

# 豬假性狂犬病疫苗之研究：分離毒 $N_3$ 株於通過牛腎細胞120代之病原性及其對四週齡仔猪之免疫效力

林敬覆

臺灣省家畜衛生試驗所

摘要

將分離毒 $N_3$ 及 $T_3$ 株分別連續通過 RK—13, ESK及BK等細胞株，以期將其馴化滅毒，並於每隔20代數時，以斑灶形成之方法 Cloning，而加以純化馴化毒。於其分別連續通過RK—13細胞160代及連續通過ESK及BK細胞120代時，各以2ml之劑量（病毒含量為 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml）以皮下接種於家兔左膝部各二頭，結果發現接種其經連續通過 BK 細胞 120代數之馴化毒，對家兔之病原性較接種未經馴化者延後24~48小時死亡。

將通過BK細胞120代之 $N_3$ 株馴化毒，於測定其病毒感染力價後，以 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml為1劑量。然後以 $\frac{1}{10}$ 劑量（1）※， $\frac{1}{5}$ 劑量（1），1劑量（2），5劑量（1）及10劑量（1）分別接種於4週齡之仔猪，並於接種後第8日攻毒之，結果除對照組（1）於攻毒後第5日發病死亡外，其試驗組均耐過。

※為接種之仔猪頭數

緒言

本病自民國六十年七月首次於本省發生以後<sup>4,7</sup>，本病病毒便長存於本省豬隻體內<sup>1,2,3</sup>，而隨着養豬事業之發展而蔓延至全省各地，時至今日實為養豬事業上一大困擾。本所因鑑於此，除早先從事於明瞭其疫情狀況外<sup>6</sup>，更從事於本病疫苗之開發<sup>5</sup>，以利於本病之控制及防疫，進而撲滅本病。分茲將本省分離毒 $N_3$ 及 $T_3$ 株於 RK—13, ESK 及 BK 等細胞株馴化相當代數後對家兔病原性之檢討及通過BK 細胞120代之 $N_3$ 株對4週齡仔猪之免疫效力試驗，分述於次，敬請指正。

材料與方法

供試病毒：Aujeszky's 株為本病之標準毒株，分讓自屏東農專，本以 PK—15 細胞增殖，今改以 RK—13增殖保存<sup>5</sup>。

$N_3$ 株係分離自本省南部患猪病例3號仔猪之腦部組織，以CE（Chicken Embryo）增殖保存<sup>5</sup>。

$T_3$ 株係分離自本省北部患猪病例3號仔猪之腦部組織，以RK—13增殖保存<sup>5</sup>。

供試細胞：兔腎細胞（Rabbit kidney, RK—13），供Aujeszky's株之增殖及 $N_3$ 及 $T_3$ 株馴化用及測定病毒感染力價用。

猪胎兒腎臟細胞（Embryonic Swine kidney, ESK），供 $N_3$ 及 $T_3$ 株馴化用及測定其病毒感染力價用。

牛腎細胞 (Bovine kidney, BK) , 供 $N_3$ 及 $T_3$ 馴化及測定其病毒感染力價用。

分離毒馴化之方法及過程：將分離毒 $N_3$ 及 $T_3$ 株分別連續通過RK—13, ESK及BK 細胞, 其每代次病毒液之收穫 (Harvesting) 應以其細胞產生 CPE 之後期為佳。並於其每通過 20 代次時Cloning 一次, 以期於純化馴化毒。

病原性之測定<sup>5</sup>：將分離毒於連續通過 RK—13, ESK 及BK等細胞相當代數時, 於測定其病毒感染力價後, 分別稀釋至 $10^4$ TCID<sub>50</sub>/ml, 然後各以其2ml之劑量分別接種於家兔之左膝部皮下各二頭, 並於接種後翌日起觀察紀錄至第七日。

供試仔豬：供試之仔豬為無假性狂犬病中和抗體之 4 週齡仔豬, 且其健康狀況良好者。

供試之馴化毒株及其免疫效力試驗之方法：將連續通過BK細胞120代之 $N_3$ 馴化毒, 於測定其病毒感染力價後, 以 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/ml為 1 劑量。然後以 $\frac{1}{10}$ 劑量,  $\frac{1}{100}$ 劑量, 1 劑量, 5 劑量及 10 劑量分別接種於供試仔豬之頸肩肌肉深部內, 其中除 1 劑量接種 2 頭外, 其餘劑量均各接種一頭。於接種後觀察紀錄之, 並於免疫接種後第八日以強毒攻毒之, 以測定其對免疫仔豬之保護力。

抗體消長之測定：於免疫接種之當日及攻毒之當日, 分別採取供試仔豬之血清, 以測定其當時之假性狂犬病中和抗體之消長情形。其方法依照筆者已發表之研究報告中<sup>6</sup>。

攻毒：將Aujeszky's株以RK—13增殖, 於測定其病毒感染力價後, 以 $10^8$ TCID<sub>50</sub>/ml之含毒量各1ml分別以鼻內及頸肩深肉部肌肉內同時攻毒之, 於攻毒後翌日起觀察紀錄至14日。

## 結 果

分離株 $N_3$ 及 $T_3$ 分別連續於RK—13細胞通過160代及於 ESK及BK通過120代後, 其對家兔之病原性之比較結果, 發現其對家兔病原性減弱之情形, 以通過BK細胞120代者比通過RK—13細胞160代及通過ESK細胞120代者較為顯著。見表 1。

Table 1. Pathogenicity of the attenuated isolates of  $N_3$  and  $T_3$  strains in rabbits

Rabbits no.	Virus titer (TCID <sub>50</sub> /ml)	Virus-Cell-Subpassages	Time in days after ino.						
			1	2	3	4	5	6	7
1	$10^4$	$N_3$ -RK-13-Original	0	0	×	—	—	—	—
2	$10^4$	$N_3$ -RK-13-Original	0	0	×	—	—	—	—
3	$10^4$	$N_3$ -RK-13-160	0	0	×	—	—	—	—
4	$10^4$	$N_3$ -RK-13-160	0	0	×	—	—	—	—
5	$10^4$	$N_3$ -ESK-120	0	0	×	—	—	—	—
6	$10^4$	$N_3$ -ESK-120	0	0	0	×	—	—	—
7	$10^4$	$N_3$ -BK-120	0	0	0	0	×	—	—
8	$10^4$	$N_3$ -BK-120	0	0	0	0	×	—	—
9	$10^4$	$T_3$ -RK-13-Original	0	0	×	—	—	—	—
10	$10^4$	$T_3$ -RK-13-Original	0	0	×	—	—	—	—
11	$10^4$	$T_3$ -RK-13-160	0	0	×	—	—	—	—
12	$10^4$	$T_3$ -RK-13-160	0	0	×	—	—	—	—
13	$10^4$	$T_3$ -ESK-120	0	0	×	—	—	—	—

14	10 <sup>4</sup>	T <sub>3</sub> -ESK-120	0	0	0	×	—	—	—
15	10 <sup>4</sup>	T <sub>3</sub> -BK-120	0	0	0	×	—	—	—
16	10 <sup>4</sup>	T <sub>3</sub> -BK-120	0	0	0	0	×	—	—
17	—	—	0	0	0	0	0	0	0
18	—	—	0	0	0	0	0	0	0

Note: O Survival. × Death.

供試仔豬於接種經BK細胞120代之N<sub>3</sub>株馴化毒(N<sub>3</sub>-BK-120)後其體溫除接種5劑量者未見升高外,其餘均行升溫至40~40.9°C不等,其體溫升高有延續3天之久者。見表2。

供試仔豬於接種N<sub>3</sub>-BK-120之馴化毒後,於第八日其假性狂犬病之中和抗體升高至×8~×16不等。見表2。

供試仔豬於以N<sub>3</sub>-BK-120之馴化毒免疫後第八日,以強毒攻毒後,其試驗組之體溫均維持正常。同時於攻毒後第十日之假性狂病之中和抗體亦未見有顯著上昇。見表2。但對照組則於攻毒後第3天起便體溫上升、咬牙、神經不振、微顫之現象,至第4天起後腿便有麻痺站立不能、口有白沫等現象出現,至第五日清晨死亡。經解剖後,採取能腦部組織及肺臟等病材、分離病毒、結果均分離出病毒,經同定之結果,係為假性狂犬病無誤。

Table 2. Body temperature and antibody response of the 4-weeks old piglets vaccinated with the LIVE-VIRUS VACCINE of the N<sub>3</sub>-BK-120 strain

Pig no.	Virus strain	Vac. dose (10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml)	Body temperature		SM titer		
			Pt-vac.	Pt-chal.	Pre-vac.	8th day Pt-vac.	10th day Pt-chal.
1	N <sub>3</sub> -BK-120	1/10	40.2 (6D)	N	<×2	×8	×16
2	N <sub>3</sub> -BK-120	1/5	40.2 (3D)	N	<×2	×8	×16
3	N <sub>3</sub> -BK-120	1	40.0 (4, 5D)	N	<×2	×8	×16
4	N <sub>3</sub> -BK-120	1	40.0 (3D)	N	<×2	×8	×8
5	N <sub>3</sub> -BK-120	5	N	N	<×2	×16	×16
6	N <sub>3</sub> -BK-120	10	40.3 (1, 2, 3D)	N	<×2	×8	×8
7	—	—	N	41.2 (3, 4)	<×2	<×2	—

D: The day of post-vaccinated or post-challenged.

N: Normal.

## 討 論

本病病毒對於豬隻之感受性隨豬隻之日齡之增加而銳減,且其免疫效力亦與豬隻之日齡有相對之關係<sup>8</sup>,故本試驗之結果雖對4週齡仔豬有良好之免疫效果,但其對於懷孕母豬及一日齡之仔豬之免疫效力及安全性未必如本試驗之結果。故擬以N<sub>3</sub>-BK-120之馴化毒為基礎繼續通過BK之細胞至N<sub>3</sub>-BK-150代時,再進行其對懷孕母豬及一日齡仔豬之免疫效力及安全性之試驗及檢討,以便開發一安全而有效之活毒疫苗。

至於接種本疫苗之仔豬其熱症日數不一之原因,即本馴化株之病毒性狀未達穩定之故,其原因即於

Cloning時可能Cloning到病原性稍強者之故。

## 誌 謝

本試驗承蒙國科會之補助得以完成，特此申謝。本疫苗效力試驗時，承蒙本所陳所長守仕博士，賴主任秀穗博士及謝主任快樂博士之指導及鼓勵和本股鍾股長與本股同仁之合作，得以順利完成本試驗，於此一並誌謝。

## 參 考 文 獻

1. 翁森昌、嚴家清等 (1976) 罹患假性狂犬病大豬羣疫情變化之調查；臺糖畜產研究64/65年期研究報告，165~170。
2. Howarth, J. A. & Depaoli, A : An Enzootic of Pseudorabies in Swine in Colifornia. J. A. V. 152, (April. 15, 1963) : 1114~1118.
3. Howarth, J. A. : A Serologic Study of Pseudorabies in Swine. J. A. V. M. A. Vol. 15 4 No. 12 (June, 15. 1962) : 1583~1589.
4. James, P. S. Yaung ; Philip. T. Durfee. Ma. C. H., Chieh, C 'P. & Albert. E. New, (1972) : An Epizootic of Aujoszky's disease in smine in Taiwan : Virus Isolation, Identification & Seroepideniological Studies, Chinese Journal of Microbiology, 5, 69 ~75.
5. Lin, K. F., & Chiu. T. C. : studies on the production of Pseudorabiens Vaccine for Swine : Investigation on the pertinent cell line cultuer for replication of the isoted viruses of N<sub>3</sub> and T<sub>3</sub> strain. Taiwan Prov. Res. Inst. Anim. Hith. Exp. Rep. 13 (1976).
6. Lin, K. F., & Chiu. T. C., : The distribution of the neutrabjing antibody against Pseuderabies from slughter pigs in Taiwan Region., Taiwan. Prov . Res. Inim. Hith. Exp. Rep. 13. 1— (1976).
7. Lin. S. C., Tung, M. C., Liu. C. I., Chang. C. F., Huang. W. C., Cheng. W. C., and Cheng. C. M. : (1972) An Outbreak of Pseuderabies in Swine in Pingtung. Chinese Jounai of Microbi ology, 5, 56—68.
8. MeLnick. J. L. : Cytopathology. in Viral disease. 40—43.

## Studies on the Production of Pseudorabies Vaccine for Swine: The Virulence and Immunity of the Isolates of N<sub>3</sub> Strain after 120 Subpassages in Bovine Kidney Cell Cultures

K. F. Lin.,

(Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health)

### Summary

In order to develop a live-virus vaccine against Pseudorabies for Swine use, the isolates of N<sub>3</sub> and T<sub>3</sub> strain have been passaged in various cell line cultures for a long period, and purified by plaque forming method in every other 20 subpassages. After the pathogenicity test of these attenuated isolates in rabbits have been finished, the results of the test revealed the virulence of the isolates after 120 subpassages in Bovine Kidney Cell in Rabbits were weaker than those of the isolates after 160 subpassages in Rabbit Kidney Cell (RK-13), and 120 subpassages in Embryonic Swine Kidney.

The 4-week old piglets were vaccinated by the attenuated isolate of N<sub>3</sub> strain after 120 subpassages in Bovine Kidney (N<sub>3</sub>-BK-120) with 1/10 dose (1 dose: 10 TC ID<sub>50</sub>/ml) (1)\*, 1/5 dose (1), 1 dose (2), 5 dose (1), and 10 dose (1). And challenge at 8th day after being vaccinated by the virulent virus of Pseudorabies of Aujeszky's strain. And all the vaccinated piglets have survived from being challenged but control piglet.

\* : Head of piglet.