

猪瘟GP組織培養疫苗之安全性及免疫效力

林再春、謝竹茂、陳由昌、賴秀穗、李正雄、陳正吉、陳守任

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

關於猪瘟活毒疫苗之應用，近年來各國均甚重視組織培養疫苗研製^{1,2,9,10,11,12,13} 在日本自去(1969)年起普遍採用由笹原等研究多年遂告成功之猪瘟 GP 組織培養疫苗供為全面注射用。該項疫苗對於過去應用結晶紫猪瘟疫苗之日本猪隻在實驗室及田間等試驗，已證明確實優良^{10,11}。

鑑於應用組織培養技術製造猪瘟活毒疫苗之優點很多，本省亦甚重視其研製。筆者(林)於民國57年6月由日本農林省家畜衛生試驗場分讓 GP 疫苗，携同並使用 SPF 小豬進行其安全性及免疫性等試驗得知該項疫苗甚優³，惟本省猪隻經普遍應用兔化猪瘟疫苗^{3,4,5} 以來已有15載，其免疫情形與日本猪隻者不同，再者猪隻品種亦不同，故 GP 疫苗對於本省猪隻之安全性免疫效果如何？需進一步之研討。為此，於58年3月間再向日本該場分讓該項疫苗製造用種毒株—GPE⁻株，並在清水悠紀臣博士指導下依 Seed-Lot-System 製成大批種毒並由其試製乾燥疫苗供為進行有關試驗。茲將其安全性及免疫效力有關成績報告於後。

試 驗 材 料

1. 毒株：

GPE⁻株：供猪瘟 GP 疫苗試製之種毒，於58年3月由日本農林省家畜衛生試驗場清水悠紀臣博士携贈。本研究之猪瘟 GP 疫苗為該場製品及以分讓之種毒株依 Seed-Lot-System 製成大批種毒後由其試製疫苗。

ALD 株：本所保存之猪瘟強毒株係供猪瘟之研究及疫苗檢定用，本研究使用其感染猪毒血 $10^{-7.0}$ PID 50/ml)。

A76株：係將 ALD 猪瘟強毒繼代猪單丸 (ST) 細胞之毒株，供猪瘟中和試驗之用。

新城雞瘟毒：宮寺株及 TCND 株，係通過雞胚胎之感染尿液供用。

2. 猪單丸 (ST) 細胞：由瑞芳建基農場採取之 4~6 週齡未經預防注射三品種小豬單丸，均以無菌操作採取，經細胞消化後，以細胞增殖培養液 (GS 為 20% 及抗生素) 調製為 250 萬個/ml，供為 END 中和試驗等用。

3. 山羊血清 (GS)：本省產黑色雜交山羊，經猪瘟抗體微量測定為陰性者，經 56°C，30 分非働化後分裝並凍結保存於 -20°C 供用。

4. 小豬：本所生產 SPF 小豬，7~9 週齡，猪瘟中和抗體陰性。

猪瘟GP疫苗製法

1. 天竺鼠腎 (GK) 細胞之調製：

將天竺鼠(雜交種，體重 200~250gm) 腎臟包膜剝離，採取皮質切成小塊，加入含有抗生素液 2% (Penicillin 200u/ml Streptomycin 200 γ /ml, Kanamycin 20 γ /ml) 之 PBS 浸漬 10 分鐘後除去 PBS，剪碎，加入適量之 PBS 於攪拌器攪拌，除棄 PBS 後加入 0.25% trypsin 攪拌消化，即於 30°C 且採用長時間一次消化方式，待完全消化後，使用 120 mesh 之白鐵製網過濾，經以遠心分離 1,000 rpm 5'，棄上清液，收集沈澱之細胞，加入含有山羊血清 5% 之 Earle's 液，反覆換液洗滌 3~4 次，收集之細胞再以細胞增殖液即 Earle's 液加 10% GS，抗生素液 2% 配成

(2)

細胞懸浮液 (通常為 0.5 % 之細胞液) 供用。

2. Seed Virus 之試製:

將上述 GK 細胞懸浮液分裝於角瓶, 於 37°C 定溫箱培養 6~8 天, 至 monolayer 完全形成時除去培養液, 並以 PBS 洗滌一次後, 接種 Seed Virus (細胞培養液之 $\frac{1}{10}$) 於 30°C 靜置培養 6~8 天後收集培養液經以 Millipore filter 濾過。

本研究所製成之 Seed Virus Lot 1 係由 3 小批合成 (參照下表), 經以干涉法¹⁴⁾ 測定其 Virus 力價並實施各項檢定試驗合格後分裝於小瓶 (50~100ml) 並於 -70°C 凍結保存供為 GP 疫苗試驗用。

Lot 1 Seed Virus

Sub-lot No.	製成日期	製成效果量	Virus 力價 Log ₁₀ TCID ₅₀	病毒迷入試驗	豬接種試驗
1.	58. 11. 2	1,250ml	3.5	陰性	均無任何反應
2.	58. 11. 6	980ml	4.0	陰性	均無任何反應
3.	58. 12. 1	2,340ml	4.25	陰性	均無任何反應
Lot 1		4,570ml	4.0		

註: 1) 病毒迷入試驗項目請參照後述之方法。

2) 豬接種試驗係各小批使用 SPF 小豬 2 隻各接種 30ml 觀察 2 週。

3. 乾燥 GP 疫苗之試製:

GP Virus 培養液之調製法與 Seed Virus 之者同, 即採該培養液實施 Virus 力價測定後, 稀釋為適當之濃度後加入等量特殊媒劑 (試藥一級乳糖 20%, Polyvinyl Pynolidone 0.3%, 硫酸 Kanamycin 0.02mg/ml 之水溶液) 完全混合後分裝每瓶 2ml, 在零下 70°C 預備凍結 5 小時後經以冷凍乾燥製成之疫苗, 共製成 2 批供試。

試驗方法及成績

1. 試製 GP 疫苗之 Virus 迷入試驗

1) GK 細胞液試驗: 供疫苗製造之 GK 單層細胞中任意抽出瓶數之 $\frac{1}{6}$, 除去培養液後分別加入天竺鼠紅血球液或雞紅血球液感作 1 小時結果未呈現紅血球吸着反應現象。

2) 選體重 40~50Kg 中豬 3 頭經測定豬瘟中和抗體價陰性者, 接種上述 GK 單層細胞培養液各 30ml, 皮下, 經觀察 2 週未呈任何反應。

3) 製成之 GP 疫苗原液 30ml 加 30ml 豬瘟免疫血清後放置於孵卵器感作 1 小時, 取出接種於小豬 3 頭, 每頭 20ml, 觀察 2 週無呈任何反應。

4) 將疫苗製造用之 GK 單層細胞培養液接種於 GK 細胞, SK 細胞及 ST 細胞觀察 10 天結果無細胞變性現象並實施其血球吸着反應結果均為陰性。

5) Marker 試驗: 將乾燥前之試製疫苗二批分別實施各項 Marker 試驗結果分述如下:

a. 疫苗 Virus 經以 END 法測定其感染價, 以新城雞瘟病毒 10~100 倍攻擊時, 無呈任何細胞變性現象。

b. 以標準豬瘟病毒為對照, 其與疫苗 Virus 分別於 GK 細胞經以 30°C 及 40°C 培養比較其增殖能力結果, 疫苗 Virus 在 30°C 之增殖能力遠較 40°C 者為優。

c. 標準豬瘟病毒與疫苗 Virus 在 GK 細胞之增殖情形, 經比較結果, 疫苗 Virus 之增殖應較強毒豬瘟病毒高 100 倍以上。

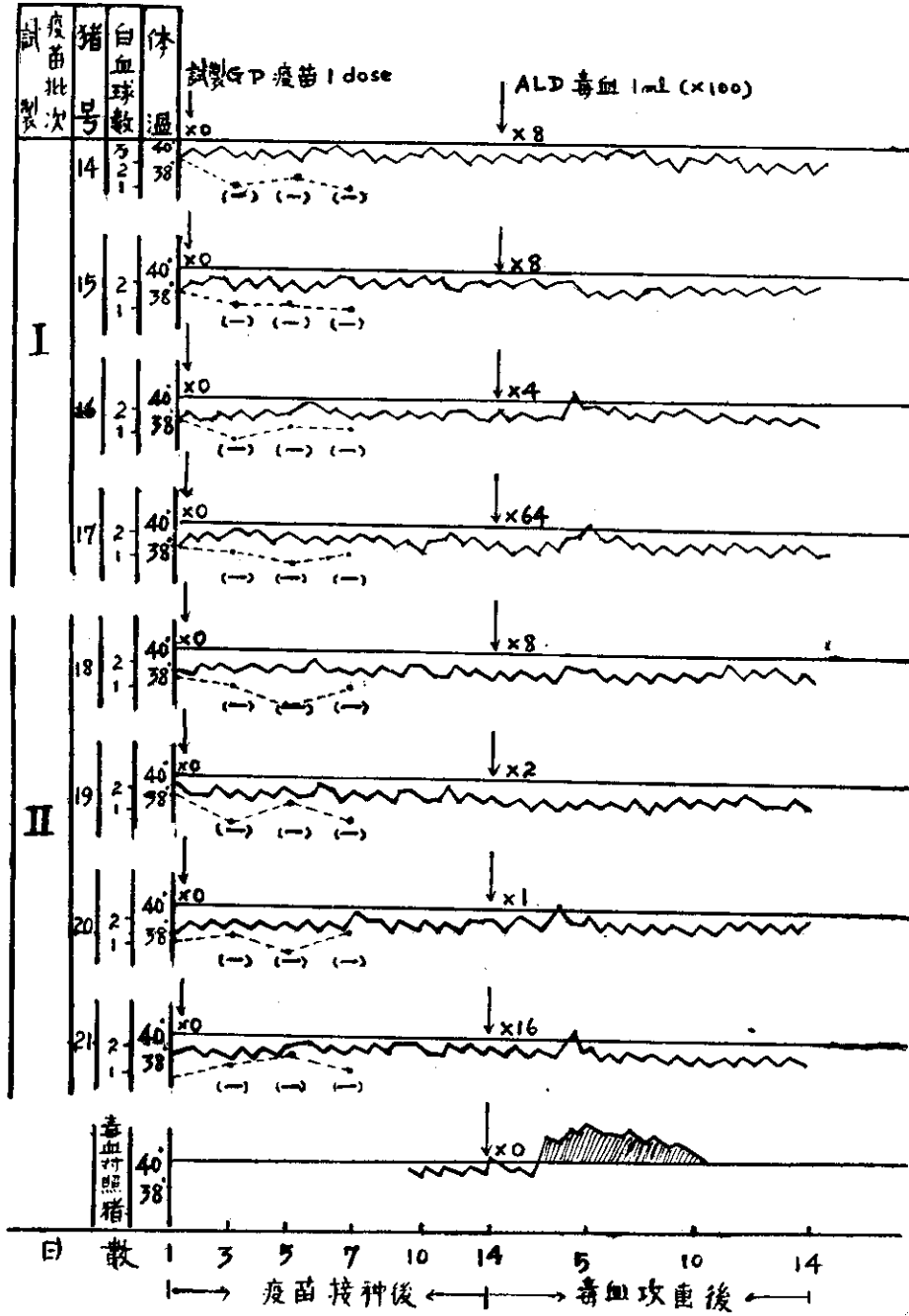
2. 豬瘟 GP 疫苗之安全性

1) 小豬之接種反應

將試製乾燥疫苗 Lot 1 及 2 分別接種於 SPF 小豬 8 頭, 每頭 1 劑量 (即 1ml) 皮下注射, 經觀察 14 天未見任何接種反應 (免疫效力後述)。詳細成績如圖 1。

至於由日本分讓之 GP 疫苗 Lot 1 經使用 10 頭 SPF 小豬如上述方法試驗結果與自行試製疫苗之成績相同。其詳細成績如圖 2 及 3 (免疫效力後述, 其中 5, 6 及 10 號小豬留為抗體之消長試驗)。

圖 1 試製乾燥GP疫苗之接種反應及免疫效力



註： 體溫。
 ----- 白血球數。
 (-) Viremia 陰性
 x1. x4..... 中和抗體價

(4)

圖 2 日製乾燥GP疫苗之接種反應及免疫效力 (14天攻擊)

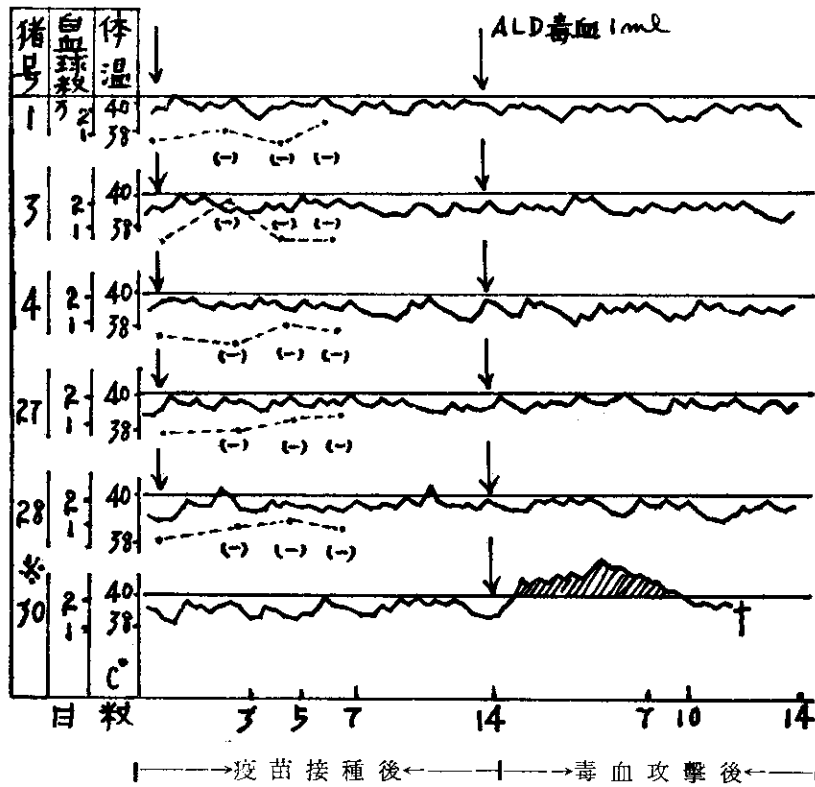
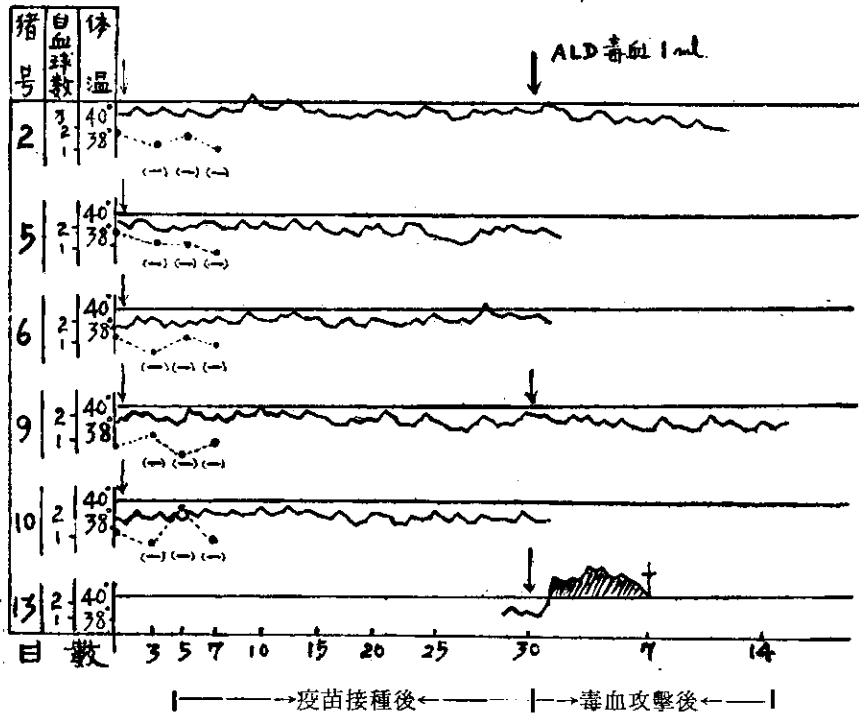


圖 3 日製乾燥GP疫苗之接種反應及免疫效力 (30天攻擊)



註：※：同居感染試驗兼毒血對照。

2) 接種小豬之 Viremia 試驗

將試製 GP 疫苗 Lot 1 各 1 劑量接種於 SPF 小豬 5 隻，並於接種前及後第 1~5 天及 7, 10, 14 天分別由頸靜脈採血經干涉法試予檢出其 Virus 是否出現，攻之 WEE 為 100 TCID₅₀，經試驗結果均為陰性即未有 Viremia 之出現，其詳細成績如表 1。又如圖 1, 2, 3 所示試製疫苗組 8 隻日製疫苗組 10 隻，於疫苗接種前及後第 3, 5, 7 天採血供為 Viremia 試驗結果亦均為陰性。

表 1 GP 疫苗接種小豬之 Viremia 試驗

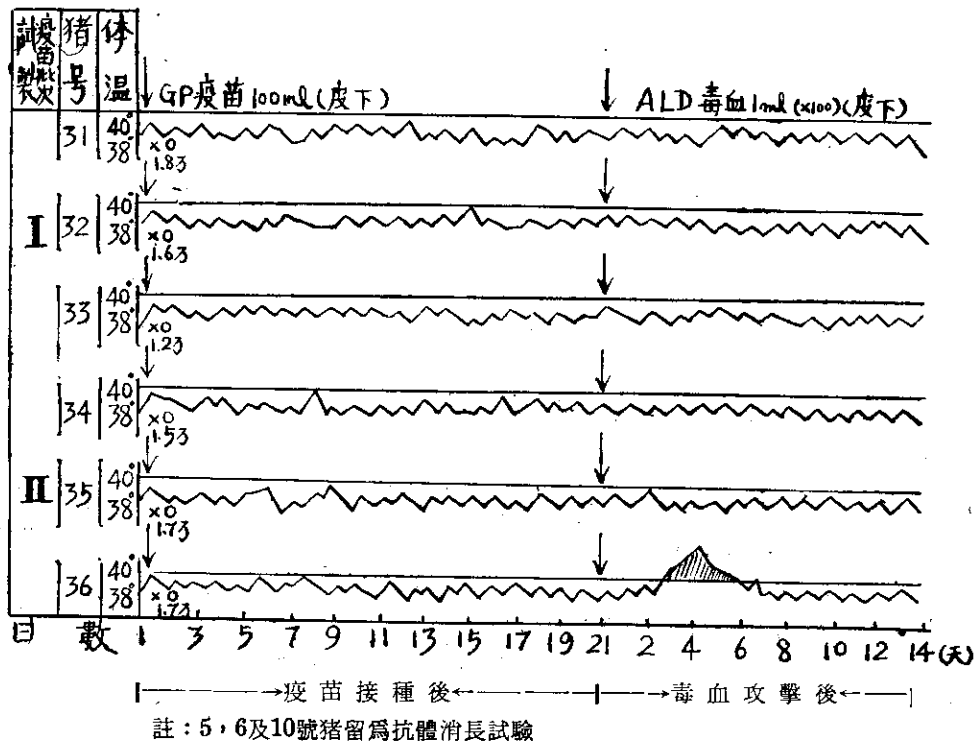
供試小豬 No.	疫苗接種日數									
	0	1	2	3	4	5	7	10	14	
1	0/8	0/8	0/5	0/8	0/8	0/7	0/2	0/8	0/8	
2	0/8	0/8	0/5	0/8	0/8	0/7	0/8	0/8	0/8	
3	0/8	0/8	0/8	0/7	0/8	0/8	0/8	0/7	0/8	
4	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	
5	0/7	0/6	0/8	0/8	0/8	0/8	0/3	0/8	0/8	

註：分母示供試支數，分子示陽性支數。

3) 疫苗大量接種試驗

將試製 GP 疫苗 Lot 1 及 2 冷凍乾燥前之原液各以 100ml (TCID₅₀ 10⁸/ml) 接種於 SPF 小豬 6 頭，經觀察 21 天均未見任何接種反應 (攻擊後成績後述)，其詳細成績如圖 4。

圖 4 試製 GP 疫苗之安全性疫苗大量接種

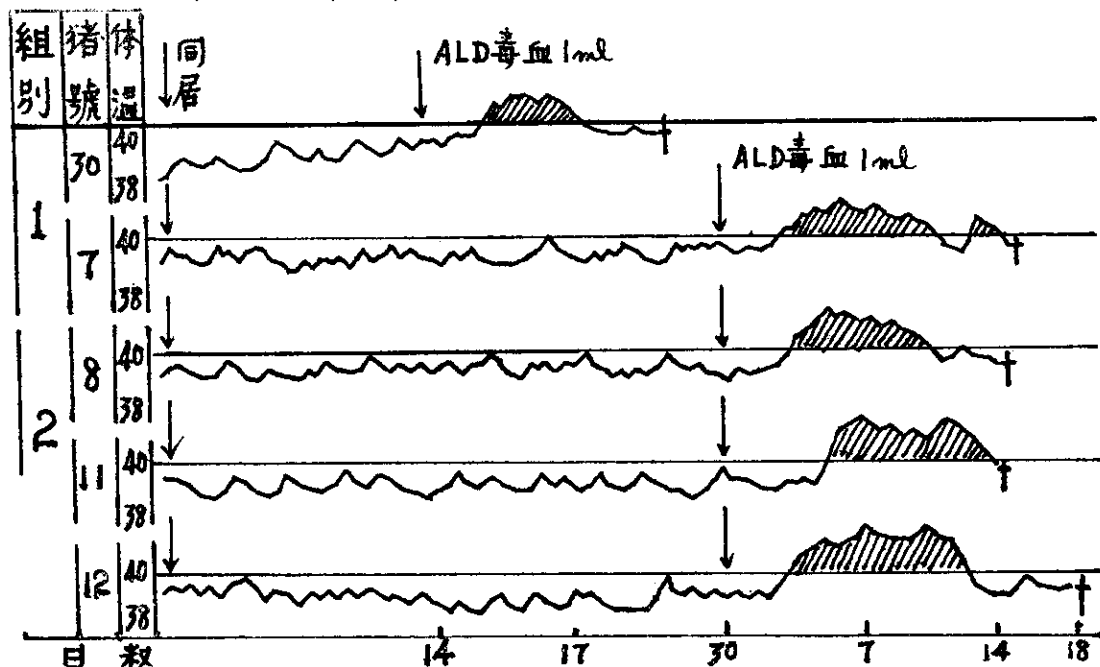


(6)

4) SPF小豬與苗疫接種小豬之同居感染試驗

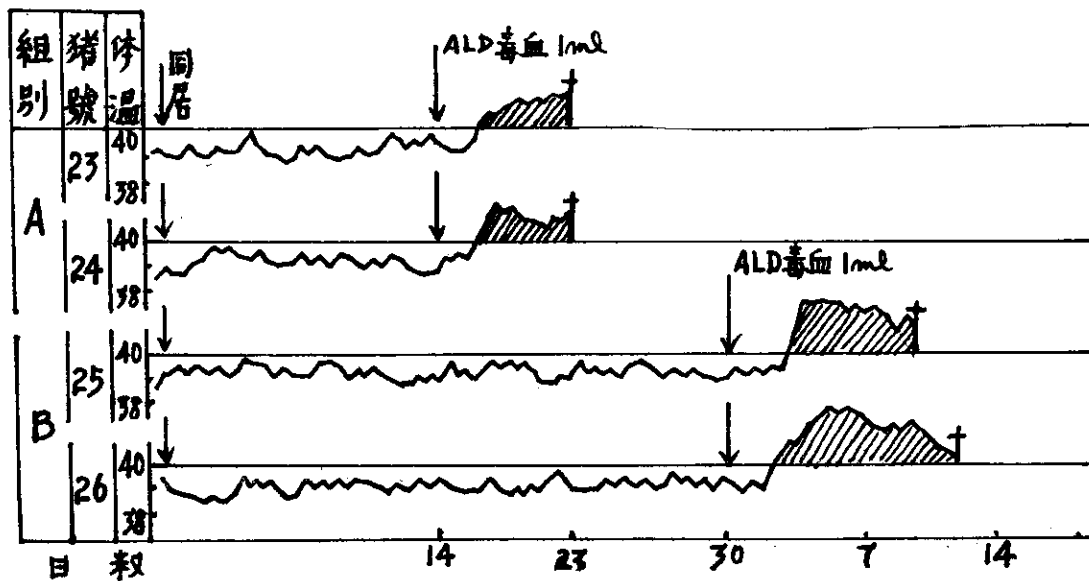
共試驗 2 次，第一次使用日製 GP 疫苗 Lot 1，第二次使用自行試製之 GP 疫苗。第一次試驗之疫苗接種小豬共 10 隻，未接種疫苗之同居小豬為 5 隻，詳如圖 5 之註明。第二次試驗之疫苗接種小豬 8 隻，未接種疫苗之小豬 4 隻。觀察 14 天或 30 天，未經疫苗接種之 9 隻均無呈任何反應，且以豬瘟強毒 ALD 毒血 (X100) 1ml 攻擊結果，未接種疫苗之豬 9 頭均呈豬瘟症狀發病致死，反之疫苗注射小豬全部無反應耐過，其詳細成績如圖及 5 6。

圖 5 日製豬瘟 GP 疫苗接種豬之同居感染試驗



註：1. 第一組與疫苗接種豬 No. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 46. 47 同居。2. 第二組與疫苗接種豬 No. 9. 10 同居

圖 6 試製豬瘟 GP 疫苗接種豬之同居感染試驗



註：A. B 兩組各與 4 頭疫苗接種豬同居。

3. 猪瘟 GP 疫苗之免疫性

1) 疫苗接種後之中和抗體價產生情形

供試猪 5 頭，每頭接種 GP 疫苗 1 劑量，於接種前及接種後 1 至 7 天及 10, 14, 21, 28, 35 天分別採血，並以中和試驗，即稀釋血清加入等量之 100TCID₅₀/ml 猪瘟病毒 (A76) 靜置 37°C 內感作 1 小時取出分注於小試管 4 支，各支 0.1ml，再加 0.4ml ST 細胞懸浮液於 37°C 培養 4 天後 NDV (宮寺株) 攻擊，依 END 法判定其細胞變性現象，其成績如表 1。

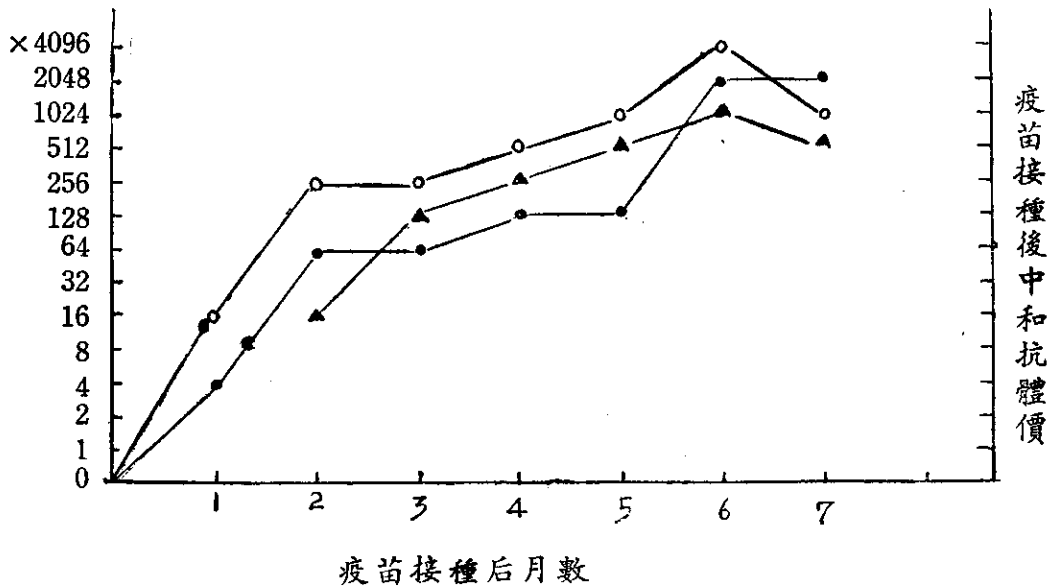
由表 2 得知經疫苗接種后中和抗體價之產生，最快者 10 天後即出現，至 21 天則全例出現，35 天最低為 8 倍，最高者達 1024 倍之高。

表 2 猪瘟 GP 疫苗接種小豬之中和抗體產生情形

採血日數 猪號	中 和 抗 體 價													攻 毒 結 果	
	0	1	2	3	4	5	6	7	10	14	21	28	35		
51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	22	64	健	存
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	64	256	健	存
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	64	265	128	健	存
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	8	健	存
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	64	1024	健	存
對 照	56	0												猪瘟斃死 (13天)	
	57	0												猪瘟斃死 (13天)	

另將 GP 疫苗接種於 3 頭 SPF 小豬每頭 1 劑量 (參照圖 3 之 5, 6 及 10 號)，經 1 至 7 個月，每月採血一次，供為中和抗體價之測定，觀察其消長情形詳細成績如圖 7。由該成績得知，供試之 SPF 小豬經 GP 疫苗接種 30 天後之抗體價為 4~16 倍，2 個月後上增至 256 倍，其後上昇較為緩慢，至 7 個月後尚保有 1,024 倍以上，且對於 ALD 毒 100 倍 1ml 之攻擊，無呈反應而耐過健存。

圖 7 接種猪瘟 GP 疫苗猪隻之中和抗體消長



(8)

2) 疫苗接種小豬之免疫產生時間

供試豬10頭，每頭接種試製 GP 疫苗 Lot I 各 1 劑量，疫苗接種後 1, 2, 3, 4 及 5 天，每天任意抽出 2 頭以強毒 ALD 毒血 (x100) 1 ml 接種攻擊結果，疫苗接種后 1 及 2 天者全倒斃死，3~5天呈輕或中等反應後耐過健存，其成績如表 3。

表 3 免疫效力發生時間

疫苗接種後 至攻毒日數	1天	2天	3天	4天	5天
攻毒結果	●	●	⊙	⊙	⊙
	●	●	⊙	⊙	⊙

註：●表示豬瘟斃死。

⊙表示輕反應耐過。

⊙表示中等反應耐過。

3) 疫苗接種小豬之免疫效力

如上述，圖1~3接種自行試製或日贈之 GP 疫苗各 1 劑量小豬共18隻，經 2 週或 1個月後再以強毒 ALD株毒血 (100x) 1ml 接種於皮下攻擊結果，全例均無呈任何反應而耐過。又圖 4 之疫苗大量接種試驗小豬共 6 隻，經接種 3 週後再以豬瘟強毒 (如上述同) 攻擊結果亦均未呈任何反應。

討 論

關於豬瘟疫苗之研究，最初各國均注重不活化疫苗之發展，惟其免疫性不强，且免疫持續期間亦短，加之製造成本高，及其製造材料之病毒處理不方便，因而逐漸試以兔、山羊及其實驗小動物之豬瘟病毒通過研究活毒疫苗，且已由許多國家應用於豬瘟防疫工作而被認為其免疫性確實優異。

本省十數年來普遍應用兔化豬瘟疫苗^{3, 4, 5)} 獲得輝煌的成果，但其對於少數小豬尚具輕度之反應，由各地應用之統計，佔注射頭數之3~5%。為期獲得更安全之活毒疫苗製造用種株，林等^{6, 7)} 曾將兔化豬瘟毒試予通過並累代繼代山羊至 110 代以上，且於實驗室及田間等試驗獲得良好成績。惟鑑於近年來組織培養技術之長足進步，組織培養疫苗不僅成本更為經濟，而且製造過程中之病毒處理亦較多方便，而將該項試驗停止，並致力以組織培養技術進行有關研究 (兔化豬瘟毒之兔腎細胞通過繼代試驗)。

笹原等研究多年之 GP 疫苗^{9, 10, 11)} 遂被採用並於去 (1969) 年 4 月以來在日本供於全面預防注射用。該 GP 疫苗對於過去一直應用結晶紫豬瘟疫苗之日本豬隻，證明不但安全，且免疫效果甚優。本省為豬瘟疫苗之不斷改進，於去 (1969) 年 3 月間會正式分讓該 GP 疫苗種株，試製疫苗並進行各項之試驗。所得結果與笹原等報告成績同，對於小豬之安全及免疫效力均甚佳。且曾與本省應用多年之兔化豬瘟疫苗比較結果，兩者均未見 Leucopenia 或 Viremia 之出現，共同居感染亦未能成立。惟為慎重計，將再進一步實施其病原性之復歸試驗及接種豬之排毒試驗，現正計劃中。

結 論

1. 依 Seed-Lot-System 試製 GP 疫苗製造用之 Seed Virus 一批4,500ml，其Sub-Lot 批之 Virus 力價為 3.5, 4.0, 4.25，且混合後為4.0。

2. 由上述 Seed Virus 試製乾燥GP疫苗 2 批，其培養原液 (TCID₅₀10^{5.7}/ml) 之大量，即以 100ml 接種於 SPF 小豬共 6 頭，觀察 3 週結果均未呈任何反應。且無 Leucopenia及 Viremia 之出現。至試製乾燥疫苗之安全性經使用 SPF 小豬18隻接種 (各接種 1 劑量) 試驗結果均無呈任何反應。

3. 至於同居感染試驗，經使用 SPF 8 週齡小豬 9 隻與疫苗接種小豬18隻，分為 4 組同居，

經試驗結果均為同居感染陰性，即該疫苗之安全性甚高。

4. GP 疫苗接種豬之中和抗體最快者於接種后10天出現，其抗體價為1~2倍，全例於21天後即8~64倍之抗體產生，且於2個月后上昇至256倍以上，爾後上昇較為緩慢，觀察7個月後尚保有 $\times 1024$ 之高抗體，且對於ALD毒血100倍1ml之接種攻擊無呈反應而耐過健存。

5. 小豬經接種GP疫苗第3天後即發生免疫效力，對於豬瘟強毒ALD毒血(100x) 1 ml之接種攻擊可耐過健存。

6. 試製二批GP疫苗之免疫效力甚高，共使用SPF小豬15頭，每頭接種1劑量，並經觀察14天後再以強毒ALD($\times 100$) 1 ml 接種攻擊結果，均未呈任何反應，其耐過比率為100%。

本研究承蒙農復會研究經費補助及李組長崇道博士之策劃與指導，楊顯問守神，林技正本欽，劉技正永和等先生之鼓勵與指導，謹致衷心之謝忱。

本研究之豬瘟組織培養疫苗種毒GP株承蒙日本農林省家畜衛生試驗場之撥贈，並在試驗進行上曾承該場製造部長笹原二郎博士及豬瘟研究室清水悠紀臣博士來臺懇切之技術指導，謹此一併申致萬分之謝意。

參 考 文 獻

1. Bass, E. P. & Ray, L. D. Evaluation of a tissue culture hog cholera vaccine. J. Amer. Vet. Med. Ass. 142, 1112-1117 (1963).
2. Gillespie, J. H. Sheffy, B. E., Coggins, L., Stewart, M. & Baker, J. A. : Propagation and attenuation of hog cholera virus in tissue culture. Proc. Ann. Mtg. U. S. Livestock San. Ass. 65, 57-63(1961).
3. Robert C. T. Lee : A preliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. Chinese-American Joint Commission on Rural Reconstruction, Animal Industry Series, No. 5 (1954).
4. 林再春等：兔化豬瘟毒之接種反應，及免疫效力，農林廳獸疫血清製造所研究報告 No. 2(1958)
5. 林再春等：兔化豬疫病毒冷凍乾燥之研究第1報，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 1, 1~27 (1963)。
6. 林再春等：兔化豬瘟毒山羊化試驗；第1報 山羊通過情形及對豬之免疫性，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 2 (1954)。
7. 林再春等：兔化豬瘟毒山羊化試驗；第2報 續報山羊通過情形及乾燥山羊化豬瘟疫苗之製造應用試驗，臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 3 (1966)。
8. 林再春等：豬瘟GP組織培養疫苗之安全性及免疫效力，民國58年3月於臺灣畜牧獸醫學會春季學術演講會報告 (1969)。
9. Sasahara, J. & Kumagai, T.: Development of tissue culture living hog cholera vaccine. Jap. Agr. Res. Quart. 1, 24-26(1966).
10. 笹原二郎：豚コレラ生ウイルス予防液，社團法人日本獸醫師會 (1968)。
11. Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y. and Furuuchi, S. : Field experiments of hog cholera living vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 9, 93-91 (1969).
12. Sato, U. Hanaki, T. and Nobuto, K. : Field safety test of a tissue cultured hog cholera vaccine "LOM". Bull. Off. int. Bpiz., 63, 97-101 (1965).
13. Sato, U, Hanaki, T. and Nobuto, K. : Attenuation of hog cholera virus by means of continuous cell-virus propagation (CCVP) method. II. Preparatory experiments on the attenuated strain as a live vaccine. Arch. Ges. Virusforsch.

(10)

15(1), 113-121 (1964).

14. 清水悠紀臣等：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)。

THE POST-VACCINAL REABTIONS AND IMMUNITY EFFICIECY OF HOG CHOLERA GP TISSUE CULTURE VACCINE

T. C. Lin, C. M. Shieh, Y. C. Chen, S. S. Lai, C. S. Lee, and C. C. Chen
(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

ENGLISH SUMMARY

In the recent, many researchers have engaged in research of hog cholera tissue culture vaccine. Since April, 1969, the hog cholera GP live vaccine (developed by Sasahara et al, 1968) has been wildly applied for hog cholera control, and very good results both in the laboratory and field experiments being obtained in Japan.

For further improvement of hog cholera vaccine, the GP strain was introduced to Taiwan in March, 1969, and advanced study for applying the vaccine has been done since then. Two lots of GP vaccine were experimentally manufactured according to Seed-Lot-System, and employed for further studies under Dr. Shimizu's direction.

The experimental results are summarized as follows:

1. According to Seed-Lot-System, one lot of GP vaccine seed virus consisting of three sublots was manufactured. The titer (TCID₅₀/ml) of sublots showed 3.5, 4.0 and 4.5 respectively, and it showed 4.0 after mixing.

2. Two lots of GP vaccine were experimentally manufactured by using the seed virus mentioned above. Six SPF pigs were inoculated with a large amount of the GP vaccines respectively, 100ml for each pig, and no ill post-reactions such as thermal response, leucopenia and viremia were observed. One dose of the two trial vaccines was also inoculated to 18 pigs respectively and all the test pigs showed no post-reaction.

3. Nine SPF pigs of 8 weeks of age were kept together with the above 18 vaccinated pigs, divided into 4 groups, and did not show any reaction.

4. The neutralization antibody was presented on the 10th day after vaccination and its titer showed $\times 1 \sim 2$, while the titer increased to $\times 8 \sim 64$ at 21 days, and reached higher than $\times 256$ at 2 months, then increased slowly, and maintained $\times 1,024$ of high titer at 7 months.

5. The Pigs were survived from the challenge with one ml of ALD virulent blood ($\times 100$) on the 3rd day after vaccination.

6. The immunity efficiency of the two trial GP vaccines was proved 100% by using 18 SPF pigs vaccinated respectively with one dose of the vaccine and challenge with one ml of ALD virulent blood ($\times 100$) at 14th post-vaccination day.