

# 乾燥組織培養豬瘟疫苗製造試驗

## I (HGV-LOA 弱毒疫苗製造及依 END 法作 HCV 證明)

王銘堪、劉焯炎、葉明得 劉義雄、李新進、陳世珍

家畜衛生試驗所

### 一、緒 言

世界各國豬瘟防治用疫苗，起初注重不活化疫苗之發展，最近集中於活毒疫苗的研究，本所有關豬瘟疫苗的研究亦沿此途徑而努力，1964年日本農林省動物醫藥品檢查所佐藤氏等以 CCVP 法製成 LOM 弱毒疫苗後農林省家畜衛生試驗場亦以同法製成 LOA 弱毒株，經試驗結果頗有應用價值，本省於1965年2月及9月奉准向日本索贈該 LOM 疫苗依野外試驗結果堪稱良好，因此農林廳即於1965年9月間延聘日本佐藤博士來臺在本所指導該疫苗之製造試驗事宜並製成75,000劑量，並在本省九縣間行野外應用試驗共72,378頭，其結果堪稱良好。其後本所至目前為止以組織培養法已製成十數批約二百萬劑量並以組織培養 END 法檢討豬瘟病毒之增殖情形，茲將培養製造期間中所得試驗結果報告於後，請各位先進賜予指正。

### 二、實驗材料

(1) 毒株：(A) HCV LOA. LOM strain：由日本農林省贈送的。

(B) 兔化豬瘟弱毒株：由本所保存製造用株。

(C) HCV 強毒 ALD strain：亦由本所保存使用於疫苗檢定攻擊用株。

(D) 由野外採取的病性鑑定材料。

(E) 新城雞瘟病毒：宮寺株通過鵝胚胎所得尿腔液毒，保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 力價 $\text{CEID}_{50}10^{-7.0}$ 。

(2) 組織細胞及牛血清：

(A) 6~9週齡豬睪丸：在臺北區附近採取的一代雜種小豬。

(B) 初生乳公牛之睪丸及腎臟：亦在臺北附近採取的。

(C) 初生小公牛血清，乳牛血清，黃牛血清：經 $56^{\circ}\text{C}$ 30分之非動化後保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

(3) 細胞的培養液配製法：

⊖ PBS (Phosphate Buffered Stock Saline)：

NaCl 80g, KCl 2.0g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  11.5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0g, 再加蒸餾水(以下簡稱純水) 1000ml, 經 10 lbs 10' 滅菌消毒。

⊕ 0.25% Trypsin 液 (Difco製)：

Trypsin 1.0g 加入 PBS 100ml 溶解後，使用細菌濾過器 (B.W. 濾過管) 濾過後，保存於 $-20^{\circ}\text{C}$ ，使用時，用PBS液稀釋4倍成0.25% Trypsin 溶液。

⊕ Hank's 液配製法：

① Stock Solution A: NaCl 160g, KCl 8.0g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4.0g 另取 100ml 純水加入  $\text{CaCl}_2$  4.0g, 使其完全溶解後再加 100ml 純水使全量配成 1000ml。

② Stock Solution B: 純水 800ml,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  3.04g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2g, Glucose 20.0g 加入溶解，再加 0.4% Phenol Red 100ml 及 100ml 純水後使全量成 1000ml (0.4% Phenol Red 配法即 Phenol Red 0.5g 溶解於 N/20 NaOH 70ml 後，再加純水 55ml 即成)。

③ A液及B液混合後每 1000ml 加 Chloroform 5 ml 保存之。

⊕ Earle Stock solution: NaCl 68.0g, KCl 4.0g,  $\text{CaCl}_2$  2.0g,  $\text{MgSO}_4$  1.0g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.25g.

glucose 10.0g, 0.4% Phenol Red 100ml 上述全量溶解於 1000ml 純水。

⑤LH20配製：Hank A 液50ml B液 50ml 加入900ml純水中，再加 Lactalbumin hydrate (Difco製) 5.0g，待溶解後分裝，每支200~300ml，並經10lbs 10' 高壓滅菌即成 LH 液，若加入20%非動化牛血清即成LH20。

(4)細胞消化法及細胞浮游液製法：

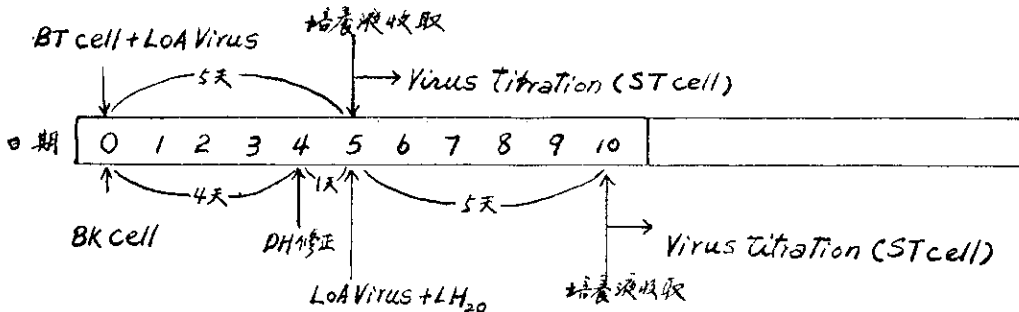
將牛睪丸(BT)、腎臟(BK)或小猪睪丸(ST)包膜白膜剝離後，睪丸組織全部採取，腎臟僅採取皮質部，組織切成小塊，放入置有 Penicillin 1000u/ml, Streptomycin 1000r/ml 之 PBS 中經10分鐘浸漬後把 PBS 倒掉，用剪刀剪碎再放入有攪拌子之小瓶，同時 PBS 進去用攪拌器(Magnetic stirrer) 攪拌洗滌1~2次，棄去PBS，加入0.25% Trypsin 開始行細胞消化，10~20分后靜置沉澱收集其上液(亦即消化細胞液)或放置有冰塊冷卻之 Hank's 液內(放入時需經 150mesh 白鐵製網濾過)上述消化細胞工作重複行數次，直至組織內之細胞完全消化出來為止。消化細胞收集後用 Hank's 液洗滌(與血球洗滌方法相似)並遠心分離 2000r.p.m. 10分鐘棄去上清液，收集沉下細胞如此洗滌三次。細胞收集後以LH20配成細胞浮游液，BT, ST 細胞配成0.8% (有  $2.5 \times 10^6$  細胞數/ml)，BK 配成 1.0%，上述 LH20 液中每ml量加入 Penicillin 100u, Streptomycin 100r，最後分注試管每支 1 ml，分注角瓶每支 15ml，放置於37°C定溫箱內靜置培養。

三、實 驗

1 HCV LOA Strain 培養

用BT細胞時，HCV LOA Strain  $10^{-2}$ /ml 與細胞同時培養，若用 BK細胞時則需先培養細胞待其發育完整後再加LOA Strain培養，培養 5~6 天後即可收取培養液，然後測定其力價(Virus Titer) 以下為HCV LOA strain培養 (BT cell BK cell) 簡圖：

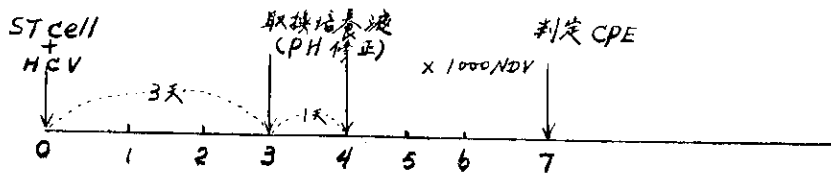
表一A. LoA stain 培養 (BT CELL BK CELL) 略圖：



2 END 法

用 END 法可測定 Virus 之存在及其 titer，其方法即將上述 LOA strain 病毒培養液 (BT 或 BK) 加入於ST細胞浮游液(或稀釋后加入)培養，即每支試管分注 1 ml 放置於 37°C 定溫箱內靜置培養。至第三天取換培養液(亦修正 PH)，至第四、五天再抽出培養液接種  $\times 1000$  NDV 宮寺株雞胚培養之尿液毒(即尿液毒 1 ml 加 LH20 1000ml.) 1 ml 繼續培養三天，在此三天內判定細胞變性現象(Cytopathic effect 簡稱 C.P.E) 至於HCV其他 strain 亦同樣地用此方法測定其 Virus 存在和其力價。

表一B NED 法簡圖



3 培養用牛血清與各 LOT# Cell virus 增殖關係：

即初生乳公牛血清，乳牛血清及黃牛血清與 LOA Strain 培養後之 Virus 增殖力價有何差異之試驗。採取 5 頭初生乳公牛，3 頭乳牛，4 頭 1~2 歲齡黃牛之血清，各作 BT, BK 細胞培養 LOA Virus。製成 12 Lot# Vaccine，次用 END 法測定各 Lot# 之病毒力價，結果如下表：

表二 培養用牛血清與各 Lot—LOA virus 增值關係

製造lot#	牛血清種類	組織細胞	HCV-LOA strain 增殖力價	virus 培養日	培
1	No. 1小公牛	BT	$10^{-0}$	5	
		BK	$10^{-5}$	6	
2	No. 4 "	BT	$10^{-0}$	5	
		BK	$10^{-1}$	5	
3	No. 5 "	"	$10^{-0}$	5	
			$10^{-0}$	6	
4	No. 7 "	"	$10^{-2}$	5	
			$10^{-2.5}$	7	
5	No. 8 "	"	$10^{-1}$	5	
			$10^{-2}$	7	
6	乳牛 A	"	$10^{-0}$	5	
			$10^{-0}$	5	
7	" C	"	$10^{-6.5}$	5	
			$10^{-6.0}$	5	
8	" D	"	$10^{-0}$	5	
			$10^{-0}$	6	
9	黃牛 88 號	"	$10^{-6.25}$	5	
			$10^{-4}$	6	
10	" 29 "	"	$10^{-6.25}$	5	
			$10^{-5.5}$	5	
11	" 69 "	"	$10^{-5.5}$	5	
			$10^{-5.35}$	5	
12	" 89 "	"	$10^{-5.25}$	5	
			$10^{-0.0}$	5	

由上表可看出 5 頭乳小公牛血清僅得一頭  $10^{-0}$  力價，3 頭乳牛亦僅得一頭  $10^{-0}$  力價可供利用，但 4 頭黃牛血清皆在  $10^{-5} \sim 10^{-6.25}$  力價皆可利用。另比較 BT 細胞與 BK 細胞兩者培養之毒力，發現 BT 細胞增殖之毒力高於 BK 細胞。

黃牛係向臺東區農業改良場購入者且其血清與 LOA Virus 作中和試驗結果陰性。（乳牛及小公牛之血清未作中和試驗）。

4 BT Cell, BK Cell 培養 LOA Virus 之一段法與二段法力價增殖的差異。本試驗目的在明瞭 BT, BK 細胞培養之持久性與病毒增殖能力。BT Cell 與  $10^{-8}$ /ml LOA Virus 同時培養，五天後收集病毒培養液此為一段法培養。培養液取出后再加入等量  $LH_{20}$  下去繼續培養，至第五天復收集病毒培養液此為二段法培養。BK 細胞則需先行培養細胞，使其發育完整後接種  $10^{-8}$ /ml LOA Virus 下去培養，5 天後收集培養液（一段法），復加入等量  $LH_{20}$  繼續培養，至第六天收集之（二段法），無論 BK 或 BT 之培養皆採用角瓶每支 15ml 量，一段法二段法培養液分別收集混合之，且各以 END 法測定其力價，結果如下表：

表三 LOA Virus <sup>BT</sup>/<sub>BK</sub> cell 一段法及二段法培養成績表

lot# No.	BT cell virus							titer	BK cell virus							titer			
	10 <sup>0</sup> tube	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-7</sup>	tube	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
一 段 培 養	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	10 <sup>-5.5</sup>	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	10 <sup>-5.75</sup>	
	2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—		2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—		
	3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	⊥		—	3	卅	卅	卅	卅	卅	卅		—
	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	⊥		—	4	卅	卅	卅	卅	卅	—		—
培養 日數	5天								5天										
二 段 培 養	1	卅	—	—	—	—	—	—	10 <sup>-6.5</sup>	1	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	10 <sup>-5.50</sup>	
	2	卅	—	—	—	—	—	—		2	卅	卅	卅	卅	卅	+	—		
	3	⊥	—	—	—	—	—	—		—	3	卅	卅	卅	卅	卅	—		—
	4	⊥	—	—	—	—	—	—		—	4	卅	卅	卅	卅	卅	—		—
培養 日數	5天								6天										

由上表得知BT細胞可行一段法（力價 10<sup>5.5</sup>）培養，若以二段法繼續培養時則病毒無增殖能力，且在二段法培養期間部份培養細胞膜(sheet)已呈脫落現象似乎培養細胞已無再增殖能力。但在BK細胞一段法力價 10<sup>5.75</sup>，二段法仍保持在10<sup>5.25</sup>，且二段法培養後之細胞膜仍健全存在。總之，BT 細胞培養 LOA Virus 僅可行一段法培養，而BK細胞培養 LOA Virus 可行二段法，且一段法，二段法兩者培養後之力價並無顯著之差異。

5. LOA Virus 在 END 法之力價與注射豬隻產生中和抗體之有效力價比較試驗：

LOA strain BK cell 培養 virus 在 END 法力價與注射豬隻產生中和抗體之有效力價之關係如何，採取 Lot#16 BK cell 培養 virus 經 END 法測出其力價 10<sup>5</sup>/1ml 及 Lot#18 BK cell virus 力價 10<sup>5</sup>/ml。使用稀釋液 P.B.S 稀釋至 10<sup>-7</sup>，將各病毒稀釋液注射於小豬耳根部每隻 1 ml（體重 20~22kg），並於 Vaccine 注射前，注射後第10天第14天，第21天分別採血分離血清以 END 法測定其中和抗體產生情形。注射 Vaccine 21天后以強毒 ALD Strain 毒血 10<sup>-2</sup>/ml 攻擊之，其結果如下表：

表四 LOA virus 在 END 法之力價與注射豬隻產生中和抗體有效力價之比較試驗

豬隻號碼	LOA BK cell virus		在 END 法中之 virus Titer	血清中和抗體產生日期			第21天攻擊 ALD 強毒毒血 10 <sup>-2</sup> /ml 之結果	
	Lot#	肌注 1ml		注射前	第10天	第14天		第21天
# 530	Lot#16	10 <sup>0</sup>	10 <sup>5</sup> /1ml	—			○ 觀察21天正常	
# 531	"	10 <sup>-2</sup>	"	—			○ "	
# 532	"	10 <sup>-3</sup>	"	—			○ "	
# 81	"	10 <sup>-4</sup>	"	—	×4	×16	×128	○ "
# 82	"	10 <sup>-5</sup>	"	—	×2	×8	×256	○ "

猪	83	"	$10^{-6}$	"	×2	-	-	-	● <sub>12</sub>	呈典型猪瘟斃死
猪	84	"	$10^{-7}$	"	-	-	-	-	● <sub>10</sub>	"
猪	85	Lot#18	$10^{-0}$	"	-	×8	×32	×256	○	觀察21天正常
猪	86	"	$10^{-3}$	"	-	×8	×32	×256	○	"
猪	87	"	$10^{-4}$	"	-	×4		×8	○	"
猪	88	"	$10^{-5}$	"	-	×4		×32	○	"
猪	89	"	$10^{-6}$	"	×2	-	-	-	● <sub>10</sub>	呈典型猪瘟斃死
猪	90	"	$10^{-7}$	"	×2	-	-	-	● <sub>11</sub>	"

由上表之成績得知在試管裏用END法測出含有 $10^{-5}$ /1ml力價之 Vaccine LOT #16及LOT #18。其 Vaccine 原液之各稀釋液分別接種於小豬，其中和抗體必須在注射後第10天始能產生，且在 $10^{-5}$ 以上的稀釋倍數才能產生中和抗體，而 $10^{-6}$ ， $10^{-7}$ 稀釋倍數至第21天仍保持陰性未產生中和體，於第21天以強毒ALD攻擊之，結果中和抗體在×8以上力價者均可耐過ALD之攻擊，而無中和抗體者全部呈典型猪瘟斃死。以上之成績在END法中力價，與注射猪隻產生中和抗體有效力價皆在 $10^{-6}$ 均相符合。

6 冷凍乾燥疫苗製造及各LOT効力比較與疫苗 Virus titer 測定。將 Hank's 液中加入 Skim-milk 15% lactose 5% Lactalbumin 0.5% 經  $100^{\circ}\text{C}$  25 分間歇滅菌二次，為乾燥疫苗用。使媒劑中含 LOA Virus 量於每一劑量中必有 1000 Pu 以上之 Virus 濃度。20ml 裝之真空乾燥瓶中各分注 1 ml 混合液，經本所冷凍真空乾燥設備行真空乾燥共製出 10 批疫苗。此疫苗依照効力檢定標準對小豬接種行効力檢定及用 END 法測定所含有病毒力價，所得成績如下表：

表五 冷凍乾燥疫苗各 Lot# 効力及疫苗 virus Titer 測定

疫苗 Lot#No	注射量	小豬注射頭數	疫苗注射后觀察日數	ALD強毒攻擊量	觀察14天之結果	病毒力價
4	1Dose/2cc s.c.	2 隻	10天	$10^{-2}$ /ml s.c.	無反應。免疫	$10^{-4.0}$
5	"	"	"	"	"	$10^{-4.0}$
6	"	"	"	"	"	$10^{-3.0}$
7	"	"	"	"	"	$10^{-3.75}$
8	"	"	"	"	"	$10^{-3.0}$
9	"	"	"	"	"	$10^{-3.75}$
10	"	"	"	"	"	$10^{-3.0}$
11	"	"	"	"	"	$10^{-3.5}$
18	"	"	"	"	"	$10^{-4.0}$
27	"	"	"	"	"	$10^{-3.0}$
對 照 組		7 6 8 9 4 隻			發病斃死	

由上表得知供試乾燥疫苗每劑量注射於小豬均無任何反應，且注射后第10天用 $10^{-2}$ /ml 強毒ALD毒力攻擊，攻擊后作14天觀察，供試組均健存且無任何反應，對照組則呈典型猪瘟症狀斃死。用 END 法所測得之病毒力價保持在 $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ 範圍。

7 猪隻注射疫苗後之免疫發生日期及中和抗體產生情形。將組織疫苗注射猪隻於第 3. 4. 5. 6. 7 天每組 2 頭分別以強毒 ALD $10^{-2}$ /ml 毒血 1 ml 皮下注射攻擊，注射後觀察免疫產生情形並於疫苗注射前，各組的強毒攻擊前及強毒攻擊後第 14 天各採取血清用 END 法作中和抗體之測定。每組被檢血清各自混合後經 56°C 30 分非動化後以 Hank's 液作二倍稀釋法稀釋，各稀釋倍數血清 0.5 ml 各加入 0.5 ml ALD STTC-5 代之培養液 (END 法 titer 100 TCID $50$ /0.5 ml) 於 37°C 的溫水浴中感作 1 小時，次從各稀釋倍數血清中取 0.1 ml 加入 0.8% ST 細胞浮游液 0.9 ml 同時培養，結果如下表：

表六 猪隻注射疫苗后之免疫發生日期及中和抗體產生情形

疫苗注射后	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天	對 照	備 註
使用頭數及其結果	● 10 ● 11	⊙ ⊙	○ ○	○ ○	○ ○	● 6 ● 8	○ 無反應耐過生存 ● 發病后至斃死口數
× 128				⊙			⊙ 呈中度者反應
× 64		⊙					⊗ 疫苗注射前
× 32							△ 強毒攻擊前
× 16			⊙		⊙		⊙ 強毒攻擊后 14 天
× 8							
× 4							
× 2							
× 0	⊗ △	⊗ △	⊗ △	⊗ △	⊗ △		

由上表得知疫苗注射后第四天組雖可耐過猪痘強毒 ALD 株之攻擊，但呈中度之熱反應，而第五天以後各組均無任何反應獲得免疫。又中和抗體產生情形於疫苗注射後第 3. 4. 5. 6. 7 天均與注射前同樣呈陰性而經強毒攻擊后第 14 天始能檢出，檢出之中和抗體價最低為 × 16，最高達至 × 128 以上，由此看來，疫苗注射后第七天以前要檢出中和抗體似乎過早。

8 強毒 ALD 株、弱毒株及野外毒用 END 法證明 HCV 之試驗：為了明瞭 HCV 強毒 ALD、野外毒、弱毒 LOA 株、免化毒等不同的毒株，其出現 CPE 的時間與所用不同成份的 medium 以及攻擊用之 NDV 不同濃度之間的關係而作以下之試驗。

(1) 將 ALD 株毒血，LOA 株 BK 細胞培養液，免化脾臟毒分別用 Hank's 液作 10 倍稀釋法稀釋  $10^{-1}$  ~  $10^{-7}$ 。每階段使用 4 支試管，每支試管加入 0.1 ml 病毒稀釋液再加入 1 ml, 0.5% ST 細胞浮游液，放置於 37°C 定溫箱內靜置培養。第三天換 medium，第四天分別加入 NDV 窩寺株 × 1000 (LH $_{20}$  medium + NDV  $10^{-3}$ /ml) 組及 × 100 組 (LH $_{20}$  medium +  $10^{-2}$ /ml) 攻擊，攻擊后分別於第 24, 48, 72 小時觀察 CPE 現象。× 1000 NDV 組與 × 100 NDV 組兩者力價及 HA 力價結果如表七：

表七 強毒 ALD 株，弱毒株及野外毒用 END 法證明 HCV 之試驗

(LH $_{20}$  medium NDV  $10^{-3}$ /ml.) (LH $_{20}$  medium NDV  $10^{-2}$ /ml.)

Virus 種別	判定時間	Tube	Virus 稀釋度							Titer	Virus 稀釋度							Titer
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$		$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	
ALD 毒 血	24	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-		
		2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-		
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

HA Titer	48	1	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-	$10^{-3.25}$		
		2	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
		3	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
		4	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
	72	1	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
		2	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
		3	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
		4	卅	卅	卅	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	-	-	-			
	HA Titer			40	40	40	5	5	5	5	40	40	40	5	5	5			
	LOABK cell Virus	24	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		-	$10^{-6.0}$
			2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-		-	
			3	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	
4			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
48		1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-			
		2	卅	卅	卅	卅	+	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-			
		3	卅	卅	卅	+	+	+	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	-			
		4	卅	卅	卅	+	+	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	+	-			
72		1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-			
		2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-			
		3	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-			
		4	卅	卅	卅	卅	+	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-			
HA Titer			40	40	40		5		40	40	40		5		5				
兔化毒 (家兔脾臟)	24	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$10^{-6}$			
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	48	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	72	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
HA Titer			5			5		5		5			5		5				

由上表得知HCV強毒ALD株與弱毒LOA株用END法在NDV  $10^{-3}/ml$ 與NDV  $10^{-2}/ml$ 之間並無差異，唯兔化毒用END法似難成立。而CPE現象出現時間均在48小時以後，且48小時至72小時CPE出現情形並無顯著之差異，但在病毒力價上 $\times 100$  NDV純 ( $NDV 10^{-2}/ml$ ) 比 $\times 1000$  NDV ( $NDV 10^{-3}/ml$ ) 組低 $10^{-0.25}$ 又出現CPE + 陽性或CPE - 陰性，試管取出培養液做HA test T測其HA價，結果CPE陽性全為 $\times 40$ ，CPE - 陰性全為 $\times 5$ 。

(2)依照上述試驗方法以END法 ( $\times 1000$  NDV 攻擊) 測定ALD ST cell-Virus. LOA BK

cell Virus，兔化豬瘟弱毒株 ST cell-一代 Virus 及野外採取毒 1 號、2 號、3 號，其成績結果如下表：

表八 END 法測定 HCV 之力價

Virus 種 別	判定 時間	Tube	Virus 稀 釋 度							CPE Titer
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
ALD ST-1	72	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	10 <sup>-5.7</sup>
		2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	
		3	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	
		4	卅	卅	卅	卅	+	—	—	
LOA BK	72	1	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	10 <sup>-6.25</sup>
		2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	
		3	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	
		4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	
兔化豬瘟病毒 ST-1	72	1	—	—	—	—	—	—	—	10 <sup>0</sup>
		2	—	—	—	—	—	—	—	
		3	—	—	—	—	—	—	—	
		4	—	—	—	—	—	—	—	
野外採取1號(口)	72	1	卅	卅	—	—	—	—	—	10 <sup>-2.0</sup>
		2	卅	+	—	—	—	—	—	
		3	卅	+	—	—	—	—	—	
		4	卅	+	—	—	—	—	—	
野外採取2號(血)	72	1	卅	卅	卅	卅	—	—	—	10 <sup>-3.75</sup>
		2	卅	卅	卅	+	—	—	—	
		3	卅	卅	卅	+	—	—	—	
		4	卅	卅	+	—	—	—	—	
野外採取3號(嘉溪)	72	1	—	—	—	—	—	—	—	10 <sup>0</sup>
		2	—	—	—	—	—	—	—	
		3	—	—	—	—	—	—	—	
		4	—	—	—	—	—	—	—	

由上表得知，於 ALD、LOA、野外毒等株均可用 END 法來測定，但兔化毒經 ST 細胞一代培養之 Virus 仍呈陰性。又野外毒 Virus 用 END 法測出陽性者 1 號 2 號與小豬接種所得之成績均相符合。野外 3 號係非豬瘟。

9 豬瘟人工感染豬隻血液中病毒證明日期及各臟器 HCV 證明率。

將一頭小豬用強毒 ALD 毒血 10<sup>-2</sup>/ml，注射后分別於第 2、3、4、5、6、7、8 天採取血液分離血清用 END 法檢出病毒出現日期及小豬斃死后採取各臟器做 HCV 之證明，試驗結果如下表：





抗體的產生在疫苗注射後第 3, 4, 5, 6, 7 天均與疫苗注射前同樣保持陰性第 10 天後始有產生且達至  $\times 2 \sim \times 8$ ，第 14 天達至  $\times 8 \sim \times 32$  第 21 天  $\times 8 \sim \times 256$  以上。如在疫苗注射後第 3, 4, 5, 6, 7 天以強毒攻擊之，攻擊後第 14 天其中和抗體在  $\times 16 \sim \times 128$  以上，但在疫苗注射後第七天以前檢查中和抗體似乎為時過早。

(4) 取 2 批 LOA BK cell virus 依 END 法測定含有  $10^{-5}$ /ml 力價 Virus 與其 Virus 稀釋液  $10^{-0}, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$  之各 Virus 稀釋液注射小豬每隻 1 ml，注射後第 21 天攻擊強毒 ALD  $10^{-5}$ /ml 結果供試二批中  $10^{-4} \sim 10^{-5}$  稀釋液分別注射豬隻且經攻擊後均無任何反應耐過，但稀釋  $10^{-6} \sim 10^{-7}$  之階段稀釋液接種豬隻經攻擊強毒後呈發典型豬癩斃死。由此可知以 END 法測出之力價與注射豬隻有效力價皆為  $10^{-5}$ /ml 亦均相符合。

## 五、結 論

依照佐藤氏方法試製組織培養豬癩疫苗及依 END 法作豬癩病毒證明得下列結論：

1. 試製之 LOA 豬癩疫苗其免疫效力甚佳，對豬隻之有效量與試驗管內 END 法檢出之毒力價相符。加媒劑行乾燥後尚能保持每劑量含 1,000 P.U. 以上力價。
2. 培養用牛血清須選用中和抗體陰性者，BK 細胞可作二段培養，BT 則不適合供作二段培養。
3. 組織培養 LOA 豬癩疫苗注射於豬隻後第七天尚無法檢出中和抗體，要到第 10 天以後始可檢出，至 3 週時達最高，但接種後第 4 天至第 5 天即能對強毒 ALD 株之攻擊耐過。
4. END 法可證明 ALD 株、LOA 株、野外毒，但對退化毒之證明尚有困難。

## 致 謝

本試驗承蒙佐藤卯三郎先生直接指導謹申謝忱。

## 參 考 文 獻

1. U. Sato, Y. Nishimura, T. Hanaki and K. Nobuto: Bull. off. int. Epiz; 1964. 61(1. 2). 15-35.
2. T. Shimizu, T. Kumagai, S. Ikeda and M. Matumoto: Arch. Ges. Virusforsch., 14 697-699 (1964)
3. U. Sato, Y. Nishimura, T. Hanaki and Nobuto: Arch. Ges. Virusforsch. 14 395-403 (1964)

## Studies on Production of Dried Tissue Cultured Hog Cholera Vaccine

### ( I ) Production of low HCV LOA strain Vaccine and measurement of HCV by END method

M.K. Wang, J.Y. Liu, M.T. Yeh, Y.S. Liu, S.C. Lee and S.C. Cheng

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

#### ENGLISH SUMMARY

1. The immunizing value of Hog Cholera LOA strain Vaccine is highly Produced. The vaccines have same results between the effective dose in swine and the measuring value in vitro method (END method).
2. The bovine serum used for tissue cultured had to be neutralizing antibody negative. BK cell of two Grade culture could be obtained, but BT cell couldn't
3. The neutralizing antibody couldn't be detected after 7th day of injecting with tissue cultured Hog Cholera LOA strain Vaccine in swine. It was observed after the 10th day and the highest point at the 3rd week and could against challenged with Virulent Hog Cholera virus ALD strain.
- 4 Strains of ALD, LOA and nature were detected by END method, but the lapinized strain wasn't.