臺灣省畜衛試研報7：1—12 (1970)



# 兎化猪瘟毒之試管內 (in vitro) 檢出及定量法之研究

林再春　　賴秀穗

(臺灣省家畜衛生試驗所)

猪瘟之發現歷史已久，惟其病毒對猪及野猪以外之其他動物則均無病原性，近年來雖然組織培養技術有驚人之發展，而該病毒則因其在培養細胞不呈顯細胞變性 (CPE)，故無法在試管內 (in vitro) 檢出。因此，過去猪瘟及其疫苗之研究甚至該病之診斷，均賴猪接種試驗，故其研究工作不但在方法上受到限制且因缺乏系統性，致多爲片斷的實驗而不明之處尚多。

惟由於各先進研究者之不斷努力，至1958年始由 Kumagai 等報告 END (Exaltation of Newcastlé Disease Virus) 法[2] 可於試管內檢出猪瘟病毒—ALD 及野外發生之猪瘟强毒株，經繼續改進至1961年方確立其標準操作法[3]後對於猪瘟之研究貢獻至鉅。

繼由 Solorzano[14] 於 1962年首次應用螢光抗體法於猪瘟之診斷成功，嗣後經 Mengeling 等[8,9] 許多研究者相繼加以檢討及改進其方法，咸認其特異性，迅速性均高，而可應用螢光抗體一組織培養法 (FACCT) 於猪瘟病毒之檢出及定量[4]。

目前仍有些猪瘟弱毒株未能以 END 法檢出，例如組織培養馴化株之中，GPE⁻ 株需應用WEE毒干涉法[12]，LOM 株即需以 Satq 等之 INC法 [11] 方可檢出及定量其病毒，但兎化猪瘟毒仍無法於試驗管內檢出 [6,7]。該兎化疫苗於本省應用於猪瘟全面預防注射以來已有十餘年之久。惟該疫苗之研製，檢定等均賴毛猪實施需費至鉅，且操作繁雜致在方法上均受到阻礙，亟待創立一種適當之試管內法，已不必贅述。

筆者1967～1968年在日本研修期中曾就 END 法，干涉法及 FACCT 法等對猪瘟病毒之檢出定量詳細比較研討 [4] 并應用於猪瘟毒感染增殖之研究時，其活毒疫苗接種猪均於接種後第3天由扁桃腺檢出病毒，此與其疫苗接種後第3天發生效力似有關係認爲由於病毒干涉現象 (Viral Interference) 所致 [5]。猪瘟病毒在培養細胞上對其同類 (Homologous) 病毒之再接種感染時必呈同樣之增殖干涉現象，故兎化猪瘟毒於試管內雖然未能直接檢出似可利用此種 Homo 毒之增殖干涉現象，而被間接檢出及定量之，實值得吾人研討。

本研究係針對兎化猪瘟毒之試管內檢出及定量而進行，以期供於兎化猪瘟疫苗之製造及檢定等之改進及其感染免疫機序等之解明。茲將所得初步成績報告於後：

## 試驗材料及方法

1. 病毒株

1) 兎化猪瘟毒—LPC 株：本株係於民國42年12月農復會現任秘書長李崇道博士由菲律賓分讓携回，交本所由筆者負(林)責再行累代通過本省產家兎，并研製兎化猪瘟疫苗成功後大量製造供爲全省猪瘟預防注射之用。該毒株在本省被稱爲 LPC 株（此後本研究報告內簡稱兎化毒）其感染兎脾病毒對猪之感染價爲 $10^5$/ml 以上。供本研究用者爲 811 代，即將該毒株接種於 20 隻家兎靜脈內，於第3天體溫開始下降時放血採取脾臟混合以 Earle 液（本研究所用之 Earle 液均含有 0.5% Lactoalbumin）製成 10倍乳劑經 2,000rpm15 分冷却遠心分離之上清液分裝小試管內於 —70°C下凍結保存供試。

2) 培養細胞馴化猪瘟弱毒—GPE⁻株：係笹原博士之 B 株 GP 系 E⁻毒，B株係製造活毒疫苗用病毒株爲目的而將 ALD 株感染猪血清經猪睾丸組織培養 28代，繼以其單層細胞培養114代後實施二次限界稀釋，再經牛睾丸細胞養36代，然後再實施 3 次限界稀釋繼代而分離得到之 Clone 株。GP 株係將 B 株對天竺鼠腎 (GPK) 細胞行32代繼代之病毒，E⁻ 病毒由 GP 株所分離之變異毒與原病毒在 END 效果上呈不同之性質即該毒感染之猪睾丸 (ST) 細胞上，新城雞瘟毒完全不增殖致不呈顯 CPE ，即 END 效果爲陰性故被命名爲 E⁻ 株。本研究所用者係將 GPE⁻毒於 GPK 單層細胞大量培養，濾過所得之病毒液分裝於小試管內，凍結於−70°C 供用，其病毒價爲 $10^4$ TCID 50/ml。

3) 猪瘟强毒 —ALD 株：本株係於1949年由 Dr. H. N. Spears 携贈本所供爲結晶紫猪瘟疫苗製造之猪瘟强毒。該毒株現仍以毛猪繼代保存供猪瘟血清製造，兎化猪瘟疫苗之效力檢定攻擊及猪瘟之研究等用。本研究所用者係將其接種於 SPF 小猪（本所自產）俟其發病至最高度時採血，分離血清，分裝於小試管內於−70°C 凍結保存供試。其對 SPF 小猪之感染價爲 $10^5$/ml 以上。

4) 新城鷄瘟毒 (NDV) ：係使用宮寺株供爲 END法之攻擊用，宮寺株係以鷄胚胎繼代者。本研究所用者即將該毒接種於10日齡之鷄胚胎尿囊腔內使其感染，於接種後36～48小時斃死者經檢出抽其尿液混合分裝於小試管內凍結保存於−70°C 供試。使用前先以成鷄紅血球實施凝集反應測定其HA 價，並使用其 1 HA 單位即約相等於 $10^6$PFU 供爲 END 法之攻擊病毒。

5) 西部馬腦脊髓炎 (WEE) 毒：本毒株係於1953年由 Dr. A. B. Sobin 分贈予日本農林省家畜衛生試驗場並以小白鼠繼代12代後再以鷄胎兒培養細胞繼代 3 代者。筆者（林）於1968年 6 月由該場分讓該種株携回。本研究所用者係將該毒接種於鷄胎兒細胞，大量培養採集混合經冷却遠心後之病毒液，分裝於小試管內凍結保有於−70°C 供用。其對 ST 細胞之感染價爲 $10^{5.75}TCID_{50}$/ml，攻擊接種之 WEE 毒係使用其 $100TCID_{50}$ 且每於使用同時以 ST 細胞測定確認其病毒價。

2. 供用培養細胞

1) 猪睾丸細胞：供本研究之猪睾丸均由瑞芳建畜農場，未經猪瘟疫苗預防注射之 6 ～ 9 週齡小猪所採取者，即以無菌操作連同總鞘膜採取後立即冷藏携回，以70%酒精棉拭清消毒並浸漬於含有抗生素液 2 % (Penicillin 200u/ml, Streptomycin200r/ml, Kanamycin 20r/ml) 之 PBS 液約10分鐘後取出將實質剪碎再加入適量之 PBS 洗淨後以0.25% Trypsin 行 30°C 長時間一次消化方式，待完成消化後使用 120 mesh 不銹鋼絲網過濾，經以1,000～1,200 rpm 5 分鐘冷却遠心分離，收集沉澱細胞加入含有非働化山羊血清 (GS) 5%之 Earle 液反覆換液洗滌 3 ～ 4 次，所得細胞再以細胞增殖培養液即 Earle 液加20% GS及2%抗生素液而配成爲250個萬/ml 細胞浮游液供爲本所究用。至於 ST 細胞之維持培養液即 Earle 液加 GS 10%，抗生素液 1.0%，1.4 %之 $NaHCO_3$ 液 3 %。

2) 猪腎株化細胞 PK-15 株：此株化細胞被登記於American Type Culture Collection 之細胞，登記號碼爲 CCL-33。係於1966年由 Cutter Laborotories 之 E.Stice 從成猪之腎臟獲得之細胞株 (PK-2a) 所分離之 Clone，被稱爲 PK-15 株化細胞。該細胞於 1966 年由美國之 Nationcl Animal Disease Laborotory, Ames, Dr. E. C. Pirtte 分贈給日本農林省家畜衛生試驗場，於 1968 年 6 月筆者（林）由該場分讓携回，供爲 FACCT 法之用。其繼代方法係以 3 - 4 天培養之細胞，每週繼代 2 次，3 倍稀釋培養。

3. 猪瘟病毒檢出法

1) END 法：按照 Kumagai 等[3] 之原法實施，即猪瘟病毒之原液或稀釈之病毒液 0.1ml 分注於 4 或 8 支之小試管 (11mm×45mm) 後與上述之 ST 細胞液 0.5 ml 混合，經 37°C 4 天靜置培養後除去培養液再以 1 HA 價即約 $10^6$PFU/ml 之 NDV 液 0.5ml 接種。NDV 液即以 ST 細胞維持液稀釈後接種之。經 NDV 攻擊後於 37°C 繼續培養 3 天後鏡檢有無 CPE 而判定之。

猪瘟病毒之 END 現象如 Kumagai 等[3] 之報告所述，猪瘟病毒或 NDV 單獨時對 ST 細胞

並不呈顯 CPE，但對猪瘟病毒感染之 ST 細胞經 NDV 接種後即呈顯强烈之 CPE。因此，猪瘟病毒之檢出或定量必須以 NDV 攻擊後呈顯之 CPE 爲其指標始能實施。本研究之 END 法，部份之實驗係使用 2 日齡之 ST 單層細胞且其猪瘟病毒之培養日數爲 4、6及 8 天後方以 NDV 攻擊。又 END 二段法即將猪瘟病毒液先以 2 日齡之 ST 單層細胞培養 4～5 天，採集其培養病毒液混合後實施END 法檢出病毒。

2) 干涉法：對猪瘟弱毒 GPE⁻ 毒之檢出即應用干涉法[12]，其方法與 END 法同，但以 WEE 病毒之攻擊取代 END 法之 NDV。攻擊用 WEE 毒液係以 ST細胞測定其病毒價並使用100 $TCID_{50}$，攻擊 2 日後判定有無 CPE。干涉法爲清水等[12]所報告之猪瘟弱毒定量法，即猪瘟弱毒之變異已失去 END效果，而利用其干涉 WEE 毒（或 NDV）對 ST 細胞之感染，藉以測量其干涉能力而獲悉該病毒之力價，故判定時無呈 CPE 之試管方法爲猪瘟病毒陽性。本研究之部份實驗使用 2 日齡 ST 單層細胞，且猪瘟病毒之培養日數爲4、6及 8 天後攻擊，又干涉二段法亦如 END 法項所述，即將被檢之病毒液以 ST 細胞培養 4～5 天之培養液供爲干涉法試行檢出病毒。

3) 螢光抗體—組織培養法：簡稱 FACCT (Fluorescent Antibody—Cell Culture Technique) 法，依照 Mengeling 等[8,9]及筆者[4]之報告所述方法實施，簡述其操作方法如下：

a. Coverslip 單層細胞之培養：將培養 3～4 天之 PK-15 細胞除去培養液後，經以 TV 液 (0.1%Trypsin 及 0.01% EDTA 等量液) 剝離再以 PK-15 細胞增殖培養液 (Earle 液含有 GS 10%， 1.4% $NaHCO_3$ 液 5 %，抗生素液 0.5～1 %) 稀釋爲原量之$\frac{1}{3}$量後將其 2ml 培養於直徑 3cm 小燒皿內之蓋玻片 (18mm×18mm)，徑 16～20小時培養，該玻璃片即形成全面單層細胞。

b. 病毒接種：將上述單層細胞之培養液除去後，接種病毒液，每個小燒皿接種 0.5ml，於 37°C 孵卵器內感作 2 小時後除去病毒液，以 PBS 洗滌 3 次後，再加入培養液 2ml 並於 37°C 繼續培養48小時後染色。通常各稀釋病毒液接種 Coverslip 2 個。

c. 染色法：將蓋玻片取出，以猪瘟標示抗體 (FAb) 液依下列順序染色之。取出蓋玻片→0.01M PH 7.2 PBS 洗滌（換液4.5次）→吹乾→以無水丙酮室溫固定10分→吹乾→滴下猪瘟 FAb →37°C（密封）1 小時使其反應染色→PBS 洗滌（換液4、5次）→50% 甘油—PBS 液封入。

d. 鏡檢：使用 Nikon 牌螢光顯微鏡以 UV 勵起或 BV 勵起鏡檢，如 PK-15 細胞有特異螢光即兎化毒爲陽性。

4) 猪接種試驗：使用本所生產之 8 週齡 SPF 小猪，以子宮切除法且不餵初奶之初代或自然分娩及哺乳育成之第 2 代 SPF 小猪。經病毒液肌肉內接種 14 天後再以 ALD 感染血清100 倍 1 ml (10,000 MLD以上) 接種攻擊，即耐過生存者，爲猪瘟病毒陽性；反之，猪瘟發病斃死者爲陰性。

## 試 驗 成 績

1. 以 END 法試行兎化猪瘟毒之檢出

1) 兎化猪瘟毒培養日數之研討

將兎化毒接種感染兎脾50倍乳劑（於試驗材料項所述預先準備之10倍乳劑上清液再稀釋爲 5 倍）與 ST 細胞同時接種或接種於 2 日齡 ST 單層細胞經 4 天或 6 、8 天後以 NDV 1 HA 價接種攻擊，3 天後鏡檢有無 CPE。由於培養日數之延長而不致影響 ST 細胞之發育，故每 3 或 4 天換新培養液一次。

經屢次實驗所得果如表 1。兎化毒組無論依照 Kumagai 之原法培養日數爲 4 天或延長爲 6 ，8 天後方以 NDV 攻擊，全例與對照之 ST 細胞或 GPE⁻ 組者相同，並未呈顯CPE。反之，ALD組則全例呈顯强烈之CPE。至於兎化毒組於 NDV 攻擊前之該 ST 細胞培養液均以 FACCT 法檢出特異螢光抗元即兎化毒陽性。由試驗結果確認兎化毒未能以 END 法檢出。

表1　END法之病毒培養日數與兎化毒之檢出

| 毒株 | 接種量 | 病毒接種至 NDV 攻擊日數 4天 | 6天 | 8天 |
|---|---|---|---|---|
| 兎化株 | LPC毒感染兎脾50倍乳劑0.1ml | (±)※ | (±) | (±) |
| ALD株 | 感染血清100×0.1ml | ± | ± | ± |
| GPE⁻株 | GPK培養 Virus液$10^{2.5}TCID_{50}$ 0.1ml | − | − | − |
| ST細胞對照（接種 NDV） | 未接種豬瘟 Virus | − | − | − |
| ST細胞對照（未攻擊NDV） | 未接種豬瘟 Virul | − | − | − |

註：（1）＋、－記號示 CPE 陽性或陰性。
（2）※即之（±）記號示 NDV 攻擊前之該培養液以 FACCT 證明兎化毒陽性，且其$10^{-4}$或$10^{-5}$稀釋病毒液亦能檢出螢光抗元。
（3）兎化毒無論與 ST 細胞同時或接種於2日齡 ST 單層細胞均得同樣之試驗結果。
（4）培養日數8天者，屢次覆試時，偶有呈應CPE，但因其對照ST細胞亦同，故該成績未包括於本表內

2）NDV 攻擊接種量之研討

本研究目的係將含有 HA 價不同之 NDV 接種攻擊試以 END 法檢出兎化毒，并觀察其NDV之增殖情形。將 NDV 接種量分爲1、2、4及8 HA 價等4組。猪瘟病毒與 ST 細胞同時接種，經4至8天後，每天或每隔2天每組抽出 ST 培養4支（細胞發育正常者）分別以上述 NDV 液接種攻擊，3天後鏡檢有無 CPE，并將其培養液抽出分別混合供爲測定 NDV 之 HA 價，結果如表2。由試驗成績得知，GPE⁻ 組之對 NDV 增殖干涉甚爲顯着，全例不但未呈顯 CPE 且 NDV-HA 價亦未有增高。兎化毒組之 NDV—HA 價遠較對照 ALD 毒組爲低，且與未接種猪瘟毒之 ST 對照組略同，其 NDV 接種量及 ST 細胞日齡愈高，其 NDV-HA 價亦隨着慢慢地昇高。至 CPE 出現情形與 HA 價有密切之關係。NDV 接種量爲 8 HA 價者，於第4天時無論兎化毒組或 ST 對照組均呈輕度 CPE，且本次試驗之第8天組攻擊者，該二組亦均呈顯輕度 CPE且其 HA價亦昇高。但 GPE⁻ 組毫未呈 CPE 且未增高其 HA 價。

表2　END法與兎化毒之檢出—病毒培養日數及NDV接種量之研討

| 培養日數 | 兎化毒組 ※8 | 4 | 2 | 1 | ALD毒組 8 | 4 | 2 | 1 | GPE⁻毒組 8 | 4 | 2 | 1 | ST細胞對照組（未接種猪瘟病毒） 8 | 4 | 2 | 1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4天 | ＋ 2 | ± 1 | − 1 | − 0 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | − 1 | − 1 | − 0 | − 0 | − 4 | ± 2 | − 1 | − 0 |
| 5天 | ＋＋ 8 | ＋ 4 | − 2 | − 2 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | | | | | ＋＋ 8 | ＋ 4 | ± 2 | − 1 |
| 6天 | ＋＋ 16 | ＋＋ 8 | ± 8 | − 4 | ＃＃ 32 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | ＃＃ 16 | − 2 | − 1 | − 0 | − 0 | ＋＋ 16 | ＋ 8 | ± 8 | − 4 |
| 7天 | ＋＋ 32 | ＋ 8 | ± 8 | − 4 | ＃＃ 64 | ＃＃ 64 | ＃＃ 64 | ＃＃ 32 | | | | | ＋＋ 16 | ＋ 8 | ＋ 8 | − 4 |
| 8天 | ＃＃ 32 | ＃＃ 16 | ＋＋ 16 | ＋ 8 | ＃＃ 32 | ＃＃ 32 | ＃＃ 32 | ＃＃ 16 | − 2 | − 1 | − 0 | − 0 | ＃＃ 8 | ＋＋ 8 | ＋ 8 | ＋ 4 |

註：（1）※即數字示 NDV 攻擊接種之 HA 單位。
（2）＃：呈完全 CPE。
＋＋及＋：部分細胞呈 CPE。
±：部分細胞與正常者稍有不同，但細胞層尚維持良好狀態。
－：與未接種任何病毒之對照 ST 細胞完全相同。

由本次試驗成績得知 ALD毒可增强 NDV之增殖，反之 CPE⁻毒對其增殖之干涉甚爲顯着，而 LPC毒與未接種任何猪瘟病毒之對照ST細胞同樣，似無增强或干涉作用，此點今後尙待進一步之究明。

2. 以干涉法試行兎化毒之檢出

操作方法與上述 END 法相同，攻擊之 WEE 毒接種量約 100 $TCID_{50}$，在使用直前以 ST 細胞維持培養液稀釋之，WEE 毒接種後 2天判定是否呈 CPE。WEE 毒於每次試驗同時測定其所使用病毒液之力價。

由屢次試驗得知，兎化毒未能以干涉法檢出，亦培養日數之增加至6或8天，亦與未接種猪瘟毒之 ST 細胞對照組相同呈顯 CPE 即猪瘟病毒爲陰性。（ALD 組亦同呈 CPE。）對照之 GPE⁻組，均呈顯着干涉現象即無CPE。

表 3　干涉法之病毒培養日數與兎化毒之檢出

| 毒株 | 接種量 | 猪瘟病毒與 ST 細胞同時接種 ※4天 | 6天 | 8天 | 使用 2 日齡 ST 單層細胞 7 天 |
|---|---|---|---|---|---|
| 兎化株 | LPC 毒感染兎脾50倍乳劑 0.1ml | + | + | + | + |
| GPE⁻株 | $10^{2.5}$ $TCID_{50}$ | − | − | − | − |
| ALD 株 | 感染血清 100×0.1ml | + | + | + | + |
| ST 細胞對照（接種 WEE 毒） | | + | + | + | + |
| ST 細胞對照（未接種WEE毒） | | − | − | − | − |
| 攻擊之 WEE 毒價 | 第一次試驗 | 0.75 | 1.25 | 0.5 | 0.75 |
| (log10 $TCID_{50}$/ml) | 第二次試驗 | 3.25 | 2.75 | 2.75 | 3.0 |

註：（1）+、−記號示 CPE 陽性或陰性。
（2）※印數字示猪瘟病毒接種後至 WEE 毒攻擊之日數。

3. 以 END 二段法或干涉二段法試行兎化猪瘟毒之檢出

將兎化毒感染兎脾乳劑接種於 2 日齡 ST 單層細胞，累代通過 1 至 5 代，并就其第 1、3 及 5 代之培養病毒液之原液再以 END 法，干涉法或 FACCT 法等試行檢出其抗元，結果如表 4。前兩方法均未能檢出病毒，而後者之 FACCT 法全例檢出其螢光抗元。

表 4　兎化毒於ST細胞通過培養後試以END法、干涉法及FACCT法檢出

| 培養代數 | 培養日數 | END 法（CPE） | 干涉法（CPE） | FACCT 法（螢光抗元） |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 | − | + | + |
| | 7 | − | + | + |
| 3 | 5 | − | + | + |
| | 7 | − | + | + |
| 5 | 4 | − | + | + |
| | 5 | − | + | + |
| | 6 | − | + | + |
| | 7 | − | + | + |

註：FACCT法係病毒接種48小時染色鏡檢螢光抗元散在全面細胞。

4. Homo 毒干涉與兎化毒之檢出

1）猪瘟病毒對其 Homo 毒之增殖呈干涉現象，操行方法與上述 END 法及干涉法略同，即使用2日齡 ST 單層細胞接種兎化毒，使其完全感染後（接種後5天以上）再接種其 Homo毒—CPE⁻毒時，第二次接種之該 GPE⁻ 毒未能以 WEE 毒攻擊之干涉法檢出。故利用第二次Virus 之存在與否以探知被檢 Virus 是否陽性或陰性。試驗詳細成績如表5，兎化毒組之3天培養者 CPE 爲陰性，4天培養者於3次之實驗中2次爲陰性，另一次爲陽性（4天以下者呈陰性似因兎化毒之增殖尚未達到所需之程度尚待究明），5天培養者，每次實驗均呈陽性，即很可能因 GPE⁻ 毒對 WEE 毒未呈現干涉現象致其 CPE 陽性，此點似因受兎化毒之干涉致 CPE⁻ 毒未有增殖。至未接種兎化毒或其猪瘟病毒之對照組亦與兎化毒組同，全例 CPE 爲陽性，GPE⁻ 毒及 ALD 毒亦與兎化毒同對其 Homo 病毒亦呈同樣之干涉現象。

表5　猪瘟病毒對其 Homo 毒之增殖干涉作用

| 被檢猪瘟病毒 | 第二次接種猪瘟病毒 | 攻擊毒 | 猪瘟病毒接種（2次）之間隔日數※ 3 × 3 | 4 × 4 | 5 × 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| 兎化毒 | GPE⁻ 毒 | WEE 毒 | − | − 或 + | + |
| GPE⁻ 毒 | 兎化毒 | 〃 | − | − | − |
| GPE⁻ 毒 | ALD 毒 | 〃 | − | − | − |
| ALD 毒 | GPE⁻ 毒 | 〃 | + | + | + |
| 兎化毒 | 無 | 〃 | + | + | + |
| 無 | 兎化毒 | 〃 | + | + | + |
| GPE⁻ 毒 | 無 | 〃 | − | − | − |
| 無 | GPE⁻ 毒 | 〃 | − | − | − |
| ALD 毒 | 無 | 〃 | + | + | + |
| 無 | ALD 毒 | 〃 | + | + | + |
| 無 | 無 | 〃 | + | + | + |

註：（1）「無」示僅換新培養液。

（2）＋、－記號示 CPE 陽性或陰性。

（3）例如 5×4，即5示被檢猪瘟毒之接種日數（至第二次猪瘟毒接種），4 示第二次接種猪瘟病毒之接種日數（至攻擊毒接種）。

（4）攻擊所用之 WEE 毒每次同時測定其 Virus Titer $10^{1.5}$～$10^{2.5}$ $TCID_{50}$/ml。

（5）未接種任何病毒之 ST 對照未呈 CPE。

由上述成績得知兎化毒可應用其對 Homo毒—GPE⁻ 毒之增殖干涉現象而檢出或測定其抗元，此法暫稱爲 Homo 毒干涉法。（各組爲維持其 ST 細胞起見，每3天或4天換新培養液一次）。

2）第二次 Virus 之 GPE⁻ 毒及攻擊用 WEE 毒接種量之研討

本試驗係就第二次接種之 Homo 毒—GPE⁻ 毒及攻擊用之 WEE毒等之接種量詳細加以研討。使用2日齡 ST 單層細胞將兎化毒接種5天後（於第 3 天換新培養液），再接種濃度不同之 GPE⁻毒，4天後以 WEE 毒攻擊，攻擊後2天判定其成績，詳如表6。GPE⁻ 毒及 WEE 毒之接種量間似無影響。

表 6　第二次 Virus—GPE⁻ 毒及攻擊用 WEE 毒接種量之研討

| 第二次 Virus GPE⁻ | 兎化毒接種組 | | ST 細胞對照組 | |
|---|---|---|---|---|
| 接種量 ($TCID_{50}$) | WEE 毒 500 u | WEE 毒 100 u | WEE 毒 500 u | WEE 毒 100 u |
| 1,000 | + | + | − | − |
| 100 | + | + | − | − |
| 50 | + | + | − | − |
| 10 | + | + | − | − |

註：（1）供攻擊用之 WEE 毒液 100u 組者同時測定其病毒價爲 $10^{7.75}$ $TCID_{50}$。
（2）＋、－記號示 CPE 陽性或陰性。

5. FACCT 二段法之兎化毒檢出

將兎化毒感染兎之脾乳劑接種於 16—20 小時培養之 Coverslip PK-15 單層細胞48小時後（感作時間 2 小時），以猪瘟標示抗體染色，鏡檢可檢出特異之螢光抗元，其形狀與 ALD 强毒所形成者相似，即形成 "Plaque" 甚易鑑別，惟其大多數 Plaque 之大小較同一培養時間之 ALD 螢光 Plaque 爲小（照片參照），至該 Plaque 計數隨其病毒之稀釋度而呈平行增減，特異螢光抗元未見於核內而僅出現於細胞質內。

說明：
兎化毒培養於 PK—15 單層細胞 48 小時後之特異螢光抗元 "Plaque"（400 ×）。

將兎化毒之感染兎之脾乳劑以 Earle 液（加 GS 5%）10 倍稀釋後，將各稀釋病毒液 0.1ml，培養於 2 日齡 ST 單層細胞（各稀釋度 4 支）4—5 天後採取其培養液混合再行接種於 PK-15 單層細胞以 FACCT 法檢出其抗元結果此二段法較上述之直接法（即未先以 ST 單層細胞培養）者其檢出率爲優。經復試結果（病毒各稀釋使用 Coverslip PK-15 單層細胞 2 個，其 1 個以上檢出特異螢光抗元時即兎化毒爲陽性）詳如表 7。此法可應用於兎化毒之檢出及定量實值得吾人研討，並暫稱其爲螢光抗體一組織培養二段法或簡稱 FACCT 二段法。

表 7　FACCT 二段法之兎化毒檢出

| 兎化毒稀釋倍數 | $10^{0}$ | $10^{-1}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FACCT 直接法 | + | + | + | − | − | − |
| FACCT 二段法 | + | + | + | + | + | − |

註：＋，－記號示特異螢光抗元陽性或陰性。本試驗所使用兎化毒係感染脾乳劑。

6. FACCT 二段法及猪接種試驗對兎化毒力價測定之比較

如上述方法將兎化毒之感染兎之脾乳劑以10倍稀釋法稀釋後分別接種於 SPF 小猪，各稀釋度病毒液使用1隻，1 ml 肌肉注射，同時就該各稀釋度病毒液以 FACCT 二段法行病毒檢出。SPF 小猪接種 14天後再以 ALD 感染血清100×1 ml 皮下注射攻擊，再繼續觀察14天結果經稀釋 $10^{-4}$及$10^{-5}$病毒液接種之2隻均無呈反應而耐過，但稀釋度$10^{-6}$之1隻呈猪瘟發病且於第 13天斃死。至 FACCT 法者 $10^{-1}$～$10^{-5}$各稀釋度病毒均檢出猪瘟螢光抗元，$10^{-6}$者爲陰性，即與猪接種試驗所得之成績相同。詳如表8。

表 8 FACCT 二段法及猪接種試驗對兎化毒力價測定之比較

| 兎化毒稀釋倍數 | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | 感染價 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FACCT 二段法 | ＋ | ＋ | ＋ | ＋ | ＋ | － | $10^5$ $TCID_{50}$ |
| 猪接種試驗 | | | | ＋ | ＋ | － | $10^5$ PID |

註：＋、－記號示兎化毒之檢出陽性或陰性。

## 討　論

猪瘟病毒可於許多組織培養細胞增殖感染 [3,4,13]，但毫不呈顯細胞變性，致無法在試管內檢出。Kumagai 等 [2,3] 經多年之研究，發現猪瘟病毒於其感染之 ST 培養細胞，可以增强 NDV 之增殖而創立 END 法，致能於試管內行猪瘟病毒之檢出及定量，對猪瘟及其疫苗之研究貢獻至鉅。

惟該 END 法對有些猪瘟弱毒株未能應用。Nishimura 等 [10] 報告其利用猪腎細胞之 HEIC 法 (Hemagglutination Exaltation & Inhibition of Cytopathogenic Effect) 亦可檢出及測定强毒猪瘟病毒，但對有些弱毒株亦尚難應用。組織培養由來之猪瘟弱毒中，天竺鼠腎細胞馴化之 $GPE^-$株可應用清水等報告之干涉法 [12]，猪腎細胞培養之 LOM 株可以 Sato 等之 INC 法 [11] 檢出及測定其抗元。

至兎化猪瘟毒尚無適當之試管內法可資應用。Matumoto 等 [7] 及Loan 等 [6]曾報告兎化毒無法應用 END 法檢出。Bool 等[1]亦報告 ETV 法 (Exaltation of Teschen Virus) 可檢檢出及定量强毒猪瘟病毒且其檢出率與 END 法完全一致，但該法對於兎化毒亦未能應用。筆者（林）過去於兎化猪瘟疫苗研製進行中，亦曾屢次以 END 法試行兎化毒之檢出，但均未獲成功（未發表）。

本省十餘年來應用於全面猪瘟預防注射之兎化毒（LPC 株），迄已累代通過本省產家兎達800餘代，其接種家兎隻數之95%以上呈現顯着之熱型。筆者等這一年來再以 END 法及干涉法（WEE 毒攻擊）屢次試行該毒之檢出，甚至設法延長其培養日數或將其先通過 ST 細胞或猪腎，兎腎及 PK-15株化細胞（後三種細胞之成績未包括於本報告內，續試中）等後再就其培養病毒液試以 END 法及干涉法檢出，但均爲陰性而再度確認兎化毒（LPC 株）無法應用 END 法及干涉法或其二段法檢出病毒。惟 ST 細胞之兎化毒培養病毒液以本次完成之 FACCT 二段法試行檢出均爲兎化毒陽性。

猪瘟病毒於 in vivo 可干涉其 Homo 毒之感染增殖，此點由於活毒疫苗注射第3天後即發生抵抗猪瘟强毒之接種攻擊，且該疫苗接種猪亦能於第3天由其扁桃腺檢出抗元，經活毒疫苗接種猪隻在未經產生抗體前可發生效力之事實，可以解說乃因 Viral Interfernce（病毒干涉現象）所致 [5]。因此，猪瘟病毒於 in vitro 即在其感染之培養細胞上，對其 Homo 毒之再次接種亦應同樣干涉其增殖。筆者使用數種之强毒及弱毒猪瘟病毒株經覆試得知，無論强毒或弱毒均呈顯互相之增殖干涉現象。故僅測知第二次接種之 Homo 毒是否存在？即可確定被檢病毒（第一次接種）之陽性或陰性。此種方法暫稱爲 Homo 毒干涉法 (Growth Interfernce of the Homo Virus；或 Homo Virus

Interference Method）。由於兎化毒及 GPE⁻ 毒對 WEE 毒干涉情形相反，即前者毫無干涉而後者對其干涉作用甚強，故如第二次接種之 GPE⁻ 毒未能以 WEE 毒檢出時則示兎化毒陽性，否則即爲陰性矣，又利用 Homo 毒干涉法似可定量其病毒價，但其操作標準尚待今後復試予以改進訂立。

兎化猪瘟毒可應用 FACCT 法檢出其特異螢光抗元，惟如直接接種於 PK-15 單層細胞時，經高度稀釋之陽性病毒液則常常未能檢出抗元。本研究之成績因各稀釋液僅使用 2 個 Coverslip 之 PK-15 單層細胞，或許將影響其檢出率之或然。但將其同一稀釋液通過 ST 細胞培養時，其高度稀釋之陽性病毒液亦可以 FACCT 法檢出抗元，且與猪之接種試驗成績同。後者可利用於兎化毒之定量且甚爲方便而可行。此方法暫稱爲 "螢光抗體—組織培養二段法" 簡稱 " FACCT 二段法" (Two-step FACCT)。惟上述二種新方法即〖Homo 毒干涉法〗及〖FACCT 二段法〗對兎化毒之檢出及定量上，前者由於 ST 細胞之培養日數，因需較長時間致維持細胞之正常發育不易，其方法需再進一步之研究改進，後者不但敏感性高且特異性亦高，加之其實施時間較短，僅需6～7天（自病毒接種至判定結果）故極有應用之價值。

至此二種方法最佳之操作標準尚待今後之繼續研究訂立，俟其實施操作標準確定後，將即應用其於兎化猪瘟疫苗之檢定改進，例如該兎化毒之同定及其每劑量之 Virus 含有量之測定等已能獲得解決，且兎化猪瘟毒之免疫機序究明，其於猪隻體內之感染分布情形，甚至於該疫苗之應用上遇有發生問題亦必能查明其眞相矣。

## 結　　論

1. 兎化猪瘟毒（指 LPC 株）未能以 Kumagai 等報告之 END 法檢出。試將該毒培養日數延長至第6及8天方以 NDV 接種攻擊或先通過 ST 細胞 1、3 及 5 代之培養病毒液亦未能以 END 法檢出其抗元。

至於以 WEE 毒攻擊之干涉法，與上述同一試驗方法實施結果亦均未能檢出其病毒。

2. 兎化毒感染之 ST 單層細胞，經以 NDV 接種攻擊時，其 NDV—HA 價遠較 ALD 毒者爲低，即與對照之未接種猪瘟病毒 ST 細胞者略同，且 NDV 接種量及 ST 細胞培養日數愈高，其 HA 價隨着昇高；反之，GPE⁻ 毒接種感染者對 NDV 增殖之干涉作用顯着而毫無呈現 CPE，亦無增高其 HA 價，且該 ST 單層細胞之發育情形反而較未接種猪瘟病毒之 ST 細胞（僅於攻擊時接種 NDV 之對照組）者爲佳。

3. 猪瘟病毒對其 Homo 毒於 ST 細胞之增殖呈干涉現象。將兎化猪瘟毒感染 ST 細胞後約5天再接種其 Homo 毒—GPE⁻ 毒，經 4 天後以 WEE 毒攻擊之干涉法未能檢出 GPE⁻ 毒（ST 細胞呈顯 CPE)。即 GPE⁻ 毒於兎化毒感染之 ST 細胞似受該兎化毒之干涉致未能增殖感染，兎化毒可利用其對 Homo 毒之增殖干涉現象於試管內檢出。此法暫稱爲 "Homo 毒干涉法 (Homo Virus Interference Method)" 至其操作標準尚待覆試後訂立。

4. 兎化毒可應用 FACCT 法（使用 PK-15 株化細胞）檢出。其螢光抗元之形狀與 ALD 毒者相似即於 PK-15 單層細胞上形成 "Plaque"。但該 Plaque 通常較 ALD 毒之同一方法及時間培養之 Plaque 爲小。其特異螢光抗元僅出現於細胞質內。

5. 將兎化毒先培養於 ST 細胞增殖後（4～5天）再就其培養液應用 FACCT 行病毒檢出時其敏感度較其直接法（未將兎化毒先通過 ST 細胞）者爲高，且與猪感染價同高。此法可應用於兎化猪瘟毒之檢出及定量，並暫稱爲 "螢光抗體—組織培養二段法" 或簡稱 "FACCT 二段法 (Two-step FACCT method)"。

上述 "Homo 毒干涉法" 及 "FACCT 二段法" 俟其操作標準訂立後即可應用於兎化猪瘟疫苗之 Virus 同定及其 Virus 含有量測定等對該疫苗之檢定法改進甚有價值且可節省鉅額之檢定費用

並可提高該兎化疫苗之製造及應用。

## 誌　　謝

本研究之完成得國家科學委員會之經費補助，並蒙農復會李秘書長崇道博士及本所陳所長守仕之殷切指導與鼓勵，復得本所猪瘟研究股同仁之協助，謹誌謝忱。

## 參　考　文　獻


1. Bool,P.H.and Ressang,A.A. : Swine fever diagnosis. 1. Techiques based on the 'exal-tation' of Teschen and Newcastle disease virus. Tijdschr. Diergeneek. 91, 1133—1147 (1966) .
2. Kumagai,T.,Shimizu,T. and Matumoto,M. : Detection of hog cholera virus by its effect on Newcastle disease virus in swine tissue culture. Science, 128, 366 (1958) .
3. Kumagai,T., Shimizu, T., Ikeda,S. and Matumoto,M. : A new in vitro method (END ) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. 1. Establishment of standard procedure. J. Immunol. 87, 245—256 (1961) .
4. 林再春：螢光抗體—組織培養法對於猪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第五期，1～22 (1968) 。
5. 林再春：應用螢光抗體法測定猪瘟病毒感染增殖之研究。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告第五期，23—34， (1968) 。
6. Loan,R. W. : Increased sensitivity of END (Exaltation of Newcastle disease virus) test for hog cholera virus. Amc. J. Vet. Res. 26, 1110—1113 (1965) .
7. Matumoto, M., Kumagai, T., Shimizu, T. and Ikeda, S. : A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. 2. Some characteristics of END method. J. Immunol. 87, 257—268 (1961) .
8. 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. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 246—252 (1963) .
9. Mengeling, W. L. : Field evaluation of the fluorescent antibody tissue culture test for diagnosis of hog cholera. Proc. Book, 10lst Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass. 274—275 (1964) .
10. Nishimura, Y., Sato, U., Hanaki, T. and Nobuto, K. : Studies on the tissue culture of hog cholera virus. II. Neutralization test by means of the influence of hog cholera virus infection on Newcastle disease virus infection (HEIC method) . Jap. J. Vet. Sci., 26, 133 (1964) .
11. Sato,U.,Hanaki, T. and Nobuto, H. : Attenuation of the hog cholera virus by continous cell—virus prepagation. III. Growth interference of Newcastle disease virus by attenuated hog cholera virus titration and the neutalization test. Arch. ges. Virusforsch. 26, 1—10 (1969) .

12. 清水悠紀臣，古内進，林重美，熊谷哲夫，笹原二郎：豚コレラウイルス END 效果における變異。ウイルス，15，287～288 (1965) 。
13. Soekawa, M. and Izawa, H. : Propagation of hog cholera virus on monolayer cell cult-ures. Japan Kitasato Arch Exp. Med., 33, 25—35 (1960) .
14. Solorzano, R. F. : An in vitro test for hog cholera. Ph. D. Thesis. Pennsylvania State University, University Park (1962) .

# Detection and Titration of Lapinized Hog Cholera Virus by means of Tissue Culture Technique

T. C. Lin　　S. S. Lai

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

## ENGLISH SUMMARY

Hog cholera (HC) virulent virus such as ALD strain and field isolates can be detected in vitro by the END test which was firstly reported by Kumagai et al. Some tissue culture-attenuated HC virus which shows the END negative, such as GPE⁻ strain can be demostrated by the interference (IF) test (Shimizu et al.), and LOM strain by the INC test (Sato et al.).

However, there is still no in vitro test for the lapinized HC virus (LPC strain) which has been widely applied for HC control in Taiwan for more than 15 years. Therefore, the studies on the lapinized vaccine and its assay have depended only on the pig inocultation tests that wasted much money and time for its performance.

With the intention of devloping an in vitro method for the detection and titration of lapinized HC virus, the present study has been performed. The results are summarized as follows :

1. Lapinized HC virus could not be detected by the END test. Although the virus was treated by prolonging the cultured period (challenged with Newcastle disease virus (NDV) on the 6th or 8th day) or previously passing through swine testicle (ST) cell cultures, the 1st, 3rd and 5th passage virus showed negative results in the END test. The IF test challenged with Western equne encephalomyelitis (WEE) virus, performed with the procedures mentioned above also showed the IF phenomenon negative. That means the lapinized HC virus could not be detected by the IF test.
2. After the challenge of NDV, the NDV—HA titers in ST cell previously infected with the lapinised HC virus were much lower than that in ALD virulent virus infected group, and the same as that of the cell control group without HC virus treatment. The NDV-HA titers of the two groups i.e. the lapinized virus group and the cell control group increased when the amount of NDV inoculation and the age of ST cell cultures enlarged, On the contrary, the GPE⁻ HC virus group showed a marked growth interference of NDV, on which no END-CPE and increased NDV—HA titer were found, furthermore, the monolayer cultures appeared much better compared with the cell control group.

3. It was found that the growth interference phenomenons occurred among HC virus and its homologous virus on ST cell cultures. The GPE⁻ HC virus that was Cultured in the lapinized HC virus infected ST cell could not be detected by the IF test challenged with WEE virus, that is GPE⁻ HC virus was interfered by the lapinized HC virus and could not grow in the lapinized HC virus infected ST cell. The growth interference phenomenon of its homologus virus by HC virus could be applied for the detection and titration of lapinized HC virus. This was provisionally called, "Homo Virus Interference Method." The further studies for the establishment of the standerd procedure of this new method is still underway.
4. Lapinized HC virus could be detected by means of the fluorescent antibody-cell culture test (FACCT) , and formed so-called "plaque" on the PK-15 monolayer culture just like ALD virulent virus did, but the plaque from lapinized virus was much smaller than that from ALD virulent virus of the same hours' culture. The fluorescence of lapinized HC virus was observed only in the cytoplasm of infected PK-15 cell but not in the nucleus.
5. It was much more sensitive in detecting the lapinized HC virus by the FACCT when the virus was previously cultured in ST cells for 4 to 5 days than directly inoculated the virus on the PK-15 monolayer, and its virus titer was the same as that of pig inoculation test. This method was provisionally called,"Two-step FACCT".

Both methods of "Homo Virus Interference" and "Two-step FACCT" metioned above are worthy to be applied for the virus identification and titration in the assay of the lapinized HC vaccine. And these methods can save much expenses and enhance the production and application of the lapinized HC vaccine.