

# 乾燥猪瘟 GP 組織培養疫苗之保存性 及免疫持續試驗

謝竹茂 林再春 蘇杰夫 鄭建盛

(臺灣省家畜衛生試驗所)

## 緒 言

關於猪瘟 GP 組織培養疫苗之研製，於 58 年 4 月聘請日本農林省家畜衛生試驗場清水博士來臺指導，依 Seed-Lot-System 製成大批種毒後由其試製乾燥 GP 疫苗 2 批，其安全性及免疫效力均優，已於前期報告，並續行其保存性及免疫持續性試驗，茲將迄至 59 年底所得成績報告於後，敬請賜予指正。

## 試驗材料及方法

1. 供試疫苗：本所試製 Lot I 及 II 之乾燥 GP 疫苗。其乾燥直後之 Virus 力價為  $10^{2.5}$  及  $10^{2.25}$ 。
2. 供試小豬：本所生產之 6~9 週齡 SPE 小豬及臺糖公司生產之小豬，體重 20 公斤左右，前者猪瘟中和抗體陰性，後者 0~64 倍。
3. 攻擊毒株：強毒 ALD 株之感染猪毒血係供為本所猪瘟研究及疫苗檢定用，其 Virus 價為  $10^{7.0}$  PID<sub>50</sub>/ml。
4. 猪單丸 (ST) 細胞：由瑞芳建基農場採取之 4~6 週齡未經預防注射三品種小豬單丸，ST 細胞調製法依照前報所述，係供為干涉法或 END 中和試驗等用。
5. Virus 力價及中和抗體測定法：應用干涉法<sup>2)</sup> 及 END 中和試驗<sup>1,11)</sup> 均係使用山羊血清 (GS)，經 56°C 30 分非礪化後分裝凍結保存於 -20°C 供用。至試管內法之操作程序詳如前報所述。

## 試 驗 成 績

### 1. 乾燥 GP 疫苗之保存性

#### A) Virus 力價之 in Vitro 檢定。

上述試製 Lot I 及 II 疫苗分別保存於 5°C 冷室內，每月任意抽出 3 瓶以稀釋液 [NaCl 局方特級 8.0g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O (JIS 特級) 0.45g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O (JIS 特級) 1.25g, 溶解於蒸溜水 1000ml, 加 1% phenol red (JIS 特級) 溶液 1ml]，溶後混合，取出其 0.1ml 接種於 ST 細胞 0.4ml，以干涉法測定其 Virus 力價所得成績如表 I。

表 I 試製乾燥 GP 疫苗於冷室之保存性—以干涉法測定之 Virus 力價

疫 苗 No:	乾燥前	乾燥直後	保 存 期 間									
			1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月
Lot I	3.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.75	1.75	1.75	1.5	1.5	1.25
Lot II	2.75	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	1.5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.0

註：數字示 Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml 冷凍乾燥後均下降 0.5。

( 14 )

由表 I 成績得知該兩批疫苗之保存性無甚大差異，保存於 5°C 冷室內經 4 個月後仍保持其乾燥製成直後之 Virus 力價，至保存 12 個月後均較其乾燥直後之 Virus 價下降 1.25。

B) 猪接種試驗

該 2 批疫苗於冷室保存 3、6、9 及 14 個月後任意抽出疫苗 3 瓶加稀釋液混合將其 1 劑量 (即 1 ml) 接種於 SPF 小豬經觀察 10 天後，再以 ALD 毒血 ( $\times 100$ ) 1ml 接種攻擊測定其免疫效力結果如表 II。

表 II 試製乾燥 GP 疫苗於冷室之保存性—以猪接種試驗檢定

疫苗 No:	保 存 期		間	
	3 個 月	6 個 月	9 個 月	12 個 月
Lot I	○○○○	○○	○○	○○○○
Lot II	○○○○	○○	○⊙	○○○○
毒血對照猪	● <sub>3</sub>	● <sub>10</sub>	● <sub>10</sub>	● <sub>9</sub>

註：○示 ALD 攻擊後無反應耐過。

○⊙示輕度反應耐過。

●<sub>s</sub>示猪瘟發病斃死，數字表示斃死日數。

本試驗之疫苗接種猪隻均未見任何不良之接種反應，且經以 ALD 毒血接種攻擊後亦僅輕度反應或無反應耐過。保存 3、6、9 及 12 個月後疫苗之免疫效力無明顯之差異，均能保持其安定之免疫性而得 100% 之耐過率。

2. 接種猪之中和抗體持續試驗

使用 SPF 小豬 (3 隻) 之接種乾燥 GP 疫苗免疫持續性試驗成績已於前報報告，其 7 個月後之中和抗體價尚保持  $\times 1024$  之高，且對於 ALD 毒血 100 倍 1ml 之接種攻擊均無呈反應而耐過健存。本試驗即針對含有移行抗體價之高低不同之小豬其 12 隻由亞糖公司購入於疫苗接種前測定其中和抗體價，詳如表 III，該些小豬經接種製試疫苗 Lot II 1 劑量後繼續詳細觀察均未呈任何不良反應，經 6、9 及 12 個月後各抽出 4 隻測定其抗體價，並以 ALD 毒血 100 倍 1ml 接種攻擊結果如表 III。

表 III 乾燥 GP 苗接種猪隻之抗體消長情形及攻擊成績

組 別	猪 號	疫苗接種前抗體價	ALD 毒攻擊前抗體價	攻 擊 結 果
6 個月	1	64	0	● <sub>10</sub>
	2	16	128	○
	3	16	128	○
	4	1	<64	○
毒血對照猪				● <sub>6</sub>

	5	16	1024	○
	6	4	128	○
9個月	7	8	128	○
	8	4	128	○
	毒血對照豬			● <sub>12</sub>
	9	16	4	○
	10	4	1	○
12個月	11	0	4	○
	12	8	32	○
	毒血對照豬			● <sub>8</sub>

註：○示 ALD 攻擊後無反應耐過。

●示豬瘟發病斃死，數字表示斃死日數。

由表Ⅲ成績得知接疫苗種前之中和抗體價×16以下者於疫苗接種後均能產生良好之免疫力且保持相當高之抗體價，可保持12個月以上。但疫苗接種前之抗體價64倍者，僅至6個月後，不但中和抗體價零，且未能耐過ALD毒之攻擊，而豬瘟發病於10天後斃死，其餘試驗豬均無呈反應耐過ALD毒之攻擊。

## 討 論

豬瘟 GP 組織培養疫苗係由笹原等研究成功，現於日本普遍應用<sup>8-10,12</sup>，本省自兔化豬瘟疫苗研製成功後十多年來普遍應用，獲得輝煌之成果<sup>2-5</sup>，惟仍對於組織培養疫苗之研究甚為重視，筆者（林）於57年6月由日本農林省家畜衛生試驗場分讓 GPE<sup>-</sup> 毒株，携返後並在清水博士之指導下試製 GP 疫苗2批，並曾報告該 GP 疫苗對本省產豬隻之安全性甚高，且免疫效力卓著，然本試驗係進一步研討其保存性及免疫持續性，以供將來製造應用上之依據。

筆者（林，等1969）曾報告<sup>7</sup>，接種小豬之移行抗體與活毒疫苗接種後免疫抗體產生之關係，即移行抗體價在×16以下時，經活毒疫苗接種後之抗體產生良好，但在×32以上時有不產抗體豬隻出現，由本試驗得知×16以下之 GP 疫苗接種豬隻，全例於接種6、9及12個月後尚能保持相當高之抗體價，且耐過於豬瘟強毒之攻擊，反之移行抗體價×64之豬（#1）經 GP 疫苗接種6個月後其抗體價零，且未能耐過於豬瘟毒之攻擊，筆者（林，等）亦曾報告<sup>7</sup>於豬瘟強毒攻擊直前之中和抗體價1倍或以上之豬隻可耐過其攻擊，本試驗中疫苗接種12個月後之#10豬，於攻毒前之抗體價雖僅呈×1，亦能無反應而耐過其攻毒，此些成績與前報所述，及與笹原等報告相吻合，同時由本試驗得知 GP 疫苗之免疫持續性甚長可維持一年以上。

## 結 論

依照日本現行製造之方法，試製乾燥豬瘟 GP 組織培養疫苗2批，其保存性及免疫性持續試驗成績如下：

1. 試製 Lot I 及 II 疫苗於冷室（5°C）保存後，每個月任意抽出測定其 Virus 力價，4個月後尚能保持其乾燥直後之 Virus 力價，至12個月後均僅下降  $10^{1.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml 尚能保持相當高之 Virus 力價。
2. 該兩批疫苗冷室保存後於3、6、9及12個月任意抽出疫苗接種於 SPF 小豬各2~4頭，

觀察10天後再以強毒 ALD 毒血  $\times 100$  1ml 攻擊結果全例無反應或輕度反應而耐過健存。

3. 試製 Lot II 疫苗接種於含有高低不同之移行抗體價，小豬 12 頭經繼續飼養至 6、9、12 個月後各抽出 4 頭測定其中和抗體價，並以 ALD 毒血  $\times 100$  1ml 攻擊結果，移行抗體價  $\times 64$  之小豬於 6 個月後其抗體價零，而未能耐過豬瘟強毒之攻擊，至移行抗體價  $\times 16$  以下之其餘小豬全例均能產生且保持良好之抗體價，對於豬瘟毒之接種攻擊均無呈反應而耐過健存。其免疫持續期間似可達一年以上。

## 誌 謝

本研究承蒙農復會研究經費補助及李秘書長崇道博士之策劃與指導，並余組長如桐及本所陳所長守仕之鼓勵與指導謹致衷心之謝忱。至乾燥 GP 疫苗之試製及本研究之初期曾承日本農林省家畜衛生試驗場清水博士之來台技術指導，謹此一併申致萬分之謝意。

## 參 考 文 獻

1. 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 hog cholera virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture, I Establishment of standard procedure. J. Immunol. 87, 245-256 (1961) .
2. Lee, Robert C.T. Preliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan Chinese-American Joint Commission on Rural Reconstruction Animal Industry Series no.5 (1954)
3. 林再春等：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 No. 2 (1958)。
4. 林再春等：兔化豬瘟病毒冷凍乾燥之研究第一報，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 1, 1—27 (1963)。
5. 林再春等：兔化豬瘟病毒冷凍乾燥之研究第二報，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 1, 1—28 (1963)。
6. 林再春等：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 1—10 (1969)。
7. 林再春等：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。(1969)。
8. Sasahara, J, & Kumagai T: Development, of tissue culture living hog cholera vaccine Jap. Agr. Res. Quart. 1, 24—26 (1966)
9. 笹原二郎：豚コレラ生ウイルス予防液，社團法人日本獸醫師會 (1968)。
10. Sasahara, J, Kumagai T. Shimizu, Y and Turuchi S: Field experiments of hog cholera living vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture Nat. Inst. Anim. Hlth Quart 9. 93—91 (1969)
11. Shimizu, T. Kumagai, 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. III END neutralization test Arch. Ges. Virusforsch. 14, 215—226 (1964)
12. 清水悠紀臣等：豚コレラウイルス END 効果における變異ウイルス 15 ; 287—288 (1965)。

# STUDIES ON THE PRESERVATION AND IMMUNITY DURATION OF FROZEN-DRIED HOG CHOLERA GP TISSUE CULTURE VACCINE

C. M. Shieh, T. C. Lin, J. F. Su, C. S. Cheng

## ENGLISH SUMMARY

Two lots of hog cholera G P tissue culture vaccine were experimentally manufactured according to Dr. Sasahara's formula with GPE<sup>-</sup> strain introduced from Japan. The post-vaccinal reactions and immunity efficiency of the two trial vaccines were carefully discussed in the previous report.

In the present report, the results of their preservation and duration of immunity tests are summarized as follows:

1. For preservation test, the vaccines (Trial lot 1 & 2) were kept in refrigerator at 5°C, and then viurs titration of the vaccines taken out at random and combined were conducted every month for one year by means of in vitro-interference method. As the results, the two trial vaccines could almost remain the original virus titers for 4 months and then only a little drop of  $10^{4.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml in virus titers after 12 months. The vaccine, therefore, could keep a considerably high viurs titers for one year long.
2. The vaccines preserved in refrigerator were subcutaneously inoculated to 2~4 SPF pigs with one dose each respectively after 3, 6, 9 and 12 months' preservation. All the experimental pigs showed no ill post-vaccinal reaction with 10 days' close observation and survived with only slight or no reaction from the challenge with one ml of ALD virulent blood (100x).
3. The Lot 2 vaccine was employed to vaccinate 12 pigs (6 weeks old) with various titers of colostral antibody, then challenged 4 pigs each with one ml of ALD virulent blood (x100) at 6th, 9th and 12th month after vaccination. All pigs with colostral antibody titers of x16 or lower were survived from the virus challenge even as long as for 12 months after vaccination, while the experimental pig with colostral antibody titer of x64 acquired no immunity antibody and died of hog cholera at 6 months' test. Therefore, the immunity acquired after vaccination could last at least for one year.