

# 乾燥兔化豬瘟疫苗稀釋液改進試驗

楊敏雄\* 詹益波 林惠君 崔國君

台灣省家畜衛生試驗所製劑研究系

**摘要** 各種試驗稀釋液，經高溫高壓滅菌後保存，均保持透明，色澤亦無變化。各種稀釋液稀釋疫苗後，放置 23 °C 及 37 °C，保存 0、2、4、6 小時，其 pH 值變化差異不顯著，與病毒含量相關性不高。PBS 係一最理想稀釋液，稀釋後無論放置於 23 °C 或 37 °C，病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 均非常穩定，其他各種試驗稀釋液，在 23 °C 較低溫狀態下，病毒含量也可保持穩定，其差異不顯著。

**關鍵詞：**兔化豬瘟疫苗 (Lapinized hog cholera vaccine)  
 兔 50 % 感染劑量 (RID<sub>50</sub>)，( Rabbits 50 % infection dose )  
 稀釋液 (Diluent)

## 緒言

乾燥兔化豬瘟疫苗自開發成功經林等<sup>[1, 2]</sup>比較各種稀釋液結果以 5 % 葡萄糖稀釋最理想，沿用迄今 30 餘年。近年來有部分人士質疑 pH 值如此低 (3.9~5.2) 是否會影響疫苗之免疫效果？鍾等<sup>[3]</sup>以 5 % 葡萄糖稀釋兔化豬瘟組織疫苗，放置室溫 32 °C 4 小時後，有大幅降低病毒力價 (TCID<sub>50</sub>) 之趨勢。為了探討較常用疫苗稀釋液對乾燥兔化豬瘟疫苗病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 之影響，期能尋求更適當之代替稀釋液。

## 材料與方法

1. 乾燥兔化豬瘟疫苗：本所製造 Lot 2457。
2. 材料家兔：購自本所契約養兔場，健康良好家兔，體重 1.8~3.0 kg。
3. 葡萄糖：製藥用原料。
4. 食鹽及動物膠 (Gelatin)：試藥一級品。
5. 蒸餾水：本所自行蒸餾製造。
6. 5 % 葡萄糖溶液：為本所製造供乾燥兔化豬瘟疫苗稀釋用之溶液，每瓶分裝 40 ml，121 °C，20 分鐘高壓滅菌，冷卻後測定 pH 值。
7. 磷酸緩衝生理食鹽水 (PBS)

- |   |         |
|---|---------|
| NaCl  | 8.0 g   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 0.45 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 2.52 g  |
| 0.4 % Phenol red 溶液                                   | 2.5 ml  |
| 蒸餾水加至   | 1000 ml |
- 並修正為 pH 7.0，每瓶分裝 40 ml 封蓋，121 °C，20 分鐘高壓滅菌，冷卻後再測 pH 值。
8. 0.5 % 動物膠磷酸緩衝生理食鹽水 (0.5 % Gelatin PBS)

製備：

- M / 15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.08 g + 1000 ml DW )  
 M / 15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ( Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11.19 g + 1000 ml DW )

配方：

- |   |         |
|---|---------|
| M / 15 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 60 ml   |
| M / 15 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 40 ml   |
| Gelatin                                 | 5 g     |
| 0.85 % NaCl 蒸餾水加至                       | 1000 ml |

修正 pH 值為 7.0

每瓶分裝 40 ml，121 °C，20 分鐘高壓滅菌

## 9. 生理食鹽水

- |          |         |
|----------|---------|
| NaCl     | 8.5 g   |
| 蒸餾水      | 1000 ml |
| 不修正 pH 值 |         |

\*抽印本索取作者  
 台灣省家畜衛生試驗所

每瓶分裝 40 ml，121 °C，20 分鐘高壓滅菌。

10. 疫苗稀釋後保存於不同溫度及時間，分別測定 pH 值。

(A) 使用本所製造乾燥兔化豬瘟疫苗 Lot 2457 疫苗分成用 PBS，0.5 % Gelatin PBS，生理食鹽水及 5 % Glucose 四組。

(B) 每組稀釋疫苗溶液分別放置於 23 °C 及 37 °C 保存 0，2，4，6 小時並分別用 pH Meter 測試 pH 值，成績如表 1。

11. 不同稀釋液稀釋疫苗後保存於不同溫度及時間，分別測試其病毒含量 (RID<sub>50</sub>)

(A) 使用同批號乾燥兔化豬瘟疫苗 20 劑量 16 瓶。

(B) 分 PBS，0.5 % Gelatin PBS，0.85 % NaCl，5 % Glucose 不同稀釋液等 4 組。

(C) 每組稀釋疫苗溶液分別放置於定溫室 23 °C 及 37 °C，保存 0，2，4，6 小時。

(D) 每組各不同保存階段均分別稀釋成 10<sup>-1</sup>，10<sup>-2</sup>，10<sup>-3</sup>，10<sup>-4</sup>，並以碎冰塊冷藏備用。

(E) 自 10<sup>-2</sup> 至 10<sup>-4</sup> 每一稀釋階段靜脈接種家兔 4 隻，每隻 2 ml。

(F) 試驗前一日及接種後每天上、下午各量免體溫一次，並作成體溫變化圖表，以便判定。

(G) 試驗 6 天後用 Reed - Müench 氏方法計算 RID<sub>50</sub>，其成績如表 2。

## 結 果

(一) 由稀釋後保存於不同溫度及時間測定 pH 值 (表 1) 分析

(A) pH 值之信賴限界

保存於 23 °C

PBS pH : 7.14 < μ < 7.24

PBS + 0.5 % Gelatin pH : 7.0 < μ < 7.1

0.85 % NaCl pH : 7.1 < μ < 7.25

5 % 葡萄糖 pH : 6.37 < μ < 6.4

保存於 37 °C

PBS pH : 7.14 < μ < 7.18

PBS + 0.5 % Gelatin pH : 6.98 < μ < 7.01

0.85 % NaCl pH : 7.1 < μ < 7.25

5 % 葡萄糖 pH : 6.39 < μ < 6.4

(B) pH 值與病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 之相關分析

保存於 23 °C

r = 0.0219797 實測 t = 0.0822604 < t (14, 0.05)  
= 2.145 差異不顯著 (> P (0.05)) pH 值變化與病毒含量無關

保存於 37 °C

r = 0.1989474 實測 t = 0.7595769 < t (14, 0.05)  
= 2.145 差異不顯著 (> P (0.05)) pH 值變化與病毒含量無關

由以上分析資料得知，不同 pH 值的稀釋液與兔化豬瘟疫苗混合，不論保存於 23 °C 或保存於 37 °C，其 pH 值均非常穩定，與疫苗病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 相關性不高。

(二) 由不同稀釋液稀釋保存於不同溫度後測試其病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 成績 (表 2) 分析

1. 迴歸分析

(1) 稀釋後保存於 23 °C

(A) 保存 4 小時後其迴歸方程式如下

Y = 3.85875 - 0.060625 ×，實測 F 值 = 2.960734 < 4.96 (F (1, 10, 0.05))  
差異不顯著 (> P (0.05))

(B) 保存 6 小時後其迴歸方程式如下

Y = 3.87475 - 0.072625 ×，實測 F 值 = 5.129605 > 4.6 (F (1, 14, 0.05))

差異顯著 (< P (0.05))，迴歸有意義，隨保存時間作緩和下降，但斜率不大，保存 6 小時後各組力價仍然相當高。

(2) 稀釋後保存於 37 °C

(A) 保存 4 小時後其迴歸方程式如下

Y = 3.76 - 0.03125 ×，實測 F 值 = 0.1871465 < 4.96 (F (1, 10, 0.05))  
差異不顯著 (> P (0.05))

(B) 保存 6 小時後其迴歸方程式如下

Y = 3.961749 - 0.209125 ×，實測 F 值 = 9.433981 > 8.86 (F (1, 14, 0.01))  
差異極顯著 (< P (0.01))，迴歸有意義，且線型已呈隨保存時間加長而快速下降之趨勢；其中 0.85 % NaCl 組已降至 1.6 RID<sub>50</sub>，5 % 葡萄糖組已降至 1.5 RID<sub>50</sub>，而 PBS 組則仍然保持在 3.5 RID<sub>50</sub>。

2. 變異數分析 (ANOVA)

(A) 稀釋後保存於 23 °C RID<sub>50</sub> 之分析

變方分析表

Source	DF	SS	MS	F	F (3, 9, 0.05)
稀釋液	3	0.2215	0.0738	0.7307	< 3.86
保存時間	3	0.5206	0.1735	1.7178	< 3.86
誤差	9	0.9090	0.1010		
總和	15	1.6615			

(B) 稀釋後保存於 37 °C RID<sub>50</sub> 之分析

變方分析表

Source	DF	SS	MS	F	F (3, 9, 0.05)
稀釋液	3	2.4191	0.8064	3.8128	< 3.86
保存時間	3	4.3679	1.4560	*6.8842	> 3.86
誤差	9	1.9037	0.2115		
總和	15	8.6906			

稀釋後保存於 37 °C 疫苗 RID<sub>50</sub> 因保存時間加長有力價遞減現象。

表 1. 不同稀釋液稀釋兔化豬瘟疫苗保存於不同溫度及時間 pH 值之變化

稀釋液種類	試驗疫苗批號	疫苗稀釋後 pH 值								
		保存於 23 °C (小時)				保存於 37 °C (小時)				
種	類	批號	0	2	4	6	0	2	4	6
PBS		2457	7.14	7.20	7.21	7.20	7.14	7.17	7.17	7.16
PBS+0.5 %Gelatin		2457	7.0	7.07	7.05	7.07	7.0	7.0	7.0	6.98
0.85% NaCl		2457	7.2	7.2	7.2	7.1	7.2	7.2	7.2	7.1
5% Glucose		2457	6.40	6.38	6.39	6.40	6.40	6.40	6.39	6.39

表 2. 不同稀釋液與不同溫度對乾燥兔化豬瘟疫苗病毒含量穩定性試驗結果

稀釋液種類	試驗疫苗批號	疫苗稀釋後病毒含量 (RID 50)								
		保存於 23 °C (小時)				保存於 37 °C (小時)				
種	類	批號	0	2	4	6	0	2	4	6
PBS		2457	3.66	4.0	3.66	3.66	3.76	4.0	4.0	3.5
PBS+0.5 %Gelatin		2457	4.0	3.5	3.5	3.0	4.0	3.67	3.5	3.23
0.85% NaCl		2457	4.0	3.5	3.77	4.0	3.5	3.5	2.8	1.6
5% Glucose		2457	4.0	4.0	3.76	3.0	3.76	3.66	3.37	1.5

## 討 論

不同成分製成稀釋液，經高壓滅菌後保存，每種稀釋液安定性均良好，無混濁現象。

由不同稀釋液稀釋前後 pH 值變化情形觀察，5% 葡萄糖溶液成品 pH 值雖然偏低，但稀釋後再測定已呈中性，疫苗本身似具有緩衝其 pH 值之作用，全部稀釋液依標準差及信賴限界觀察，雖放置於 23 °C 及 37 °C 達 6 小時之久，pH 值變化差異不顯著，故其 pH 值與病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 之降低相關性不高。

由不同稀釋液稀釋後保存於不同溫度及時間測得病毒含量 (RID<sub>50</sub>) 成績觀察。

(A)由迴歸分析得知，稀釋後保存於 23 °C 及 37 °C 4 小時後使用，其差異均不顯著。但稀釋保存 6 小時後使用，23 °C 組差異顯著；37 °C 組差異極顯著，迴歸直線已隨時間加長病毒含量顯著下降；0.85% NaCl 組已降至 1.6 RID<sub>50</sub>，5% 葡萄糖組已降至 1.5 RID<sub>50</sub>。

(B)由變方分析成績觀察，保存於 23 °C 部分雖保存至 6 小時，其稀釋液間及保存時間之間差異均不顯著，但保存於 37 °C 部分，保存時間之間差異顯著，有隨保存時間加長而 RID<sub>50</sub> 遞減之趨勢。

由以上成績給我們的訊息是，以 5% 葡萄糖溶液稀釋後，於高氣溫之環境，如放置較長時間才使用，會嚴重影響疫苗品質（使用疫苗時最好儘量保持低溫），亞熱帶的台灣，夏天氣溫即有可能出現此情況，如能改用 PBS 為稀釋液，則將會使兔化豬瘟疫苗品質更趨穩定。

## 參 考 文 獻

1. 林再春，楊子儒，周懋森，張茂林，兔化豬瘟病毒冷凍乾燥之研究 (I) 畜衛試研報 No. 1, 1-27, 1963
2. 林再春，楊子儒，周懋森，林仁志，陳森雄，真空冷凍乾燥過程及乾燥疫苗之保存性，畜衛試研報 No. 1, 28-35, 1963
3. 鍾明華，詹益波，邱資峰，李振宗，吳詩南，兔化豬瘟組織培養疫苗之研製，畜產評議會試研報 80-V-14, 267-274, 1991
4. 葉樹藩，生物統計學，1962
5. 張魯智，試驗技術講義，1965
6. Robert R. Sokal & F. James Rohlf, 蕭如英譯，生物統計學導論，1989

## Improvement on the diluent for Frozen-dried lapinized hog cholera vaccine

M. S. Yang\* I. P. Chan, H. J. Lin, G. J. Tsua

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.

**SUMMARY** Alteration of the transparency and color of the diluents was not found after being autoclaved.

Variation of the pH value of the vaccine being reconstituted in all of the tested diluents stored at 23 °C and 37 °C for 0, 2, 4 and 6 hours was not significant, indicating there was no correlation between the virus content and the pH of diluents being used.

Results revealed that phosphate buffer saline (PBS) was a ideal diluent since the virus content kept stable when the vaccine was reconstituted in PBS and stored whether at 23 °C or 37 °C . Moreover, the virus content kept stable too when the vaccine was reconstituted in other diluents and stored at 23 °C.

**Key words:** *Lapinized hog cholera vaccine ; Rabbits 50 % infection dose ; Diluent*

---

\*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.