

螢光抗體-組織培養法對於豬瘟病毒

檢出及定量之研究

林再春

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

Kumagai 等⁷於1961年首創之END法，對組織培養細胞不呈顯細胞變性效果(CPE)之豬瘟病毒亦可在試管內被檢出及定量。此不但對豬瘟之診斷且成爲解明豬瘟感染機序之有效手段，繼而 Solorzano²³將螢光抗體法應用於豬瘟病毒之檢出，其後經 Mengeling 等^{10,11}加以檢討改良其方法後，咸認爲其特異性甚高且爲最優之方法。

由Mengeling等^{10,11,12,14}所考案之螢光抗體一組織培養法(Fluorescent Antibody-Cell Culture Test, 簡稱FACCT)乃係將豬腎株化細胞之PK-15株化細胞經接種後以螢光抗體染色檢出病毒之方法。後經 Carbrety 等⁴, Robertson 等¹⁷, Ressang 等^{15,16}研究者加以檢討並確認其爲豬瘟病毒檢出上極少非特異反應之優良方法。此外 Karasszon 等⁶, Carbrety 等^{3,4}, 姜等⁵曾利用PK-15細胞以外之培養細胞，例如豬胎兒腎細胞，初代豬腎細胞試予檢出豬瘟病毒結果認爲PK-15細胞對豬瘟病毒之感受性最高且螢光抗原之出現亦較明顯，且被病毒感染之細胞成爲所謂Plaque，不但能定量病毒且極易與非特異染色識別。

Stair 等^{24,25}, Aiken 等¹, Robertson 等¹⁸, Maess 等⁹, 澤田等²⁰, Teebken 等²⁶, Zimmermann 等²⁹亦由豬瘟感染豬之臟器凍結切片，以螢光抗體法試予檢出其病毒。又Aiken 等^{1,2}, Sirbu 等²², Wynobradnyk 等²⁷, 佐藤等¹⁹曾以感染豬組織之塗抹片行螢光抗體染色之方法嘗試檢出病毒。

Ressang 等¹⁶以上述三種方法對實驗感染例及野外感染例比較檢討結果，其中以塗抹法之檢出率稍差。

雖無論何種方法其對豬瘟病毒之檢出均爲優良的方法，但對病毒之定量時則以螢光抗體一組織培養法最爲適當。本研究爲比較評價螢光抗體法與END法且檢討並確立豬瘟病毒之試管內檢出及定量法，以利究明豬瘟病毒感染相。

試驗材料及方法

1. 病毒株

a. 強毒豬瘟病毒

使用日本農林省家畜衛生試驗場(以下簡稱日本家衛試)以豬繼代保存之ALD株爲標準株，此株係1950年聯合國糧食農業組織Dr.K.V.L. Kesteven 所分贈爲廣泛應用製造結晶紫豬瘟疫苗及研究豬瘟病毒。本實驗使用之該病毒係在日本家衛試豬瘟研究室通過豬18代感染極期之病豬血液凍結保存於-40°C者，但實驗的一部份使用將此ALD株繼代於豬睪丸培養細胞約20代之病毒，此病毒被命名爲A76株，在日本家衛試應用於中和試驗及其他試驗之標準豬瘟病毒。

b. 弱毒豬瘟病毒

註：本研究報告係筆者於1968年提出日本麻布獸醫科大學之博士學位論文第一報，並於同年臺灣省畜牧獸醫學會年會宣讀。其英文報告Japan Nat.Inst.Anim. Hlth Quart. 9 10-19 (1969)。

使用B株GP系E⁻病毒，B株是製造活毒疫苗用病毒株為目的，在日本家衛試由ALD株感染豬血清經單層組織培養28代，繼續以其單層細胞培養114代，繼代後實施2次限界稀釋，再經牛單層細胞培養36代，然後實施3次限界稀釋繼代而分離出之Clone株。GP株是將B株對天竺鼠腎細胞行32代繼代之病毒。E⁻病毒是由此病毒所分離之變異病毒與原病毒在END效果上有不同之性質，即經原病毒感染之豬單層細胞，若經NDV的感染則呈現極為強烈的細胞變性，反之被變異病毒所感染之豬單層細胞則NDV完全不增殖。原病毒對END效果呈現正常，即因END陽性而被命名為E⁺病毒，又變異病毒對END為陰性故被命名為E⁻病毒。

c. 新城雞瘟病毒 (NDV)

使用1962年 Dr. R. A. Bankowsky 撥讓予日本家衛試之新城雞瘟弱毒，TCND株。此株為馴化於株化細胞 (Hela, 豬腎細胞) 之病毒。如係培養細胞增殖之病毒，其病毒價為 $10^{5.0} \sim 10^{7.0}$ TCID₅₀，而在雞胚胎增殖之病毒則呈 $10^{8.0}$ EID₅₀ 以上之力價。在本實驗使用於END法，即豬瘟病毒定量之攻擊因在使用上高力價之病毒於種種方面較為方便，故使用雞胚胎尿腔內接種而增殖之病毒。END法之攻擊病毒係先以成雞紅血球行血球凝集反應測定後使用其一單位即血球凝集單位約相當於 10^6 PFU 感染價。

d. 西部馬腦脊髓炎 (WEE) 病毒

此病毒為1953年由 Dr. A. B. Sabin 分贈予日本家衛試，而在豬瘟研究室接種於小白鼠腦內通過12代後以雞胎兒培養細胞，繼代3代者在雞胎兒細胞增殖之病毒，對雞胎兒細胞之感染價通常呈 $10^{8.0}$ TCID₅₀ 以上，而在豬單層細胞則為 $10^{5.75}$ TCID₅₀。

2. 豬瘟感染臟器乳劑之調製

供試小豬體重 12~15kg，供試前之豬瘟中和抗體為陰性。強毒病毒羣共7頭各接種ALD株感染血液 10^4 MLD 及弱毒病毒羣共12頭各接種GP系E⁻病毒 10^4 TCID₅₀。於後肢左內股部皮下。接種後每24小時放血，強毒羣1頭，弱毒羣2頭，分別採取其全身臟器、淋巴節、血液及尿等供為試驗。

至於上述感染臟器乳劑之調製，係將實質臟器及淋巴節經充分除去脂肪後以 Earle 氏液內加有非働化山羊血清 5%，Penicillin 100u/ml, Streptomycin 0.1mg/ml, Kanamycin 0.01mg/ml 之病毒稀釋液做成10倍乳劑經 3,000rpm 10 分鐘之遠心上清液分裝於小試管凍結 -20°C 保存供試。

3. 豬單層組織培養法

將 6~9 週齡仔豬之單層連同總鞘膜以去勢術行外科摘出，表面以 70% 乙醇消毒，後除去總鞘膜與固有膜取出實質，以剪刀細切之單層組織以磷酸緩衝食鹽液 (PBS) 洗淨一次後，每一單層加 0.25% Trypsin 液 (Difco 製 1:250) 約 80ml，置於 30°C 之水槽內以電磁攪拌器消化之。經約 120~180 分鐘後大部細胞均被分散而結合組織被消化。將細胞浮游液以 150mesh 之滅菌金屬網濾過，遠心分離 1,000 rpm 5 分鐘後採集其沉澱之細胞以培養液浮游成為 2.5×10^6 /ml，並將此豬單層 (ST) 細胞液 (PH7.2~7.4) 分裝於小試管 (11mm × 45mm) 各 0.5ml 供為使用。培養液為加有 20% 非働化山羊血清及 3% 經加壓濾過滅菌之 1.4% NaHCO₃ 液，Penicillin 100u/ml, Streptomycin 0.1mg/ml 及 Kanamycin 0.01mg/ml 之 Earle 氏液。

4. 病毒感染價之測定法

a. END法

按照 Kumagai 等⁷ 之原法實施，即病毒液以 10 進法稀釋後將各稀釋之病毒液 0.1ml 分裝於 4~10 支小試管後與上述之 ST 細胞液 0.5ml 混合，經 37°C 4 天靜置培養後除去培養液，再以 10^6 PFU/ml 力價之 NDV 液 0.5ml 接種。NDV 係以 ST 細胞培養液稀釋之。

上述攻擊之 NDV 係使用 TCND 株或在一部份實驗使用官寺株。經 NDV 攻擊後於 37°C 迴轉培養 3 天後以鏡檢判定有無細胞變性。豬瘟病毒之 END 現象如 Kumagai 之報告所詳述，豬瘟病毒或 NDV 單獨時對 ST 細胞並不呈現 CPE，但對豬瘟病毒感染之 ST 細胞經 NDV 之感染即顯

示強烈的變性。因此豬瘟病毒之定量必須以攻擊之NDV早顯CPE為其指標，始能實施。

b. 干涉法

對GP系病毒之檢出即使用干涉法。其方法與END法同，但以WEE病毒之攻擊取代TCND病毒。攻擊用WEE病毒液係以ST細胞測定其力價並使用其100TCID₅₀，並於攻擊2日後予以判定。

干涉法為清水等²¹所報告之弱毒化豬瘟病毒之定量法，即豬瘟弱毒變異病毒已失去END效果而利用其干涉NDV或WEE毒對ST細胞之感染者，藉以測定其干涉能力而獲悉該病毒之力價，故判定時無CPE之試管成為該豬瘟病毒陽性。

c. 依洗淨接種乳劑之病毒檢出法

依上述之END法或干涉法實施病毒價測定，而接種臟器乳劑原液時常因ST細胞之發育受阻礙而無法進行實驗。尤其以胰、肝、空腸、副腎、耳下腺、淋巴節、尿等之阻害作用顯著。為避免因濃厚乳劑所引起之阻害作用，試用下列之變法；首先將ST細胞培養，俟細胞Sheet完成後（普通為3日後）接種臟器乳劑原液0.1ml，在37°C迴轉培養3小時使病毒吸着於細胞，然後除去接種乳劑，並以PBS 1ml洗淨細胞後加0.5ml之培養液培養之。4日後與原法同樣接種TCND毒或WEE毒，再等3日後（WEE為2日後）判定其結果。實施本法之實驗時經常以病毒價較低之陽性臟器乳劑為對照以確認病毒力價並未降低。

d. 脾組織片二段培養法

雖使用上述方法洗淨接種乳劑，但在胰、尿及一部份淋巴節之乳劑亦引起ST細胞發育之阻礙致無法實驗。此等臟器乳劑依Matumoto等⁹之脾二段法，即將臟器乳劑先接種於脾組織片行培養，然後由此培養液以END法或干涉法檢出病毒。其方法之概要如下：將健康仔豬（生後約2個月）之脾，以剪刀切成約1mm³後加等量之ST細胞培養液。以先端彎曲之毛細吸管將組織片約10個移植於試管壁（15mm×150mm），後將試管直立放置在孵卵器內30分鐘，使組織片附着固定於試管壁，然後接種乳劑原液0.2ml並加培養液2ml，於37°C迴轉培養3日後換新培養液，再培養3日後，以此培養液做END法或干涉法之病毒檢出。每次實驗均以病毒濃度較低之既知陽性乳劑為對照以確認病毒之檢出。

e. 病毒檢出之確認

以END法檢出豬瘟病毒時，有時因TCND病毒攻擊後之CPE不甚明瞭而引起判定之困難。尤其是病毒價較低之乳劑，有確認其判定之必要。乃將判定困難之試管之培養液接種於新的ST細胞，並以END法施行確認。此時有中和上述被檢培養液中所含NDV之必要，故於該培養液中加入等量之中和抗體價1,024倍之NDV免疫血清10倍稀釋液，置於37°C 30分鐘後取其0.1ml接種於新ST細胞，再培養4日後以NDV攻擊時為除去NDV免疫血清而以1ml之PBS洗滌細胞1次。

5. 使用組織培養檢出豬瘟病毒之螢光抗體法

a. 豬瘟螢光標示抗體之製造法

(1) 豬瘟高度免疫血清

使用子宮切除手術所得之2月齡SPF仔豬經以豬瘟病毒接種而製造高度免疫血清。免疫之方法為皮下接種10⁴TCID₅₀之GP系E⁻病毒7日後，以強毒病毒ALD株感染豬血清2ml行皮下接種，14日後再以同感染血清150ml接種於腹腔內9日後再以同感染血清125ml接種於腹腔內，最後攻擊13日後行全放血並分離血清。如此獲得之高度免疫血清顯示32,768倍的中和抗體價。

(2) 螢光標示抗體之製造

上述之高度免疫血清經3,000rpm 10分鐘遠心後以Millipore Filter (DA650m μ) 濾過，然後用水塊由外部冷卻血清，並以磁力攪拌器在不發生氣泡之狀態下輕輕地攪拌，並滴入抗血清同量之硫酸銨飽和液，繼續攪拌一小時後放置冰箱一夜，次日以3,700rpm 遠心30分鐘除去上清液後將白色之沉澱加少量之蒸餾水，在不發生氣泡下使其溶解。此溶液再以同樣之操作，滴下同量之硫酸

(4)

鉍飽和液。同樣操作反覆實施 3 次，最後所得之沉澱加適當量之蒸餾水（通常為原血清之 $\frac{1}{2}$ 量）溶解，並以 0.01M pH7.2 之 PBS 於冰箱中，屢換外液透析至硫酸鉍被除去為止（即外液中不能以 Nasller 氏試藥檢出 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 為止）。此 γ -globulin 溶液以 Folin 法定量其蛋白質量，並用 0.01 M pH7.2 之 PBS 溶解為 1%。將上述所計算之蛋白總量之 $\frac{1}{100}$ 量之 Fluorescein isothiocyanate (FITC, 美國 BBL 製) 溶解於蛋白溶液 $\frac{1}{10}$ 量之 0.5M pH 9.0 之 Carbonate-Bicarbonate 緩衝液中，然後將此 FITC 溶液與 γ -globulin 溶液混合並使色素與抗體結合。此時 γ -globulin 溶液須在水上 ($0\sim 2^\circ\text{C}$) 以磁力攪拌器一面攪拌一面滴下色素液。

經 FITC 結合後之 γ -globulin 溶液為除去未結合色素，以 Sephadex Column 濾過。Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 係使用 G-25 Coarse 經浮游於 0.005M pH 7.0 PBS (加 0.1M 之 NaCl) 後裝入玻璃製 Column 然後將上述之螢光抗體液由上面倒入。螢光抗體液倒入 Sephadex Column 後沖入 PBS，則螢光抗體在 Sephadex Column 中很明顯的可分為較早落下之部分與較遲落下之部份。較遲部分為游離之色素，故採集較早落下之部分即可。經 Sephadex 濾過之螢光抗體液以 0.005M pH 7.0 之 PBS 在水箱中，屢次更換外液透析至外液不呈黃綠色為止。

通過 Sephadex 之螢光抗體液為了除去非特異性的螢光物質及 F/P 比較大之螢光抗體而通過 DEAE (Diethylaminoethyl) Cellulose Column。DEAE Cellulose 係使用西德 Serva 社製品 (0.76meq/g)，將 DEAE 粉末約 100gm 浮游於 3,000ml 之蒸餾水在陰壓下以磁力攪拌器攪拌，然後以 1N 之 NaOH 液，繼以 1N 之 HCl 液，再以 1N NaOH 液交互洗淨，最後以蒸餾水、PBS 洗淨至上清液之 pH 呈 7.0~7.5 為止。洗淨之 DEAE 與 Sephadex 同樣之操作裝入玻璃製 Column。此 Column 以 PBS 洗淨二次後，倒入上述以 0.005 M pH 7.0 之 PBS 透析一夜之螢光抗體液，螢光抗體液流入 Column 後繼以 PBS 加入而使其繼續流出。非特異性螢光較強部份將被 DEAE Cellulose 所吸着，故收集流出部份，則為螢光標示抗體液，此螢光標示抗體液經檢定確認其染色力價，非特異性後供為使用，曾以螢光標示抗體液之製造法實施二、三基礎試驗，故後述之。

b. PK-15 細胞與其培養法

PK-15 細胞為 1966 年由 National Animal Disease Laboratory, Ames, Dr. E. C. Pirtle 所分贈後，每星期繼代二次迄今者。此細胞為被登記於 American Type Culture Collection 之細胞 (登記號碼 CCL-33)，係 1966 年由 Cutter Laboratories 之 E. Stice 從成豬之腎臟樹立之細胞株 (PK-2a) 所分離之 Clone。

由接種豬臟器乳劑之病毒檢出，使用 Leighton tube 裝入蓋玻片 (10mm×36mm) 之培養容器，其他實驗則使用直徑 3cm 之 Petri dish 裝入 18mm×18mm 蓋玻片之容器。為使這些蓋玻片上之細胞在 16~20 小時後形成單層細胞而調整接種細胞數 (每張 Petri-dish 接種細胞數約 1.2×10^6 個) 後接種之。每一蓋玻片上單層細胞形成後之細胞數約為 10^6 個。PK-15 細胞之培養法首先由舊培養液除去培養液後加入 PBS，而洗淨細胞 Sheet 後以 TV 液 (0.1% Trypsin 與 0.01% EDTA 等量混合之液) 洗淨然後再加入少量 (通常為培養液之 $\frac{1}{20}$ 量，200ml 容積之培養瓶時為 1ml) 之 TV 液，在 37°C 靜置 5~10 分鐘，使細胞分散剝離並將分散後之細胞液收集於遠心管以 1,000rpm 遠心沉澱 5 分鐘，再將沉澱之細胞浮游於培養液中。培養液為在 Earle 氏液中添加 Lactoalbumin 水解物 0.5%，非動化山羊血清 10%，1.4% NaHCO_3 液 5%，抗生物質液 (與上述 ST 細胞培養同濃度) 0.5%。

c. 使用 PK-15 細胞之豬痘病毒檢出法

病毒之接種 Leighton tube 為 1ml, Petri-dish 為 0.5ml。首先除去舊培養液後方接種病毒並在 37°C 之孵卵器內放置 3 小時且為促進病毒對細胞之吸着，其中間輕輕振盪二次。至接種之病毒量經調整為每一蓋玻片上所形成之 Plaque 數為 50~200 個之範圍內。經接種病毒之細胞以 PBS 洗滌三次後再加入培養液 1ml 或 2ml 培養之。至染色時之培養時間雖因試驗之目的而異，惟

由臟器乳劑之病毒檢出則培養48小時。

d. 染色及鏡檢法

染色法均以直接法行之，最先取出 Coverslip 後以 0.01M pH 7.2 P B S 換液 4~5 次，洗滌 5 分鐘，經風乾後以丙酮固定10分鐘，風乾後滴下螢光標示抗體液，並放入有濕氣之容器內，在密封之狀態下於 37° C 染色 20 分鐘，後以 P B S 換液 4~5 次即洗滌共約 15 分鐘。風乾後以 50% Glycerin-P B S 液或 Evanol 處理後於載玻璃上鏡檢之。螢光顯微鏡為日本光學 Nikon 製品，並使用東芝超高壓水銀燈 (SH200)，勵起光為 BV 照射，Filter 在光源側使用 2 張 (B , O) 而於接眼側使用 2 張 (中、1) 。照片攝影使用 Kodax Trix 黑白，曝光約為 3 分鐘。

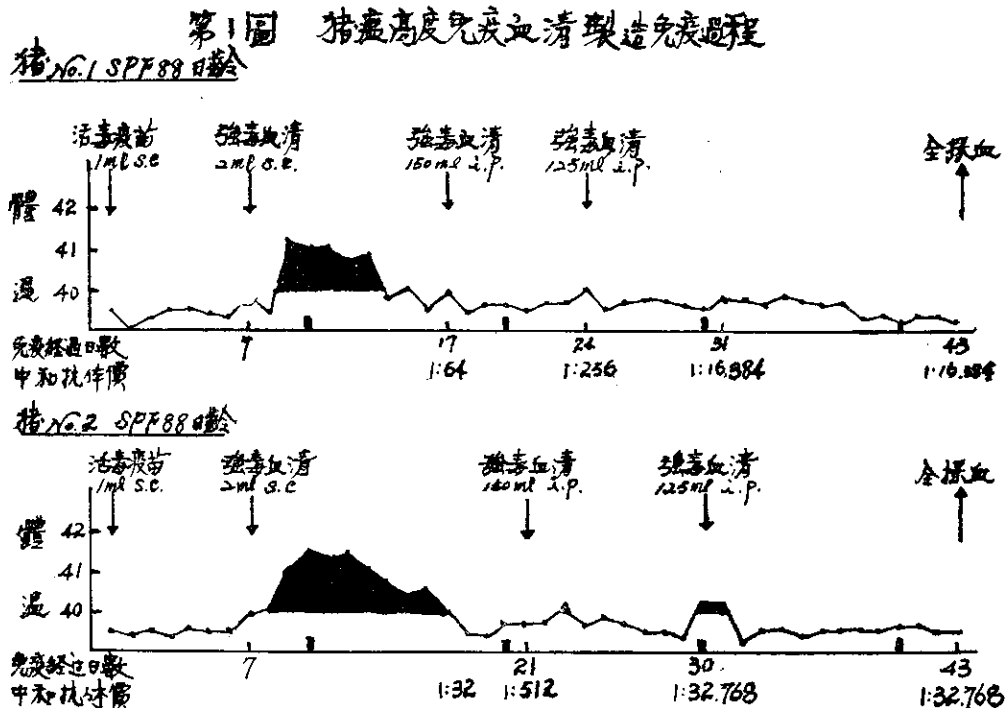
試 驗 成 績

1. 應用螢光抗體一組織培養法對豬瘟病毒之檢出基礎試驗

a. 豬瘟螢光標示抗體製造法之檢討

螢光抗體直接法係對欲檢出病毒之抗體與螢光色素結合而利用其螢光標示抗體做病毒之檢出及定量之方法，因此螢光色素之標示抗體，其品質尤其特異性應加以充分檢討。本試驗所用之螢光標示抗體之製造法，雖記載於試驗材料及方法項目中，但最主要者為高度抗體價血清之免疫方法及於螢光標示抗體製造過程中防止其抗體價之降低。對免疫方法進行檢討，例如以不活化疫苗、活毒疫苗、強毒病毒等之互相配合之各種免疫法，經試驗結果如於第 1 圖所示方法，略可獲致滿意之高度免疫血清。如圖所示，最初接種活毒疫苗 7 日後在抗體尚未出現以前以強毒病毒攻擊，此後攻擊 100ml 以上之強毒病毒二次即可獲得 1 萬倍以上之中和抗體價之免疫血清。

於螢光標示抗體製造過程中，抗體價之下降如第 1 表所示，共三批螢光標示抗體製造中經硫酸之塩析後有些批之抗體價稍為降低，其後 r-globulin 之分割，標識 Fluorescein isothiocyanate (B B L) 並通過 Sephadex Column 之過程中完全不致下降，但 DEAE Cellulose 通過後抗體價約降低 1/8~1/10。



第1表 螢光標示抗體製造過程中各分割之中和抗體價*

分 割	製 品 批 號		
	1	2	3
供 試 血 清	16,384	4,096	32,768
r-globulin	8,192	4,096	4,096
Sephadex	8,192	4,096	2,048
最 終 製 品	512	512	N.D.
染 色 力 價	8	8	8

* 中和抗體價之測定係使用 100TCID₅₀ virus

因此，F. isothiocyanate 之結合量等，實有檢討之餘地，然所試製之第三批螢光標示抗體呈示 512 倍之中和抗體價並以螢光抗體一組織培養法所測定之染色力價亦有 8 倍且均無非特異反應。該螢光標示抗體已足夠供為檢出豬瘟病毒之用。

b. 使用各種培養細胞對豬瘟病毒之定量

依 Mengeling 等^{10,11} 所考案之為檢出豬瘟病毒之螢光抗體一組織培養法，係使用 PK-15 細胞。Carbrey⁴ 亦認為初代豬腎細胞不如 PK-15 細胞即後者由豬瘟病毒所形成之 Plaque 數也較多且螢光亦清晰。

在螢光抗體一組織培養法所用病毒增殖之細胞，影響檢出結果之關係很大是理所當然。因此除使用 PK-15 細胞，初代豬腎細胞、初代 ST 細胞外尚使用對豬瘟病毒有高度感受性之 ESK-1 細胞（豬胚胎之株化細胞）等 4 種細胞對病毒之檢出做為比較試驗。

上述 4 種之細胞經接種馴化 ST 細胞之豬瘟病毒 ALD 株之 A76 Virus 10⁻¹~10⁻⁸ 接種後每日取出蓋玻片做螢光抗體染色後觀察能檢出螢光抗原之最高稀釋倍數。如第 2 圖所示，上記 4 種細胞中呈示最高感受性者為 PK-15 細胞，於感染第 5 日後能檢出至 10⁻⁸ 之抗原。ESK-1 比 PK-15 細胞經全試驗過程中約低 1 log 之力價，但 5 日後之成績於 PK-15 細胞同樣能檢出 10⁻⁸ 之抗原。SK 及 ST 細胞比前 2 者感受性稍差。至抗原之出現時間在 4 種細胞間並無差異，均於 24 小時後被檢出。但在感受性上則差異顯著，PK-15 細胞與 ST 細胞間約有 2 log 之差。

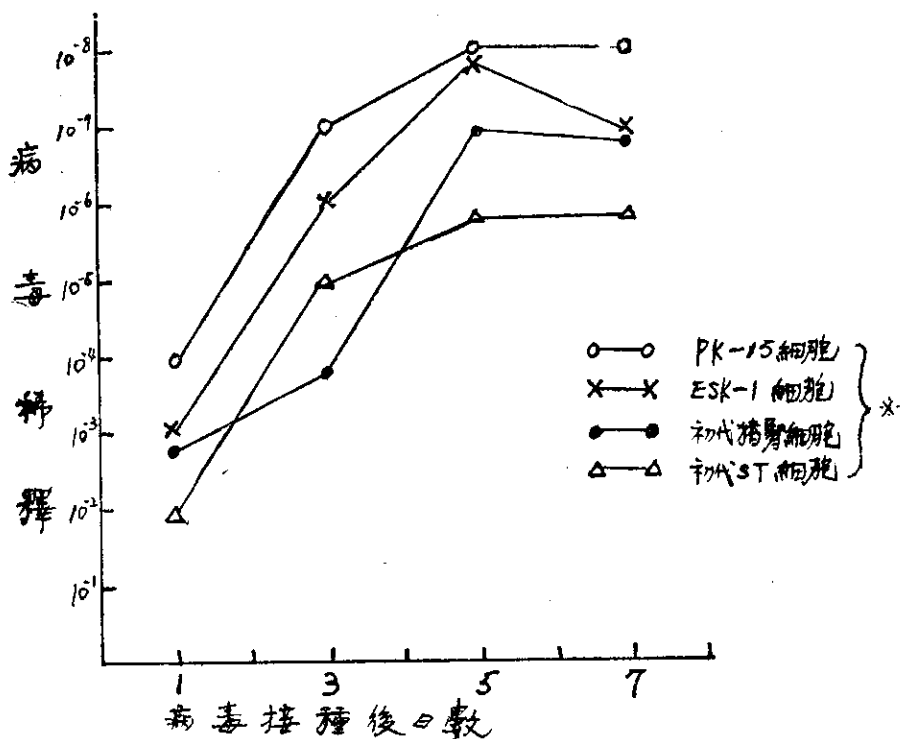
c. 豬瘟病毒在 PK-15 細胞上所形成與接種病毒液稀釋度之 Plaque 數關係

該實驗以直徑 3cm 之燒皿放入 18mm×18mm 之蓋玻片，待 PK-15 細胞接種形成單層細胞後接種病毒。所接種病毒能在蓋玻片上形成 200 個以內之 Plaque 數為準而稀釋則對病毒之稀釋度與數之變化之關係詳細檢討。豬繼代之 ALD 株接種 24 小時後，形成局限性之陽性感染細胞之集團，即 Plaque，於 48 小時後變成數倍至數 10 倍之大，但 Plaque 數殆無變化。通過培養細胞之 A76，E⁺ 及 E⁻ 之各病毒均於接種 24 小時後呈 Plaque 即感染細胞之集團或孤立之 1~2 個陽性細胞散見而能計算，然後於 48 小時後抗原呈瀰漫性擴散，即於陽性細胞集團之周圍有多數之感染細胞散見而致無法計數。

如此豬瘟繼代之 ALD 株於感染 48 小時後尚能計算其 Plaque 數，然而細胞繼代之病毒於 36 小時以後則無法計數，故應於計數可能之時間內計算 Plaque 數而觀察與 Virus 稀釋之關係。如第 3 圖所示，由豬繼代之 ALD 株及培養細胞繼代之數種病毒，所形成之 Plaque 數與病毒液之稀釋能平行增減，即於病毒之稀釋與 Plaque 數之間呈直線關係。

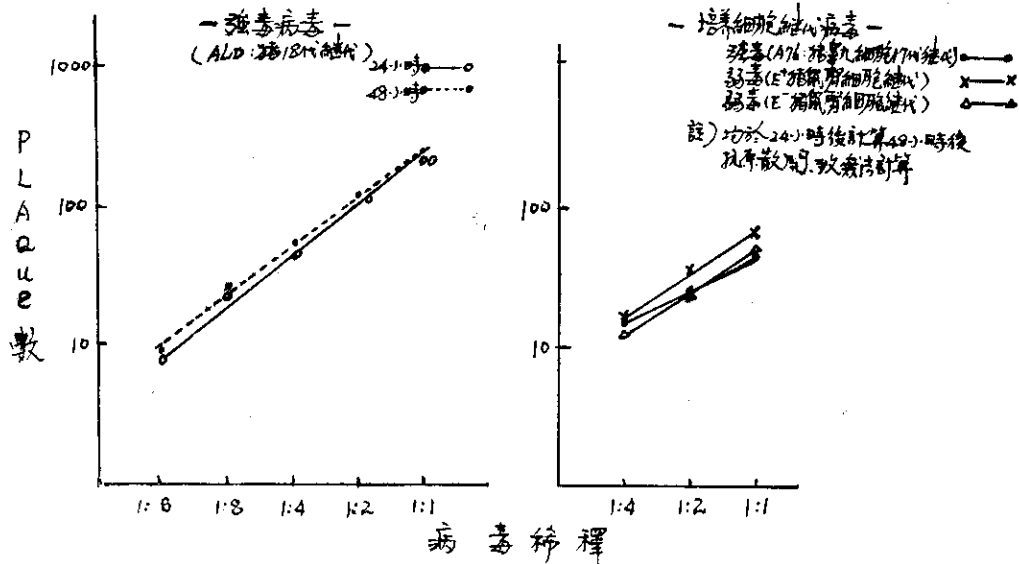
上述實驗所用之蓋玻片約 1.8cm²，在蓋玻片上能計數之 Plaque 數為約 200 個以內即在易於計

第2圖 使用各種培養細胞對猪瘟病毒之檢出



* 圖示 抗原之陽性最高稀釋度

第3圖 依猪瘟病毒所形成 plaque 數與持種量之關係 (依螢光抗体法)



數之範圍 (200~50個) 其 Plaque 數之增減呈示 Dose response, 故依此 Plaque 法之病毒定量乃為精度頗高之方法即由此實驗可證。

d. 螢光抗體法與 END 法對豬瘟病毒感染價之比較

依螢光抗體法之 Plaque 價與 END 法之 TCID₅₀ 之比較行詳細檢討。依 END 法之感染價, 係以 Virus 之各稀釋 0.1ml, 接種於 8 支試管之 ST 細胞並照常法求其 50% 感染價。至以螢光抗體法之 Plaque 價, 係以內徑 2.8cm 之燒皿放入 1.8cm² 之蓋玻片並接種 0.95ml 之病毒, 計算蓋玻片上 1ml 左右之 Plaque 數。病毒係使用豬繼代 ALD 株接種豬之扁桃腺乳劑, 反覆實驗 3 次。

結果如第 2 表所示, 經過 3 次實驗 END 法者以對數值第 1 次 0.3, 第 2 次 0.2, 第 3 次 0.4 平均 0.3 log 而呈高價, 但一般 50% 感染價則乘 0.69 之力價計算為 1 感染單位, 如以感染單位比較螢光抗體所得之 Plaque 價與以 END 法之感染價即兩者, 略示同一力價。

第 2 表 螢光抗體法與 END 法對豬瘟病毒力價之比較

實驗號碼	END 法 (Log ₁₀ TCID ₅₀)	FAb 法 (Log ₁₀ PFU)	D
1	46.	4.3	0.3
2	4.4	4.2	0.2
3	6.9	6.5	0.4
平均	5.3	5.0	0.3

$$D: \text{Log}_{10} \text{TCID}_{50} - \text{Log}_{10} \text{PFU}$$

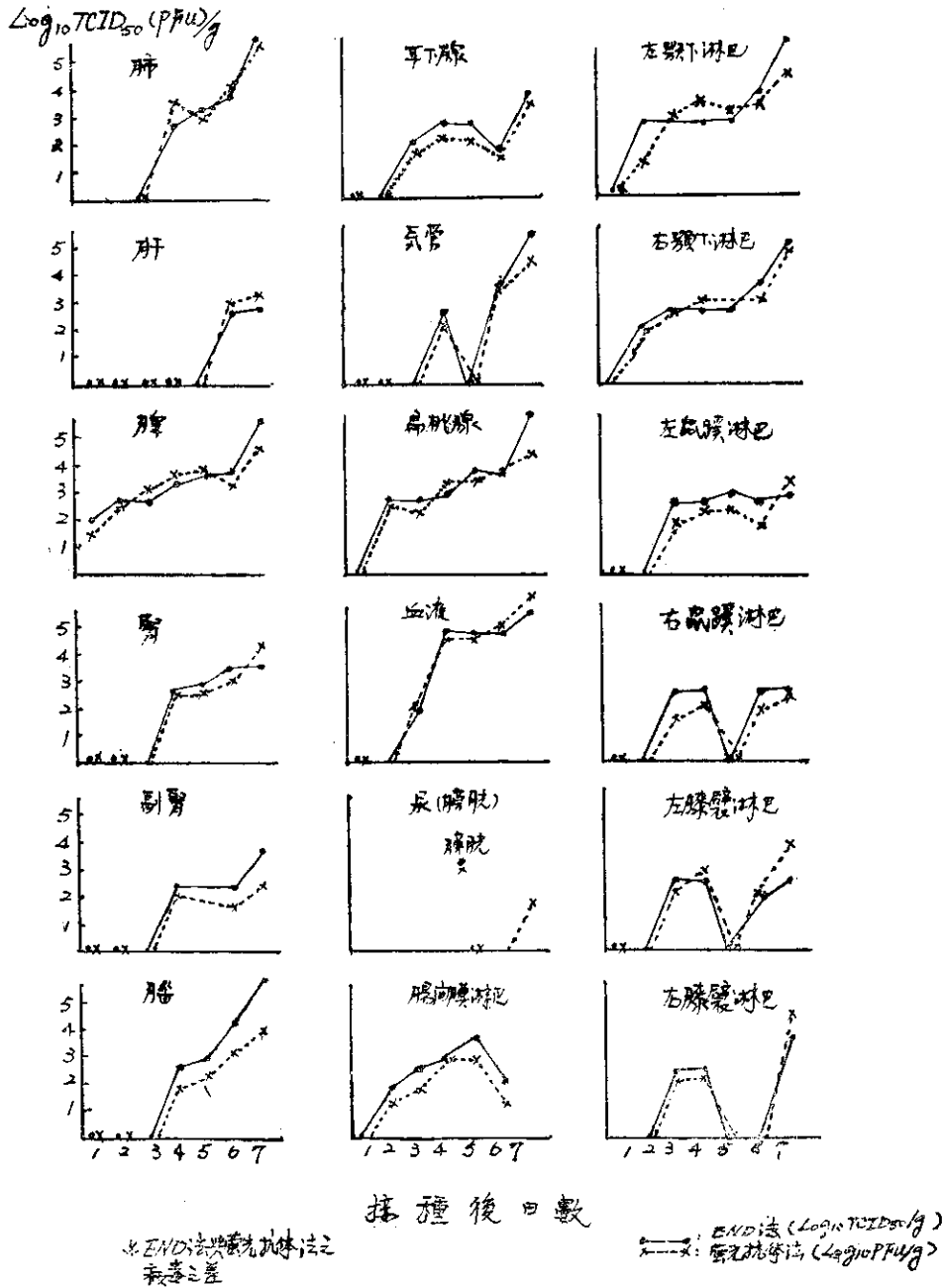
e. 豬瘟病毒感染臟器以螢光抗體法及 END 法對豬瘟病毒檢出之比較

至目前之試驗成績由螢光抗體法所得病毒價與以 END 法之病毒價略呈相等力價已甚明確。對強毒病毒或弱毒病毒所接種豬隻之各臟器, 應用螢光抗體法及 END 法 (或以干涉法) 試以檢出病毒而進行兩法之比較。

強毒豬瘟病毒 ALD 株 10⁴ MLD 接種 7 頭之豬, 每日撲殺 1 頭並採取血液、淋巴節及全身各臟器, 供為製作乳劑後, 以前述之螢光抗體法檢出及定量病毒並與 END 法作比較。如第 4 圖所示豬瘟病毒檢出之成績, 以 END 法無法檢出病毒之感染尿倘能以螢光抗體法檢出外, 其餘之感染乳劑 END 法陽性例者, 螢光抗體法亦均為陽性則兩法之檢出成績略為完全一致。對病毒價而言, 經以兩法所得之力價間呈示僅輕微之差異, 即以螢光抗體法所得力價平均呈示 0.2 log 之低價而並無呈示 1 log 以上之差異例, 依兩法所得之力價均隨其感染之經過略呈平行增減。可能檢出病毒之材料中, 兩法呈示同價之例數為 1 例, END 法較高者 54 例, 其他 23 例以螢光抗體法者呈示較高力價。

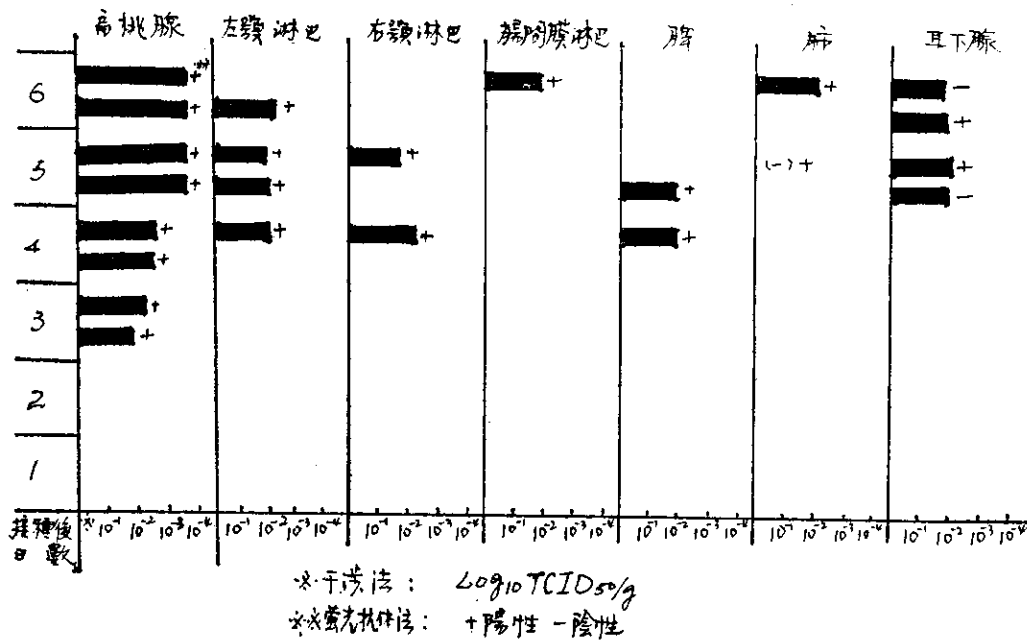
一方面觀察弱毒感染豬之情形, 如第 5 圖所示則由兩法之檢出成績呈示差異之例, 係耳下腺 2 例 (干涉法陽性、螢光抗體法陰性), 肺 1 例 (螢光抗體法陽性, 干涉法陰性) 外其餘完全一致。如此觀察病毒之檢出成績可得一結論, 即螢光抗體法比干涉法並無遜色。

第4圖 螢光抗体法及END法对猪霍病毒感染臟器之病毒檢出比較



*END法與螢光抗体法之
病毒之差

第5圖 猪痘弱毒(GPE)接種猪之各脏器以螢光抗體法及干涉法對病毒之檢出



2. 强毒及弱毒猪痘病毒感染 PK-15 細胞之螢光抗原出現及 Virus 增殖曲線之關係。

由上述成績以 Mengeling 等^{10,11} 所考索之螢光抗體—組織培養法對猪痘病毒之定量法被確認為最優良之方法。因此對培養於 PK-15 細胞之猪痘病毒所形成之 Plaque 之性狀及其形成之推移外，同時將强毒及弱毒病毒之螢光抗原形成狀態之差異，依其增殖曲線逐次加以檢討之。

病毒係使用强毒 ALD 株，A76 及弱毒 E⁺，E⁻ 等4種病毒。在蓋玻片上形成單層細胞之 PK-15 細胞經以病毒接種，然後細胞面以 P B S 洗滌3次後加入培養液。如第6圖所示之各時間取出蓋玻片並以螢光抗體染色，同時對培養液以 E N D 法或干涉法測定其病毒價。

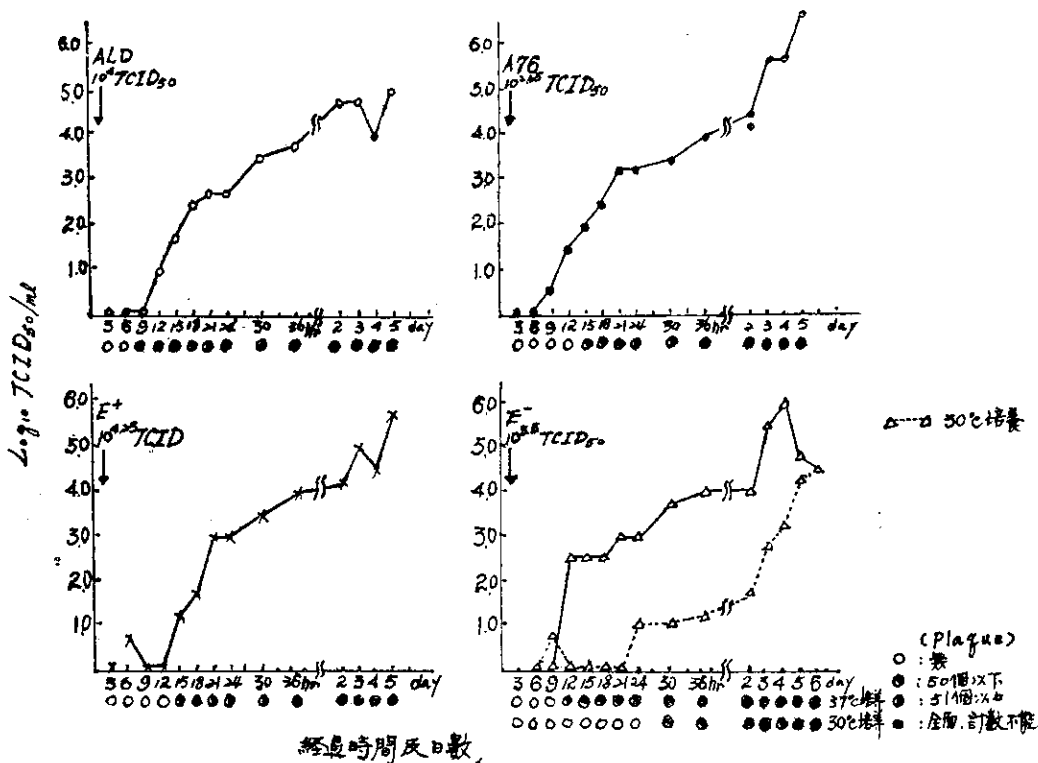
此項試驗主以觀察 Plaque 之形成過程為目的，故接種病毒量係採用於預備試驗時認為其 Plaque 最易觀察之稀釋濃度而實施。Plaque 之形成過程如照片 1~40。螢光抗原之出現與病毒增殖曲線之關係如第6圖所示。

如照片所示以 ALD 株 10^4 TCID_{50} 接種之細胞經感染9小時後即檢出弱螢光之陽性細胞3個散在，12小時後形成陽性細胞2~3個之集團，其數目共達89個，24小時後其陽性細胞之集團即 Plaque 數變成463個且1個之 Plaque 由20~50個以上之感染細胞所構成而增大。該 Plaque 此後更為增大與接近之 Plaque 相互融合，至72小時後其數量未見增加但螢光抗原之 Intensity 則趨於低下(照片8)。培養液中之病毒比細胞上螢光抗原遲3小時後始被檢出。此後培養液中之病毒價與 Plaque 數之增加而平行上昇且接種2日後達最高，其後並不特別顯示上昇。

A76 株雖以較低接種量之 $10^{6.65} \text{ TCID}_{50}$ 接種，於培養液中9小時後即能檢出病毒，但螢光抗原於15小時後始檢出。此後 Plaque 之大小及數目均有增加，且由30小時後可以觀察甚小之 Plaque 此係2次感染之散在性感染細胞(照片13)，至36小時後散在於細胞層全面且48小時後細胞層全面細胞變成陽性。培養液中之病毒價隨抗原之形成而平行上昇，比接種病毒量較高之 ALD 株為高，5日後會達 $10^{6.75} \text{ TCID}_{50}$ 。

E⁺ 及 E⁻ 病毒於 37°C 螢光抗原之出現及增殖曲線均與 A76 病毒呈示類似趨向。由36小時後與 A76 病毒同樣則感染細胞散在而無法計數(照片22)。E⁻ 病毒於 30°C 之增殖抗原之出現時

第6圖 猪瘟病毒感染PK-15細胞之螢光抗原出現
及Virus增殖曲線之關係



間及形成之速度比其於 37°C 時緩慢，24 小時後始於培養液中檢出病毒，30 小時後始由細胞檢出螢光抗原。其後兩者呈示平行而緩慢增加，且由 3 日後急激上昇，至於 5~6 日後液中之病毒價為 10^{4.5} TCID₅₀。

將上述試驗綜合結果，通常螢光抗原之出現與液中病毒之放出略為同一時間，Plaque 之形成即在病毒接種 24 小時後且該 Plaque 隨時間之經過而逐漸增大，液中之病毒價亦同時平行上昇。48 小時後感染細胞之 Intensity 為最強，以後漸弱。至液中之病毒其後 2~3 日間不呈示病毒價之下降。嗣後隨着時間之經過僅於極少數之細胞能認出螢光抗原。

對病毒間之螢光抗原差異而言，為比較探究強毒與弱毒病毒間之差異，則以猪繼代病毒與培養細胞繼代病毒間認為似較有明顯之差異，即猪繼代之 A L D 株最初形成 Plaque 後僅其形狀增大而數目並不增加則僅對隣接細胞進行感染之趨勢。一方面培養細胞繼代病毒，由最初感染細胞所放出病毒，不僅以 2 次的向隣接細胞且對其他細胞亦容易感染而形成新感染細胞羣之趨勢。

討 論

關於猪瘟病毒試管內定量法，Kumagai 等⁷ 所報告之 E N D 法不僅對於猪瘟之實驗室內診斷極具價值，其對於猪瘟疫苗之創製及病毒增殖之研究等亦有極大之貢獻。另一方面在美國曾以螢光抗體法從事猪瘟病毒檢出之研究，主對猪瘟診斷進行探討並由 Mengeling 等¹¹，Stair 等²⁴，Aiken 等¹ 確立其診斷方法。本試驗以螢光抗體法與 E N D 法測定病毒感染價結果並無顯著差異則確認兩法均為優良之猪瘟病毒檢出定量法。如備有特異性充分加以檢討之螢光標示抗體則螢光抗體法之染色技術極為簡便且較 E N D 法可在短時間內實施故今後將廣泛被應用。又螢光抗體一組織培養法所使用之 PK-15 細胞為被固定化之細胞株，其培養操作亦甚簡便且可隨時獲得，故更提高螢光抗體法之特

性。但測定多數例被檢材料之病毒感染價及中和抗體價時則以E N D法之效率較高，兩法雖各有長短，但本質上並無差異。兩法之病毒檢出率，感染價均呈同價，因此將來此兩法均將成爲研究豬瘟病毒有力之手段。

其次，關於強毒病毒與弱毒病毒抗原形成之異同，Stair 等²⁵曾報告弱毒病毒對於螢光抗體之 Intensity 較低。又 Teebken 等²³認爲出現於病毒接種豬扁桃腺之抗原，由病毒之病原性而不同則強毒病毒抗原在上皮及淋巴細胞之細胞質出現瀰漫性強光。反之，弱毒病毒抗原則在腺窩之上皮細胞形成局限性 Plaque 狀，並逐漸變大而增強光度，但5日以後即減退。筆者在實驗上亦曾觀察強毒病毒與弱毒病毒間，對螢光抗體之 Intensity 呈示差異。此外，由豬直接分離之野外病毒及豬繼代病毒在 PK—15 細胞上呈顯局限性增殖而形成明顯之 Plaque。反之馴化於培養細胞之病毒，雖於培養初期形成 Plaque，但隨着時間之經過，二次感染細胞增加，而且有瀰漫性抗原。這些抗原形成之差異似非強毒或弱毒之差異而是對培養細胞馴化之程度所致，如此，以螢光抗體法識別培養細胞上之強毒或弱毒誠不容易，但對未經培養細胞繼代之豬由來病毒或培養細胞馴化病毒則可予以識別，故對組織培養活毒疫苗病毒與野外強毒病毒似可予以識別。

對豬瘟病毒所形成之螢光抗原予以討論時，依筆者之實驗與 Mengeling 等¹¹之報告同樣，螢光抗原主形成於細胞質而核內並無螢光抗原。但 Solorzano²³，Stair 等²⁴，Sirbu 等²²則報告細胞質與核內均有螢光抗原。目前豬瘟病毒在分類學上之位置尚不明，但以類似 Arbo 或 Myxo 病毒羣之見解較多。這些病毒羣之大多數，其抗原即最初出現於核內，然後蓄積於細胞質之增殖形態。故此次實驗雖未能在核內檢出抗原，但對於豬瘟病毒在增殖初期是否在核內形成抗原之問題，似須加以慎重檢討之必要。

結 論

1. 螢光抗體—組織培養法，在豬瘟病毒之檢出及定量觀點，經與E N D法詳細比較試驗結果，得知其特异性甚高，而最爲可靠之方法即爲試管法具有甚高之利用性。製作螢光標示抗體之要點爲如何獲得高度抗體價之免疫血清，乃檢討其方法；經以活毒疫苗免疫7天後，以強毒病毒攻擊，然後以大量之感染極期豬強毒血清攻擊二次者爲最佳。

至於螢光標示抗體製作過程中之抗體價，則與螢光色素結合時殆無抗體價之下降，但經 DEAE Cellulose 以精製後雖其抗體價約下降爲 $1/8 \sim 1/16$ ，却可獲得毫無非特异性之螢光標示抗體且尙具有染色力價8倍之高。

2. 使用各種培養細胞在接種豬瘟病毒後，以螢光抗體法比較病毒之檢出情形結果 PK—15 細胞之感受性最優良且螢光抗原之出現亦較清晰。

3. 豬瘟病毒感染細胞之螢光抗原成爲集團即所謂“Plaque”。此 Plaque 之數，在強毒病毒例於接種後24小時及48小時均無變化，但馴化於培養細胞之病毒例則於24小時後形成 Plaque，至48小時後則瀰漫於細胞層全面因而無法計數。弱毒感染後24小時之 Plaque 數及強毒感染之 Plaque 數均與病毒之稀釋度呈平行增減，具有所謂 Dose response。

4. 將豬瘟病毒以螢光抗體法之 Plaque 價與E N D法之50%感染價比較測定結果有 0.3 log 之差異。

5. 應用螢光抗體法與E N D法實施強毒豬瘟病毒接種豬各臟器之病毒分離，經比較檢討結果兩法之檢出成績略爲一致，並確認兩種方法均爲檢出豬瘟病毒之優良方法。

6. 使用豬瘟強毒及數種弱毒感染 PK—15 細胞後，比較檢討細胞上螢光抗原出現培養液中病毒與增殖曲線之關係，得知由感染豬直接分離而無細胞繼代經歷之強毒病毒，在 PK—15 細胞上感染9小時後即形成抗原並開始放出病毒於液中，感染24小時後所形成之 Plaque 其面積雖增大，但其數目並未增加。至通過培養細胞之病毒，其病毒之放出與抗原之出現約爲同一時間，感染24小時內形成 Plaque，但以後似由 Plaque 放出之病毒所引起之二次感染細胞散在，逐漸增加遂瀰漫於細胞層。

至於豬瘟螢光抗原僅形成於細胞質而核內並未觀察到螢光抗原。

本研究承蒙 日本農林省家畜衛生試驗場長藤田淳吉博士，麻布獸醫科大學校長越智勇一博士及中國農村復興聯合委員會畜牧生產組長李崇道博士賜給研究之機會謹致衷心之敬意，在實驗上又蒙日本生物科學研究所長中村淳治博士，麻布獸醫科大學教授深野高正博士惠賜助言與校閱，並承農林省家畜衛生試驗場製劑研究部長笹原二郎博士，豬瘟研究室長熊谷哲夫博士，同研究室清水悠紀臣博士給予懇切之指導，謹致誠摯之謝忱。實驗進行上又承豬瘟研究室古內進、田村英穗、長谷川知子各技官之協助，謹此一併誌謝。

參 考 文 獻

1. Aiken, J. M., Hoopes, K. H. & Stair, E. L. : Rapid diagnosis of hog cholera: A direct fluorescent-antibody technique. Proc. Book. 101st Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass. 282-284 (1964) .
2. Aiken, J. M., Hoopes, K. H., Stair, E. L. & Rhodes, M. B. : Rapid diagnosis of hog cholera: A tissue impression fluorescent-antibody technique. J. Am. Vet. Med. Ass. 144: 1395-1397 (1964) .
3. Carbrey, E. A. : Routine laboratory diagnosis of hog cholera employing the fluorescent antibody tissue culture technique. Report of the FAO/OIE Intern. Meet. on hog cholera and African Swine Fever. Rome, Italy, May 31-June 5, (1965) .
4. Carbrey, E. A., Stewart, W. C., Kresse, J. I. & Lee, L. R. : Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique. Proc. 69th Ann. Meet. U. S. Livestock Sanit. Ass. 487-500 (1965) .
5. 姜炳稷、清水悠紀臣、古內進、熊谷哲夫：螢光抗體による豚コレラウイルスの検出 I. 日本獸醫學雜誌，28: 474 (1966) .
6. Karasszon, D. & Bodon, L. : Demonstration of the swine fever virus in tissue culture by immunofluorescence. Acta Microbiol. Hung. 10: 287-291 (1963) .
7. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. & Matumoto. : 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. I. Establishment of standard procedure. J. Immunol. 87: 245-256 (1961) .
8. Maess, J. & Iess, B. : The immunofluorescence method for the laboratory diagnosis of swine fever. Zentbl. Vet. 13B: 660-670 (1966) .
9. Matumoto, M., Kumagai, T., Shimizu, T. & 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. II. Some characteristics of END method. J. Immunol. 87: 257-268 (1961) .
10. Mengeling, W. L., Gutekunst, D. E., Fernelius, A. L. & Pirtle, E. C. : Demonstration of an antigenic relationship between hog cholera and bovine viral diarrhea viruses by immunofluorescence. Can. J. Comp. Vet. Sci. 27: 162-164 (1963) .
11. Mengeling, W. L., Pirtle, E. C. & 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) .
12. Mengeling, W. L. : Field evaluation of the fluorescent-antibody tissue culture test for diagnosis of hog cholera. *Proc. Book, 101st Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass.* 274—275 (1964) .
 13. Mengeling W. L. & Torrey, J. P. : The diagnosis of hog cholera by the fluorescent antibody technique. Report of the FAO/OIE Intern. Meet. on Hog Cholera and African Swine Fever, Italy, May 31-June 5 (1965) .
 14. Mengeling, W. L. & Torrey, J. P. : Evaluation of the fluorescent antibody-cell culture test for hog cholera diagnosis. *Am. J. Vet. Res.* 28 : 1653—1659 (1967) .
 15. Ressang, A. A. & Bool, P. H. : Swine fever diagnosis. II. The fluorescent antibody technique. *Tijdschr. Diergeneek.* 91 : 1148—1163 (1966) .
 16. Ressang, A. A. & Den Boer, J. L. : A comparison between the cell culture, frozen tissue section, impression and mucosal smear techniques for fluorescent antibody in the diagnosis of hog cholera. *Tijdschr. Diergeneesk.* 92 : 567—586 (1967) .
 17. Robertson, A., Greig, A. S., Appel, M., Girard, A., Bannister, G. L. & Boulanger, P. : Hog cholera. IV. Detection of the virus in tissue culture preparations by the fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29 : 234—241 (1965) .
 18. Robertson, A., Bannister, G. L., Boulanger, P., Appel, M. & Gray, D. P. : Hog cholera. V. Demonstration of the antigen in swine tissues by the fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 29 : 299—305 (1965) .
 19. 佐藤卯三郎、澤田實、松野直治、信藤謙藏 : 扁桃直接塗抹螢光法による豚コレラの早期診断について、*日本獣醫學雑誌*、29 : 70—71 (1967) .
 20. 澤田實、佐藤卯三郎、花木琢磨、信藤謙藏 : 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、I. 豚体内における強毒および弱毒 ウイルス 増殖像の比較、*日本獣醫學雑誌* 28 : 473 (1966).
 21. 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効果における變異、*ウイルス*、15 : 287—288 (1965).
 22. Sirbu, Z., Ieremia, D. & Bona, C. : Immunofluorescent microscopy in the diagnosis of swine fever. *Brit. J.* 120 : 587—591 (1964).
 23. Solorzano, R. F. : An in vitro test for hog cholera. Ph.D. Thesis, Pennsylvania State University, University Park (1962).
 24. Stair, E. L., Rhodes, M. B., Aiken, J. M., Underdahl, N. R. & Young, G. : A hog cholera virus-fluorescent antibody system. Its potential use in study of embryonic infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113 : 656—660 (1963).
 25. Stair, E. L., Rhodes, M. S., Grace, O. D. & Aiken, J. M. : Fluorescent antibody for diagnosis of hog cholera. *Proc. 67th Ann. Meet. U. S. Livestock Sanit. Ass.* 599—606 (1964).
 26. Teebken, D. L., Aiken, J. M. & Twiehaus, M. J. : Differentiation of virulent, attenuated, and inactivated hog cholera viruses by fluorescent-antibody technique. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 150 : 53—58 (1967).

27. Wynohradnyk, V., Cirstet. I., Michoilov, L., Lonita, G. & Monoiu, I.:
Diagnosis of swine fever by using various modifications of the immunofluorescence technique. *Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur.* 4:27-41 (1966).
28. Zimmermann, T.: Immunofluorescent diagnosis of swine fever. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 74:250 | 252 (1967).

照 片 說 明

照片號碼

- 1~8: 感染強毒豬瘟病毒A L D株之 PK-15 細胞螢光染色。
- 1: 感染9小時後, 孤立之感染細胞。
 - 2: 感染12小時後, 成爲2~3個集團之感染細胞。
 - 3: 感染15小時後, 由最初感染之細胞擴大感染至鄰接細胞。
 - 4: 感染18小時後約10個感染細胞成爲集團而形成所謂 Plaque。
 - 5: 感染21小時後, Plaque 之面積擴大。
 - 6: 感染24小時後之 Plaque, Plaque 數最多。
 - 7: 感染2日後之 Plaque, 更增加其面積, 螢光亦更明瞭。
 - 8: 感染3日後 Plaque 擴大而與鄰接 Plaque 融合, 感染擴大至全面, 但螢光稍減弱。
- 9~16: 感染A L D株以S T細胞繼代之 A76 病毒之 PK-15 細胞螢光抗體染色。
- 9: 感染15小時後5、6個感染細胞有微弱螢光。
 - 10: 感染18小時後, 感染細胞之集團螢光較明顯, 已成 Plaque。
 - 11: 感染24小時後感染細胞集團變大 Plaque 容易計數。
 - 12: 感染30小時可能是二次感染之細胞開始飛散, 因而無法計數。
 - 13: 感染30小時後, 二次感染細胞之擴散增加。
 - 14: 感染36小時後, 感染殆及於細胞全面, 但尚有部份未感染細胞。
 - 15: 感染2日後, 呈顯螢光之細胞遍及全面。
 - 16: 感染3日後, 螢光隨時間之經過稍退色。
- 17~24: 感染弱毒豬瘟G P系 E⁺ 之 Pk-15 細胞螢光抗體染色。
- 17: 感染15小時後, 始出現2、3個感染細胞。
 - 18: 感染18小時後, 成爲約10個感染細胞之集團。
 - 19: 感染21小時後感染細胞集團更向周圍擴大。
 - 20: 感染24小時後, 同上向周圍擴大。
 - 21: 感染30小時後二次感染細胞開始向周圍飛散。
 - 22: 感染36小時後, 二次感染細胞散播廣汎。
 - 23: 感染2日後, 二次感染細胞飛散至細胞層全面。
 - 24: 感染3日後, 感染於細胞層全面, 發生強螢光。
- 25~32: 感染弱毒豬瘟病毒G P系 E⁻ 之 PK-15 細胞 37°C 培養螢光抗體染色。
- 25: 感染12小時後孤立之感染細胞。
 - 26: 感染15小時後, 感染波及鄰接細胞。
 - 27: 感染18小時後, 感染向周圍擴大。
 - 28: 感染24小時後, 形成 Plaque, 並開始二次感染。
 - 29: 感染36小時後, 感染向周圍擴散。
 - 30: 感染2日後, 感染擴散至全面。
 - 31: 感染3日後, 未見特別的經時變化。
 - 32: 感染4日後, 僅極少數之細胞殘留螢光, 其他大多數之感染細胞其螢光有消失傾向。
- 33~40: 感染弱毒豬瘟病毒G P系 E⁻ 之PK-15 細胞 30°C 培養螢光抗體染色。
- 33: 感染30小時後, 螢光薄弱之孤立感染細胞。
 - 34: 感染36小時後, 螢光逐漸增強, 並向周圍擴大。
 - 35: 感染1日後, 感染細胞集團更向鄰接細胞擴大, 螢光在細胞質內呈顯顆粒狀爲其特徵。
 - 36: 感染3日後, 感染細胞之集團更擴大。
- 37及38: 感染4日後, 二次感染細胞開始飛散。
- 39: 感染5日後, 同上散佈於細胞全面。
 - 40: 感染6日後, 呈顯感染細胞之大集團, 尤以螢光抗原成顆粒狀爲 30°C 培養之特徵。

