

# 臺灣豬隻鷺山病毒之血清學監測及人工感染試驗

黃天祥\* 李淑慧 張家宜 黃金城 鍾明華

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

臺北縣淡水鎮中正路 376 號

## 摘要

鷺山病毒 (*Sagiyama virus*) 首次於 2002 年自苗栗縣某一豬場約九週齡的石頭豬分離出。檢測當年 11 縣市上市肉豬血清中和抗體結果，陽性率業已高達 51% (296/586)。將 9 頭無鷺山病毒抗體之 12 週齡豬隻分成兩組，第一組 7 頭，每頭分別肌肉接種鷺山病毒，第二組 2 頭，不予接種供同居對照用。試驗結果顯示鷺山病毒對豬隻之病原性極低或無病原性，接種鷺山病毒組豬隻雖於接種後 1-2 天會有短暫性病毒血症和排毒現象，但經 8 週同居試驗，同居感染並不成立，顯需藉由病媒蚊的叮咬而傳播感染。

**關鍵詞：**鷺山病毒，人工感染試驗，豬

## 緒言

鷺山病毒 (*Sagiyama virus*)，屬披衣病毒科 (*Togaviridae*) 中之阿爾法病毒屬 (*Alphavirus genus*) (10)，為一單股正鏈 RNA 病毒，基因體長 11,698 nt (9)，最早係於 1956 年日本研究人員從 *Culex tritaeniorhynchus* 蚊蟲分離出來 (7,8)。本病毒對豬、馬、鳥類和人均具有感受性，經病媒蚊叮咬自然感染後會有抗體產生，但目前只知對馬會有臨床症狀產生，包括發熱、發疹、後腿水腫、顎下淋巴結腫大、白血球輕微減少和病毒血症等 (4,5,6,7)。台灣首次於 2002 年 6 月底自苗栗縣某一豬場約九週齡的石頭豬同時分離出鷺山病毒、環狀病毒 (PCV2) 和日本腦炎病毒，將此次豬分離之鷺山病毒之非結構性蛋白 (nsP1) 和糖蛋白 (E1) 基因增幅、定序並與其他鷺山病毒株比對結果其相似性均達 96% 以上，其中 E1 序列更與台灣衛生署疾病管制局從蚊子分離出之鷺山病毒株序列相似性高達 99.6% (1)。本試驗目的即在探討鷺山病毒在田間之污染狀況和對豬隻之病原性。

## 材料及方法

- 1. Vero 株化細胞：**係向美國申購而得，供鷺山病毒增殖和鷺山病毒試驗豬隻採集試材之病毒分離及血清中和抗體測試用。
- 2. 鷺山病毒 (SAGV-ML-V3)：**係筆者在 2002 年 6 月底由苗栗縣送檢某一豬場約九週齡的石頭豬分離而得。經 Vero 株化細胞增殖 3 代，病毒力價為  $10^{6.05}$  TCID<sub>50</sub>/mL。供豬鷺山病毒接種和中和抗體測試用。
- 3. 血清樣品：**田間豬隻鷺山病毒血清中和抗體調查，係利用存放在本所豬瘟研究組血清庫中 2002 年 7 月份來自台北、宜蘭、新竹、南投、嘉義、台南、高雄、屏東、台東、金門和澎湖等 11 縣市口蹄疫抗體檢測用肉市豬隻血清，共計 586 個血清樣品，實施鷺山病毒血清中和抗體檢測，以瞭解田間豬隻鷺山病毒之污染情形。
- 4. 試驗豬隻鷺山病毒的分離：**Vero 株化細胞於六孔盤長滿後，抽出細胞生長液並以滅菌 0.01M Phosphate-buffered saline solution (PBS)，pH

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

7.2 溶液洗過一次。每孔各接種 1mL 之採集試驗豬的棉拭液、抗凝血和臟器乳劑上清液後置 37°C 培養箱感作一小時。抽去接種液並以 PBS 洗過三次，然後每孔分別加入 3 mL 細胞維持液。放置 37°C 培養箱，每日觀察有無細胞病變產生，直至接種後第七天為止。將有細胞病變產生者回收，利用套組萃取病毒核酸後實施反轉錄聚合酶鏈反應予以確認（9）。

**5.鷲山病毒血清中和試驗：**將欲測血清經 56°C 30 分鐘處理後，於 96 孔細胞培養盤第一行每孔加入 50  $\mu$ L 血清，每一欲測血清 2 孔，每盤檢測 6 個血清樣品。將細胞培養液加入 96 孔細胞培養盤中，每孔 50  $\mu$ L。以 12 爪微量吸管將血清作連續 2 倍稀釋。每孔加入 50  $\mu$ L 含 100 TCID<sub>50</sub> 之 SAGV-ML-V3 株鷲山病毒液。置於震盪器上震盪 1 分鐘，充分混合後放入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱內感作 1 小時。每孔加入 100  $\mu$ L 之 Vero 株化細胞液（細胞濃度為  $2 \times 10^5$ /mL）後放回 37°C 5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱內培養，以能阻止一半細胞病變形成之最高血清稀釋倍數為抗體力價（SN<sub>50</sub>）。

#### 6.豬隻鷲山病毒人工接種試驗：

將放置於本所 GLP 動物舍同欄中之 9 頭無鷲山病毒抗體的 12 週齡豬隻分成兩組，第一組 7 頭（編號 1、2、3、4、5、6、7），每頭分別經由頸部肌肉注射 5 mL 之鷲山病毒細胞培養液（SAGV-ML-V3， $10^{6.05}$ TCID<sub>50</sub>/mL）；第二組 2 頭（編號 8、9）不予接種，供同居感染對照用。試驗開始後至第 14 天，每日量取肛溫、觀察臨床症狀，並採集脫纖血、血清、口鼻棉拭子和肛門棉拭子供抗體檢測和病毒分離用。試驗期間，於病毒接種後第 2、3、5、7 和 10 天分別各犧牲 1 頭接種豬，觀察肉眼病變並採集扁桃腺、脾臟、頷下淋巴結、入胸淋巴結、肺門淋巴結、腸間淋巴結、內腸骨淋巴結、鼠蹊淋巴結、鼻黏膜、氣管、肺臟、心臟、肝臟、腎臟、膀胱、唾液腺、甲狀腺、胸腺、腎上腺、胰臟、舌頭、會厭軟骨、食道、胃、小腸、大腸、主動脈、肺動脈、大腦、小腦、頸髓、胸髓、

腰髓、薦髓、眼瞼、鼻鏡、蹄部皮膚、睪丸（編號 1、2、3）和卵巢、輸卵管以及子宮角（編號 4、5）等全身各臟器供病毒分離用。剩餘 4 頭豬隻，包括 2 頭接種豬和 2 頭對照豬則持續觀察至試驗開始後第 8 週為止。其間每週採集該 4 頭豬隻血液，並將一半血液注入含肝素抗凝劑試管內。血液凝固後分離血清，供病毒分離和抗體檢測用，而抗凝血於離心後抽去血漿，沉降血球再以細胞培養液清洗三次並經冰凍解凍後供病毒分離用，以瞭解同居感染情形。

## 結果

### 田間豬隻鷲山病毒血清中和抗體調查：

檢測 2002 年 7 月份台北、宜蘭、新竹、南投、嘉義、台南、高雄、屏東、台東、金門和澎湖等 11 縣市 586 個血清樣品之鷲山病毒中和抗體結果，共有 296 頭豬隻血清呈現陽性反應，陽性率 50.5%（296/586）。以縣市別而言，陽性率高低差異很大，其中以宜蘭縣豬隻陽性率為最高，高達 86.0%（37/43），其次為嘉義縣豬隻 82.7%（43/52）。外島豬隻之陽性率則有偏低現象，金門縣僅為 21.2%（11/52），而澎湖縣 52 頭受檢豬隻則全部均為陰性（表一）。

### 豬隻鷲山病毒人工接種試驗：

鷲山病毒接種豬後除編號 5 號接種豬外，其餘 6 頭接種試驗豬和 2 頭未予接種對照豬均偶有不等熱反應發生（40.0-40.6 °C 間）（圖一），然而臨床上皆無不良反應發生。病毒接種後第 2、3、5、7 和 10 天各犧牲 1 頭接種試驗豬結果，除第 2 天犧牲試驗豬（編號 1 號）可見內腸骨淋巴結潮紅充出血、膀胱內有少量黃白色棉絮狀物、膀胱黏膜水腫增厚並有針點狀出血點，第 3 天犧牲試驗豬（編號 2 號）可見腎臟雙側腎盂內有大量黃白色棉絮狀物、雙側輸尿管內有少量黃白色棉絮狀物和黏膜下層水腫、膀胱內有大量黃白色棉絮狀物和黏膜下層水腫增厚、副睪頭有一囊體（cyst），以及第 10 天犧牲豬（編號 5 號）入胸淋巴結腫大等病變外，並無其他特異肉眼病

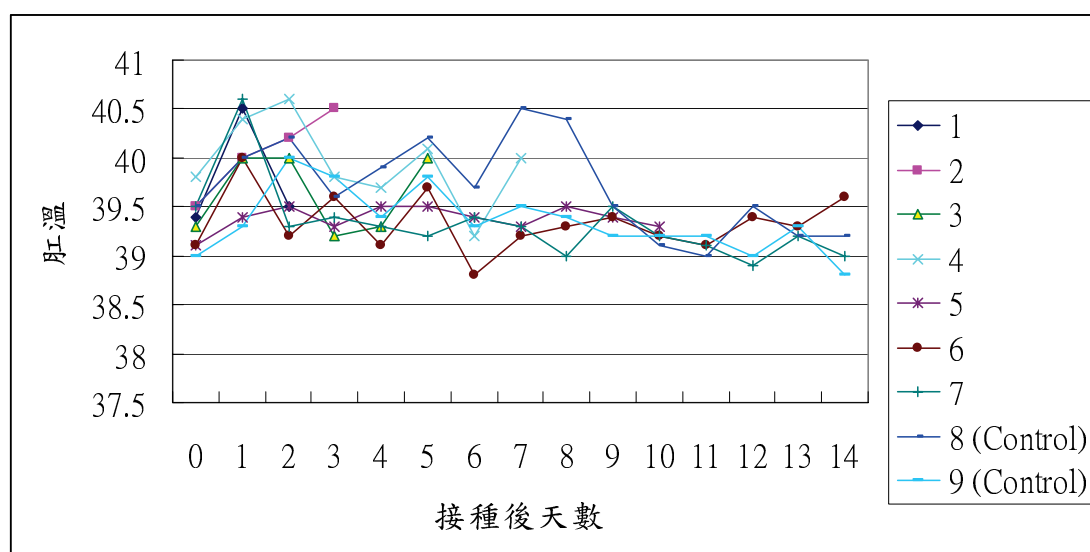
變。顯示鷺山病毒對豬隻之病原性極低，甚至無病原性。

鷺山病毒接種豬後病毒血症產生極快，接種後第 1 天即可從 6 頭接種豬（編號 2、3、4、5、6、7 號）之脫纖血和血清分離出病毒，而第 2 天僅能從 1 頭接種豬（編號 3 號）之脫纖血分離出病毒。此後至第 14 天每日採集之脫纖血和血清，以及至第 8 週每週採集之血球和血清均無法分離出病毒。2 頭同居對照豬（編號 8、9 號）試驗期間均無法從其脫纖血、血清和血球分離出病毒。

鷺山病毒接種豬後經由口鼻和肛門排毒時間亦極為快速和短暫。接種後第 1 天僅能從 5 頭接種豬（編號 2、3、4、5、6 號）之口鼻棉拭子和 1 頭接種豬（編號 3 號）之肛門棉拭子分離出病毒，此後至第 14 天則無法分離出病毒。而 2 頭同居對照豬，試驗期間均無法從其口鼻和肛門棉拭子分離出病毒。

鷺山病毒接種豬後於豬體內分佈情況似無一定規則可循。接種後第 2 天犧牲豬（編號 1 號）之脾臟、下淋巴結、入胸淋巴結、鼠蹊淋巴結和鼻鏡，第 3 天犧牲豬（編號 2 號）之鼻黏膜、腎上腺、鼠蹊淋巴結和耳皮，第 5 天犧牲豬（編號 3 號）之扁桃腺、耳皮、蹄部皮膚和眼瞼，第 7 天犧牲豬（編號 4 號）之腎臟等臟器均可分離出鷺山病毒，而第 10 天犧牲豬（編號 5 號）則無法從任何臟器分離出病毒（表二）。

接種豬和同居對照豬於病毒接種後 14 天內每日採血及此後每週採血至第 8 週，分離血清檢測鷺山病毒中和抗體結果，病毒接種後第 4 天 5 頭接種豬中有 3 頭開始產生中和抗體，分別為 6、11、23 倍。第 5 天 5 頭接種豬均可測得中和抗體力價，並於第 8 天達於最高峰，3 頭剩餘接種豬分別為 45、45 和 64 倍。此後至第 8 週試驗結束時 2 頭接種豬並無顯著變化仍持續維持在 23 至 45 倍間。而 2 頭同居對照豬至第 8 週試驗結束時均無法測得中和抗體力價（表三），顯示同居感染並不成立。



圖一、豬隻人工接種鷺山病毒後之肛溫變化

表一、台灣 2002 年 7 月份 11 縣市肉市豬隻鷺山病毒中和抗體檢測結果

縣市別	血清中和抗體力價 (SN <sub>50</sub> )				合計頭數
	≤3 倍	4-45 倍	64-512 倍	≥724 倍	
台北縣	21 (39.6) <sup>a</sup>	10 (18.9)	22 (41.5)	0 (0)	53
宜蘭縣	6 (14.0)	8 (18.6)	28 (65.1)	1 (2.3)	43
新竹縣	31 (59.6)	11 (21.2)	10 (19.2)	0 (0)	52
南投縣	27 (55.1)	7 (14.3)	15 (30.6)	0 (0)	49
嘉義市	9 (17.3)	7 (13.5)	34 (65.4)	2 (3.8)	52
台南市	17 (32.7)	14 (26.9)	20 (38.5)	1 (1.9)	52
高雄縣	28 (53.8)	10 (19.2)	14 (26.9)	0 (0)	52
屏東縣	28 (53.8)	8 (15.4)	16 (30.8)	0 (0)	52
台東縣	30 (39.0)	14 (18.2)	33 (42.9)	0 (0)	77
金門縣	41 (78.8)	8 (15.4)	3 (5.8)	0 (0)	52
澎湖縣	52 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	52
合計	290 (49.5)	97 (16.6)	195 (33.3)	4 (0.7)	586

註：a 表示反應頭數 (百分比)

臟器或部	接種後日數	2	3	5	7	10
位名稱	豬隻編號	1	2	3	4	5
扁桃腺		—	—	+	—	—
脾臟		+	—	—	—	—
頷下淋巴結		+	—	—	—	—
入胸淋巴結		+	—	—	—	—
鼠蹊淋巴結		+	+	—	—	—
鼻黏膜		—	+	—	—	—
腎臟		—	—	—	+	—
腎上腺		—	+	—	—	—
眼瞼		—	—	+	—	—
鼻鏡		+	—	—	—	—
耳皮		—	+	+	—	—
蹄部皮膚		—	—	+	—	—

[illegible]

## 討論

台灣首次於 2002 年 6 月自送檢豬隻病例分離出鷺山病毒後(1)，隨即調查隔月上市肉豬血清抗體，結果陽性率高達 51%(表一)。顯示本病毒業已普遍存在田間豬場豬隻。又由 7 頭無鷺山病毒抗體之 12 週齡豬隻經接種鷺山病毒後臨床上以及接種後第 2、3、5、7、10 天各犧牲 1 頭接種種豬結果，非但無明顯臨床症狀發生亦無特異病變產生，顯示本病毒對豬隻雖具感染性，但病原性極低或無，與前人報告相似(4,7)。

從鷺山病毒接種後第 2 天犧牲豬之脾臟、下淋巴結、入胸淋巴結、鼠蹊淋巴結和鼻鏡，第 3 天犧牲豬之鼻黏膜、腎上腺、鼠蹊淋巴結和耳皮，第 5 天犧牲豬之扁桃腺、耳皮、蹄部皮膚和眼瞼，以及第 7 天犧牲豬之腎臟等均可分離出鷺山病毒，而第 10 天犧牲豬則無法從任何臟器分離出病毒(表二)。顯示鷺山病毒侵入豬隻體內後會短暫存在於淋巴臟器組織和皮膚等部位，但在中和抗體快速於第 4 天產生後(表三)即可經由免疫系統而於第 10 天時全部予以清除體外。而皮膚之感染並非鷺山病毒所特有，筆者曾從試驗或送檢發病豬之皮膚分離出豬瘟、豬假性狂病、豬鐵士古症、豬二型環狀病毒、口蹄疫和豬水泡病等病毒。皮膚對於這些病毒之感受性如何？是否曾經由汗腺、脫落皮膚和毛囊而散播出病毒並造成傳染則頗值深思和探討。

人工接種感染鷺山病毒豬隻，血清中和抗體的產生試驗期間最高僅達 64 倍(表三)，但田間自然感染市售豬隻則常達 64-512 倍(表一)，此種差異可能與田間豬隻不斷遭受蚊蟲叮咬而重複感染有關。

豬隻感染鷺山病毒後第 1-2 天雖有短暫性病毒血症發生，並於第 1 天會經由口鼻和糞便排出病毒，然而 2 頭同居對照豬於 8 週試驗期間非但無法從其血液、血清、口鼻和肛門拭子分離出病毒，抗體亦無陽轉現象。顯示鷺山病毒與赤羽病毒一樣，同居感染無法成立，需藉由病媒蚊叮咬方能造成傳播感染(2,3,7)。

## 參考文獻

1. 張家宜、黃金城、黃天祥、鄧明中、鍾明華、林士鈺。鷺山病毒在台灣豬隻的分離。台灣省畜牧獸醫學會第二十二屆暨中華民國獸醫學會第十屆會員大會九十一年度聯合會暨學術論文發表會。P. 97, 2002。
2. 黃天祥、黃金城、鄧明中、鍾明華、林士鈺。豬赤羽病(Natural infection of akabane virus in pigs)。台灣省畜牧獸醫學會九十一年度春季學術研討會專刊。P33, May 17, 2002。
3. Huang CC, Huang TS, Deng MC, Jong MH, Lin SY. Natural infection of pigs with akabane virus. Vet Microbiol 94: 1-11, 2003.
4. Kono Y. Getah virus disease. In The Arboviruses: Epidemiology and Ecology, pp. 21-36. Edited by Monath TP, Boca Raton FL: CRC Press. 1988.
5. Kumanomido T, Kamada M, Wada R, Kenemaru T, Sugiura T and Akiyama Y. Pathogenicity for horses of original Sagiyama virus, a member of the Getah virus group. Vet Microbiol 17: 367-373. 1988.
6. Nakamura T, Isahai K, Matsumoto M, Matsuyama T, Oya A and Okuro T. Antibody response following natural infection of swine to group A arbovirus Getah and preliminary survey for its antibody among domestic animals. Nihon Koshueisei Zasshi.14: 569-573. 1967.
7. Scherer WF, Funkenbusch M, Buescher EL and Izumi T. Sagiyama virus, a new group A arthropod-borne virus from Japan. I. Isolation, immunologic classification, and ecologic observations. Am J Trop Med Hyg 11, 255-268. 1962a.
8. Scherer WF, Izumi T, McCown J and Hardy JL. Sagiyama virus. II. Some biologic physical, chemical and immunologic properties. Am J Trop Med Hyg 11, 269-282. 1962b.

9. Shirako Y and Yamaguchi Y. Genome structure of Sagiya virus and its relatedness to other alphaviruses. *J Gen Virol* 81:1353-1360, 2000.
10. Strauss JH, Calisher CH, Dalgarno L, Dalrymple JM, Frey TK, Pettersson RF, Rice CM and Spaan WJM. Togaviridae. In *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 428-433. Edited by Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA. and Summers MD. Vienna and New York: Springer-Verlag, 1995.

## Serological surveillance and experimental infection of sagiyama virus in pigs in Taiwan

Huang TS, Lee SH, Chang CY, Huang CC, Jong MH.

In 2002, Sagiyama virus was first isolated from pigs located in Miao-Li County, Taiwan. During that year, 586 serum samples of marketing pigs were collected from 11 counties and tested by serum neutralization test. The positive rate of serum antibodies against sagiyama virus was 51% (296/586). In a trial, 9 pigs aged at 12-week old without antibodies against sagiyama virus were divided into two groups. The first group consisted of 7 pigs were inoculated intramuscularly with sagiyama virus suspension, respectively. The second group consisted of 2 pigs were uninfected and housed together with the first group for studying the transmission. During a 2-week observation, all the pigs did not show significant clinical symptoms and special pathological lesions when those infected pigs were sacrificed on the 2,3,5,7 and 10 days post inoculation, respectively. Although the infected pigs developed viremia and shedding infectious virus particles from secretion and excretion for the first 1-2 days post inoculation, the two contact control pigs remained negative in virus isolation and antibody response through the 8-week study.

*Keywords: Experimental inoculation, Sagiyama virus, pigs*