

兔化豬瘟疫苗乾燥媒劑改良試驗

楊揚輝 劉義雄 陳由昌 黃文徹 林進發
林正陽 林澤清 江良興 詹益波 陳守仕

緒 言

民國41年(1952)農復會顧問紐遜博士(Dr. Newson)與李主任委員崇道^(1,5)由菲律賓分讓兔化豬瘟毒一株供本所從事各項基礎試驗並試製水劑疫苗,結果安全性及免疫性甚佳,因此首先在彰化縣社頭鄉實施田間試驗結果令人滿意,然後普及全省各地應用,惟此項疫苗須冷藏當日使用,無法保存,且無法列入接受國家生物藥品檢定,易生弊端等短拙。至1959年由林再春等⁽¹⁾進行兔化豬瘟疫苗冷凍乾燥試驗,在乾燥媒劑之選擇試驗中以25%脫脂奶粉加等量健康馬血清對兔化豬瘟毒之保存最優,故乃採用此法大量製造疫苗供豬瘟防治之需,沿用迄今已十餘年,其效果極佳,惟近幾年來為節省外匯而使用臺製之真空瓶及橡皮栓,因此種真空瓶及橡皮栓之品質欠佳,而且疫苗乾燥媒劑仍使用脫脂奶粉與健康馬血清故時有真空不良,疫苗變質,或溶解性不佳等問題發生。

笹原等(1966)開發豬瘟 GP 組織培養疫苗成功並於1969年起在日本已普遍採用供豬瘟防治之用,該項疫苗使用 Polyvinyl Pyrrolidone (簡稱P. V. P.)及乳糖為媒劑,其保存性及溶解性均有良好之成績。

筆者等為探討病毒能長期保存且溶解性良好之媒劑供為爾後兔化豬瘟疫苗製造之依據,乃參照笹原等^(2,4,9,10,14)之方法配製 P. V. P. 及乳糖為主要媒劑,並檢討其濃度等各種試驗,並且應用氮氣代替真空對兔化豬瘟毒之影響性,保存性,溶解性等進行試驗茲將試驗所得結果報告如下:

試驗材料及方法

(一) 供試毒株:

(1) 兔化豬瘟毒:製造用毒株 I.P.C. 816代毒,係以感染家兔脾臟加入脫脂乳粉(Skimmilk)與等量健康馬血清為媒劑經冷凍乾燥保存。

(2) 豬瘟強毒 -ALD 株:係本所保存之豬瘟強毒,供疫苗檢定及豬瘟研究之用,其病毒力價為 10^7 PID₅₀/ml。

(3) 豬瘟毒 LOA 株:係由日本農林省動物醫藥品檢查所分讓,於本試驗中經 ST 細胞繼代保存。供試管內中和抗體測定用之抗原。

(4) 新城雞瘟病毒—宮寺株:係由日本農林省動物醫藥品檢查所分讓,係以雞胚胎繼代採取其感染尿液供用。

(二) 家兔:本省產白色及雜色健康家兔,由臺灣省養兔協會供應體重 1.8~3.0kg。

(三) 小豬:由臺糖種畜場購入,體重 15~20kg,未經豬瘟免疫之三品種小豬。

(四) 豬睪丸 (ST) 細胞:由臺糖種畜場採取之 4~6 週齡未經預防注射之三品種小豬睪丸,以無菌操作採取,經 0.25% Trypsin 消化后之細胞以增殖培養液 (Earle's液+0.5% Lactoalbumin+15%健康牛血清+抗生素)調成每 ml 200萬個細胞之濃度供為 E. N. D 法^(6,8,10,11)中和試驗用。

(五) 健康牛血清 (B. S.):本省產一歲左右之小黃牛,經牛傳染性下痢症抗體檢查陰性,在本所關西疏散處隔離飼養所採取之血清,經 56°C 非働化及雜菌檢查陰性者,保存於-20°C 之冰櫃備用。

- (六) PK-15 株化細胞：係由日本農林省家畜衛生試驗場分讓，在本所繼代者。
- (七) Polyvinyl Pyrrolidone (P. V. P): 英國製 BDH 牌 (The British Drug House LTD, BDH Laboratory Chemicals Division.)。
- (八) 氮氣(Nitrogen Gas)：由市販購買，使用前用長72公分，寬14公分之玻璃筒二支經乾熱消毒填滿乾燥劑及 Pyrogallol Acid($C_6H_3(OH)_3$) 後鎖緊，兩端各以橡皮管連結，氮氣經 Pyrogallol Acid 及乾燥劑后以自然方式注入真空封栓機內，使氮氣充滿真空瓶內後封栓。
- (九) 真空冷凍乾燥機：西德製 Leybold Go₄ 之 Chamber 型，其 Chamber 內之最低溫度到達 $-25^{\circ}C$ 其最高真空度為 0.001mmhg, Condenser 之最低溫度為 $-75^{\circ}C$ 以 Diffusion Pump 行最後乾燥。
- (十) 真空封栓機：美國製 Stokes 牌，Model 506PM 真空封栓機。
- (十一) 螢光顯微鏡：係 Nikon 牌螢光顯微鏡，東芝牌 SH200 高壓水銀燈。
- (十二) 乾燥媒劑之種類與各種濃度之配製：共試製三批，其 Medium 之配法如下：

- Lot I. 1% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin (真空) 簡稱 Lot I - A.
0.3% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin (真空) 簡稱 Lot I - B.
25% Skimmilk + 50% 健康馬血清 + 0.02mg/ml Kanamycin (真空) 簡稱 Lot I - C
(Lot 1146)
- Lot II. 0.3% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin (真空) 簡稱 Lot II - A.
及
Lot III. Lot III - A.
0.3% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin (以氮氣代替真空)
..... 簡稱 Lot II - AN. Lot III - AN.
0.15% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin (真空) 簡稱
Lot II - B. Lot III - B.
0.15% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin (以氮氣代替真空)
簡稱 Lot II - BN. Lot III - BN.
25% Skimmilk + 50% 健康馬血清 + 0.02mg/ml Kanamycin (真空) 簡稱
Lot II - C (Lot 1278) Lot III - C (Lot 1285)
25% Skimmilk + 50% 健康馬血清 + 0.02mg/ml Kanamycin (以氮氣代替真空)
簡稱 Lot II - CN (Lot 1278) Lot III - CN (Lot 1285)

- (十三) 疫苗試製及病毒之檢出試驗：將兔化豬瘟病毒種毒稀釋成爲 10^2 ，將其 1ml 接種於健康家兔靜脈內，經 72 小時后採取其脾臟及腸間膜淋巴腺與上述各製備之媒劑製成 10 倍組織乳劑，分裝於 10ml 真空瓶各 1ml，在 $-75^{\circ}C$ 之冰櫃內行預備凍結約 5 小時後送入冷凍乾燥機內行冷凍乾燥後，分爲二組，第一組以真空封栓機抽出空氣，使瓶內成爲真空后封蓋橡皮栓及鋁蓋，另一組以真空封栓器抽出空氣後再以自然方式使氮氣通過焦性沒食子酸與乾燥劑進入真空瓶內使瓶內充滿氮氣再封橡皮栓及鋁蓋，每批試製成之疫苗於乾燥直後各組任意抽出 2~3 支以稀釋液溶解稀釋成爲乾燥前之 10% 組織乳劑，按組混合後再稀釋至所需倍數，並將其 1ml 接種於小豬或家兔測定其病毒力價及熱型並以螢光抗體法檢出病毒。
- (十四) 乾燥疫苗之保存性試驗：將每次試製之疫苗分別保存於冷室 ($0^{\circ}C \sim 6^{\circ}C$) 及室溫，按期每組任意抽取 2~3 支分別以稀釋液溶解稀釋爲乾燥前之 10 倍組織乳劑，按組混合後稀釋至所需倍數，並將每稀釋階段 1ml 接種於小豬或家兔測定病毒力價及熱型。
- (十五) 螢光抗體法測定病毒力價：依林再春^(3,14)之二段法實施，各組試製疫苗分別於製造直後，或經冷室及室溫保存至一定期間後接種小豬或家兔，並以各稀釋階段 0.1ml 接種培養於小試管，后每支小試管加入 0.4ml 之豬睪丸細胞浮游液於 $37^{\circ}C$ 靜止培養 5 天后之培養液接種於已形成單層細胞之 PK-15 細胞之 Leighton tube 或放有蓋玻璃片之小燒皿，再加入培養液繼續培養 48~60 小時后以豬瘟螢光標示抗體液染色后鏡檢。

試驗成績

(一) 試製疫苗之保存性

每次試驗將各稀釋階段 1ml 接種於小豬 1~2 頭，經疫苗接種後 10 天再以豬瘟強毒 ALD 株 10,000M LD 攻擊，觀察二星期，另選二頭為毒血對照豬，結果由表 1 得知 P. V. P. 與 Lactose 對病毒之保存效果雖佳，但其濃度過高反而有影響病毒之保存性之趨向，亦急速降低疫苗之力價，如 Lot I—A 組雖製造直後之疫苗力價有 $\geq 10^{5.5}$ ，但在冷室保存 222 日後降至 $10^{3.5}$ ，故本組將停止試驗，Lot I—B 組與對照組之 Lot I—C 組在製造直後之力價均為 $\geq 10^{5.5}$ ，冷室保存 222 日同樣保持為 $10^{5.0}$ 之力價，冷室保存 379 日尚存 $10^{4.5}$ 之力價，Lot II—A 及 Lot II—C 組雖製造直後未做小豬之接種試驗，但經冷室保存 6 個月後與 Lot I—B 組之冷室保存 222 日同樣其力價為 $10^{5.0}$ ，冷室保存至 18 個月之力價為 Lot II—A，Lot II—C 均為 $10^{4.0}$ ，Lot II—AN 為 $\geq 10^{4.5}$ 詳如附表 1。

(二) 試製疫苗對健康家兔熱反應測定試驗

兔化豬瘟毒引進臺灣初期對接種家兔後之熱反應不甚明顯，但經幾年來繼續通過家兔至今已 816 代，家兔接種後之熱反應雖偶有極少數因個體之差異而有例外，大部份均呈極明顯之熱型反應，故本試驗亦自 Lot II 以後為節省經費利用家兔熱型反應來測定病毒力價，經家兔熱反應試驗，其中雖熱型反應稍有強弱之差但尚可供為病毒感染之指標。由表 2 得知 Lot I—B 與 Lot I—C 組在冷室保存 559 日後對家兔熱反應尚保持 10^4 之力價 Lot II 及 Lot III 各組在製造直後之力價均為 $\geq 10^{3.5}$ ，經室溫保存 2 個月後各組之力價為 Lot II—A $\geq 10^{4.5}$ ，Lot II—AN $10^{3.5}$ ，Lot II—B $10^{3.5}$ ，Lot II—BN $\geq 10^{4.5}$ ，Lot II—C $\geq 10^{4.5}$ ，Lot II—CN $10^{3.5}$ ，Lot III—A $10^{3.5}$ ，Lot III—AN $10^{2.5}$ ，Lot III—B $10^{2.5}$ ，Lot III—BN $10^{2.5}$ ，Lot III—C 及 Lot III—CN 均在 $\geq 10^{4.5}$ 由此成績顯示以 0.3% P. V. P. 為媒劑時比 0.15% P. V. P. 為媒劑者對兔化豬瘟毒之保存似較佳，且 Lot II 比 Lot III 為好，因此採用 Lot II—A，Lot II—AN，Lot II—C 等為繼續進行保存性試驗，經冷室保存 6 個月後之力價為 Lot II—A，Lot II—NA，Lot II—B，Lot II—BN，均為 $\geq 10^{3.5}$ ，Lot II—C，Lot II—CN 為 $10^{4.5}$ ，冷室保存至 18 個月之力價均為 $10^{4.0}$ ，詳如附表 2。

(三) 螢光抗體法測定病毒力價

每次試驗均利用小豬或家兔接種試驗時，以各稀釋階段 0.1ml 接種培養於小試驗管，每支小試驗管加入 0.4ml 之豬睪丸細胞浮游液於 37°C 靜置培養 5 天後培養液接種於已形成 monolayer 之 PK-15 細胞之 Leighton-tube 或放有蓋玻璃片之小燒皿，再加入培養液繼續培養 48~60 小時後以豬瘟螢光標示抗體液染色後鏡檢結果大致與小豬之成績稍一致。

(四) 疫苗溶解性之比較

將試製疫苗分別保存於冷室及室溫後，在進行小豬接種試驗或家兔熱反應試驗時分別詳細觀察其溶解性結果由表 3 所示由 P. V. P. 為媒劑者無論其濃度如何溶解性均甚佳，加入稀釋液即可溶解，反之由 25% 脫脂乳粉 + 50% 健康馬血清為媒劑者其溶解性較慢，經室溫保存 2 個月或冷室保存 6 個月以上者加入稀釋液則需振盪 2—3 分鐘始溶解所以兩者在溶解性方面有顯著差異，詳如附表 3。

(五) 疫苗接種後中和抗體產生情形

試製疫苗之保存性試驗供試豬隻在疫苗接種前，接種後 10 日及豬瘟強毒攻擊後第 14 日分別採血分離血清，並經 56°C 非熱化後依 END 法測定其中和抗體，試驗結果如表 1 所示疫苗接種前之中和抗體為 0~8 倍，疫苗接種 10 日後之中和抗體為 0~256 倍，雖疫苗接種後第 10 日尚有無中和抗體產生者，但亦可耐過豬瘟強毒之攻擊，而豬瘟強毒攻擊後第 14 天之中和抗體普遍升高在

X32~ \geq X512。

(六) 氮氣對兔化豬瘟毒之影響

為明瞭氮氣對兔化豬瘟毒有無影響分為兩組實施比較試驗，第一組即疫苗經乾燥後按照以往方法放入真空封栓機抽去空氣後封栓，使瓶內保持真空狀態，第二組即疫苗放入真空封栓機抽出空氣使裡面真空後讓氮氣通過（為本試驗特別設計之乾燥玻璃筒），以自然吸入方式吸入真空封栓機內，使真空瓶內吸滿氮氣來代替真空後封栓之。經冷室保存18個月後對小豬之接種試驗結果未影響兔化豬瘟毒之活性，小豬接種後無任何不良反應均耐過強毒之攻擊，足以證實冷室保存18個月對兔化豬瘟毒之生存似未有所影響，製造直後及冷室保存6，12、18個月後分別接種家兔結果對病毒力價似未有多大影響對家兔並無任何不良反應與上述豬隻接種試驗成績稍相同。

(七) 預備凍結溫度對乾燥過程之影響

試製由P. V. P. 與 Lactose為媒劑之乾燥疫苗雖在 -20°C 之Deep-freezer 內行預備凍結5小時，但在乾燥過程中曾發生溶解起泡情形，不但對病毒之活性及保存有所影響且失去商品價值，故改用 -75°C 之冰櫃先行預備凍結後不但在乾燥過程中未發生溶解起泡情形，乾燥後之疫苗亦相當美觀故以P. V. P. 為媒劑者須使用超低溫行預備凍結始能得到理想之製品。

(八) 疫苗對小豬之安全性

使用小豬2頭，每頭接種50劑量，則將50劑量之疫苗溶解為40ml之稀釋液，分別接種於兩側耳根部皮下各20ml，觀察三星期結果，接種部位之腫脹翌日則已消失，豬隻亦未有任何反應。

討 論

本次試驗純係為改良在臺灣普遍應用十餘年由脫脂乳粉與健康馬血清為媒劑之乾燥兔化豬瘟疫苗之溶解性，簡化製造過程，以及因臺製真空瓶栓之品質不佳，容易導致真空不良，引起疫苗變質效力減低等問題，笹原等以各種 Adjuvant之配製檢討試驗結果以0.3% P. V. P. 20% Lactose對病毒之安定性較優，故採用該法應用於GP豬瘟疫苗，林再春等^{2,4}亦在臺灣追試結果亦得到良好之結果。

筆者等嘗試以P. V. P.及Lactose為媒劑來代替歷年來之媒劑，尤其對P. V. P.與Lactose之濃度詳加以檢討，由配成不同濃度之P. V. P. 經試驗檢討結果由0.3%P. V. P.，10% Lactose為 Adjuvant者較1%P. V. P.及0.15% P. V. P.為優，1% P. V. P. 為 Adjuvant 者在冷室保存222日時對小豬之力價已降低到 $10^{3.5}$ ，而0.3% P. V. P. 為 Adjuvant者在 Lot I 之試製疫苗冷室保存18個月尚與對照組之脫脂乳粉與健康馬血清為媒劑者相同保持 $10^{4.0}$ 之病毒力價（如表1）0.15% P. V. P. 為媒劑者在室溫保存二個月後用家兔熱反應或螢光抗體法測定結果如表2所示似比0.3%P. V. P.者病毒力價之損失為快，疫苗之溶解性以P. V. P.為媒劑者無論其濃度如何在室溫保存半年或冷室559日後加入稀釋液即時溶解，對照組之脫脂乳粉與健康馬血清為媒劑者在室溫保存半年者頗難溶解，冷室保存559日加入稀釋液後須劇振2—3分鐘後始能溶解，關於使用接種家兔熱反應來測定病毒力價，雖有家兔個體之差異除無法測定之例外仍須檢討者，但可以做感染之指標，如Lot I—B之冷室379日之保存試驗使用家兔熱反應測定結果尚保持 10^4 之力價。Lot II各組之冷室保存18個月之力價均為 $\geq 10^{4.0}$ 。

疫苗接種小豬之中和抗體產生情形，在疫苗接種前之中和抗體價為0~8倍，疫苗接種後10天為0~256倍，強毒攻擊後14天時中和抗體價為16倍—2048倍，雖疫苗接種第10天尚有中和抗體陰性小豬，但均可耐過強毒之攻擊。

關於氮氣代替真空注入完成乾燥之真空瓶內，觀察氮氣對兔化豬瘟毒之影響性結果，冷室保存至18個月時氮氣對兔化豬瘟毒之活性似未有所影響，而對小豬之接種或家兔之接種均無任何不良反應，以冷室保存至18個月之成績所觀察結果N瓦斯充填之乾燥疫苗與原來之真空冷凍乾燥疫苗之間對保存性似無顯著差異。

至於預備凍結之溫度與乾燥過程之關係，以往兔化豬瘟疫苗之乾燥過程中為減輕冷凍乾燥機之負荷而未採用 Chamber 內行預備凍結，改在 -20°C 之 Deep-Freezer 內先行預備凍結，因所使用之媒劑為脫脂奶粉與健康馬血清在冷凍乾燥過程中，不但未發生溶解起泡情形，乾燥後之外觀頗美觀。但今試製由 P. V. P. 與 Lactose 為媒劑之乾燥疫苗，使用 -20°C 之 Deep-Freezer，預備凍結 5 小時后移入冷凍乾燥機乾燥結果在乾燥過程中，曾有溶解起泡之情形發生，改以 -75°C 之冰櫃預備凍結后未發生溶解情形，而可得到外觀優美之疫苗，由此可推想可能因 P. V. P. 之品質有關故預備凍結時須使用超低溫凍結似為妥。疫苗對小豬之安全性經使用小豬 2 頭各接種 50 劑量結果未發生任何反應，足以證明兔化豬瘟病毒甚具安全性同時亦證明試用之媒劑亦無任何毒性。

結 論

- (一) 以 P. V. P. 為媒劑在各種濃度之選擇試驗中以 0.3% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml K-anamycin 者對兔化豬瘟毒之活性，保持最優，在冷室保存 18 個月后尚與現行之 25% Skim milk 與 50% 健康馬血清為媒劑者可保持 $10^{4.0}$ 之同等力價。
- (二) 由 P. V. P. 為媒劑者無論其濃度如何在室溫保持 6 個月或者冷室 559 日尚能與製造直后同樣保持良好之溶解性，則加入稀釋液后瞬即溶解。
- (三) 疫苗接種小豬中和抗體之產生，疫苗接種前之中和抗體在 0 ~ 8 倍，接種后 10 天為 10 ~ 256 倍，攻擊后 14 天為 16 ~ 2048 倍，在疫苗接種后 10 天雖有部份豬隻未出現中和抗體但均能耐過 10,000 MLD 之強毒攻擊。
- (四) 使用家兔熱反應來測定病毒力價結果似可供為兔化豬瘟毒感染之指標。
- (五) 冷凍乾燥疫苗使用 N 瓦斯代替真空所觀察 N 瓦斯對兔化豬瘟毒之影響性，結果不影響對兔化豬瘟毒之活性，且對小豬與家兔之接種試驗亦無任何不良反應發生。
- (六) 預備凍結時使用 -20°C 之 Deep-Freezer 時在乾燥過程中，曾發生溶解起泡情形，經使用 -75°C 之冰櫃情形甚佳，故使用 P. V. P. 為媒劑時必需使用超低溫之預備凍結始可獲得品質優良之製品。
- (七) 對病毒之檢出使用螢光抗體法測定病毒力價結果與小豬之接種試驗結果能一致。
- (八) 疫苗對小豬之安全性很高，經接種 50 劑量之疫苗亦未有任何反應。

誌 謝

本研究之完成，承蒙國家科學委員會及農復會之研究補助費與經費之補助，並蒙農復會李主任委員崇道博士，余組長如桐，劉技正永和，林技正再春之指導與鼓勵，且本股同仁之協助謹此致謝忱。

Table I. Virus titers of inoculation pig and FACCT with trial vaccine Preserved in refrigerator

Medium	Trial Lot No.	Condition	Preservation Period	Vaccine Dilution Series	Pig No.	N. T. titer			FACCT	Results	Remarks			
						Before Vaccination	10 days after Vaccination	32 days after challenge						
1% P. V. P. + 10% Lactose Lot I + 0.02mg/ml Kanamycin	Lot I	V	Right after Drying	10 ³	17 18	0 0	0 0	32 512	- -	10 ^{5.5}	Control : Challenge Virus (1) Right after drying #25 D ₇ #28 D ₉ (2) Preserved for 6 mons. #55 *7 #58 D ₈ (3) Preserved for 222days #385 *5 #386 *6 (4) Preserved for 379 days #91 *5 #92 *5 (5) Preserved for 12 mons #337 D ₁₁ #338 D ₁₃ (6) Preserved for 18 mons #61 D ₁₁ #62 *11 Note : V : Vacuum N : N ₂ gas D : Died of H.C. rumerals indicate days elapsed since Challenge * : Killed when moribund rumerals indicate days elapsed since Challenge			
				10 ⁴	15 16	0 0	0 4	32 512	- -					
				10 ⁵	13 14	8 0	0 16	64 128	- -					
			222 days	10 ³	370	0	32	128	-	10 ^{3.5}				
				10 ⁴	368 369	0 2	0 2		D ₁₁ D ₉					
				10 ⁵	366 367	2 0	0 0		D ₁₁ D ₁₂					
			0.3% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin	Lot I	V	Right after Drying	10 ³	19 20	0 4	0 4		128 64	- -	10 ^{5.5}
							10 ⁴	23 24	0 4	2 8		512 64	- -	
							10 ⁵	21 22	0 0	0 0		512 128	- -	
222 days	10 ³	375 376				0 8	8 32	128 64	- -	10 ^{5.0}				
	10 ⁴	373 374				0 4	8 32	64 64	- -					
	10 ⁵	371 372				0 0	0 64	64 64	D ₁₄ -					
379 days	10 ³	86 87				0 0	0 4	128 64	- -	10 ^{4.5}				
	10 ⁴	84 85				0 0	4 8	32 64	- -					
	10 ⁵	82 83				0 8	0 0		D ₆ D ₈					
1% P. V. P. + 10% Lactose Lot II + 0.02mg/ml Kanamycin	Lot II	V	6mons.	10 ³	67 68	2 0	0 8	256 128	++ -	10 ^{5.0}				
				10 ⁴	65 66	0 0	2 32	64 512	- -					
				10 ⁵	63 64	0 0	0 0	128	++ D ₁₂					
			12mons.	10 ³	343 344	8 2	64 8	32 64	+ -	10 ^{4.5}				
				10 ⁴	341 342	4 0	8 8	128 64	+ -					
				10 ⁵	339 340	0 0	0		D ₁₁ D ₁₀					

	N	18mons.	10 ²	5 6	0 0	8 16	1024 512		-	4.0 10	
			10 ³	3 4	8 0	16 8	32 256	+	-		
			10 ⁴	1 2	4 0	16 8	16	+	D		
		6mons.	10 ³	73 74	0 0	0 0	64 128	++	-	5.5 10	
			10 ⁴	71 72	2 0	16 0	64 32	++	-		
			10 ⁵	69 70	0 0	0 0	64 512	---	-		
		12mons.	10 ³	349 350	0 0	8 32	64 256	+	-	4.5 10	
			10 ⁴	347 348	2 2	64 32	128 16	+	-		
			10 ⁵	345 346	4 0	<8 0		-	D ₁₃ D ₁₂		
	18mons.	10 ²	11 12	0 0	8 8	512 128		-	4.5 10		
		10 ³	9 10	0 0	8 8	2048 64	+	-			
		10 ⁴	7 8	0 0	8 8	2048 32	+	-			
	25% Skimm -ilk + 50% normal Horse Serum + 0.02 mg/ml Kanamycin	Lot I	Right after Drying	10 ³	5	0	0	64		-	5.5 10
				10 ⁴	3 4	0 2	0 0	128 64		-	
				10 ⁵	1 2	0 0	4 0	64 64		-	
222 days			10 ³	365	0	4	512		-	5.0 10	
			10 ⁴	363 364	2 4	8 4	256 256		-		
			10 ⁵	361 362	0 2	0 0	64		D ₉		
379 days		10 ³	80 81	4 0	8 16	256 64		-	4.5 10		
		10 ⁴	78 79	2 0	8 16	64 128		-			
		15 ⁵	76 77	0 0	8 4			D ₁₁ D ₁₃			
Lot H (Vac. 1278)		V	6mons.	10 ³	61 62	4 0	0 0	128 128	++	-	5.0 10
				10 ⁴	59 60	0 0	16 0	64 64	++	-	
				10 ⁵	57 58	0 0	0 0	64	++	D ₁₆	

12mons.	10 ³	367 368	0 0	128 256	128 512	+	-	4.5 10
	10 ⁴	365 366	0 0	256 16	512 64	+	-	
	10 ⁵	363 364	8 4	< 8 8		-	D ₁₀ D ₁₀	
18mons.	10 ²	23 24	0 0	256 8	512 64		- -	4.0 10
	10 ³	21 22	2 0	16 8	64 64	+	- -	
	10 ⁴	19 20	16 0	8 8	128	-	D ₁₃ +	

Table 2-1 Virus titers of inoculation rabbits fever reaction and FACCT With trial Vaccine (0.3% P. V. P.)

Medium	Trial Lot No.	Condi- tion	Storage		Dilution	Fever Reac- tion	FACCT	Remarks
			condi- tion	period				
0.3% P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin	Lot I	V	Cold Storage	559 days	10 ²	+ -	+	Note : V : Vacuum N : N ₂ gas
					10 ³	+	+	
					10 ⁴	+	+	
	Lot II	V	Right after Drying	10 ³	+	++		
				10 ⁴	+	++		
				10 ⁵	+ -	++		
		N		10 ³	+	++		
				10 ⁴	+	++		
				10 ⁵	-	--		
	Lot III	V	10 ³	++	+			
			10 ⁴	++	++			
			10 ⁵	++	++			
		N	10 ³	++	++			
			10 ⁴	++	++			
			10 ⁵	+	+-			

Lot II	V	Room Temperature	2 mons.	10 ²	+	++	
				10 ³	+	++	
				10 ⁴	+	++	
	N			10 ²	+	++	
				10 ³	+	++	
				10 ⁴	+ -	+ -	
Lot III	V	Room Temperature	2 mons.	10 ²	+	++	
				10 ³	+	+ -	
				10 ⁴	-	--	
	N			10 ²	+	++	
				10 ³	-	+ -	
				10 ⁴	-	--	
Lot II	V	Cold Storage	6 mons.	10 ³	+	++	
				10 ⁴	+	-- +	
				10 ⁵	+	++	
				N	10 ³	+	++
					10 ⁴	+	++
					10 ⁵	+	--
	V	Cold Storage	12 mons.	10 ²	+		
				10 ³	+	+	
				10 ⁴	+	-	
				N	10 ²	+	
					10 ³	+	+
					10 ⁴	+	+

	V	Cold Storage	18 mons	10 ²	++	
				10 ³	+±	+
				10 ⁴	+±	-
	N			10 ²	+	
				10 ³	++	+
				10 ⁴	+±	-
FACCT control	L. P. C. (Seed Virus)			10 ⁴		++
				10 ⁵		++
				10 ⁶		--
	Virus Control			10 ⁴		++
				10 ⁵		++
				10 ⁶		+--
Cell Control (Negative)						---

Table 2-2 Virus titers of inoculation Rabbits fever reaction and FACCT with trial Vaccine (0.15% P. V. P.)

Medium	Trial Lot No.	Con- dition	Storage		Dilution	Fever Reac- tion	FACCT	Remarks
			condi- tion	period				
0.15%P. V. P. + 10% Lactose + 0.02mg/ml Kanamycin	Lot II	V		Right after Drying	10 ³	+	++	Note : V : Vacuum N : N ₂ gas
					10 ⁴	+	++	
					10 ⁵	+	++	
		N			10 ³	+	++	
					10 ⁴	±	++	
					10 ⁵	+	++	
	V	Room	2 mons.	10 ²	+	++		
				10 ³	-	++		

FACCT Control	Lot III	temp.	N	10 ⁴	-	--	
				10 ³	+	++	
				10 ²	+	++	
				10 ¹	+	+-	
		Cold Storage	V	6 mons.	10 ³	+	++
					10 ⁴	±	++
					10 ⁵	+	+-
					10 ³	+	++
		N	6 mons.	10 ⁴	+	++	
				10 ⁵	+	++	
				10 ³	++	++	
				10 ⁴	++	++	
	Right after Drying	V	Right after Drying	10 ³	++	++	
				10 ⁴	++	++	
				10 ⁵	++	++	
				10 ³	++	++	
	N	Right after Drying	10 ⁴	++	++		
			10 ⁵	++	++		
			10 ²	+	++		
			10 ³	±	++		
Room temp.	V	2 mons.	10 ⁴	-	--		
			10 ²	+	++		
			10 ³	-	+-		
			10 ⁴	-	--		
N	Room temp.	10 ³	-	+-			
		10 ⁴	-	--			
L. P. C. (Seed virus)			10 ⁴		++		
			10 ⁵		++		

	10 ⁶		--
Virus control (A. L. D.)	10 ⁴		++
	10 ⁵		++
	10 ⁶		+ -
Cell Control (Negative)			---

Table 2-3 Virus titers of inoculation rabbits fever reaction and FACCT With using Vaccine of now

Medium	Trail Lot No.	Condition	Storage		Dilution	Fever reaction	FACCT	Remarks
			condition	period				
25% Skimmilk + 50% normal Horse serum + 0.02mg/ml Kanamycin	Lot I (Vac. 1146)	V	Cold storage	559 days	10 ²	+	+	Note : V : Vacuum N : N ₂ gas
					10 ³	+	+	
					10 ⁴	+	+	
	Lot II (Vac. 1278)	V	Right after drying	10 ³	+	+		
				10 ⁴	+	+		
				10 ⁵	+	+		
		N		10 ³	+	+		
				10 ⁴	+	+		
				10 ⁵	+	+		
	V	Room temp.	2 mons.	10 ²	+	++		
				10 ³	+	++		
				10 ⁴	+	++		
N		10 ²		+	++			
		10 ³		+	++			
		10 ⁴		-	+ -			

Lot III (Vac. 1285)	V	Cold Storage	6 mons.	10 ³	+	++
				10 ⁴	+	++
				10 ⁵	-	++
				10 ³	+	++
				10 ⁴	+	++
				10 ⁵	-	++
	V	Cold Storage	12 mons.	10 ²	+	
				10 ³	+	+
				10 ⁴	+	+
	V	Cold Storage	18 mons.	10 ²	+	
				10 ³	++	+
				10 ⁴	++	-
	V		Right after drying	10 ³	++	++
				10 ⁴	++	++
				10 ⁵	++	++
				10 ³	++	++
				10 ⁴	++	++
				10 ⁵	++	++
V	Room Temp.	2 mons.	10 ²	+	++	
			10 ³	+	++	
			10 ⁴	+	++	
			10 ²	+	++	
			10 ³	+	++	
			10 ⁴	+	++	
N		Right after drying	10 ³	+	++	
			10 ⁴	+	++	
			10 ⁵	+	++	
			10 ³	+	++	
			10 ⁴	+	++	
			10 ⁵	+	++	

FACCT Control	L. P. C. (Seed Virus)	10 ⁴		++
		10 ⁵		++
		10 ⁶		--
	Virus Control I (A. L. D.)	10 ⁴		++
		10 ⁵		++
		10 ⁶		+ -
Cell Control (Negative)				----

Table 3. Comparison of solubility test of trial vaccine preserved at room and refrigerator temperature

Medium	Trial Lot No.	Right after drying	2 mons.	6-7 mons.		379 days	559 days	Remarks
			Cold storage	Room. Temp	Cold Storage	Cold Storage	Cold Storage	
1% P. V. P. + 10% Lactose	Lon I	⊖			⊖	⊖	⊖	
0.3% P. V. P. + 10% Lactose	Lot I	⊖			⊖	⊖	⊖	
	Lot III	⊖	⊖	⊖	⊖			
	Lot II	⊖	⊖	⊖	⊖			
0.15% P. V. P. + 10% Lactose	Lot II	⊖	⊖	⊖	⊖			
	Lot III	⊖	⊖	⊖	⊖			
25% Skimmilk + 50% Normal horse Serum	Lot I (1146)	⊕			⊕	⊕	⊕	
	Lon II (1278)	⊕	⊕	⊕	⊕			
	Lot III (1285)	⊕	⊕	⊕	⊕			

Note : ⊖: Good solubility.

⊕: Dissolving in 1 minute.

⊕⊕: Dissolving in 2-3 minutes.

⊕⊕⊕: Poor solubility.

參 考 文 獻

1. 林再春等：兔化猪瘟病毒冷凍乾燥之研究第 1、2 報。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 1.1~39 (1963)。
2. 林再春等：猪瘟GP組織培養疫苗之安全性及免疫效力。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 6.1~10 (1969)。
3. 林再春等：兔化猪瘟毒之試管內 (in Vitro) 檢出及定量法之研究。臺灣省家畜衛生試驗所研究報告No. 7,1~12 (1970)。
4. 謝竹茂等：乾燥猪瘟GP組織培養疫苗之保存性及免疫持續試驗。
臺灣省家畜衛生試驗所研究報告 No. 7,13~18 (1970)。
5. Robert, C. T. Lee. : Apreliminary report on the lapinized hog cholera vaccine in Taiwan. Chinese-American Joint Commission on Rural Reconstruction, Animal Industry Series. No. 5 (1958)。
6. Kumagai, T., Shimizu, T. and Matumoto, M. : Detection of hog cholera virus by its effectoin Newcastle disease virus in swine tissue culture. Science, 128:366 (1958)。
7. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S. and Matumoto, M. : Anew in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. I. Establishment of standard procedure. Jour. of Immunol. 87:245 (1961)。
8. Matumoto, M., Kumagai, T., Shmizu, T. and Ikeda, S. : A new in-vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. 2. Some characteristics of END method. Jour. of Immunol. 87:257 (1961)。
9. Kumagai, T., Morimoto, T., Sasahara, J. and Watanabe, M. : Antigenic relationship between hog cholera (HC) virus and bovine viral diarrhea (BVD) virus as revealed by cross neutralization tests. Nat. Inst. Animal Health Quart, 2:201 (1962)。
10. Kumagai, T., Shimizu, T., Ikeda, S., and Matumoto, M. : A new in vitro method (END) for detection and measurement of hog cholera virus and its antibody by means of effect of HC virus on Newcastle disease virus in swine tissue culture. IV. Reappraisal of effect of serum in culture medium and time of challenge with ND virus. Nat. Inst. Animal Health Quart. 4:135 (1964)。
11. 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. 15 (1) 13:121 (1964)。
12. Sato, U., Hanaki, T. and Nobuto, K. : Field safety test of a tissue culture hog cholera vaccine "LOM". Bull. Off. Int. Epiz. 97:101 (1965)。
13. Sasahara, J., Kumagai, T. : Development of tissue culture living hog cholera vaccine. Jap. Agr. Res. Quart. 1, 24:26 (1966)。
14. Sasahara, J., Kumagai, T., Shimizu, Y. and Furuchi, S. : Field experiments of hog cholera living vaccine prepared in guinea-pig kidney cell culture. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart 9. 83:91 (1969)。

Improvement Studies on the Media for the Lapinized Hog Cholera Vaccine

Y. H. Yang, Y. S. Liu, Y. C. Chen, W. C. Hwang, C. F. Lin

C. Y. Lin, T. C. Lin, L. S. Kiang, I. P. Chan, S. S. Chen

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

English Summary

Skimmilk and healthy horse sera have been employed as the media for the preparation of Frozen-dried Lapinized Hog Cholera Vaccine since 1959. The vaccine preserved by this way maintained excellent quality. Recently, in order to save the national expenses, the import vials for holding frozen-dried vaccine were substituted by native products. However, the quality of vaccine was not uniform and its solubility was poor after new containers were used.

In order to find an ideal medium instead of skimmilk and healthy horse sera for the preparation of frozen-dried Lapinized Hog Cholera Vaccine, the authors have done many experiments using Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) and Lactose instead of conventional media and Nitrogen Gas (N gas) instead of vacuum condition for checking their preservation, solubility and safety. The results are summarized as follows :

1. 0.3% PVP and 10% Lactose were the optimal concentration for the preservation of Lapinized hog cholera virus. Both media, conventional and new media for the preservation of vaccine showed the same virus titer (10^4 PIU₅₀) 18 months after stored at ice box.

2. The vaccine employed new media stored at room temperature for six months and 559 days at ice box still had good solubility, but the vaccine employed conventional media showed very poor solubility, six months after stored at room temperature and one year at ice box. It take 2-3 minutes and required vigorously shaking for dissolving the vaccine when diluent was added.

3. The neutralization antibody titer of the piglets was ranging from 0-x8 prevaccination, 0-x64 post vaccination. It showed x32-x1024 14 days after challenge with virulent virus. Although some of the piglets could not be detected neutralization antibody 10 days post vaccination, all were survived when challenged with 10,000 MLD virulent virus.

4. The thermal reaction of the rabbits could be probably used for titrating Lapinized hog cholera virus.

5. It did not show any ill effect to the lapinized hog cholera virus, piglets and rabbits by using N gas instead of vacuum condition.

6. Thawing and bubing occasionally occurred when prefreezing process was carried out at -20°C deep freezer, but not found at -75°C. Therefore, when PVP was employed as media prefreezing must be carried out at the ultra-low deep freezer for obtaining good quality products.

7. It showed same results to detect and titrate the virus by fluorescent antibody technique and pig inoculation.

8. The vaccine was safe when pig was inoculated with 50 doses.