

假性狂犬病之研究

II 臺灣分離毒株之雞腎細胞馴化試驗

蘇杰夫 謝竹茂 林再春 陳守仕

(臺灣省家畜衛生試驗所)

緒 言

養豬事業在臺灣農業生產中，可謂佔極重要的地位，約為農業生產總值的五分之一，對吾國經濟發展貢獻頗鉅，惟於民國 60年7月在屏東某畜殖場，發生一種疫情上與本省既有之豬隻傳染病頗有差異之疾病，幼畜死亡率高達100%，於是年7月起10月止，僅僅三個月內其患畜斃死頭數幾近三千頭，疫勢至熾，遭至嚴重損失；綜觀疫學，臨床症狀，病理變化，動物接種及組織培養等試驗，已證明乃屬Herpes group virus，也即 Aujeszky⁽¹⁾ 首次發表之假性狂犬病 (Aujeszky's Disease)，此由林孫權、楊秉勳等⁽⁴⁾ 及筆者等⁽¹⁰⁾ 先後提出發表。本病曾發生於歐洲、英國、美國及南北美洲等地，亞洲僅中國大陸，在臺灣此乃首次發生，可謂本省畜牧界新增傳染病。

筆者等曾就雲林縣以南各縣市家畜屠宰場，調查豬隻之中和抗體，結果僅高雄及雲林兩縣未檢出陽性例；又於去(61)年12月二度為害臺南縣轄較規模養豬戶，證明本省豬隻已廣泛遭受本病威脅。筆者等⁽¹⁵⁾ 曾試以高度免疫血清及本病耐過豬血清予以控制疫區豬隻，已證實免疫血清之效果，惟製造及應用上頗有問題。本病又對牛隻之感受性甚高，正值吾國發展養牛事業之際，故對本病之防治更顯重要，為達成本病之控制，唯有疫苗之發展應用為良策。

Wawrzkievicz (1965) 曾就本病病毒馴化於 Chicken embryo egg 成弱毒；Bartha 等⁽²⁾ (1963) 以 Aluminum hydroxide 吸著組織培養毒；Berbinschi 等⁽³⁾ (1965) 將組織培養毒以 Saponin 吸著製成疫苗。筆者曾將分離毒以 PK-15、BK、ESK、MK₂ 等株化細胞及 CE、CK、RK、RT 等初代細胞之感染試驗，發現該毒株對 RK-15 感受性極為敏感，約於24小時即發生 CPE，却對 CK 初代細胞較緩慢，故筆者藉此不同性狀，擬把該毒交互通過 PK-15 及 CK 細胞，使其 Adapt 於 CK 細胞，期來日以組織培養法製成本病疫苗，茲將本研究之各項試驗成績報告如下，敬請海內外先進賜於指正。

試驗材料及方法

一、毒株：

1. Pingtung株：係筆者由臺糖公司屏東畜殖場病畜之腦材，經 PK-15 株化細胞分離，並以抗 Aujeszky 株血清予以同定者，該毒經 PK-15 細胞繼代已5代，分注於小試管內各 IC. C.，於 -70°C 凍結保存備用，其 TCID₅₀，對家兔及仔豬 (係2—3週齡哺乳豬) 之感染價 ID₅₀ 皆為 10⁶，本株於本試驗供為馴化於 CK 細胞用種株。

2. Aujeszky's 株：係由省立屏東農專分讓之美國標準毒株，亦以 PK-15 細胞予以繼代，分裝於 -70°C 凍結保存，其 TCID₅₀，對家兔及哺乳仔豬之 ID₅₀ 皆達 10^{6.5}，本株於本試驗供為馴化毒免疫後之豬隻攻擊用及 FACCT 陽性對照用之強毒株。

二、化學藥品及材料動物和培養細胞：

1. 假性狂犬病螢光標示抗體：筆者等⁽¹¹⁾試製品。

2. 材料動物：健康家兔（由臺南縣七股鄉購入，體重 1.5~2kg），健康中雞（由本所附近養雞戶購入之肉雞，約四週齡左右）及 SPF 仔豬（本所無特定性病原動物中心自產之 2 月齡左右仔豬）。

3. 培養細胞：PK—15 細胞，係於 1966 年由 Cutter Laboratories 之 E. Stice 從成豬之腎臟獲得之細胞株 (PK—2a) 所分離之 Clone，現以 Eagle's (含 10% Calf Serum、10% TPB、7.5% NaHCO₃ 3%) 培養液培養，供為 FACCT 法及病毒力價測定用；CK 細胞，係四週齡肉用中雞之腎臟，摘取後經 Trypsin 之消化後以 Earle's (含 10% Goat Serum) 培養液配成 0.5—0.7% 之細胞懸浮液，置於 37°C 經 4—5 天之培養，待 Monolayer 形成後，供本試驗 Pingtung 株馴化之細胞。

三、應用橋樑細胞 (PK—15) 對分離毒於 CK 細胞馴化試驗：

將本病 Pingtung 株以 10^{8.0} TCID₅₀/ml，1 ml 接種於 PK—15 細胞（係培養於 250 ml 角瓶者），經 2—3 天之培養（約於 24—48 小時即發生 CPE，此際 Virus titer 達最高峰，其 TCID₅₀ 為 10^{6.0}），收集培養液接種至 CK 細胞，約經 4—5 天之培養後收集培養液，繼接種 PK—15 細胞，如此交互循環累代通過，以 PK—15 為橋樑細胞使 Pingtung 株馴化於 CK 細胞。同時每於通過 CK 細胞培養之培養液經收集後置於 -70°C 凍結保存，供病毒之力價，病原性之測定。

四、馴化毒之病毒力價及病原性之測定試驗：

1. 病毒力價測定：應用組織培養與螢光抗體組織培養法予以測定。組織培養法，係將馴化毒遞減後稀釋，每階段稀釋以 0.1 ml 與 0.4 ml 之 PK—15 細胞懸浮液混合後於 37°C 培養，各階段稀釋使用 4 支試管，經 4 天培養判定有無 CPE。螢光抗體組織培養法，依 Stewart 之法，將馴化毒依前法稀釋後，接種至 PK—15 細胞，經 12—18 小時後，取出以筆者等製成之螢光標示抗體予以染色，測定其病毒力價。

2. 病原性之測定：將分離毒 Pingtung 株 CK 細胞繼代之培養液（5、10、20、30 代）稀釋至 10⁻¹ 後，分別把每階段之病毒液 1 ml，皮下注射家兔頸部，觀察其對家兔之病原性情形。同時以未經 CK 細胞馴化之原毒做對照。

五、馴化毒對 SPF 豬之安全性及免疫效力試驗：

Pingtung 株於通過 CK 細胞 10 代時，將其培養液稀釋至 10⁻⁶ 後，分別以 1 ml 接種於 PK—15 單層細胞（25 ml 角瓶內），經 37°C，1 小時之感作後，抽棄接種之培養液，並以 Earle's 液洗滌 3—4 次，再加上第一層寒天（係 ×10 Eagle's 液中含 1% Bacto-agar，5% 之 Calf Serum 及 TPB，100 IU/ml 之抗生素），於冷卻後倒放，經 2—3 天培養後，再加入第二層寒天（係第一層寒天內再加入 0.1% neutral red 10%），再經 37°C，2 天之培養，觀察其 Plaque 之形成，同時以吸管吸取 Plaque 內之病毒再行培養於 CK 細胞使其純化。

六、馴化毒對於 CK 細胞增殖曲線之測定：

Pingtung 毒於通過 CK 細胞 30 代時，以 10^{8.0} TCID₅₀/ml 接種後，每經 8 小時採取培養液（液相），感染細胞相 即抽棄培養液，並以 Earle's 洗滌 3—4 次後凍結，再行解凍，並以 3,000r pm 離心 5 分鐘 取其上清為細胞相，如此以便測定液相 (Extracellular Virus) 病毒及細胞相病毒 (Intracellular Virus) 之增殖曲線。

試 驗 結 果

一、Pingtung 株於 CK 細胞之馴化試驗：

Pingtung 株以 PK—15 細胞為橋樑，即該毒株先經 PK—15 細胞增殖培養後，隨即通過 CK

細胞，如此循環交互累代通過，其大綱如圖一所示，於通過 PK-15 細胞第 5 代以後，即直接以 CK 細胞繼代之，並於通過 CK 細胞第 10 代時，曾應用 Plaque Selection method 實施 Cloning，其於 PK-15 細胞上所形成小型之 Plaque，所得之 Clone 仍繼續以 CK 細胞繼代，迄今已通過 CK 細胞 30 代。

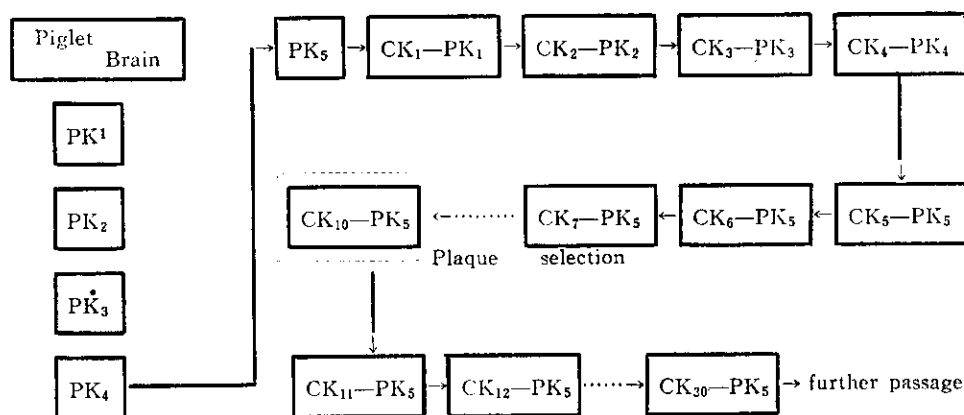


Fig 1. Passage of Pingtung strain in chicken kidney (CK) cell culture by means of Bridging cell (PK-15)

二、Pingtung 株 CK 細胞馴化毒之病毒力價測定：

1. 螢光抗體組織培養法：該 Pingtung 馴化毒經螢光標示抗體染色，測定其抗原，結果於 18 小時內即可在 PK-15 細胞上形成 Plaque，如照片 1 所示，同時測得 TCID₅₀ 為 10^{5.0}/ml。

2. 組織培養法：該 Pingtung 馴化毒依十進稀釋法稀釋後，各階段稀釋液 0.1 ml 與 PK-15 細胞 0.4ml 混合，置於 37°C，經 3—4 天之培養，判定 CPE，結果細胞呈圓形化細胞變性，如照片 2，測得對 PK-15 之感染價亦為 10^{5.0}/ml。

三、馴化毒對家兔病原性及於 CK 細胞之 CPE：

1. 馴化毒對家兔病原性之變化：假性狂犬病毒對家兔之感受性極高，藉此測定 Pingtung 株 CK 細胞馴化毒之病原性變化情形，結果其仍能使家兔致死，但致死力仍有大的變化，如表 1 所示。其致死力已見減弱，致死時間也延長。

Table 1. Pathogenicity in Rabbit inoculated with CK cell culture adapted Pingtung strain of Pseudorabies Virus

Virus strain	Passage	Pathogenicity & Dilution of inoculum						
		- 1	- 2	- 3	- 4	- 5	- 6	- 7
Original	0	D ₂	D ₂	D ₂	D ₃	D ₂	D ₃	A
P-CK ₅ P ₅	5	D ₂	D ₃	D ₃	D ₄	D ₃	A	A
P-CK ₁₀ P ₅	10	D ₄	D ₃	D ₃	D ₃	A	A	A
P-CK ₂₀ P ₅	20	D ₃	D ₄	D ₃	D ₄	A	A	A
P-CK ₃₀ P ₅	30	D ₄	D ₃	D ₄	A	A	A	A

The designation of P-CK₅P₅ refers to the Pingtung strain which was passaged 5 times in CK cell culture, 5 times in PK-15; D₃: Died after 3 days inoculated, A: Alired, S: Survived

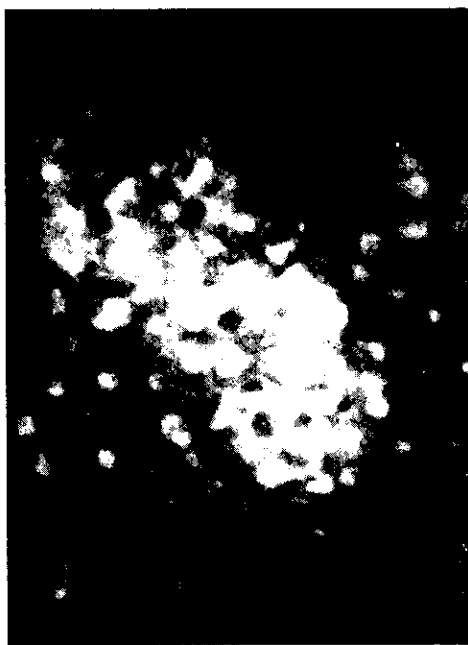


Photo 1. Fluorescence in PK — 15 cell line infected with PrV (CK₃₀PK₅) stained 24 hrs. postinoculation. $\times 200$

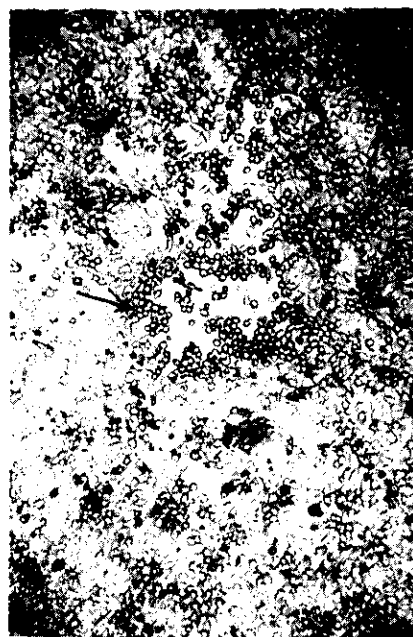


Photo 2. Cytopathogenic changes produced by PrV (CK₃₀PK₅) on PK — 15 cell line, 72 hrs. $\times 100$

2. 對於 CK 細胞發生 CPE 及增殖情形：每於通過 CK 細胞 5、10、20、30 代，測定其增殖情形，如表 2 所示，同時其 CPE 發生的時間也見延遲，由 56~68 小時延至 72~84 小時。又其 Virus titer 由 10^4 提高至 10^5 (TCID₅₀)。

Table 2. CPE change in CK Culture inoculated with CK adapted Pingtung strain of Pseudeorabies Virus

Virus strain	Passage	CPE & Dilution of inoculum						
		-- 1	-- 2	-- 3	-- 4	-- 5	-- 6	-- 7
Original	0	+	+	+	+	-	-	-
P-CK ₅ P ₅	5	+	+	+	+	-	-	-
P-CK ₁₀ P ₅	10	+	+	+	+	+	-	-
P-CK ₂₀ P ₅	20	+	+	+	+	+	-	-
P-CK ₃₀ P ₅	30	+	+	+	+	+	-	-

四、馴化毒對 CK 細胞之增殖曲線：

將 Pintung 株通過 CK 細胞 30 代後，以 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 接種於 CK 細胞，觀察其增殖曲線，如圖 2 所示，細胞相於感染後約 8 小時開始增殖，72 小時為最高感染價有 10^5 TCID₅₀/ml，維持至 84 小時，第 96 小時降至 $10^{1.0}$ TCID₅₀/ml；液相病毒於接種後第 12 小時開始增殖，84 小時達最高點

為 $10^{5.6}$ TCID₅₀/ml，維持至 120 小時，隨後即下降至 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml。細胞相病毒與液相病毒約呈相似曲線增殖，唯細胞相病毒似不如液相病毒維持較高且長時間之 Virus titer。

五、馴化毒對 SPF 小豬之病原性及免疫性：

將 Pingtung 株通過 CK 細胞 30 代並經 Cloning 之馴化毒與未經馴化之原毒 Original Virus 接種 SPF 小豬各 1 頭，並於接種後採血檢查 Viremia 之出現情形，一般臨床症狀，結果如圖 3 所示，僅原毒可檢出 Viremia 及體溫之上升，並於第 3 日呈步伐不穩、失神、後退、四肢痙攣，後期呈麻痺，於接種後第四日斃死；馴化毒株未能檢出 Viremia 且無假性狂犬病之特殊神經症狀而健存。

又將 Pingtung 株 CK 細胞馴化毒稀釋成不同稀釋倍數後，接種於 SPF 小豬，經 14 天再以 $10^{3.0}$ PID₅₀/ml 之 Aujeszky 強毒株攻擊，以測定其免疫性，如表 3 所示。結果該馴化毒對 SPF 小豬具有免疫效力，即屏東株馴化毒之 10^{-5} 能耐過 Aujeszky 強毒攻擊。

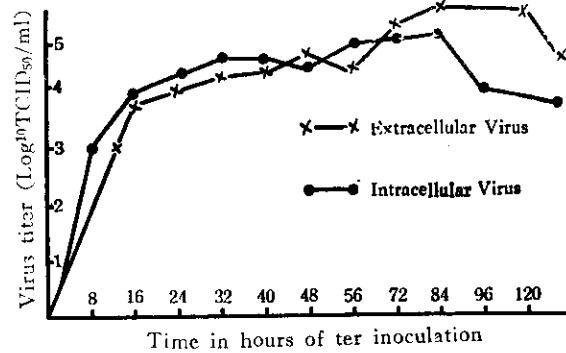


Fig. 2. Multiplication of Pingtung strain in CK cell culture

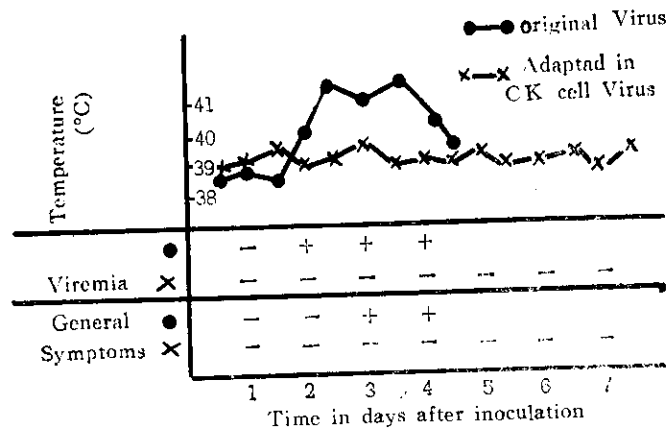


Fig. 3. The Pathogenicity in SPF piglet inoculated with Pingtung strain CK adapted & original virus

Table. 3 The Post-vaccination Reaction & Immunity Efficiency in SPF Piglets with CK cell culture adapted Pintung strain of Pseudorabies virus

Virus strain	Passage	Dilution of inoculum	Results of Vaccination in SPF Piglets		
			Reaction	Neutralizing antibody titer	Result of challenge
Original	0	10^0	Died		
P-C ₃₀ P ₅	30	10^0	no reaction	× 1	Survived
		10^1	∕	× 1	∕
		10^2	∕	× 1	∕
		10^{-2}	∕	× 1	∕
		10^{-3}	∕	× 1	∕
		10^{-4}	∕	0	∕
		10^{-5}	∕	0	∕
		10^{-6}	∕	0	Died
10^{-7}	∕	0	∕		

討 論

假性狂犬病在本省自60年7月在屏東首度發現以來，迄今已近兩年時光，然仍未能完全把本病控制，且有蔓延之勢；於去年(61)12月又發現在臺南縣轄之大養豬場發生。筆者等曾試以高度免疫血清及本病耐過豬血清予以控制，已證實免疫血清供緊急防治之效果，惟血清之製造成本耗費頗鉅，又須於臨床症狀尚未出現之前應用，方得效果，故對本病之防治唯有朝向疫苗之研究發展始為良策。

Zuffa⁽¹⁷⁾ (1963) 曾把本病病毒做成不活化疫苗，但效力未臻理想；筆者也曾試把分離毒感染家兔之腦乳劑，以 Formalin 處理，製成不活化疫苗，得相同的結果，效力甚微。隨後 Wawrzkievicz⁽¹⁶⁾ (1965)；Zuffa & Grigelora⁽¹⁸⁾ (1966) 曾把假性狂犬病病毒經通過 Embryonating Chicken eggs 數代後使成弱毒；Berbinschi & Papadopal⁽³⁾ (1965) 曾以 saponin 吸著組織培養毒做成疫苗；Bartha & Kojnok⁽²⁾ (1963) 曾把本病病毒通過雞胚胎後，再經 CE 及 BK 細胞繼代培養，次以 Aluminum hydroxide 吸著製成活病疫苗。經這些學者使本病病毒經由培養細胞之繼代，可使其毒力轉弱製成疫苗，且證明活毒疫苗遠較死毒疫苗優越，並已於歐美各國已廣泛被應用。有鑑於此，筆者即把分離之 Pingtung 株經 PK-15 細胞為橋樑，已把該毒株馴化於 CK 細胞，其對家兔之致死力已顯著轉弱（即由原有之 $10^{6.0}$ 減至 $10^{3.0}$ ）。Stewart, Carbrey & Kress (1957) 曾由假性狂犬病感染豬隻血中檢出病毒，證明其可使感染豬引起 Viremia；筆者曾就馴化毒與原毒接種豬隻，抽取血液檢查，結果僅由原毒接種豬檢出病毒，而馴化毒則否，顯示馴化毒之轉弱，然或因供試豬月齡過大，致未發生 Viremia 亦有可能，擬選擇月齡較小哺乳豬（2~3週齡）再試。Shope⁽¹²⁾ (1935)、Kojnok & Surjan⁽⁵⁾ (1962) 及 McFerran & Dow⁽⁷⁾ (1965) 等曾由本病感染豬隻的鼻汁中檢出病毒，而本試驗之馴化毒是否也可由鼻汁排泄，尙待此後追試，究明其有否排毒之虞。McFerran & Dow⁽⁷⁾ (1965) 又報告，本病感染豬隻體內病毒，最先出現於神經系統，隨至淋巴系統再到各臟器及其他部位，此與抗體產生之快慢有極大關係，是否可依 Interferon 的現象產生防禦能力；本試驗中，馴化毒接種豬隻血中抗體之產生緩慢且低，但仍可防禦強毒之攻擊，此點有待今後之研討。

又 Sazawa⁽⁹⁾ 等 (1969) 曾將分離之日本腦炎病毒於 30°C 之 BK 細胞培養而獲得減毒之 S-株；Sasahara⁽⁸⁾ 等 (1966) 也將豬瘟毒經 ST、BK 細胞再使之馴化於 GPK 細胞後，再於 30°C 下培養獲得 GPE 弱毒株；筆者也曾試把本病 CK 細胞馴化毒以 30°C 培養，結果其 CPE 發生之時間也見緩慢，約延長 36~42 小時之久，可見溫度可左右病毒之 Virulent，因此筆者擬續將 Pingtung 株 CK 細胞馴化毒試以不同之溫度予以培養，尋求適當之培養溫度予以研討，供為來日假性狂犬病組織培養活毒疫苗製造。

結 論

1. 將假性狂犬病臺灣分離毒 Pingtung 株，以 PK-15 為橋樑細胞，即先經 PK-15 細胞增殖培養後，隨即接種 CK 細胞，如此交互循環累代通過 CK 細胞已 30 代，病毒之毒力逐漸減低。
2. 該馴化毒對 CK 細胞之 Virus titer 也見提高，由原來之 $10^{4.0}$ 升高至 $10^{5.0}$ TCID₅₀。
3. 馴化毒對家兔之病原性，已逐漸減弱，由原來之 $10^{6.0}$ 減弱至 $10^{3.0}$ ID₅₀。
4. 馴化毒對 CK 細胞之增殖曲線，細胞相病毒與液相病毒採取相似曲線增殖，但液相病毒之 Virus titer 比細胞相維持時間較長且高。
5. 馴化毒對 SPF 小豬之安全性，免疫性均甚高，同時也無 Viremia 發生，其 10^{-5} 對 SPF 小豬接種後，能耐過 Aujeszky 強毒攻擊。

誌 謝

本研究之完成得國家科學委員會及農復會之經費補助，並承蒙農復會李主任委員崇道博士及余組長如桐之懇切指導與鼓勵，謹誌衷心之謝忱。

參 考 文 獻

1. Aujeszky, A. :1902 Ueber eine neue Infektionskrankheit bei Haustieren. Zbl. Bakt. Abt. I., Orig. 32:353.
2. Bartha, A., & Kojnok, J. :1963 Active immunization against Aujeszky's disease. Proc. 17th World Vet. Cong., Hanover. 1:531.
3. Berbischi, C., & Papadopol, M. :1965 Immunogenicity of Aujeszky's disease saponin vaccine prepared from culture virus. Lucraile. Inst. Cere. Vet. Bioprep. Pasteur. 4:19.
4. James, P. S. Yang, Philip, T. Durfee, Ma, C. H., Chich, C. P., & Albert, E. New, :1972 An Epizootic of Aujeszky's disease in swine in Taiwan: Virus Isolation, Identification & Seroepidemiological Studies. Chinese Journal of Microbiology, 5. 69—75.
5. Kojnok, J., & Surjan, J. :1963 Investigations Concerning the colostral immunity of pigs in the cases of the Aujeszky's disease. Acta. Vet. 13:111.
6. Lin, S. C., Tung, M. C., Liu, C. I., Chang, C. F., Huang, W. C., Cheng, C. M. : 1972 An Outbreak of Pseudorabies in swine in Pingtung. Chinese Journal of Microbiology, 5. 56:68.
7. McFerran, J. B., & Dow, C. :1965 The distribution of the virus of Aujeszky's disease (Pseudorabies) in experimentally infected swine. A. J. V. R. 26-631.
8. Sasahara, J., & Kumagi, T. :1966 Development of Tissue Culture Living Hog Cholera Vaccine. Jap. Agr. Res. Quart. 1:24.
9. Sazawa, H., Sugimori, T., Morimoto, T., Miura, Y., & Watanabe, M. : 1969 Response of swine to An Attenuated Strain of Japanese Encephalitis Virus obtained by Passage in Bovine Kidney Cell Cultures. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 9. 74:82.
10. Shieh, C. M., & Su, J. F. : 1972 Diagnosis of TSC Pingtung swine breeding farm died of Pseudorabies disease. The abstracts of papers presented at the 78th scientific meeting of TAIH.
11. Shieh, C. M., Su, J. F., & Lin, T. C. : 1973 Antibody survey on Pseudorabies in pigs in Taiwan. The abstracts of papers presented at '73 spring scientific meeting of Taiwan Vet. Med. & Anim. Husb. Ass.
12. Shope, R. E. : 1935 Prevalence of Pseudorabies among middle western swine and the possible role of rats in herd to herd infections. Jour. Exp. Med. 63:101
13. Stewart, W. C., Carbery, E. A., & Kresse, J. I. : 1967 Detection of Pseudorabies virus by immunofluorescence. J. A. V. M. A. 15:747.
14. Su, J. F., & Lin, T. C. : 1971 Studies on Pseudorabies Disease (Aujeszky's) in swine : I. Preparation and application of fluorescent-labeled antibody of Pseudorabies. Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hlth. Exp. Rep. 8, 35—43.

15. Su, J. F., Shieh, C. M., Lin, T. C., & Chen, S. S. : 1973 Application of Pseudorabies Immune Sera collected from Naturally Recovered Pigs for its emergent control. The abstracts of papers presented at '73 spring scientific meeting of Taiwan Vet. Med. & Anim. Husb. Ass.

16. Wawrzekiewicz, J. : 1965 The occurrence of antibodies against the virus of Aujeszky's disease in pigs after their natural infection. *Med. Weterynar.* 11:18.

17. Zaffa, A. : 1963 Versuch Zur Immunisierung Von Laboratoriumstiere and Schweinen mittels Formaldehyd und UV-Strahlen Inaktiviertern Aujeszky-virus. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 17:593.

18. Zaffa, A., & Griglova, K. : 1966 Immunization against Aujeszky's disease. II. Cytopathic action and plaque morphology of various virus strain in relation to their virulence to pigs. *Arch, Exp. Veterinarmed.* 20:127.

Studies On Pseudorabies (Aujeszky's Disease) In Swine :

II. Adaptation of New Isolate through Chicken-kidney Cell Monolayer

J. F. Su, C. M. Shieh, T. C. Lin, S. S. Chen.

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

English Summary

Aujeszky's disease (Pseudorabies) occurred in southern Taiwan from June 1971 for 2 years, not only had not been controlled but also continually spread. Killed vaccine had been found to be inadequate for the protection of swine during natural outbreak. But many investigators paid more attention to the living vaccine. They had found that modified live vaccines were available for use in swine. So author tried to adapt the new isolated Pingtung strain in chicken-kidney (CK) cell cultures. The results were summarized as follows:

1. The Prv. Pingtung strain could be successfully adapted in CK cell after several passages of propagating the virus in PK-15 cell and CK cell culture by turns. Being passed 30 passages through CK cell culture. The CPE change was later than original virus (from 56-68 hrs. to 72-84 hrs.) and its virus titer ($TCID_{50}$) rose to 10^3 . (Original virus is 10^4 in CK cell).

2. The adapted virus pathogenicity to rabbit had been attenuated. when injected to rabbits the infected dose (ID) was diminished to 10^3 . (Original virus is 10^6).

3. The adapted virus growth curve in CK cell culture: Extracellular virus and Intracellular virus took the same curve, but Extracellular virus maintained longer and higher virus titer than Intracellular virus.

4. The adapted virus had extremely high immunity potency to SPF piglets and there were no ill post-vaccinated reactions such as thermal response, viremia observed, but neutralization antibody titer increased slowly. Its. pig infected dose (PID) reached to 10^5