

# 豬假性狂犬病 gE 基因缺損不活化疫苗之免疫效力

鍾明華\*<sup>1</sup> 李淑慧<sup>1</sup> 丁履紉<sup>1</sup> 吳詩南<sup>1</sup> 詹益波<sup>1</sup>  
張天傑<sup>2</sup> 蔡貴雄<sup>3</sup> 李清圳<sup>3</sup>

1. 台灣省家畜衛生試驗所製劑研究系
2. 國立中興大學獸醫系
3. 雲林縣家畜疾病防治所

**摘要** 本土性假性狂犬病 gE 及 TK 雙基因缺損 R23 株病毒與 gE 基因自然缺損 Bartha 株病毒，在 PK 株化細胞上之增殖極佳；其不活化疫苗對家兔之免疫保護效力與野外分離 S-38 株，進口之 N 及 SB gE 基因缺損不活化疫苗相當，均可通過國家檢定標準。

5~7 週齡第二代無特定病原小豬經二次免疫 R23 株不活化疫苗後所產生之中和抗體較其他疫苗稍為偏低，但由免疫豬隻攻毒後之平均發熱及排毒天數觀之，各疫苗間則無分軒輊。

**關鍵詞：** 豬假性狂犬病，基因缺損，不活化疫苗

## 緒 言

豬假性狂犬病 (PR) 係於 1971 年首次在屏東地區發現<sup>[1]</sup>，然後逐漸蔓延，引起母豬之流產及幼齡仔豬死亡，成為本省重要傳染病之一。由於豬隻在恢復後，容易造成潛伏性感染，在緊迫情況下，病毒會被活化 (activated)，開始複製病毒，終致排出病毒污染豬場，成為感染源<sup>[4, 5, 8, 13]</sup>，使得病毒不斷在豬場內循環，構成本病難以撲滅的最重要原因。

為了減少本病所引起之經濟損失，應將 PR 病毒逐出豬場之外，而清除之法最徹底的方法當非撲殺莫屬。若在豬場密度高，頭數眾多，污染率又高之情況下，就只有採取疫苗免疫一途矣！撲殺政策是否可行，端視政府財力及農民守法程度。最早使用之疫苗多屬傳統性之不活化或馴化毒疫苗，其所刺激產生之抗體與野外病毒感染之抗體無法區別，因此也就無法將野外病毒感染的豬隻淘汰，減少感染源。一直到 80 年代中後期，

可辨識之基因缺損疫苗及 gE-ELISA Kit 相偕開發成功後，對本病之撲滅才有了突破性之發展<sup>[15,16]</sup>。

國內為因應防疫需要，從 1979 年開始輸入傳統不活化疫苗，由於售價偏高，本所開始投入不活化疫苗研發工作，於 1983 年正式商品化，並不斷予以改進<sup>[1]</sup>，使本省豬假性狂犬病獲得良好的控制。歐美先進國家從 80 年代後期開始應用自然或基因工程構築之 gE 單基因缺損之不活化疫苗，或應用 gE 及 TK 雙基因缺損之活毒疫苗，進行撲滅本病之工作，成果驚人<sup>[3, 7, 14]</sup>。近鄰日本也在使用基因缺損疫苗，一旦 PR 從日本絕跡之後，可能就不再輸入本省之豬肉，對本省養豬業者將是一大衝擊。

為了國內之需求，本所一方面瞭解 Bartha 株 gE 基因自然缺損病毒不活化疫苗之免疫效力，一方面與中興大學獸醫系合作，評估本土性 gE 及 TK 雙基因缺損病毒株不活化疫苗之免疫性，以期早日供應。

\*抽印本索取作者  
台灣省家畜衛生試驗所

## 材料與方法

### 細胞：

PK-CL 株化細胞係省家畜衛生試驗所製劑研究系保存，以含有 10 mM HEPES，30  $\mu$ g/ml gentamicin，8 % fetal calf serum 及適量  $\text{NaHCO}_3$  之 Eagle's MEM 培養液培養之。

### 病毒：

1. Bartha 株病毒：係由國外分讓。
2. R23 株病毒：為中興大學獸醫系張天傑教授取本所分離之 TNL 株病毒，藉基因重組技術所構築之 gE 及 TK 雙基因缺損病毒。
3. PR-TS1 株病毒：為 1991 年由野外病豬扁桃腺分離之病毒株，供攻毒之用。

### 病毒增殖、不活化及油質疫苗製作：

依鍾等<sup>[2]</sup>所述方法，當 PK-CL 細胞單層形成後，將培養液抽棄之，加入 S-38 野外分離株、Bartha 或 PR-R23 病毒液（約 0.1 MOI），置於 37 °C 暖箱培養。

當細胞變性 (cytopathic effect, CPE) 行將完成時收集病毒液，加入 0.002 M binary ethylenimine (BEI)，在 37 °C 作用 10 小時，再接種 PK-CL 細胞及 tryptic soyagar 確認無殘留活病毒及無細菌污染後，將一份病毒液緩緩加入一份內含 10 % span-80 之礦物油中，以均質機製作 W/O 單相乳劑，然後再將 1.5 份內含 2 % Tween-80 生理食鹽水溶液緩緩加入 water-in-oil (W/O) 乳劑中，以均質機製作 water-in-oil-in-water (W/O/W) 乳劑。

### 不活化疫苗家兔免疫保護效力測定：

依國家檢定方法，將 1/3 劑量 (0.66ml) 及 1/9 劑量 (0.22 ml) 之 R23 乳劑疫苗及國外進口 gE 基因缺損 SB 疫苗肌肉注射 2 公斤體重家兔各 5 頭，兩週後再以同樣劑量免疫第二次，再兩週以 100 RLD<sub>50</sub> 強毒肌肉注射攻擊之，計算 50 % 免疫保護劑量 (50 % protection dosage, PD<sub>50</sub>)。

另一次試驗中 Bartha 株乳劑疫苗及國外進口 gE 基因缺損 N 疫苗之 PD<sub>50</sub>，亦依上述方法測定之。

### S-38 野外株、Bartha 株及 PR-R23 株對 5~7 週齡小豬之免疫效力比較：

第二代無抗體無特定病原 (specific-pathogen-

free, SPF) 小豬 14 頭，分為四組，第一、二、三組各四頭，分別注射 Bartha 株、S-38 不活化乳劑疫苗及 N 進口疫苗一劑量 (2 ml) 兩次，間隔三週；第四組兩頭為對照組。第二次免疫後兩週以 10<sup>6.4</sup> TCID<sub>50</sub> 鼻腔內接種 PR-TS1 野外病毒攻擊所有小豬，每天測量肛溫，檢視症狀，採取口腔棉拭，分離病毒。所有小豬均在第一次疫苗注射前，第二次疫苗注射前，攻毒前及撲殺前採取血液測定中和抗體。

另一次試驗中則有第二代 SPF 無抗體小豬 13 頭，分為三組，第一、二組各五頭，分別注射 R-23 株 N 進口疫苗兩次，間隔三週；第三組三頭為對照組。第二次免疫後兩週以 10<sup>7.0</sup> TCID<sub>50</sub> 鼻腔內接種 PR-TS1 野外病毒攻擊所有小豬，每天測量肛溫，檢視症狀，採取口腔棉拭，分離病毒。所有小豬均在第一次疫苗注射前，第二次疫苗注射前，攻毒前及撲殺前採取血液測定中和抗體。

### 野外株及 gE 基因缺損不活化疫苗田間母豬免疫抗體測定：

在雲林縣轄內選擇四養豬場，每場十頭母豬，各免疫注射 S-38 株及 R23 株 gE 基因缺損病毒不活化疫苗五頭，在空胎時、配種一個月後及生產前三週各免疫一劑量，並在空胎免疫注射前、每一次注射前及產後採血，測定中和抗體價 (serum neutralizing antibody titer, SN titer)。

### 血清中和抗體測定：依鍾等<sup>[2]</sup>所述實施之 PR-R23 疫苗免疫豬隻 gE 抗體篩檢：

部份 R23 病毒不活化疫苗免疫 5~7 週齡小豬 (4 頭) 在免疫後及攻毒後之血清以 Idexx ELISA test kit 內所附之陽性、陰性對照血清，同時進行 ELISA 檢驗，用以辨認 R23 病毒確為 gE 基因缺損病毒株。

## 結果

### PR-R23 及 Bartha 株病毒在細胞培養之增殖：

R23 株病毒在 PK-CL 細胞產生單一圓化之 CPE，與原毒株產生之融合性 CPE 不同，CPE 亦需 48 小時以上始能達 95 %，較原毒株為晚。但病毒力價達 10<sup>8.3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml，與 TNL 原毒株無異。

Bartha 株病毒株在 PK-CL 細胞上所形成之 CPE 及時間，與 R23 株相似，病毒力價亦達 10<sup>8.3</sup>

TCID<sub>50</sub>/ml。

### R23 及 Bartha 株不活化疫苗家兔免疫保護效力：

如表 1 所示，家兔經兩次免疫 R23 及 SB 株不活化疫苗後中和抗體反應極佳，尤其是 SB 疫苗更高，但個體間仍有差異。經 100 RLD<sub>50</sub> 攻毒後，兩種疫苗免疫 1/9 劑量者，有兩頭斃死，故其 50% 保護劑量 (PD<sub>50</sub>) 均為 3<sup>-2</sup>，達到國家檢定標準。

免疫 Bartha 及 N 不活化疫苗後之中和抗體反應則較差，但個體間亦有差異。經 100 RLD<sub>50</sub> 攻毒後，兩種疫苗免疫 1/3 劑量者均耐過，免疫 1/9 劑量者耐過率不佳，故其 50% 保護劑量 (PD<sub>50</sub>) 亦為 <3<sup>-1</sup>，達到國家檢定標準。

### R23 病毒疫苗免疫豬隻 gE 抗體篩檢：

免疫不活化 R23 株疫苗之部份豬隻血清以 Idexx ELISA Kit 檢驗結果均顯示 gE 抗體陰性，攻毒後轉為陽性 (表 2)。

表 1 基因缺損不活化疫苗家兔免疫保護效力  
Table 1 Protective efficacy of the gene-deleted inactivated vaccines in rabbits

Vaccine	Dosage	Mean SN titer				No. protected / No. tested
		PVW 0	2	4	PCW 2	
R 23	1/3	0	3.93	168.9	82.5	5/5
	1/9	0	4.4	42.0	137.8	3/5
S B	1/3	0	63.3	357.1	234.4	5/5
	1/9	0	7.4	301.8	128	3/5
Bartha	1/3	0	0	26.6	ND	5/5
	1/9	0	0	8.4	ND	0/5
N	1/3	0	2	22	ND	5/5
	1/9	0	2	13.3	ND	1/5

PVW : week post vaccination

PCW : week post challenge

表 2 豬隻免疫 R 23 疫苗及野外毒攻擊後 gE 抗體轉變  
Table 2 Reversion of Anti-gE antibody of the pigs after vaccination with R23 strain and challenge with field strain

Pig No.	P V W 1		P V W 3		P C D 0		P C D 14	
	S N titer	g E A b	S N titer	g E A b	S N titer	g E A b	S N titer	g E A b
P471	< 2	-	3	-	11	-	180	+
P472	< 2	-	8	-	32	-	> 256	+
P479	< 2	-	11	-	90	-	> 256	+
P481	< 2	-	6	-	128	-	> 256	+

PVW : week post vaccination

PCD : day post challenge

**R23 病毒株及 N 不活化疫苗 5~7 週齡小豬之免疫效力：**

如表 3 所示，第二代無抗體 SPF 小豬注射一劑量 (2 ml) R23 及 N 疫苗後三週產生微量中和抗體。二次免疫後兩週 (攻毒前) 小豬之平均中和抗體價分別為 20.6 及 44.9。攻毒後則急遽上升。二種疫苗免疫豬在攻毒後皆有發燒現象，甚至超過 41 °C，但均無明顯症狀而耐過，也沒有排毒。三頭對照豬中有一頭在攻毒 6 天後斃死，對照豬有平均四天之排毒 (表 5)。

**S-38 野外株、Bartha 株及 N 不活化疫苗對 5~7 週齡小豬之免疫效力：**

表 4 所示為第二代無抗體 SPF 小豬注射 S-38 野外株、Bartha 株及 N 不活化疫苗一劑量 (2 ml) 後三週者產生微量中和抗體。二次免疫後兩週 (攻毒前) 小豬之平均中和抗體價分別為 252、177 及 58。攻毒後則急遽上升。表 5 顯示三種疫苗免疫豬在攻毒後皆有輕微發燒現象 (< 41 °C)，平均排毒天數分別為 1、0 及 1 天；平均發燒天數則分別為 4、4 及 6 天，但均無明顯症狀而耐過。兩頭對照豬均有 7 天之發燒，甚至接近 42 °C 之高溫，又有 5 天之排毒，但未斃死。

**表 3 基因缺損不活化疫苗免疫豬隻之抗體反應**  
**Table 3 Antibody response of the pigs after vaccination with gene-deleted inactivated vaccines**

Vaccine	No. pig	Mean SN titer				
		PVW 0	2	3	5	PCW 2
R 23	5	0	0	3.7	20.6	301
N	5	0	0	3.1	44.9	512
Control	3	0	0	0	0	18.8

PVW : week post vaccination

PCW : week post challenge

**表 4 基因缺損不活化疫苗免疫豬隻之抗體反應**  
**Table 4 Antibody response of the pigs after vaccination with gene-deleted inactivated vaccines**

Vaccine	No. pig	Mean SN titer						
		PVW 0	1	2	3	4	5	PCW 1
S-38	4	0	1.4	2.6	8.0	329	252	716
Bartha	4	0	1.9	4.0	7.3	150	177	212
N	4	0	0	1.4	4.0	115	58	233
Control	2	0	0	0	0	0	0	11

PVW : week post vaccination

PCW : week post challenge

田間母豬免疫 R23 (gE<sup>-</sup>) 或 S-38 完整病毒 (gE<sup>+</sup>) 不活化後之抗體反應： 一個月後 (PBM 1) 及分娩前三週 (PFW 3) 免疫 gE<sup>-</sup> 不活化疫苗後之抗體均較 gE<sup>+</sup> 完整病毒不活化疫苗者稍低，與試驗小豬所得相似。

如表 6 所示，母豬在空胎時 (Pre-B)，配種

表 5 完整及基因缺損病毒不活化疫苗免疫豬隻攻毒後之反應  
Table 5 Response of the pigs after vaccination with gene-deleted inactivated vaccines

疫苗	頭數	平均反應天數	平均排毒天數
S-38	4	4	1
Bartha	4	4	0
N	4	6	1
Control	2	7	5
R-23	5	5	0
N	5	6	0
Control	5	7 <sup>a</sup>	4

a : 3 頭對照豬中有 1 頭於攻毒後 6 天死亡

表 6 田間母豬免疫 R23 (gE<sup>-</sup>) 或 S-38 (gE<sup>+</sup>) 不活化後之抗體反應  
Table 6 Antibody response of the sows after vaccination with R23 (gE<sup>-</sup>) or S-38 (gE<sup>+</sup>) inactivated vaccine in the field

Farms	S N titer							
	Pre-B		PBM 1		PFW 3		Post-P	
	R 23	S-38	R 23	S-38	R 23	S-38	R 23	S-38
A	63.8	225.2	167.4	410.3	ND	181	ND	ND
B	179.2	107.6	127.7	253.1	127.1	177.2	ND	106.3
C	285.2	30.2	180.2	291.4	253.7	294	69.1	ND
D	75.6	89.9	359.3	406.3	304.4	322.5	ND	ND

Pre-B : pre-breeding  
PBM : post-breeding month  
PFW : pre-farrowing week  
Post-F : post-farrowing  
ND : not done

## 討 論

報告指出 gE 糖蛋白雖係 PR 病毒之結構性蛋白，亦為保護性抗體之攻擊目標，且與病毒之釋出有關，但對病毒之增殖不重要<sup>[9, 17]</sup>。本試驗結果亦顯示 TNL 株病毒核酸切除 gE 及 Tk 基因之後，在細胞培養上之增殖性依然十分優異，均可達  $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml，由此可見 gE 及 TK 基因之缺損並不影響病毒之增殖，但是 CPE 之型態不同，較少融合，CPE 完成所需時間亦較長。由此亦可間接證實 CPE 之型態或斑灶之大小或與病原性有關。

由豬隻注射 R23 株疫苗後 gE ELISA Kit 檢測為 gE 抗體陰性則攻毒後轉為陽性結果（表 2），可證實 R23 株確實為 gE 缺損病毒無誤。由家兔保護效力試驗成績（表 1）顯示，R23 株不活化疫苗之抗體反應極為優異，且與劑量成正比，而其保護劑量 (PD<sub>50</sub>) 與國外進口者幾可媲美。R23 株與 Bartha 株不活化疫苗免疫小豬攻毒後皆無排毒（表 5），此結果與其他報告稍有差異<sup>[6]</sup>，可能與採樣有關。此外，對照豬在攻毒後雖有高溫及較長的排毒天數，但未斃死，可能與攻擊毒株 (PR-TS1) 之病原性不強有關，為了顯示疫苗之效力及其差異，可考慮改用病原性更強之毒株供攻毒試驗用。

R23 株不活化疫苗免疫小豬之中和抗體低於 S-38 株、也低於 Bartha 株及進口 N 疫苗免疫者，但未影響其保護效力（表 4 & 5）。De Leeuw & Van Oirschot<sup>[6]</sup> 謂中和抗體力價與保護效力之間無明顯之相關性，McFerran et al<sup>[12]</sup> 亦稱中和抗體力價與 PR 疫苗效力間僅有些許之關係，而 PR 疫苗效力是否與 TK 基因之缺損有關？Kimman<sup>[10]</sup> 指出 TK 基因之缺損對病毒之免疫性多少有影響，可惜其文中並未指明受影響者究係細胞免疫？或係體液免疫？從本試驗結果發現，R23 及 N 雙基因缺損不活化疫苗在豬隻引起之中和抗體均較其他疫苗者為低（表 4），推測 TK 基因之存在對體液免疫或有影響。為加強不活化疫苗之效力，除了 gE 基因外，應盡量保留其他基因。因此，本土性 gE 單基因缺損不活化疫苗應予研發，而 TK 基因之作用可得以究明。

## 參考文獻

1. 鍾明華、劉堂輝、詹益波、邱資峰、曾正文。

- 1986。豬假性狂犬病不活化疫苗之改進研究，省畜衛試研報 22：81-88。
2. 鍾明華、李淑慧、邱資峰、楊喜金、詹益波。1994。豬假性狂犬病不活化疫苗油質佐劑在家兔引起之免疫及組織病理反應，省畜衛試研報 30：11-24。
3. Anderson, J. B., 1992. Eradication of Aujeszky's disease virus: aerosol spread between herds. In: Proceedings of First International Symposium on Eradication of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus (Ed. R. B. Morrison) 113-120.
4. Beran, G. W., E. B. Davies, P. V. Arambulo, 1980. Persistence of pseudorabies virus in infected swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 998-1000.
5. Davies, E. B., G. W. Beran, 1980. Spontaneous shedding of pseudorabies virus from a clinically recovered postparturient sow, J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 1345-1347.
6. De Leeuw, P. W. and J. T. van Oirschot, 1985. Vaccines against Aujeszky's disease: evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. Vet. Quarterly 7: 191-197.
7. Engel, M. and M. Wierup, 1989. Vaccination and eradication programme against Aujeszky's disease in Sweden, based on gI ELISA test. Vet. Rec. 125: 236-237.
8. Getekunst, D. E., E. C. Pirtle, L. D. Miller and W. C. Stewart. 1980. Isolation of pseudorabies virus from trigeminal ganglia of a latently infected sow. Am. J. Vet. Res. 41: 1315-1316.
9. Kimman, T. G., N. de Wind, N. Oei-Lie, J. M. A. Pol, A. J. M. Berns and A. L. J. Gielkens. 1992c. Contribution of single genes within the unique short region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity. J. Gen. Virol. 73: 243-251.
10. Kimman, T. G. 1994. Immunological protection against pseudorabies virus. In: O. I. E. Symposium on "Aujeszky's Disease" Bangkok, Thailand pp 11-22.
11. Lin, S. C., M. C. Tung, C. I. Liu, C. F. Chang, W. C. Huang, and C. M. Chang, 1972. An outbreak of pseudorabies in swine in Pingtung. Chinese J. Microbiol. 5: 56-68.

12. McFerran, J. B., R. M. McCracken and C. Dow. 1982. Comparative studies with inactivated and attenuated vaccines for protection of fattening pigs. In: Aujeszky's disease. Wittmann, G., S. A. Hall (eds.). *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* 17 : 163 - 170.
13. Schoenbaum, M. A., G. W. Beran and D. P. Murphy. 1990. Pseudorabies virus latency and reactivation in vaccinated swine. *Am. J. Vet. Res.* 51 : 334 - 338.
14. Stegeman A., M. J. M. Tielen, T. G. Kimman, J. T. van Oirschot, W. A. Hunneman and F. W. Berndsen, 1994. Intensive regional vaccination with a gE-deleted vaccinemarkedly reduces pseudorabies virus infections. *Vaccine* 12 : 527 - 531.
15. Van Oirschot, J. T., H. J. Rziha, P. L. J. M. Moonen, J. M. A. Pol, and D. van Zaane, 1986. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. *J. Gen. Virol.* 67 : 1179 - 1182.
16. Van Oirschot, J. T., C. A. H. De Wall, 1987. An ELISA to distinguish between Aujeszky's disease vaccinated and infected pigs. *Vet. Rec.* 121 : 305 - 306.
17. Zsak, L., F. Zuckermann, N. Sugg and T. Benporat. 1992. Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J. Virol.* 66 : 2316 - 2325.

## Efficacy of the gE-deleted Pseudorabies Inactivated Vaccine

M. H. Jong\*<sup>1</sup>, S. H. Lee<sup>1</sup>, L. J. Ting<sup>1</sup>, S. N. Wu<sup>1</sup>, I. P. Chan<sup>1</sup>  
T. J. Chang<sup>2</sup>, G. S. Tsai<sup>3</sup> and C. C. Lee<sup>3</sup>

1. Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.
2. Department of Veterinary Medicine, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R. O. C.
3. Yunlin Hsien Livestock Disease Control Center, Doouluh, Taiwan, R. O. C.

**SUMMARY** Propagative ability of the gE and TK double gene-deleted R23 strain constructed from local isolate and natural gE gene-deleted Bartha strain of pseudorabies virus both in PK cell line was satisfied. Immune protective efficacy of these two inactivated vaccines in rabbits was comparable with that of S-38 field strain and imported gE gene-deleted N and SB vaccines. Protective dosage in rabbits induced by all of them could pass the test of national drug assay.

The neutralizing antibodies of secondary SPF pigs with 5~7 weeks of age elicited by the local gene-deleted R23 inactivated vaccine were slightly lower than those by other vaccines. However, it protected the pigs as good as the other vaccines when evaluated by mean fever and virus shedding days points of view.

**Key words:** *Pseudorabies, Gene-deletion, Inactivated vaccine*

---

\*Corresponding author  
Taiwan Animal Health Research Institute, Taiwan, R. O. C.