

# 組織培養新城雞瘟活毒疫苗製造試驗(第一報)

王銘堪 劉焜炎 葉明得 劉義雄 李新進 陳世珍

家畜衛生試驗所

## 一、諸 言

有關新城雞瘟疫苗之研究甚多，但對組織培養疫苗之應用報告很少，據最近美國 Ban Kowski 教授不使用雞胚胎，即應用豬腎臟組織培養法製造新城雞瘟活毒疫苗，由此組織疫苗可避免因應用雞蛋所發生的白血病，鷄白痢，CRD或其他 Virus 混入之慮，又對雞隻肌肉注射很安全，所以頗受歡迎應用。關於新城雞瘟疫苗之各種動物組織細胞培養研究報告，對 NDV (New Castle Disease Virus) 似乎需在特定組織細胞才能保持其免疫原性，且其培養代數頻度之相關關係亦甚大。

活毒疫苗就過去之經驗確實優於死毒疫苗之效果，但至目前所有活毒疫苗仍未使一般養雞業者所稱頌，筆者等需進一步改進活毒疫苗，將本所之鴨胎化 NDV 弱毒株 TP618 Strain (此株對雞隻仍有 2.4~4.1% 反應) 選擇小鴨腎臟組織細胞 (Duck Kidney 以下簡稱 DK) 繼代培養至 46 代餘，結果對 DK 細胞產生甚高之感受性及富有安全柱之 Virus Strain，將此 Virus 培養液對雞隻效力試驗與測定中和抗體產生情形得相當優異之成績茲擬就製成乾燥疫苗試驗所得結果報告於後，敬請各位先進惠賜指正。

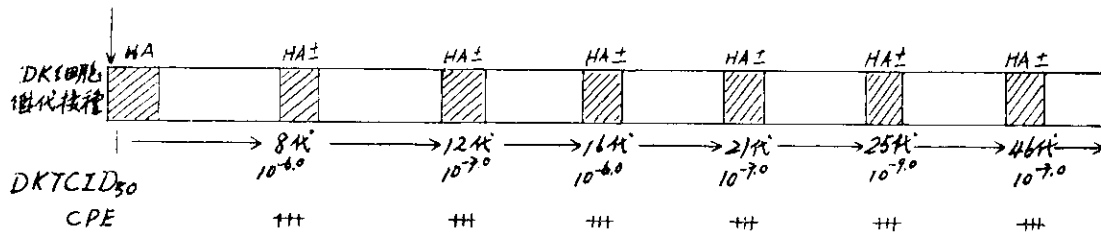
## 二、實驗材料

- 1) 毒 株：(A) 新城雞瘟弱毒株 TP618 係本所經鴨胎接種減毒作成之鴨胎化弱毒株，  
(B) 新城雞瘟強毒佐藤株 (Sato) 係本所新城雞瘟疫苗檢定攻擊用毒經雞隻接種保存者。
- 2) 孵化雞蛋：本所自產無疫苗免疫過母雞所產之雞蛋。
- 3) “ ” 鴨蛋：無抗體鴨隻所產之鴨蛋。
- 4) 雞 隻：本所自產無抗體之雞隻。
- 5) 牛 血 清：經 56°C 30 分非動化之黃牛及乳牛血清。
- 6) 鴨隻腎臟組織細胞培養初生小鴨腎臟 (Duck Kidney 以下簡稱 DK) 採取後放入含有 Penicillin 100u/ml 及 Streptomycin 100r/ml 之 PBS 中殺菌 10 分後取出用剪刀切成小塊再以 PBS 洗滌兩次後加 0.25% trypsin PBS 液置於 Magnetic Stirrer 消化組織細胞，反覆操作數次後，收集消化細胞遠心分離除去上清液再以 Hank's 液洗滌 2~3 次後，將沉澱之細胞配入於 0.5% Lactalbumin，10~15% 牛血清 Hank's 液之培養液內 (即 LH<sup>10-15</sup>) 配成 0.5% DK 細胞浮游液分注入試管或角瓶，試管每支 1 ml，角瓶 15 ml，置於 37°C 孵卵器靜置培養 2~3 天完成了細胞培養後供病毒接種試驗。
- 7) 雞隻腎臟組織細胞培養，使本所自產無 NDV 抗體母雞生產之雞隻體重 (0.5~1.0 kg) 之腎臟 Chicken Kidney 以下簡稱 (CK) 採取後依照 DK cell 培養方法作成後供試病毒培養試驗。

## 三、實驗方法

- 1) 鴨胎化弱毒株 TP618 接種於 DK 單層細胞培養試驗：  
將鴨胎化弱毒株 TP618 DE 626 代漿尿液 Virus 0.1 ml 接種於 DK 細胞培養及繼續繼代培養後，再做細胞變性 (CPE) 及 DK TCID<sub>50</sub> 之測定，HA 價之測定其成績如表 1

表一、鴨胎化弱毒株 TP 618 Virus 用 DK 單層細胞培養之過程  
TP 618 Strain Virus



鴨胎化弱毒株 TP618 接種於 DK 細胞後通常 24~48 小時即呈顯著之 CPE 現象，從 Virus 接種後 48 小時收取培養液接種於 DK 細胞作第二代培養，繼續繼代培養至 36 代，其間之 HA Titer 一直保持「+」現象，而 DK TCID<sub>50</sub> 却漸漸增至 10<sup>-8.0</sup>

2) TP618 DKTC 各代數對雞隻安全性及効力試驗：用 DK cell 繼代培養後，各代數之 Virus 培養液對雞隻之安全性及効力試驗，採取本所自產無疫苗免疫過並經檢查確實無抗體及曾經疫苗注射過母雞所產之雞隻分別注射 DK TD (16~47 代 Virus 培養液試驗其安全性及効力。Virus 培養液之注射量，一律 0.1ml IM (不分大小)，強毒攻擊用之 Virus 係用佐藤株腦毒 10<sup>-2</sup>/ml，一週齡雛雞則減用 10<sup>-3</sup>/ml 量。中雞及成雞於 Virus 培養液注射後第七天攻擊強毒，一週齡雛雞於注射後第 21 天攻擊強毒，所得之成績如表二：

表二 NDV (TP618) DKTC 各代數對小雞安全性及効力試驗

Dktc 代數	培養日數	Dkcell	Virus	雞隻種別	注射量	Virus 稀釋度										對照	備註	
						10 <sup>-0</sup>	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>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>			
16	3	3	成雞	IM 0.1ml	注射後之情形 強毒攻擊結果	—	0/10										2/2	無抗體母雞所產之雞隻
16	3	2	中雞	"	"	"	0/5										1/1	"
20	3	3	"	"	"	"	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	"
21	3	3	一週齡雛	"	"	"	0/10										2/2	"
20	2	3	"	"	"	"	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5				5/5	疫苗注射過母雞所產之雞隻
20	2	3	中雞	"	"	"	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2				2/2	"
35	2	3	"	"	"	"				0/8							2/2	無抗體母雞所產之雞隻
35	2	3	一週齡雛	"	"	"	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7						7/7	"
42	3	3	"	"	"	"	0/6	0/6	0/6	0/18								"
46	3	3	"	"	"	"				0/10								"
47	2	3	"	"	"	"	2/40	0/40										"

\* 分母表試驗隻數。  
分子表發病斃死隻數。

由上表之成績得知 TP618 Strain Virus 通過 DK 細胞培養 16~47 代後之 Virus 培養液注射於無抗體之一週齡雛雞以上之雞隻僅對一週齡雞呈一過性之腳癢痺，食慾減少(2~3 天)恢復者約 0.5~0.75 % 其他均無反應且經強毒攻擊後之効力相當良好，並對中雞効力在  $10^{-7}$  之 Virus 稀釋液仍然有效。

- 3) TP618 DKTC Virus 對孵化雞胚胎及鴨胚胎之感受性：鴨胎馴化毒 TP618 Strain 經 DK cell 培養後對雞胚胎及鴨胚胎之感染性有無變化，用無抗體母雞所產之孵蛋接種比較之結果如表三

表三 TP618 DKTC Virus 對孵化雞胚胎及鴨胚胎之感染性

Virus 別	孵蛋別	孵化日數	ID <sub>50</sub>	斃死時間
TP618 DE632代	雞 蛋	12	$10^{-5.5}$	24~48
DE Virus	鴨 蛋	12	$10^{-5.0}$	24~48
DKTC 30代	雞 蛋	12	$10^{-5.5}$	48~96
cell Virus	鴨 蛋	12	$10^{-5.0}$	48~96

由上表之結果經 DK cell 培養之 Virus 培養液接種於雞胚胎及鴨胚胎，ID<sub>50</sub> 減至  $10^{-5.0}$ ~ $10^{-5.5}$  之毒力，由此成績可見 DK cell 培養之 TP618 Strain Virus 似呈減弱其毒性。

- 4) 冷凍乾燥疫苗製造及効力試驗：

將 DK cell 培養至 22~26 代之 TP618 DK cell-Virus 培養液以 Skim-milk 15%, lactose 5%, Lactalbumin 0.5% 配於 Hank's 液作為乾燥疫苗之媒劑，Virus 培養液加入於此媒劑中，使每 ml 含有 10,000 P.F.U 以上之 Virus Titer，次分裝於 20cc 裝之真空乾燥瓶每支分注 1 ml，行冷凍真空乾燥，共製疫苗五批。用無抗體母雞所生之雞隻(經中和試驗陰性者，作効力試驗及測定乾燥疫苗保持之 Virus Titer，試驗之強毒(佐藤)腦毒攻擊日期分為成雞組，疫苗注射後第七天攻擊  $10^{-2}$ /ml，一週齡雛則疫苗注射後第 21 天攻擊  $10^{-3}$ /ml 後觀察 14 天所得之成績如表四：

表四 冷凍乾燥疫苗之効力試驗與疫苗保持 Virus Titer 測定

疫苗 Lot#	DKTC 代數	雞 隻 種 別	注射量	強毒攻擊日期	使用隻數及結果	對照	Virus titer (DKTC)
1	DK-22	成雞 1.0~1.5kg	IM0.2ml	7	0/5	2/2	$10^{-3.5}$
"	"	一週齡雛	IM0.1ml	21	2/8	5/5	"
2	DK-23	成雞 1.0~1.5kg	IM0.2ml	7	0/5	2/2	$10^{-3.0}$
3	DK-24	"	"	7	0/5	2/2	$10^{-3.5}$
"	"	一週齡雛	IM0.1ml	21	2/10	5/5	"
4	DK-25	成雞 2.0~1.5kg	IM0.2ml	7	0/5	2/2	"
5	DK-26	"	"	7	0/5	2/2	"
"	"	一週齡雛	IM0.1ml	21	2/10	3/3	"

由上表之成績得知，用 Skim-milk 等乾燥疫苗之媒劑所製之疫苗對雞隻之効力試驗相當優良，供試驗製造五批對雞隻之効力均有 100% 之成績，一週齡雛雞供試驗三批中約在 80%~90% 之效果，測定所製之乾燥疫苗保持之 Virus Titer 均在  $10^{-3.0}$ ~ $10^{-3.5}$ 。

- 5) 疫苗注射後之免疫發生日期及HI價與中和抗體產生情形：疫苗注射後之鷄隻免疫發生日期與 HI 價及中和抗體價產生情形有何差異，以乾燥疫苗Lot# 1與鉛膠(Gel)死毒疫苗比較之，依疫苗之注射量分別注射於鷄隻各組 2 隻，作疫苗効力之比較。Lot# 1 與鉛膠疫苗(Gel Vaccine)注射鷄隻後第 3、4、5、6、7 天分別採取血清作HI及中和抗體之測定(CKTC)並於各組分別同時攻擊新城鷄瘟強毒(佐藤株)腦毒 $10^{-2}$ /ml後觀察14天，作中和抗體測定時各組 2 隻血清分別混合後經 $56^{\circ}\text{C}$  30分非動化過再以Hank's液作2倍稀釋法稀釋之，各稀釋倍數分別取0.5ml加入NDV佐藤株DKTC-5代 $100\text{ID}_{50}$  0.5ml培養於DK細胞測定試驗所得之結果如表五：

表五疫苗注射後免疫發生日期與HI價及中和抗體產生情形

疫苗別	鷄隻種類	注射量	強 毒 攻 擊 結 果 對					備 註	
			第三天	第四天	第五天	第六天	第七天		
Lot#1	成 鷄 1.0~1.5kg	IM 0.2ml	●● 4 4	●● 5 4	○○	○○	○○	●● 4 4	○無反應耐過 ●發病斃死及日數
"	注射前	HI 價 中 和 價	—	—	—	—	—		
"	注射後	HI 價 中 和 價	—	—	—	×80 × 2	×320 × 8		
鉛膠疫苗	成 鷄 1.0~1.5kg	IM 1.0ml	●● 6 4	●● 4 5	●● 4 4	●● 4 4	○● 5	●● 4 4	
"	注射前	HI 價 中 和 價	—	—	—	—	—		
"	注射後	HI 價 中 和 價	—	—	—	—	—		
DKTC-16 Virus 培養液	成 鷄 1.0~1.5kg	IM 0.1ml	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	●● 5 6	2/5分母表注射隻 數分子表發病斃死 隻數
"	中 鷄 500~600g	"	$\frac{2}{5}$	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{5}$	●● 4 5	
"	"	點鼻0.1ml	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{0}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{0}{2}$		

由上表成績得知乾燥疫苗注射後第五天可耐過強毒之攻擊，但未乾燥之Virus培養液注射鷄隻後，在成鷄組則第三天，中鷄組則第四天均可耐過強毒之攻擊Virus培養液點鼻方法接種之効力發生與乾燥疫苗同樣第五天可發生効力但第六天組則斃死一隻，點鼻方法接種疫苗之効果似有不確實，HI價與中和抗體價需疫苗第六天始可產生HI×80，中和價×2第七天則HI價×320，中和價×8，由此成績中和價如在×8之範圍可耐過強毒之攻擊，鉛膠死毒疫苗之効力在第七天內似未見効，但第七天組則有一隻耐過強毒之攻擊且其HI價及中和價均為陰性。

- 6) 組織培養乾燥疫苗保存性之試驗：

將乾燥疫苗保存於室溫( $22\sim 25^{\circ}\text{C}$ )及用PBS稀釋後之疫苗在室溫保存之試驗。利用DK組織細胞培養來觀察細胞CPE之發生情形測定其Virus含有量，試驗結果如表六：

表六組織培養乾燥疫苗保存性之試驗

疫苗Lot#	保存期間	培 養 日 數		保 持	Virus Titer
		DKcell	Virus		
Lot# 5	室溫 $22-25^{\circ}\text{C}$ 2 日	3	3		$10^{-4.0}$

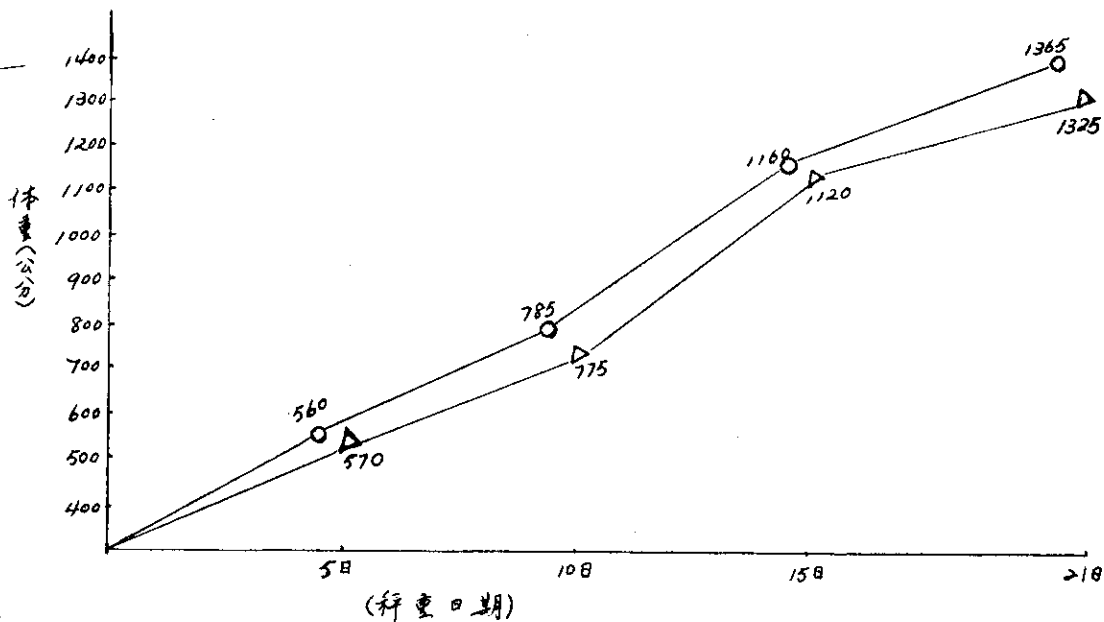
Lot# 5	7日	3	3	$10^{-4.0}$
"	14日	3	3	$10^{-3.5}$
"	21日	3	3	$10^{-3.0}$
Lot# 1	PBS稀釋后 2小時	3	3	$10^{-3.5}$
"	4小時	3	3	$10^{-3.5}$
"	8小時	3	3	$10^{-3.0}$
"	冷溫4°C-5°C 6個月	3	3	$10^{-3.5}$

由上表得知乾燥後之疫苗在室溫22~25°C下保存其 Virus Titer之保持性似無差異，而用PBS稀釋後疫苗於2.4.8.小時其Virus Titer仍未減低，且冷溫保存6個月者亦未見減少，由此可知經DK細胞培養之Virus為一相當有耐熱性之毒株。

7) 疫苗對一週齡雛雞注射後之發育影響試驗：

將疫苗注射於無抗體一週齡雛雞後對其發育是否有影響。即分兩組，一組為試驗組係注射 Lot# 2 之乾燥疫苗0.1ml IM，另一組為對照組係注射PBS液0.1ml IM每組七隻分別於保溫箱內飼育，每五天秤重一次，其結果如表七：

表七 組織培養乾燥疫苗對一週齡雛雞注射後之發育影響成績



\* —○— 表示試驗組於試驗前七隻體重共398公分  
 —△— 表示對照組 " " " 398公分

由上表成績得知組織培養疫苗注射於一週齡雛雞（無抗體）七隻與對照組七隻比較其發育情形，結果疫苗注射後21天觀察其發育均無差異。

## 8) 組織培養乾燥疫苗野外應用試驗：

將乾燥疫苗應用於某養雞場，卵用雞（6個月）2,000隻，卵用雞（4~5個月）2500隻，肉用雞（2個月）1000隻，肉用雞（1個月）1200隻預防注射後觀察14天之反應成績如表八：

表八疫苗野外注射鷄隻試驗成績表

疫苗Lot#	鷄種	注射隻數	注射量	觀察14天反應隻數及斃死隻數	斃死率	備考
1	卵用雞（6個月）	2000	IM 0.2ml	4/8	0.2%	4/8分母為反應隻數 分子為斃死
2	"（4-5個月）	2500	"	2/14	0.08%	總死亡率0.15% 總反應率0.41%
3	肉用雞（2個月）	1000	IM 0.1ml	2/6	0.2%	
5	"（1個月）	1200	"	2/10	0.17%	

由上表得知乾燥疫苗在野外注射鷄隻後無論鷄隻大小其斃死率僅在0.2%以下，斃死之因素如何未知，此種反應之斃死有否其他因素在內極待研究。

## 四、檢 討

- 1) 經DK組織細胞培養之TP618 Strain對DK細胞發生細胞變性(CPE)甚速並經繼代培養至16~47代之Virus培養液對無抗體鷄隻注射後均無反應，且經強毒佐藤株之腦毒攻擊後，更證明其免疫性相當高。對中鷄之効力，既使Virus培養液稀釋至 $10^{-7}$ 仍然有効。
- 2) DK cell培養之Virus對鷄隻之免疫產生甚速且在3~5天後均可耐過強毒之攻擊，又注射接種優於點鼻方法接種。
- 3) 以Skim-milk等媒劑製成之乾燥疫苗共5批之効力極佳，皆達100%之效果，Skim-milk等作本疫苗之媒劑似甚適合，且製出之疫苗保存於室溫21天或以PBS稀釋液稀釋溶解後8小時所保持之Virus Titer均無顯著之差異。
- 4) TP618 Strain DK培養乾燥疫苗與鋁膠肌肉用疫苗作効力之比較及HI價，中和抗體價之產生情形試驗得知TP618培養疫苗注射後第六天HI價 $\times 80$ ，中和價 $\times 2$ ，第七天HI價 $\times 320$ ，中和價 $\times 8$ ，鋁膠死毒疫苗則均呈陰性。
- 5) 所製成之乾燥疫苗應用於野外鷄場，其反應斃死率僅在0.2%以下，但此斃死鷄隻是否涉及其他因素在內極有研究之必要，又對一週齡雛鷄注射疫苗後之發育並無影響。

## 五、結 論

- 1) 將本所鴨胎化新城雞痘病毒弱毒株TP618，使用初生小鴨腎臟組織(DK)細胞培養後得到對鷄隻富有安全性及相當優異效果之DKTC TP618 Strain。
- 2) 以TP618 Strain培養於DK cell製成之乾燥疫苗共5批，對鷄隻之免疫均有100%之効力，其免疫產生日期於疫苗注射後3~5天可耐過強毒之攻擊，一週齡雛鷄則存有80~90%之効力，且疫苗注射後對其發育並無影響。
- 3) 疫苗注射後之HI價與中和抗體價之產生則需至第六天至第七天HI價 $\times 320$ ，中和價 $\times 8$ ，鋁膠肌肉用疫苗在七天內均呈陰性。
- 4) 乾燥疫苗保存於室溫 $22\sim 25^{\circ}\text{C}$  21天及稀釋溶解後8小時所保持之Virus Titer並無顯著之差異且應用於野外鷄場之反應斃死率僅在0.2%以下。
- 5) 本報告之試驗例及材料過少，對DKTC TP618 Strain將繼續進行研究。

### 參考文獻

- 一、鄭森淵、葉明得：ニユーカズスルウイルスのあひる 卵繼代通過に關する研究，日本獸醫師會雜誌 Vol.17No.4 ( '64 )
- 二、楊喜金、劉然炎、劉義雄：  
新城鷄瘟鴨胚化活毒疫苗之研究，I 本所弱毒株之型別鑑定及水劑疫苗對鷄隻之免疫効力，家畜衛生試驗所研究報告第二期1964。

## Studies on Production of The Tissue Cultured Newcastle Disease Vaccine

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

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

### ENGLISH SUMMARY

1. The TP618 strain of duck embryo passaged Newcastle disease virus inoculated into the DK cell in our laboratory was found a strain which has superior efficacy and safety to chicken.

2. As above, 5 batches of dry-living vaccine were prepared. They got 100% immune efficacy for chicken. The effective immunities is produced in 3-5 days after vaccination and had protect against the virulent virus. Among these 80-90% efficacy were to the one week old chicken and has no any influence on growth after vaccination.

3 The HI titer and Neutralizing titer were produced on the 6th day after vaccination. It has  $\times 320$  HI titer and  $\times 8$  Neutralizing titer on the 7th day. There didn't produce and positive reaction within 7 days after vaccination with Al-Gel vaccine.

4. The effective titer of dried vaccine shows no difference between 21 days storage at room temperature (22-25°C) and 8 hours after dilution. The mortality is lower than 0.2% for wild conditions.

5. The lack of report and the shorter of material tested in the experiment work. The investigation about DKTC TP618 must keep continuc.