

新城雞瘟鴨胚化活毒疫苗之研究

(2) 冷凍乾燥疫苗之製造，效力測定及毒株之組織培養細胞繼代*

楊喜金 劉熾炎 劉義雄

臺灣省家畜衛生試驗所

一、緒 言

關於新城雞瘟鴨胚化活毒疫苗之研究，從第一報試驗結果中得悉，以鴨胚化減毒所得之供試毒株，對雞隻施行滴鼻或肌肉接種時，都能賦予高度免疫，惟以本供試毒所製成之水劑性疫苗，由於保存期間之短暫，而在野外實際應用時甚感不便，故於民國 54 年間再蒙農復會補助經費，進行冷凍乾燥疫苗之製造試驗。

本試驗報告分為二部份，其一為疫苗之冷凍乾燥製造試驗，此項之主要目的係選擇及比較單項添加媒劑，對病毒保存性之優劣。其二為供試毒株之組織培養細胞之繼代，筆者等曾在第一報¹⁾中提及關於利用組織培養細胞繼代之事，故吾等使用豬隻睪丸發育細胞作接種試驗，另一方面亦使用小牛腎發育細胞作長期性培養，如此繼續培養至第20日以後之培養液，雖對雞紅血球不呈 HA 凝集反應，但以雞胚胎接種時，第90日的培養液仍能證明病毒之存在。茲將筆者等所得結果報告於後，敬請諸先進惠賜指正。

二、試驗材料藥品及儀器

A材 料

1. 供試毒株：本所弱毒 Strain, EID₅₀10^{-9.1}。
2. 鴨胚胎：用淡水附近榮鴨羣購之受精種卵，毒株之接種通常使用10~14日間之胚胎，接種部位為脈絡膜尿囊。
3. 供試雞隻：由淡水附近購入未經注射新城雞瘟任何疫苗之八週齡中雞，供試雞隻於試驗前，全部施行血清反應，認為無含新城雞瘟 HI 抗體及無患慢性呼吸器疾病者始供為試驗之用。
4. 攻擊毒：由日本農林省家畜衛生試驗場所分讓之新城雞瘟佐藤株雞體通過毒，八週齡中雞攻擊時肌肉注射1:100腦乳劑之0.5c.c.。

B藥 品

1. 酵母精 (Yeast extract)：係由美國 Baltmor Biological laboratory 出品。
2. 脫脂乳粉：從市面購入者。
3. 葡萄糖：日本和光純藥株式會社出品。
4. 健牛血清：從本所健康牛採取，56°C30分鐘非働化後使用之。
5. 乾冰：應用前從臺北購入。
6. 丙酮：係粗製 Acetone。

C儀 器

1. 冷凍乾燥機：係 Stokes freeze drying equipment, F.J stokes machine company, philadelphia 20, PA USA 出品之小型冷凍乾燥機。
2. 真空瓶：10 ml. 裝硬質冷凍真空用安瓶。

*本報告摘要已於54年12月在臺灣省畜牧獸醫學年會上提出報告。

三、試驗方法及結果

A 疫苗之配製：

1. 添加媒劑之配製：本試驗所用添加媒劑，如上所述計有脫脂乳粉，酵母精，葡萄糖，健牛血清及四種混合者。使用濃度為：脫脂乳粉以蒸溜水配成30%，再以100°C Koch 30分鐘，間隔消毒三次。酵母精以蒸溜水配成50%以100°C Koch 30分鐘消毒一次。葡萄糖以蒸溜水配成50%以100°C Koch 30分鐘消毒一次。健牛血清無菌採取後以56°C 電氣恒溫槽30分鐘非礪化後使用之。上項添加媒劑使用前一直存放於4~8°C之冰箱中。

2. 乳劑之配製：以本所弱毒之稀釋毒液，注入孵化12日之鴨胚胎，接種胚胎斃死後暫存於4°C 冰箱，然後無菌採取尿液及胚胎，所得胚胎以磨碎器充份磨碎後，行2,000 r.p.m 20分鐘遠心分離，然後取其上清液與尿液混合使用，乳劑之EID₅₀ 為10^{-8.1}，HA titer 為1:2,560，使用前一直保存於-20°C之冰箱中。

3. 疫苗之配製：上述各項媒劑一分加乳劑一分，每安瓶分裝1.0cc。至於混合者為30% Skimmilk，50% yeast extract，50% dextrose，bovine serum 各等混合液之一分加一分之乳劑所成者。

4. 疫苗之冷凍乾燥：本試驗中所使用之冷凍機為美國 F.J stockes machine company 出品之 stokes freeze-drying 小型冷凍乾燥機，乾燥前每一安瓶分注1.0cc，然後置於丙酮液與乾冰中行先預備凍結，直至冷凍機箱內溫度達-40°C 以下，真空度至真空表300左右時，將預備凍結之材料接進冷凍機行真空乾燥。茲將供試五種媒劑之乾燥情形述如表1。

表1 各種添加媒劑乾燥情形之比較

媒 劑 別	乾燥快慢比較	乾燥成品肉眼上之觀察
健牛血清	1	黃色塊狀美觀、乾燥快、乾燥情形良好。
30% 脫脂乳粉	2	呈乳白色，乾燥情形快。
混合媒劑	3	淡黃褐色，含有些氣泡。
50% 葡萄糖	4	無色，乾燥情形慢。
50% 酵母精	5	黃褐色存有氣泡，不美觀乾燥情形五種中最慢。

註：1~5係五種媒劑中以 Stockes 小型冷凍機乾燥時之優劣順序。

B 乾燥疫苗對鷄隻之效力測定：

1. 乾燥保存疫苗對鷄隻之免疫效力：

本試驗之主要項目為測定個別媒劑對病毒保存性之優劣，故試驗時以生理食鹽水10倍稀釋法測定之。上述五種媒劑中因添加 Dextrose 者未列入試驗外，其餘四種不同媒劑疫苗分別保存於28°C~30°C 室溫，4°C~8°C之普通水箱及-20°C之凍結水箱中。使用鷄隻為8~10週齡之中雞，接種前全部經血清檢查認為無含新城雞瘟 HI 抗體者始供為接種。茲將所得結果述如表2。

表2 各不同媒劑疫苗對鷄隻之免疫效力

保存別	保存期間	媒劑別	接種別及劑量	稀 釋 倍 數						
				10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	15 ⁻⁶	10 ⁻⁷
-18°C	採取當時	無加媒劑	im 1.0cc.			5/5	6/6	5/5	4/5	2/5

28°C~30°C	四個月	混合煤劑	im 1.0cc	5/5	5/5	5/5					
		脫脂乳粉	" "	4/5	5/5	5/5					
		健牛血清	" "	5/5	5/5	0/5					
室溫保存	六個月	酵母精	im "			3/5	4/5				
		"	in "		0/5	0/5					
		健牛血清	im "			1/5	1/5				
		"	in "		0/5	0/5					
4°C~8°C	三個月	混合煤劑	im "	5/5	5/5	5/5	5/5				
		"	in "	5/5	5/5						
		脫脂乳粉	im "	5/5	5/5	5/5	5/5				
		"	in "	5/5	5/5						
		健牛血清	im "	5/5	5/5	5/5	5/5				
		"	in "	3/5							
冰 箱	六個月	混合煤劑	im "			5/5	5/5	2/5			
		"	in "		5/5	4/5					
		脫脂乳粉	im "				3/5	3/5			
		"	in "		5/5	3/5					
		健牛血清	im "				3/5	0/5			
		"	im "	2/5	0/5						
	九個半月	酵母精	im "				5/5	5/5			
		混合煤劑	im "			5/5	5/5				
		脫脂乳粉	im "			5/5	5/5				
		健牛血清	im "			4/4	5/5				
-20°C	七個月	酵母精	im "					5/5	5/5	4/5	
		脫脂乳粉	im "					5/5	4/5	1/5	
冷凍冰箱	九個半月	酵母精	im "					5/5	5/5		
		混合煤劑	im "					4/4	4/4		
		脫脂乳粉	im "				4/4	4/4			
		健牛血清	im "			4/4	4/5				

註：1.分母為供攻擊隻數，分子為攻擊後生存隻數。

2.攻擊毒為佐藤株1:100腦乳劑之0.5c.c.。

3.im 為肌肉注射，in 為滴鼻接種。

依表2成績所示，①單項煤劑製成之疫苗，在室溫保存有效期間為四個月，保存至六個月者其效力已漸為降低，以添加之煤劑別論之混合煤劑以及脫脂乳粉者較優，健牛血清者則差。②4°C~8°C冰箱保存三個月者，滴鼻接種及肌肉注射之成績均優，保存至六個月時，滴鼻接種與肌肉注射間之效力已有差異。通常肌肉注射之最低有效劑量較滴鼻接種者高10—100倍，以添加煤劑別論之，仍為混合煤劑者較脫脂乳粉者為優，而血清者較差。③乾燥後保存於-20°C冷凍冰箱九個半月者，其對中雞之免疫效力，仍甚良好。

2.供試毒株為雞隻鴨胚胎及胚胎組織細胞間ID₅₀之比較：

為欲明瞭上述三者間ID₅₀之關係，茲將供試毒株以滅菌生理食鹽水行1:10稀釋法測定之，使用雞隻為8~10週齡中雞，每隻於肌肉內注入1.0cc.，每一稀釋單位注射五隻，接種後第10日行強毒攻擊，然再繼續觀察10日計算其免疫指數。鴨胚胎係使用孵化第12日者，每枚胚胎於尿膜囊腔內注入0.1cc.，(胚胎細

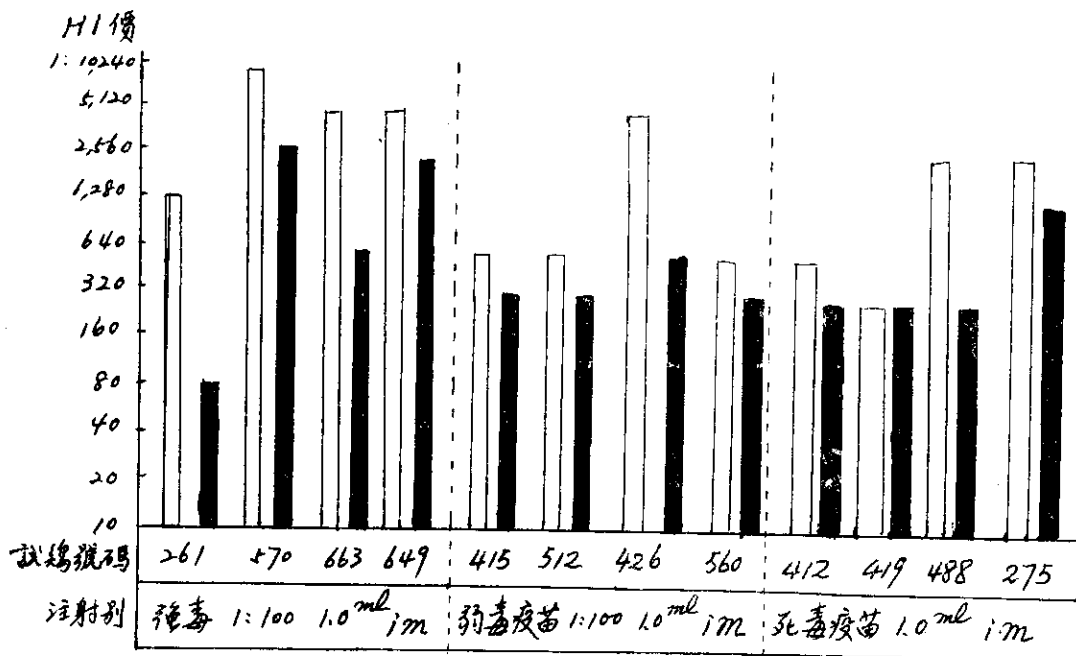
註：表 4 之 HI 抗體力價測定係採本所之方法，第 1 管 1:10 係為血清對照，第 2 管以下 (1:20) 為含有 4u 的凝集價抗原，表中倍數為終末倍數。

依表 4 成績所示：①幼齡雛由母體移行之血中 HI 自然抗體通常於孵出三週後已漸消失，而抗體消失之快慢與母雞 HI 力價之高低有密切關係，母雞力價較高者消失時間慢，反之低者則消失較快。如以週齡別論之，較幼齡者其 HI 抗體較高，反之則較低。②接種前含有 HI 抗體之雞，經活毒疫苗免疫後，則互相抵消，而 24 日齡接種前無含 HI 抗體之雞，以活毒疫苗接種時，其 HI 抗體之產生則比 17 日齡雛以下為高。筆者等對於這項試驗的結果與官本猛氏之試驗結果一致。③依表 4 成績所示小雛之接種適齡似於孵出後三週或以上為妥。

4. 新城雞瘟疫苗短期間重復注射之試驗：(9.7)

a 由表 4 之成績得知雞體含有 HI 抗體時，施行疫苗之接種似不甚理想，故筆者等特選新城雞瘟活毒疫苗接種，而經強毒攻擊耐過雞隻，其 HI 力價均在 1:320 倍以上者再行檢討，試驗雞分為三組，每組四隻，第一組以新城雞瘟攻擊用佐藤株強毒 (腦乳劑 1:100 之 1.0c.c.) 肌肉注射。第二組以弱毒疫苗 1:100 之 1.0c.c. 肌肉注射，第三組以不活化疫苗 1.0cc. 肌肉注射，上述試雞於注射後第 10 日再行採血測定 HI 力價，所得結果述如表 5。

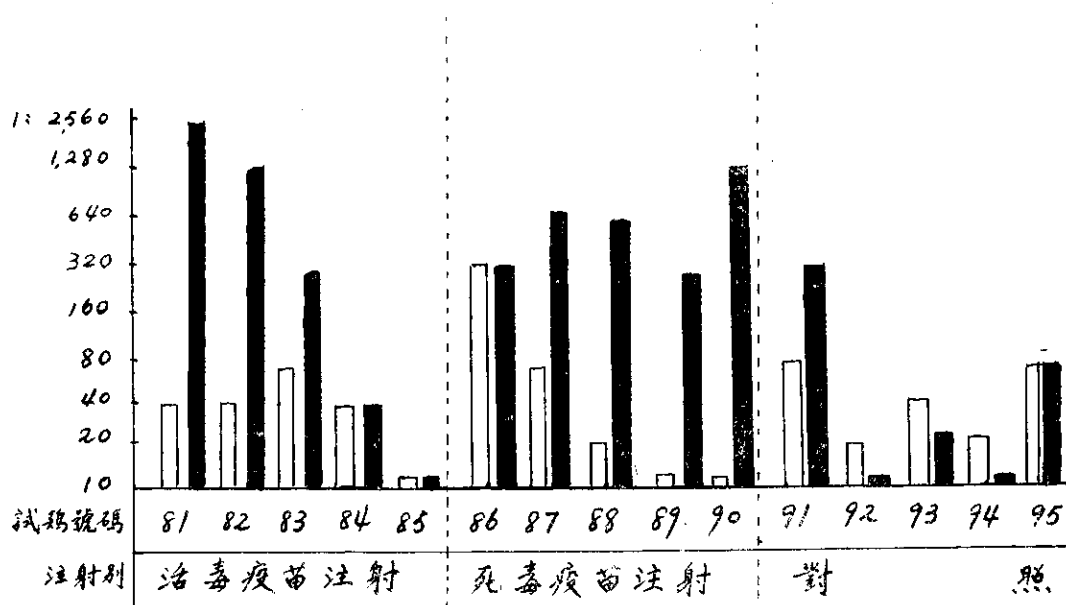
表 5 新城雞瘟疫苗短期間重復注射之 HI 力價比較



- 註：1. 血清反應方法如表 4。
 2. □ 為試雞重接種前血中 HI 抗體。
 3. ■ 為試雞重接種後血中 HI 抗體。

b 筆者等作了表 4 及表 5 之試驗後，又以一個月以後小雞作同樣的一個測定。供試雞為孵後 30 日之發育良好肉雞，接種前 HI 抗體皆呈陰性，然以活毒疫苗接種，疫苗注射第二個半月時，再與表 5 一樣，將試雞分為三羣，第一組以活毒疫苗重注射，第二組以死毒疫苗注射，第三組為對照 (只於第 30 日齡時以活毒疫苗注射一次者)。茲將第二次注射第 10 日之 HI 抗體比較如表 6

表 6 中鷄相隔二個半月疫苗接種之 HI 價比較



註：1.血清反應方法如表 4。

2.對照組試鷄隻僅於30日齡時注射活毒疫苗一次者，而表中 HI 抗體為自然消失情形。

依表 5.6. 之成績得到以下幾個結論，①活毒以及死毒疫苗接種前，鷄體之 HI 抗體力價如在 1:320 以上時，經疫苗注射後之 HI 抗體大都會呈下降，1:320 者保持原狀。②相反的注射前 HI 抗體在 1:160 以下者，經疫苗注射後之 HI 抗體都呈上昇現象。③依表 6 成績論之，小雛鷄一個月時無論注射活毒或死毒疫苗，而 5~4 個月以後重複注射時，其所獲得之免疫效力甚為理想。

5.乾燥疫苗對各不同齡鷄隻間之安全性。

將製妥之冷凍乾燥疫苗，對各不同齡鷄隻施行野外接種試驗，供試鷄隻每隻肌肉注射 1,000~10,000 Pu (有效力價) 之疫苗，注射後觀察 15 日，觀察期間將反應及斃死隻數以數字記載，然後計算結果，表中之試驗鷄隻乃在各不同地區所測定之總和，茲將結果述如表 7 及表 8。

表 7 乾燥疫苗對鷄隻週齡別之安全性

鷄 齡	接 種 鷄 別	反 應 別	觀 察 日 數															計	%	備 註	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				
3~4週	肉 鷄	反應隻數	7	5	6	10	20	22	7	4								71	1.80	未曾注 入任何 新城鷄 痘疫苗	
		斃死隻數																	○		○
		供試隻數	3,930																		
2週齡	卵 用 種 鷄	反應隻數																○	○	" "	
		斃死隻數																○	○		
		供試隻數	1,800																		

6~8週	肉 雞	反應隻數	4 3 7 14 17 26 7 5	83	5.53	3~4週 齡滴入 外國製 新城疫 苗
		斃死隻數	1 10 3	14	0.93	
		供試隻數	1,500			
5個月齡	種 雞	反應隻數	2 3 1 7 2 2 3	20	1.39	未曾注 入任何 新城疫 苗
		斃死隻數	1 2 2 3	8	0.55	
		供試隻數	1,430			

表 7 中供試的五個月齡雞隻，於疫苗接種前選20隻檢查血中 HI 抗體，結果皆呈陰性，疫苗接種後第10日再測定該20隻雞之 HI 抗體結果為：均在1:320以上。

表 8 媒劑別對雞隻之安全性

媒劑別	雞 齡 及雞種	反 應 別	觀 察 日 數													計	%		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			14	15
25% 酵母精	三週肉 雞及成 雞	反應隻數	3	2	1	4	5	15	5	3							38	2.81	
		斃死隻數									1	2						3	0.22
		供試隻數	1,350																
50% 酵母精	五個月 卵 雞	反應隻數			2		1		2		1	1						7	2.33
		斃死隻數							1						2	3	1.0		
		供試隻數	300																
15% 脫脂乳粉	三週肉 雞	反應隻數	1		1	1	15	1	1	1							21	2.33	
		斃死隻數																	
		供試隻數	900																
30% 脫脂乳粉	五個月 卵 雞	反應隻數										2						2	0.66
		斃死隻數											1					1	0.33
		供試隻數	300																
25% 乳 糖	五個月 卵 雞	反應隻數								2		1						3	0.78
		斃死隻數									1							1	0.26
		供試隻數	380																
50% 乳 糖	三週肉 雞	反應隻數				1		3		1	1						6	1	
		斃死隻數																	
		供試隻數	600																
混合媒劑 A	四週肉 雞	反應隻數	1		1	1	2	4								9	1		
		斃死隻數																	
		供試隻數	900																

混合媒劑 B	四週內 雞	反應隻數	2 4 2 3	11	2.2
		斃死隻數			
		供試隻數	500		

表 8 的反應及斃死率乃為野外試驗之成績，由本表所示，單項媒劑的反應率以酵母精較高，脫脂乳粉為次，乳糖者為低。以斃死率論之，乾燥疫苗之百分率比水劑疫苗者為低(1)。

6. 疫苗稀釋後之保存性

將弱毒原液分別以 0.85% 之滅菌生理鹽水，5% 之滅菌 Glucose 及組織培養用之 Hank's solution 行 10 倍稀釋，稀釋後分別保存於 23~25°C 之室溫，4~8°C 之普通冰箱及 -18°C 之冷凍冰箱中，然後於一定時間取出對雞隻測定免疫效力，所得結果述如表 9。

表 9 疫苗稀釋之保存時間對雞隻之免疫效力

保存時間	保存溫度	稀釋液別	稀釋倍數		
			10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4 小時	23~25°C 室溫	0.85% Saline 5% Glucose Hank's solution		5/5 5/5 5/5	2/5 2/5 4/5
	23~25°C 室溫	0.85% Saline 5% Glucose Hank's solution	5/5 5/5 5/5	5/5 5/5 5/5	
8 小時	4~8°C 冰箱	0.85% Saline 5% Glucose Hank's solution		5/5 5/5 4/5	4/5 4/5 5/5
	-18°C 冷凍冰箱	0.85% Saline 5% Glucose Hank's solution		5/5 5/5 5/5	4/5 5/5 5/5

註：如表 3 之註脚 (1~2)。

依表 9 之成績所示，供試毒株以 0.85% 之 Saline，5% 之 Glucose，及 Hank's solution 稀釋後保存於三種不同溫度下者，在 8 小時以內之免疫效力並無多大差異。

7. 供試毒株以組織培養細胞之通過試驗^(8,4,6,8,9,10)

1962 年野村吉利^(3,4) 曾報告使用犬腎細胞長期培養新城雞瘟活毒疫苗供試。筆者等亦曾考慮過，利用異種動物之組織細胞，從事對本供試毒株之長期培養時，或許有利於減低雞隻之反應率，因此筆者等利用豬睪丸 (Swine testicle cell 簡稱爲 s.t.) 組織培養細胞作初步繼代試驗。細胞之培養法乃採取胰蛋白酶 (Trypsin) 消化，然後以 LH₂₀ (Lactalbumin hank's solution, 含 20% 牛血清) 配成 0.9% 之細胞浮游液，然後分裝於角瓶置於 37°C 之孵卵器培養 4~5 日，細胞發育後將原來之培養液以真空唧筒抽取廢棄，然後將供試毒株沿着細胞面培養，而暫置於室溫感作 30 分鐘，再將新配之 LH₂₀ 加至原來之量，毒株接種後於 37°C 之孵卵器繼續培養 4~5 日。然後將其發育增殖液抽取，對雞隻施行野外試驗，供試雞隻為 3~4 週齡未曾注過新城雞瘟疫苗小雞 1,500 隻，注射後 15 日內並無發現反應及斃死等情形，疫苗注射後第 20 日效力測定結果述如下表。

表10 猪睪丸組織細胞繼代病毒增殖液對鷄隻之免疫效力

試 鷄 別	培 養 代 數	接 種 量	結 果	對 照
三個月齡種鷄	S.T-1	1:500 0.2ml im	○ ○ ○ ○ ○ ○ ⊗ ○ ○ ○	⊗ ⊗
四週齡肉鷄	S.T-3	1:1000 0.2ml im	○ ○ ○ ○ ○	⊗ ⊗

註：1.S.T-1~3，為猪睪丸細胞 (Swine testicle) 數字為繼代代數。

2.○為試鷄經強毒攻擊後健存者。

3.⊗為試鷄經強毒攻擊後斃死者。

四、討 論

本報告中之供試毒株，雖以鴨胚胎繼續通過了很久，但對鷄隻之反應率及斃死率仍2~3%之高，故筆者等曾考慮到如能利用組織培養之法，長期培養於異種動物之組織發育細胞中時，或許將會得到更安全的疫苗，上面曾約略述及以猪睪丸細胞初步所得病毒增殖液，對野外鷄隻施行試驗結果觀之，反應率很低，成績似甚理想，這雖只是初步的試驗，但今後如能採用異種動物之腎細胞作長期培養時，將會得到很理想的疫苗的。

關於組織培養之繼代，筆者等曾使用生後一週內之荷蘭小公牛之睪丸及腎臟組織細胞，依Youngner之法行之。睪丸細胞的培養法前已述及，而腎臟細胞之培養操作係將上述小牛的腎臟連同包膜採取後，無菌操作除去包膜，而將腎臟皮質部組織細切，然後以0.25% Trypsin(以再蒸餾水配成1%之 Trypsin 經細菌過濾器過濾之濾液作為原液，原液通常凍結保存於冷凍冰箱中，使用時以 Phosphate buffer solution 配成1:4即0.25%)，在磁性攪拌器上消化5次每次消化15~20分鐘，前三次之消化液廢棄，後二次的消化液以消毒紗布或金屬網過濾後，此濾液再加上2~3倍之冷卻Hank's solution，然後行1,000 r.p.m 5分鐘之遠心分離，其沉澱細胞再與同法遠心分離共計2~3次，最後將所集之細胞以 Growth medium 配成0.9~1%之細胞浮游液，再以適當量分裝於角瓶或試管中，最後靜置於37°C之孵卵器內培養6~7日，等到 Monolayer 形成後抽棄原來培養液，而將供試毒接種於 Cell sheet 上，靜置30分鐘，然後再加原量培養液繼續培養，每培養10日更換一次培養液，為使新的細胞繼續發育，於適當的間隔處用白金耳括成 space，如此腎細胞可以繼續培養4個月以上，不像睪丸細胞易從管壁脫離為其優點。Growth medium 之配方為含有0.5% Lactalbumin hydrolysate 之 Hank's solution 80ml 加 20ml 牛血清，及 100^u/ml 之 Penicillin 與 100^r/ml 之 Streptomycin，細胞發育後之維持培養液，可將20%之健牛血清減至10%，而其餘含量則相同。根據試驗結果供試毒株在90日以上的增殖液中仍能證明病毒之存在。

五、結 論

- 1.單論冷凍乾燥添加媒劑之情形，五種媒劑中，當以健牛血清者最佳，脫脂乳粉次之，而混合媒劑，葡萄糖及酵母精又依序次之。
- 2.單項媒劑對病毒保存性之優劣別論之，除50%之葡萄糖者沒有測定外，四種媒劑中以50%之Yeast extract 及混合乳劑者為最優，Skimmilk 者次之，健牛血清者最差。
- 3.單項媒劑對不同保存溫度之效力別論之，室溫保存之有效期間為4個月，4~8°C 普通冰箱以及一20°C 之冷凍冰箱保存者至10個月其效力仍很好(10個月以上無測定)。
- 4.供試毒株之 TCID₅₀ 與 EID₅₀ 較為接近，而中鷄之防禦力價(P.U)較上述兩者低一稀釋倍數，故鷄隻注射 10TCID₅₀ 或 10EID₅₀ 時就可耐過強毒株之攻擊。

5. 小雞對新城雞瘟活毒疫苗之接種適齡為孵出後三星期或血中 HI 抗體消失時為佳。

6. 表 5 表 6 所示之成績頗能一致，即接種前血中 HI 抗體在 1:320 以上者無論接種何種疫苗（包括強毒）都將原來抗體下降，1:320 者保持原狀，1:160 以下者，其抗體價均呈上昇。

7. 重復注射之相隔適當期間，最好將抗體測定後再行決定，即當 HI 抗體降至 1:320 倍以下時為宜。據過去試驗結果⁽¹⁾論之，活毒疫苗對於中雞肌肉一次注射之 HI 抗體，通常於 3 個月以後仍保持 1:320 左右或以下，故重復注射之相隔時間最快也要三個月以後為宜。

8. 弱毒以異種動物組織細胞繼代培養之增殖液，對雞隻應用之反應率很低，故今後如能採用組織培養繼代製造將會得到更理想的疫苗。而本供試毒能在小牛腎細胞長期培養中繼續增殖 90 日或以上。

9. 本疫苗以 0.85% 之 Saline，5% 之 Glucose，及 Hank's solution 稀釋後之效力並無多大差異，疫苗稀釋後在室溫保存 8 小時以內仍可應用。

本試驗得能順利進行，經費上蒙農復會，農林廳之補助，技術上又蒙黃所長文池，農復會李紹長崇道，林本欽先生，劉永和先生與日本農林省動物醫藥品檢查所佐藤卯三郎先生等之指導，謹表至高謝忱。

參 考 文 獻

1. 楊喜金、劉煥炎、劉義雄：1964，新城雞瘟鴨胚化活毒疫苗之研究(1)本所弱毒株之型別鑑定及水劑疫苗對雞隻之免疫效力，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告第二卷，第 59~73 頁。
2. 宮本猛：1962 年 8 月，ニューカッスル病ワクチン注射法について（特に免疫母雞の雛におけるワクチン効果の抑制作用を中心として），日生研たより，第 9 卷第 8 號，9529~532。
3. 野村吉利：1964 年 5 月，ニューカッスル病生ウイルスワクチンニ關する研究，(1)犬腎細胞長期培養株，ハムスター腎細胞繼代株の作出とその性狀，日生研たより第 11 卷第 5 號，9131~134。
4. 野村吉利：1964 年 7 月，ニューカッスル病生ウイルスワクチンニ關する研究，(11)，各種接種法による生ウイルス免疫能の比較，日生研たより第 11 卷第 7 號，P145~146。
5. 大森常良，原田熊幸、岩科一治、吉村昌吾：1953 年 12 月。補體結合阻止反應に關する研究，Ⅲニューカッスル病について，ウイルス，第 3 卷，第 4 號，9282-286。
6. 分木通裕：1958 年 9 月，ニューカッスル病ウイルスの Hematoxic Effect に就て，ウイルス，第 8 卷，第 5 號，P43-449。
7. 片岡敏明：1961 年 6 月，ニューカッスル病ウイルスの血清學的研究，ウイルス，第 11 卷，第 3 號，P167-176。
8. 林昇：1954 年 9 月，組織培養による Newcastle Disease Virus の培養，1. 鶏胎兒，鶏成體並びに數種の哺乳動物の組織培養における Virus の態度，ウイルス，第 4 卷，第 3 號，P231-238。
9. 林昇、川淳、松澤八郎、佐藤イネ：1958 年 8 月，組織培養による Newcastle Disease Virus の培養，Ⅱ 鶏成體脾臟組織の靜置培養における Virus の態度，ウイルス，第 8 卷，第 4 號，P337-345。
10. 林昇、川淳、松澤八郎、宮本猛：1958 年 12 月，組織培養による Newcastle Disease Virus の培養，Ⅲ，鶏成體脾臟組織の培養液交換培養による Virus の 増殖，ウイルス，第 8 卷第 6 號，P504-509。

Studies on the Production of Duck Embryo-Passaged Newcastle Disease living Vaccine

II. Efficacy of the frozen-dried vaccine and further passage by cell-culture

S. C. Yang, J. Y. Liu and I. S. Liu

Taiwan Provincial Research Institute of Animal Health

ENGLISH SUMMARY

Since 1962, the try of making an attenuated Newcastle disease virus through duck embryo-passage has been performed and the preparation of the wet type vaccine with the virus studied. The primarily results were already described at the first report in 1964.

In this study, the results on freeze-drying the attenuated virus and further passage by cell culture are summarized here under :

1. Among the various media used in the dried vaccine preparation studied has been found that both 25% yeast extract, and the mixture i.e. 50% yeast extract mixed with 30% skimmilk or normal cattle serum and 50% glucose equally mixed, showed better effects but skimmilk or normal cattle serum singly used gave much harmful effect on the viability of the virus.
2. The trial vaccine prepared with 50% yeast extract maintained good effect after 4 months preserved at room temperature (28 to 30° C) and 10 months in refrigerator of 4-8°C even deep freezer of -18°C at the authers' last test.
3. In coparative study of diluents, there were no remarkable differences in potency when the dried samples were reconstituted and diluted respectively with 0.85% saline, 5% glucose and Hank's solution They were still effects after 8 hours preserved at room temperature.
4. The TCID₅₀ value of the attenuated strain to duck embryo tissue culture cell showed 10^{-8.75} almost as high as that of to 12-day-old duck embryos. The protect value of the attenuated virus to 3-month-old chicknen showed 10^{-7.5} and chicks inoculated with 10 TCID₅₀ could protect against the newcastle disease virulent virus.
5. HI antibodies obtained maternally, may gradually disappear at 3-4 weeks after hatching and the period lasted seems to be closely related to the degree of its original titers. Therefore the optimum age of chicks for vaccination with the vaccine Should be at 4 weeks or older.
6. As to the HI antibodies, if the vaccination with the attenuated virus to chicks having 1:320 HI titer or higher, it usually decreases and 1:160 or lowere increases. Therefore the time of revaccination should be done at 4 months after the first vaccination after its HI antibody titer has been dropped to 1:160 or lower.
7. The primary passage-virus to swine testicles showed very little post-vaccinal

reactions but good potency to chickens.

The attenuated virus could also propagate in cattle kidney cells and maintained as long as 90 days only by changing the media every 10 days at the author's last test.

* The outline of this paper was read before the 1966 Annual Meeting of the Taiwan Association of Animal Husbandry and Veterinary Medicine.