

應用橋樑細胞(豬睪丸)將兔化 豬瘟毒馴化於兔腎細胞之研究

蘇杰夫 林再春

(臺灣省家畜衛生試驗所)

各國豬瘟預防用疫苗，起初注重不活化疫苗之發展，最近集中於活毒疫苗之研究^{1,3,5,6}，更因近些年來之組織培養技術之長足進步，致活毒疫苗之研製又趨向於組織培養法的應用，先進國家已相繼研究組織培養活毒疫苗成功^{2,11,12,14~16}。組織培養疫苗不僅成本降低，且製造過程中之病毒處理亦較為方便⁸；又本省十數年來普遍應用兔化疫苗雖已獲得輝煌的成績^{5,6}，但仍需使用動物為其直接製造材料，甚有不便之處，鑑於上述優劣因素，擬將兔化豬瘟毒馴化於兔腎細胞，以期作出一新種毒株，供以應用組織培養法製造活毒疫苗。筆者曾屢次以不同方法試把兔化豬瘟毒馴化於兔腎細胞，結果得知欲將該毒直接馴化於兔腎細胞較為困難，但改把兔化毒經豬睪丸細胞增殖培養後，再次培養於兔腎細胞，隨即接種家兔，俟其體溫下降之際，摘取脾臟製成乳劑再行豬睪丸細胞之增殖培養，如此交互循環累代通過，以豬睪丸細胞為橋樑，已能使兔化豬瘟毒逐漸馴化於兔腎細胞，茲將所得成績報告於後：

試驗材料及方法

1. 毒株：

1) 兔化豬瘟毒(簡稱 LPC 株)：係農復會李秘書長崇道博士於民國42年12月由菲律賓分讓携回，交由本所研製活毒疫苗，於本所繼代通過家兔達 800 餘代，其對接種家兔呈典型之熱反應(接種後第二天體溫上升至 41°C 以上，翌日下降至常溫)，感染兔脾病毒對豬隻之感染力價為 10⁵。供為本試驗者為 816 代感染兔之脾臟以 Earle's 液(內含有 5% 之山羊血清)製成十倍乳劑，分注於小試管內，置於 -70°C 凍結保存備用。

2) 豬瘟強毒(簡稱 ALD 株)：係於民國38年由 Dr. H.N. Spears 携贈本所，供為結晶紫豬瘟疫苗製造用之豬瘟強毒。現仍以豬隻繼代，本試驗所用者係將其接種 SPF 小豬，俟發病至最高度時採取血液，分離血清，分裝於小試管內，置於 -70°C 凍結保存，供為豬接種試驗之攻擊，或 FACCT-2 段法之陽性對照用。

2. 細胞之消化與培養：

1) 兔腎細胞消化與培養：將健康家兔(雜交種，購自臺南縣七股鄉，體重 1.5~2 公斤)由心臟放血，摘出腎臟，剝棄包膜，切除髓質部及結締組織，加入含有 2% 抗生素液(Penicillin 200u/ml, Streptomycin 200r/ml, Kanamycin 20r/ml)之 Earle's 液內浸漬 10 分鐘後，剪碎加入適量的 PBS，置於攪拌器上攪拌 10 分鐘，洗棄所含之血液後加入 0.25% Trypsin 於 35°C 水槽攪拌消化，待完全消化後，以 100 mesh 之白鐵製細網過濾，經 800—1,000 r. p. m. 5 分鐘的遠心，經 3~4 次遠心洗滌，收集沉澱細胞，以 Earle's 液加入 15% 山羊血清、1.5% 之 7% NaHCO₃ 的細胞培養液，配成 0.8% 細胞懸浮液，置於 37°C 經 4~5 天之培養，待 Monolayer 形成後，供病毒繼代培養用。

2) 豬睪丸細胞消化與培養：由瑞芳建基農牧場或本所附近養豬戶，4~5 週齡未經豬瘟預防注射之仔豬，以無菌操作把睪丸摘出，經棄除包膜、結締組織後，依上述方法消化後，以含有 10% 山羊血清之 Earle's 細胞培養液配成 0.5~0.7% 之細胞懸浮液，於 37°C 經 2~3 天之培養，俟

Monolayer 形成後，供為病毒增殖培養用。

3. 橋樑細胞對兔化豬瘟毒於兔腎細胞馴化法：

將兔化豬瘟毒感染兔脾臟十倍乳劑，接種於培養 2~3 天之豬睪丸單層細胞，經 4~5 天之增殖培養；繼將其培養液接種到培養 4~5 天之兔腎細胞，經 5~6 天之培養；次把該培養液，靜脈注射家兔，俟其體溫下降之際（約為接種後第 3 天），採取脾臟製成十倍乳劑，再行豬睪丸細胞增殖培養，如此交互循環累代通過，試將兔化豬瘟毒馴化於兔腎細胞，每於通過兔腎細胞培養之培養液收集後，置於 -70°C 凍結保存，供病毒之檢出試驗。

4. 兔腎細胞馴化毒之檢出試驗。

1) 螢光抗體—組織培養二段法：林再春等將兔化豬瘟毒先經豬睪丸細胞增殖培養後，再以螢光抗體組織培養法實施病毒之檢出，可獲得與豬隻接種試驗之感染價同高。依此法把兔腎細胞通過毒先以十倍階段稀釋法稀釋後，分別接種於豬睪丸細胞，經 4~5 天增殖培養後，分別把各階段之培養液接種 PK-15 細胞，經 24 小時培養後行螢光染色，藉此檢出抗原及測定其組織細胞感染力價(TCID₅₀)。

2) 家兔接種試驗：將兔化豬瘟毒通過兔腎細胞繼代之培養液(5.10.15.20代)原液或以 Earle's 液(內含山羊血清 5%)依十進階段稀釋法稀釋後，每階段以 1 ml 靜脈注射家兔各 2 隻，每天上下午量體溫各一次，觀察其溫度之變化。藉此熱反應測定該兔腎細胞通過毒對家兔之感染價。

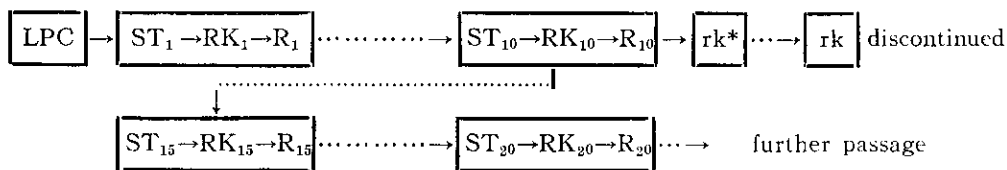
3) SPF 豬接種試驗：使用本所無持定病原研究中心自產之 SPF 小豬(7~9 週齡)，將兔腎細胞通過毒依上述方法稀釋後以 1 ml 皮下接種 SPF 仔豬，觀察其安全性；經 14 天後再以 10³ID₅₀之豬瘟強毒 ALD 株 1 ml 肌肉注射攻擊，測定其防禦能力，同時採血分離血清，依 END 法(4-13)測定其中和抗體產生情形，藉以探查該兔腎細胞通過毒存在與否？及對 SPF 豬隻之感染價如何？

試 驗 成 績

1. 橋樑細胞對兔化豬瘟毒於兔腎細胞馴化試驗：

兔化豬瘟毒以豬睪丸細胞為橋樑，即將該毒株先經豬睪丸細胞增殖培養，再通過兔腎細胞，繼而接種家兔，如此循環交互累代通過，其大綱如圖 1 所示，迄今已通過兔腎細胞 20 代，同時未見其對宿主細胞發生 CPE 的現象。又於通過兔腎細胞 10 代時，曾直接改以兔腎細胞繼代至第 5 代，因其對豬隻之免疫力差(僅 10¹ ID₅₀)致中止繼代。

Fig. 1. Passage of LPC strain in Rabbit Kidney Cell Culture by means of Bridging Cells (Swine Testicle Cells)

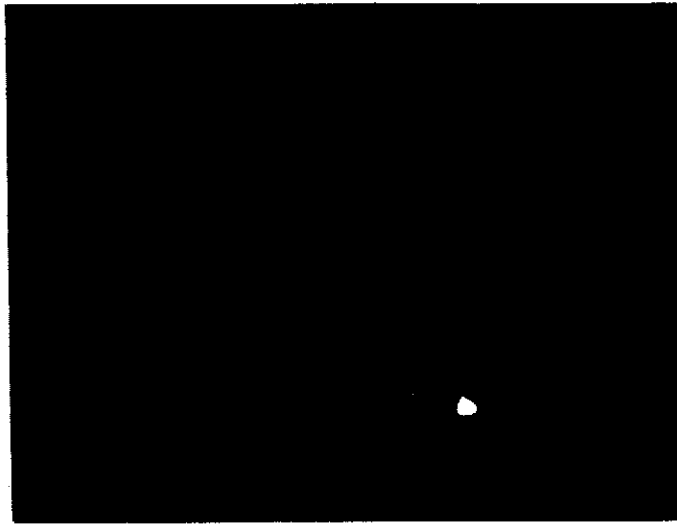


ST : Swine Testicle Cell Culture. RK & rk : Rabbit Kidney Cell Culture.

R : Rabbit. *Designate only passage through Rabbit Kidney Cell Culture.

2. 兔腎細胞馴化毒之檢出及力價測定：

1) 螢光抗體—組織培養二段法：該馴化毒經螢光抗體—組織培養二段法測定其抗原，結果可在 PK-15 細胞的細胞質上看見特異性螢光—即其抗原，如所附照片，同時測得其組織細胞感染力價 TCID₅₀ 為 10³。



Hog Cholera Rabbit Kidney Cell Culture modified virus of Lapinized strain revealed by Fluorescent Antibody Technique in PK-15 cell line. The infected cells with dark unstained nuclei show fluorescence in the cytoplasm.

2) 家兔接種試驗：兔化豬瘟毒對家兔約有97%產生典型之熱反應，即於接種後第二天體溫即上升至 41°C 以上，翌日下降至常溫，至於經橋樑細胞馴化於兔腎細胞之繼代毒，經試驗結果與原兔化豬瘟毒株相似，仍呈顯着之熱反應，詳細成績如表 1，同時測得其對家兔之感染價為 10^3 。

Table. 1. Fever reaction in Rabbit inoculated with RK Cell Culture adapted LPC strain of Hog Cholera Virus

Virus strain	Passage	Fever reaction & Dilution of inoculum							
		-0	-1	-2	-3	-4	-5	-6	
ST ₅ -PK ₅ -R ₄	5	+	+						
ST ₁₀ -RK ₁₀ -R ₉	10	+	+						
ST ₁₅ -RK ₁₅ -R ₁₄	15	+	+						
ST ₂₀ -RK ₂₀ -R ₁₉	20	+	+	+	+	+	-	-	-
Control LPC	816	+	+	+	+	+	+	+	-
ALD		-	-	-	-	-	-	-	-

The designation of ST₅-RK₅-R₄ refers to the virus which was passaged 5 times in ST cell culture, 5 times in RK cell culture, 4 times in Rabbit.

- : Showed no reaction. + : Showed fever reaction.

3) SPF 小豬接種試驗：為檢定兔化豬瘟毒株兔腎細胞馴化毒之安全性及免疫性，曾先後把該兔腎細胞通過毒 (2.5.10.15.20代) 接種 SPF 小豬，經14天再以豬瘟強毒株 ALD 攻擊，並測定

血清中和抗體價，結果如表 2。同時測得其對豬隻之感染價為 10^3 。

Table. 2. The Post-Vaccination Reaction & Immunity Efficiency in SPF Pigs inoculated with RK Cell Culture adapted LPC strain of Hog Cholera Virus.

Virus strain	Passage	Dilution of inoculum	Results of vaccination in SPF Pigs		
			Reaction of vaccinated	Neutralizing antibody titer	Result of challenge
ST ₂ RK ₂ R ₁	2	10 ⁻⁰	No reaction	2	Survived
ST ₅ RK ₅ R ₄	5	10 ⁻⁰	No reaction	2	Survived
ST ₁₀ RK ₁₀ R ₉	10	10 ⁻⁰	No reaction	1	Survived
ST ₁₅ RK ₁₅ R ₁₄	15	10 ⁻⁰	No reaction	2	Survived
ST ₂₀ RK ₂₀ R ₁₉	20	10 ⁻⁰	No reaction	1	Survived
		10 ⁻¹	No reaction	2	Survived
		10 ⁻²	No reaction	1	Survived
		10 ⁻³	No reaction	1	Survived
		10 ⁻⁴	No reaction	0	Died
		10 ⁻⁵	No reaction	0	Died

討 論

各國豬瘟防疫用疫苗，近些年來已集中活毒疫苗之研究，尤以組織培養活毒疫苗更為積極。如 Sasahara^{11,12)} 等將豬瘟強毒 ALD 株經過牛睪丸細胞，遂把 ALD 株馴化於天竺鼠腎細胞，作成 GPE-弱毒株。Sato^{15,16)} 等利用繼續增殖培養法 (Continuous Cell-Virus Propagation Method)，將 ALD 株及 Miyayi 株累代通過豬睪丸及牛睪丸細胞使其馴化，作成弱毒株—LOA 及 LOM 二株。Izawa 及 Soekawa²⁾ 亦曾報告，從豬瘟強毒 ALD 株人工感染豬之腎培養細胞在長久期間尚能以定期換液或細胞之消化方式而繼代豬瘟病毒成功，並獲對於豬隻已無病原性之弱毒株。

本省十數年來普遍應用，且在豬瘟防疫上獲得輝煌成績之兔化豬瘟毒株，由林再春等使用本省產雜交種家兔繼代，迄今已達 800 餘代，不但對於豬隻之接種甚為安全可靠¹⁰⁾，且對家兔之感受性甚高，約有 97% 以上呈現典型之熱反應；又該兔化豬瘟疫苗係直接使用動物為其製造材料，致仍有不便之處，成本也較高，檢定困難，需以豬隻接種試驗方能測定其效力及力價，非但不科學且檢定費用至鉅，直至林再春⁹⁾ 等 (1969 年) 研出 2-Step FACCT Method 始能測定兔化豬瘟毒的力價。筆者鑑於上述組織培養技術製造疫苗之優點，同時兔化豬瘟毒株又為本省普遍應用多年優良疫苗，欲進一步將該株馴化於兔腎細胞，以期作出更優良之一新毒株，供來日依組織培養法製造活毒疫苗用。試前筆者曾仿效 Izawa & Soekawa 之法²⁾，把兔化豬瘟毒株感染兔之腎培養細胞依長期換液及消化方式繼代，始終未能使其馴化。又依 Sato 等之繼續增殖培養法 (CCVP)¹⁵⁾，將兔化豬瘟毒株累代通過兔腎細胞，也遭挫折；故改依現法一即以豬睪丸細胞為橋樑，使其遂漸脫離兔體，同時適應於兔腎細胞，迄今已累代交互循環通過達 20 代，經家兔接種，豬隻接種及螢光抗體組織培養二段法等試驗，已證明兔化豬瘟毒株依此法可使其馴化於兔腎細胞，同時在檢驗上可直接應用 FACCT 法證明出該毒，又其 TCID₅₀ 之力價與家兔、豬隻之感染力價相一致同為 10^3 。但該毒株原先對家兔之感染力價為 10^5 ，而經馴化於兔腎細胞後降為 10^3 ，是否為脫離兔體而適應兔腎細胞所致，尚待繼續累代通過後方能明確究明；又該株對豬隻之感染力價原為 10^5 ，而馴化後僅為 10^3 ，此也許是剛適應於兔

腎細胞，又通過代數可能較少，力價較低所致，若能繼續累代通過兔腎細胞多代後也許可提高其對豬隻之感染力價。故現仍繼續通過，以究明其力價之變化。

結 論

1. 將兔化豬瘟毒株以豬睪丸細胞為橋樑，即以豬睪丸細胞增殖培養後，再接種兔腎細胞，繼再通過家兔，如此交互循環累代通過兔腎細胞20代，已將其馴化於兔腎細胞成功，同時不致使宿主細胞發生 CPE。
2. 該馴化毒經接種 SPF 小豬，觀察結果其安全性及免疫性均甚高，其對 SPF 小豬之感染價為 10^3 。
3. 該馴化毒經以螢光抗體組織培養二段法，甚易檢出其抗原，並測得其 TCID₅₀ 為 10^3 。
4. 該馴化毒對家兔之接種，仍保持原兔化豬瘟毒株對家兔所呈現之典型熱反應，且其對家兔之感染力價為 10^3 。

誌 謝

本研究之完成，承國家科學委員會及農村復興委員會等研究經費之補助並蒙農復會李秘書長崇道博士及余組長如桐，本所陳所長守仕之指導與鼓勵，且豬瘟研究股同仁之協助。謹此敬致謝忱。

參 考 文 獻

1. Baker, J. A. ; Serial Passage of Hog Cholera Virus in Rabbits. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 63, 183-187 (1944).
2. Izawa, H. & Soekawa, M. : Attenuation of Hog Cholera Virus in the Carrier Cell Strains Established from Kidney of Pigs Experimentally Infected with the Virulent Virus. Am. J. Vet. Res. Vol. 28, 1661-1669 (1967).
3. Koprowski, H., James, T. R. and Cox, H. R. : Propagation of Hog Cholera Virus in Rabbits. Pros. Soc. Exp. Biol. & Med., 63, 173-183 (1946).
4. Kumagai, T., Ikeda, S., and 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, 245-250 (1961).
5. Lee, Robert C. T. : A Preliminary Report on the Lapinized Hog Cholera Vaccine in Taiwan. Chinese-American Joint Commission on Reconstruction, Animal Industry Series, No. 5 (1954).
6. 林再春、楊揚輝、周懋森等：兔化豬瘟毒之接種反應及免疫效力，農林廳獸疫血清製造所研究報告第二報23—24 (1958)。
7. 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, P. 10 (1961).

8. 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).
9. Lin, T. C., and Lai, S. S., : Detection and Titration of Lapinized Hog Cholera Virus by means of Tissue Culture Technique. *Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health Experimental Report.* 7, 1-16 (1970).
10. Lin, T. C., Shieh, T. M., Su, J. F. and Cheng, C. S. : Studies on viral Excretion of swine inoculated with Lapinized Hog Cholera Virus and the Possibility of Reversion of Pathogenicity. *Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health Experimental Report.* No. 8 (1971).
11. Sasahara, J. and Kumagai, T. : Development of Tissue Culture Living Hog Cholera Vaccine. *Jap. Agr. Res. Quart.* 1, 24 (1966).
12. Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y., and Furuuchi, S. : Field Experiment of Hog Cholera Live Vaccine Prepared in Guinea pig Kidney Cell Culture. *Nat. Inst. Snim. Hlth. Quart.* 9, 83 (1969).
13. Shimizu, Y., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J., : A Mutant of Hog Cholera Virus Inducing Interference in Swine Testicle Cell Cultures *Am. J. Vet. Res.* Vol. 31, 1787-1794, (1970).
14. Soekawa, M. and Izawa, H. : Propagation of Hog Cholera Virus on Monolayer Cell Cultures. *Kitasato, Arch. Expt. l. Med.* 22, 25-35, (1960).
15. Sato, U., Nishimura, Y., Hanaki, T. & Nobuto, K. : Attenuation of Hog Ch Cholera Virus by means of Continuous Cell-Virus Propagation (CCVP) Method. *Arch. Ges. Virusforsch.* 14, 394-403(1964).
16. Sato, U., Hanaki, T., Nobuto, K. : Field Safety Test of a Tissue Culture Hog Cholera Vaccing "LOM". *Bull. Off. int. Epiz.*, 63, 79-101 (1965).

Adaptation of Lainized Hog Cholera Virus in Rabbit Kidney Cell Culture by passing through the Bridging Cells (Swine Testis Cells)

J. F. Su T. C. Lin

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

English Summary

Regarding to the early studies of Hog Cholera Vaccine, many investigators paid more attention to the inactivated vaccine. Later, they were interested in the development of the living vaccine. In addition, because of the prompt improvement of the tissue culture technique, most of them engaged in studying living vaccines by employing the tissue culture technique. The authors strongly felt that applying tissue culture technique in preparation of hog cholera living vaccine was an important work. So we tried to adapt the Lapinized Virus, which has been island-widly applied for hog cholera control, in Rabbit Kidney (RK)

cell cultures. By which the tissue culture technique could be employed for the preparation of living hog cholera vaccine with the newly adapted strain in this island. The results were summarized as follows :

1. The Lapinized Hog Cholera Virus could be successfully adapted in Rabbit Kidney (RK) after several passages of propagating the virus in Swine Testis (ST) cell culture and in RK cell culture by turns. Being passed 20 passages through RK cell culture, no cytopathic effect (CPE) was found in host cell.
2. This adapted virus had extremely high immunity potency and post-vaccination reactions were safe. Pig Infected Dose (PID) reached to 10^3 .
3. It was easily detected by means of Fluorescent Antibody Cell Culture Techniqued 2-st-
epted method. Virus titer (TCID)₅₀ reached to 10^3 .
4. The adapted virus maintained the same fever reaction of lapinized hog cholera virus when injected to rabbit, Infected Dose (ID) in rabbit was reached to 10^3