *Can. J. Corup. Med. Vet. Sci.* 27, 246—252 (1963) .
 14. Okaniwa, A., Nikagawa, M., Shimizu, Y. & Furuuchi, S. : Lesions in Swine Inoculated with Attenuated Hog Cholera Viruses. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* Vol. 9, 92—103 (1969) .
 15. Pirtle, E.C. : In vitro Spread of Hog Cholera Viral Infection from Cell to Cell : Demonstration of Viral Antigen in Dividing Cells. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 30, No. 11, 1909—1912 (1969) .
 16. Pirtle, E.C. : In vitro Spread of Hog Cholera Viral Infection from Cell to Cell : Demonstration of Viral Antigen in Cytoplasmic bridges. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 30, 1913—1919 (1969) .

Investigation for the Residual Virus in Anti-Hog Cholera Serum Production Pig-carcass

C. Chen, T. C. Lin, C. M. Shieh, J. H. Lee, D. F. Lin

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

Summary

Twenty-five out of 45 head of immune pigs for the production of anti-hog cholera serum (Lot No.87) were employed for the detection of hog cholera Virus in their tissues. The results are summarized as follows :

1. The visceral organs, lymph nodes, bone marrow, sera and urine of the immune pigs, which were bled on 10th, 14th, 21st and 28th day respectively after the last stimulative inoculation, were aseptically collected and carefully examined by means of END method and SPFpig inoculation. All of the specimens examined showed hog cholera Virus negative.
2. The specimens of the immune pigs treated with T-ALD Virus fluid instead of using ALD virulent blood throughout the whole immunization course were also hog cholera Virus negative in all cases. The potency and neutralization antibody titer of the sera from both groups which were treated respectively with ALD virulent blood and T-ALD Virus fluid were checked and showed no remarkable difference between the two groups.
3. Pigs inoculated previously with lapinized hog cholera Vaccine both the basic immunization such as simultaneous inoculation and 5 ml-blood stimulative immunization could be omitted as the vaccinated pigs always could obtain considerably high titers and no increase in antibody titer was found after reinoculation. Thus, the production cost could be largely decreased as the immunization period was shortened.