

兔化豬瘟疫苗及豬瘟 E2 次單位疫苗誘發免疫反應之不同機制探討

謝政橘、邱淑君、黃天祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 豬瘟病毒對免疫細胞具有特殊之親和性，造成白血球減少症及淋巴細胞之流失，所以免疫系統之傷害是該疾病最重要的致病機制，因此免疫反應中特异性免疫反應對疾病的防禦極為重要。而動物給予疫苗免疫後，能夠促使體內產生多種的細胞激素，進而提升免疫力，增強抗感染的能力。本研究對兔化豬瘟疫苗及豬瘟 E2 次單位疫苗誘發免疫反應之不同機制進行探討，結果發現注射疫苗後，監測各組體溫正常，精神、食慾狀況良好，並無精神不振之情形；另分析各組血液學發現各組之白血球及紅血球分佈並無顯著的差異；而檢測中和抗體力價，約 14 天後有抗體產生，至 23 天後抗體呈陽性結果；而分析周邊血液單核球（Peripheral blood mononuclear cell；PBMC）中不同淋巴球細胞次族群之變化情形，發現 CD 4、CD 8、Ig M、macrophage 在各組之間比例並無顯著差異。在細胞激素濃度檢測方面，血液中 IL-1、IL-4、GM-CSF 及 TNF- α 各組濃度沒有顯著的差異；血液中 IL-6 濃度於施打兔化豬瘟疫苗組第 4 天及第 7 天有顯著的增加；血液中 IL-12 濃度於施打兔化豬瘟疫苗組、次單位 E2 蛋白疫苗組及組織培養豬瘟疫苗組第 1 天均有顯著的增加；血液中 IFN- γ 濃度於施打次單位 E2 蛋白疫苗組第 2 天有顯著的增加，另於施打兔化豬瘟疫苗組第 3 天亦有顯著的增加。施打不同的豬瘟疫苗會有不同細胞激素的產生，而其是否具有活化其他免疫細胞的能力，或其他調控路徑以調理抗體之產生？則有待進一步的驗證。

關鍵詞：兔化豬瘟疫苗，E2 次單位疫苗，免疫反應

緒言

豬瘟為豬隻高致死性之病毒性疾病，臨床上以發燒及全身臟器出血為主徵，感染率與死亡率均高達 95%。豬瘟病毒對免疫細胞具有特殊的親和性，會造成白血球減少症及淋巴細胞的流失等，故免疫系統的傷害是該疾病最重要的致病機制。豬隻感染病毒後，中和抗體的產生是保護豬隻耐過病毒攻擊的重要防衛機制，豬瘟病毒封套糖蛋白 E^{ms} 與 E2 為該病毒引起宿主中和抗體產生之主要抗原，然而在 König[1] 與 Pauly[2] 等人的研究中指出利用去除 E^{ms}、E2 等封套

蛋白的基因重組疫苗免疫豬隻，再以豬瘟病毒強毒株進行動物感染實驗，有些攻毒豬隻雖然沒有中和抗體的產生，但仍可耐過病毒的攻擊，顯示除中和抗體之外，尚有其他防衛機制可以保護豬隻耐過豬瘟病毒的攻擊，因此除體液性的免疫反應之外，豬瘟病毒所引起的細胞性免疫反應亦值得探討。而淋巴細胞所分泌的細胞激素是調控免疫細胞生長、增殖與活化之主要因子，可活化免疫細胞執行清除細胞內抗原之功能，對於病毒感染而言亦是重要的防禦機制。豬瘟病毒屬於 *Flaviviridae* 病毒屬科中之 *Pestivirus* 病毒屬，為正向單股之 RNA 病毒，具有源自宿主細胞膜之封套外膜豬

瘟病毒對單核吞噬細胞具有高度親和性，並可於細胞質內進行複製，且複製週期短，感染後10-16小時即可於細胞外發現新生成的病毒顆粒，而於16-18小時病毒量顯著增加，24-30小時病毒複製達到高峰[3]。而在病毒分離與培養方面，活體外培養（*in vitro*）豬瘟病毒並不會造成細胞病變效應（cytopathic effect；CPE），病毒可藉由細胞培養液、細胞質間橋（cytoplasmic bridges）或細胞分裂將病毒散佈，而導致培養細胞持續性的感染[4]。鑑於豬瘟病毒的特性，世界動物衛生組織（OIE）將豬瘟歸類於會影響國際畜產品貿易及造成國家整體社會、經濟重大影響之動物傳染病。世界主要豬肉生產及輸出國如美國、加拿大及歐盟各國如英國、丹麥等，皆曾以全場撲殺之政策，成功地撲滅豬瘟成為非疫國。除可降低毛豬生產成本，提升外銷競爭力，也因無豬瘟而符合更多輸入國之動物檢疫要求，另一方面，亦可依國際動物檢疫慣例，以國際許可的檢疫規範，對豬瘟疫區國家採取限制豬肉及其他動物產品進口措施，以保護國內產業。有鑑於豬瘟對國內畜牧產業的影響，本所過去已開發出乾燥兔化豬瘟疫苗並於各豬場注射免疫後，均具不錯成效。然我國四十多年來實施豬瘟疫苗免疫結果，雖使豬瘟發生率大為降低，但由於田間可能存在帶毒豬隻的問題，以及疫苗的保存和使用不當，例如免疫適期的問題，而遭受移行抗體干擾，造成田間零星豬瘟病例的發生。而近年來本所亦積極研發E2次單位疫苗，亦有不錯之成效，以期斷絕豬瘟疾病。本研究之主要目的即在探討施打乾燥兔化豬瘟疫苗及豬瘟E2次單位疫苗後誘發不同之免疫反應機制，利用細胞分離技術進行淋巴細胞表面抗原表現型之分析，探討血液中淋巴細胞次族群改變之情形，並探討炎症性細胞激素影響表現之分析。期能探討其免疫機制之異同，俾利將來疫苗或佐劑之研發利用，減少豬瘟所造成之經濟損失。

材料及方法

動物實驗模式之建立

實驗動物以離乳後飼養至8週齡之未免疫豬隻進行試驗，豬隻隨機分為4組，每組各3隻：(一)陰性對

照組；(二)施打兔化豬瘟疫苗組；(三)施打本所研發次單位E2蛋白疫苗組；(四)施打豬瘟組織培養疫苗組。實驗過程中，每日記錄體溫及臨床症狀變化，如精神及活力、食慾、排便情形等狀況。各組於免疫前後每隔2-3天定期抽取血液，進行血液學、細胞激素及豬瘟中和抗體之檢查，另進行周邊血液單核細胞（peripheral blood mononuclear cells；PBMC）中淋巴次族群CD 4、CD 8、IgM、macrophage比例之分析。

血液學之檢測

利用全自動血球分析儀SYSMEX K-1000分析豬隻之血液相。

豬瘟中和抗體之檢測

購自IDEXX LABORATORIES之Classical Swine Fever Virus（CSFV）Antibody Test Kit檢測血清中豬瘟中和抗體之濃度。操作步驟如所附之說明書。加入50 μ L sample diluent於96孔盤中，再加入50 μ L positive control和negative control作為對照組。於其他孔加入待檢驗之血清50 μ L，混和均勻，室溫下靜置2小時。使用wash solution 300 μ L清洗三次，風乾。加入100 μ L Anti-CSFV HPRO結合，室溫下靜置30分鐘。再使用wash solution 300 μ L清洗三次，風乾。加入100 μ L TMB substrate solution，避光，室溫靜置10分鐘。加入100 μ L stop solution終止反應。使用450 nm波長檢測。

單源抗體

購自AbD seroTec之單株抗體MOUSE ANTI PIG CD 4a、MOUSE ANTI PIG wCD 8a、MOUSE ANTI PIG IgM及MOUSE ANTI PIG MACROPAGES，作為本研究使用之單株抗體。

血液單核細胞之分離

豬隻由頸靜脈採血並以肝素抗凝。購自Dako的Erythrocyte-Lysing Reagent, Uti-Lyse™，操作步驟如所附之說明書。將100 μ L全血加至12 × 75 mm的流式細胞儀專用管，加入100 μ L Reagent A，混和均勻，避光，室溫靜置10分鐘。再加入1 mL Reagent B，混和均勻，避光，室溫靜置10分鐘。離

心300 xg 5分鐘，捨去上清液，再加入1 mL PBS混和均勻，離心300 xg 5分鐘。捨去上清液，再加入300 μ L PBS混和均勻。分析前，可先放置4°C避光冷藏。

淋巴細胞表面抗原表現型之分析

將上述分離之單核細胞，加入MOUSE ANTI PIG CD 4a、MOUSE ANTI PIG wCD 8a、MOUSE ANTI PIG IgM及MOUSE ANTI PIG MACROPAGES靜置30分鐘，4°C避光冷藏；離心500 xg 7，捨去上清液，再加入0.5 mL PBS混和均勻。加入含FITC之二抗，靜置30分鐘，4°C避光冷藏；離心500 xg 7，捨去上清液，再加入0.5 mL PBS混和均勻。以流式細胞儀（FACScan Becton Dickinson）進行細胞資料之收集與分析。

細胞激素之檢測

購自RayBiotech的Quantibody Porcine Cytokine Array 1 Kit用以檢測血液中細胞激素之濃度。操作步驟如所附之說明書。將Kit所附之glass chips自4°C取出，撕除封膜，靜置1-2小時，風乾。加入100 μ L的sample diluents於各孔中，靜置室溫30分鐘。吸除sample diluents，再加入100 μ L standard或待測血清於室溫下靜置1-2小時。將液體吸出，加入1 \times wash buffer I 200 μ L室溫下，溫和搖盪5分鐘，共5次。將1 \times wash buffer I 加入蓋過glass chips，室溫下溫和搖盪10分鐘，更換1 \times wash buffer I，再溫和搖盪10分鐘。將glass chips風乾，每孔加入1 \times wash buffer II 200 μ L室溫下，溫和搖盪5分鐘，共2次。每孔加入80 μ L detection antibody，室溫下靜置1.5小時。吸除液體，再加入加入1 \times wash buffer I 200 μ L室溫下，溫和搖盪2分鐘，共5次。然後再加入1 \times wash buffer II 200 μ L室溫下，溫和搖盪2分鐘，共2次。每孔加入80 μ L Cy3，室溫下避光1小時。吸除液體，加入1 \times wash buffer I 200 μ L室溫下，溫和搖盪2分鐘，共5次。將玻片取出，放置於Kit所附之4-slide離心管，加入足夠之1 \times wash buffer I，室溫下溫和震盪15分鐘，去除1 \times wash buffer I換置1 \times wash buffer II，室溫下溫和震盪15分鐘。去除1 \times wash buffer II，離心1,000

rpm，3分鐘。離心後，避光，風乾，利用儀器判讀及軟體分析（Quantibody® Q-Analyzer）。

結果

注射疫苗後，監測各組的體溫（圖1）發現並無豬隻發燒的狀況產生，且精神、食慾狀況皆良好，並無下痢之狀況；另分析各組血液學發現各組白血球（圖2）及紅血球分佈並無顯著的差異；而檢測中和抗體力價（表1）發現，約14天後有抗體產生，約至23天後抗體呈陽性結果；而各組織間抗體產生之時間亦有差異，於次單位疫苗組抗體較早產生，但抗體力價不如其他兩組上升快速；而在免化豬瘟疫苗及豬瘟組織培養疫苗組中抗體產生時間約相同，抗體力價產生速度也約一致；而分析周邊血液單核球中不同淋巴球細胞次族群之變化情形，發現CD 4（圖3）、CD 8（圖4）、Ig M（圖5）及macrophage（圖6）在各組之間比例並無顯著差異。而檢測血液中IL-1（圖7）、IL-4（圖8）、GM-CSF（圖9）及TNF- α （圖10）各組濃度，沒有顯著的差異；血液中IL-6濃度（圖11）於施打免化豬瘟疫苗組第4天及第7天有顯著的增加；血液中IL-12濃度（圖12）於施打免化豬瘟疫苗組、次單位E2蛋白疫苗組及豬瘟組織培養疫苗組第1天均有顯著的增加；血液中IFN- γ 濃度（圖13）於施打次單位E2蛋白疫苗組第2天有顯著的增加，另於施打乾燥免化豬瘟疫苗組第3天亦有顯著的增加。

討論

在急、慢性豬瘟病毒感染後，除造成血管內皮傷害及凝血障礙所導致全身性出血病灶外，最明顯的病變則為免疫系統之傷害，會呈現白血球減少症與淋巴球減少症[5]。本研究中所施打之免化豬瘟疫苗及豬瘟組織培養疫苗係屬經馴化之活毒疫苗，而次單位疫苗係屬重組疫苗，可發現中和抗體的出現，但豬隻臨床症狀觀察上並無異狀，不如野外毒株會造成顯著的白血球減少症及淋巴球減少症，因此研究中未能發現淋巴球次族群中有顯著的變化。而在細胞激素濃度的檢測中，發現幾類激素有顯著之差異，包括細胞激素IL-6有顯著的增加，IL-6主要是由單核吞噬細胞、血管內

皮細胞、纖維母細胞、活化T淋巴球等細胞受到微生物及其他細胞激素，尤其是在IL-1和TNF刺激下而產生。IL-6參與了先天性及後天性的免疫反應，在先天反應中，刺激肝細胞合成急性期蛋白，亦促進骨髓生成嗜中性球；在後天免疫反應中會刺激B淋巴細胞的生長，並促其分泌抗體。然後過量的IL-6的合成，可能會導致過度的炎症反應發生、自體免疫疾病、惡性腫瘤及病毒感染等病理變化[6, 7]。亦發現細胞激素IL-12於疫苗免疫1天後即有顯著的增加，當有病原感染細胞的情況下，IL-12是早期先天性免疫及細胞免疫的重要媒介細胞激素，其主要的來源細胞為活化的單核吞噬細胞及樹狀突細胞[8]。IL-12在Th1免疫反應中扮演關鍵作用的細胞激素[9]，主要由巨噬細胞和B細胞產生，主要誘導Th1相關的細胞激素產生，並通過誘導和釋放包括IFN- γ 在內的各種細胞激素，活化自然殺手細胞和T細胞。當促進IFN- γ 的產生，而IFN- γ 又會進一步再活化巨噬細胞，促進更多IL-12的分泌，並強化吞噬的作用，以達到撲滅外來病原。因此，IL-12除參與活化NK細胞及巨噬細胞的先天性免疫反應外，亦作為連接細胞免疫的橋樑；刺激naive

CD 4+細胞分化成為產生IFN- γ 的Th1淋巴細胞，所分泌的IFN- γ 會強化吞噬細胞的功能；亦可作用於naive CD 8+細胞，使其成為細胞毒性T淋巴細胞，直接撲殺遭受病原感染的宿主細胞。接續IL-12顯著增加之後，疫苗施打後二至三天即可發現IFN- γ 增加；IFN- γ 主要由T細胞和自然殺手細胞產生，其中以Th1細胞分泌為主[10]。IFN- γ 具有很強的免疫調節作用，可以顯著增加MHC I類和MHC II類分子表達，促進T細胞和B細胞分化，增強自然殺手細胞殺傷活性，充分活化單核巨噬細胞。淋巴細胞所分泌的細胞激素是調控免疫細胞生長、增殖與活化的主要因子，其中IFN- γ 為激活吞噬細胞與細胞毒殺型T淋巴細胞等之主要細胞激素，可活化免疫細胞執行清除細胞內抗原之功能，對於預防病毒感染之疾病是相當重要的。本研究發現有部分細胞激素顯著增加，不同的細胞激素會受到不同的免疫細胞所誘發，亦會誘導不同免疫細胞之生成，因此有其極複雜之交互作用。所以施打不同的豬瘟疫苗會有不同細胞激素的產生，而其是否具有活化其他免疫細胞的能力，或其他調控路徑以調理抗體之產生？則有待更進一步的驗證。

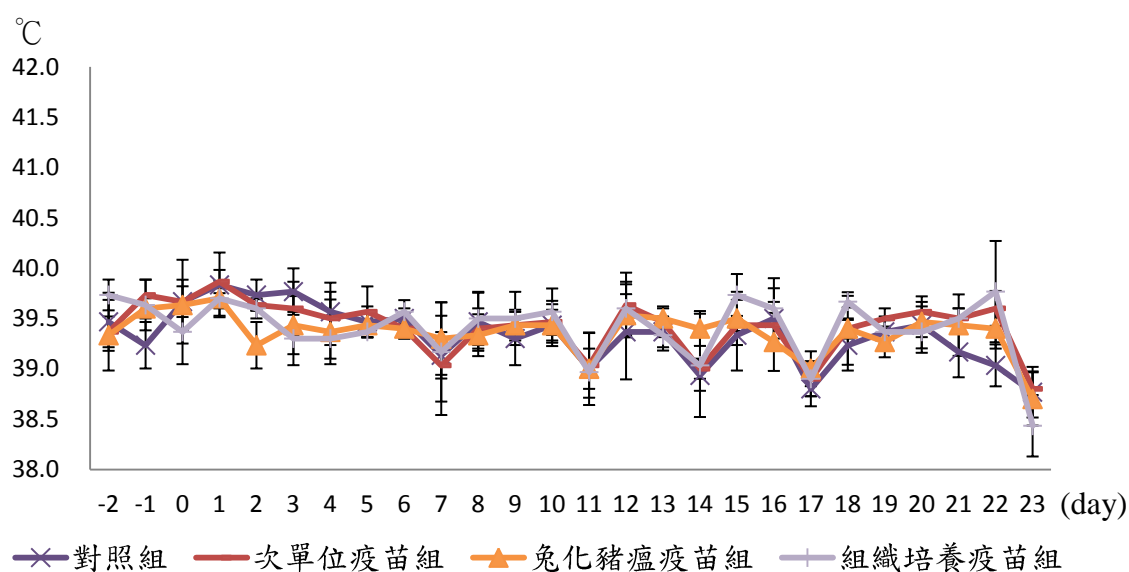


圖 1、各實驗組平均體溫比較。

兔化豬瘟疫苗及豬瘟 E2 次單位疫苗誘發免疫反應之不同機制探討

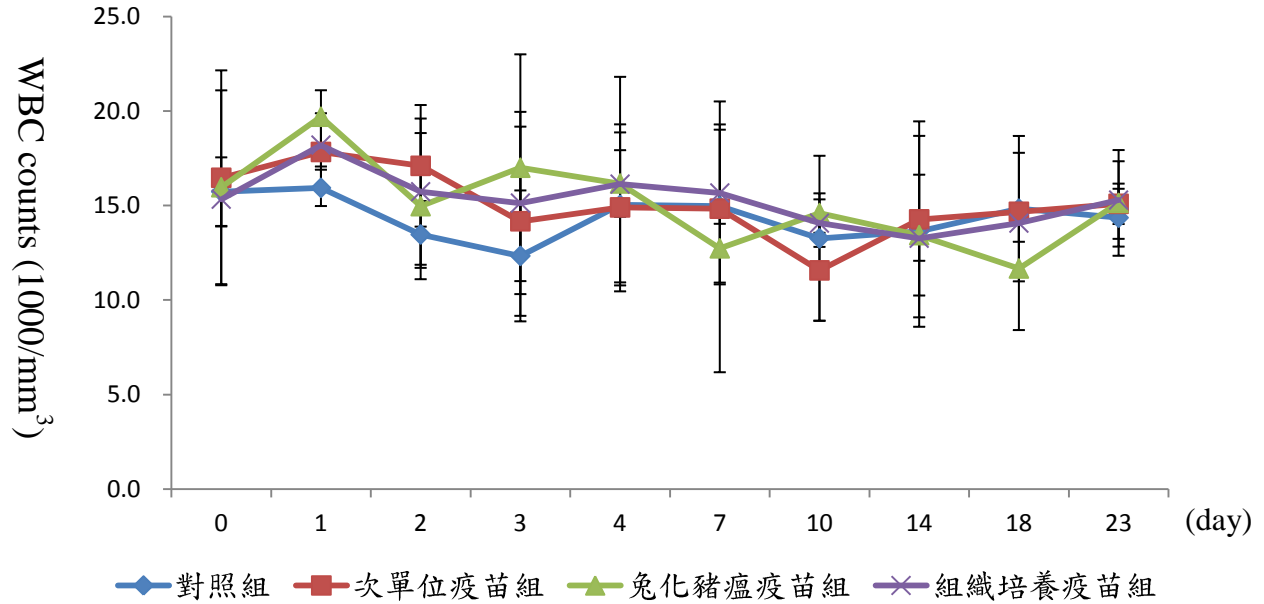


圖 2、各實驗組白血球總數之變化情形。

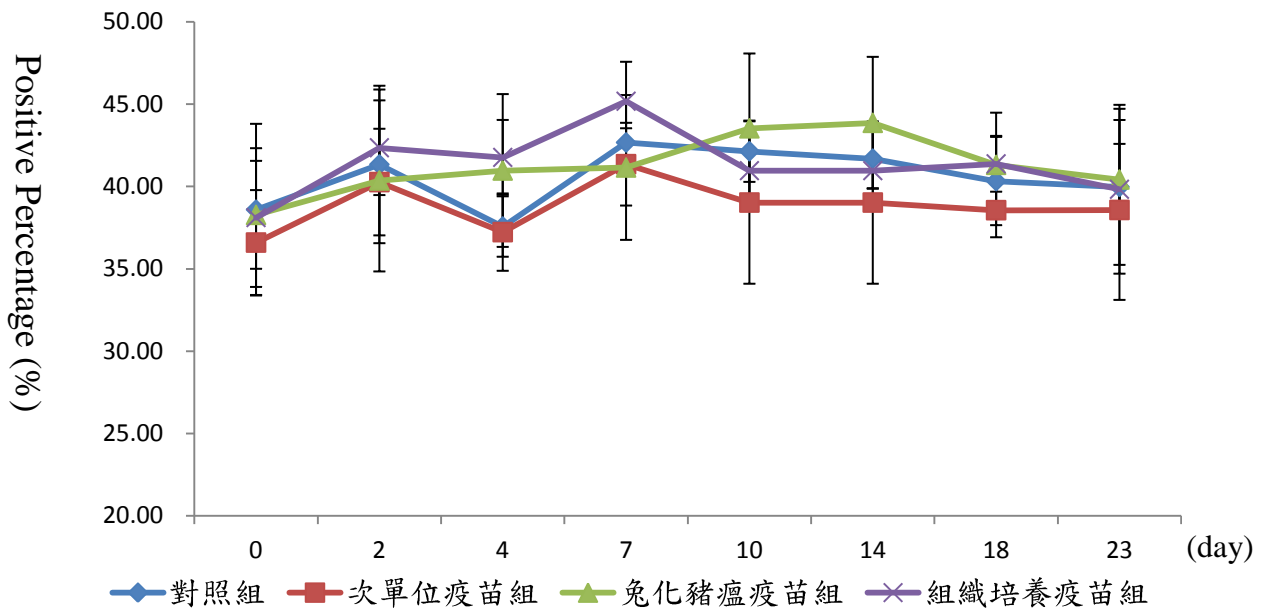


圖 3、各實驗組周邊血液單核細胞中 CD 4 所佔之比例。

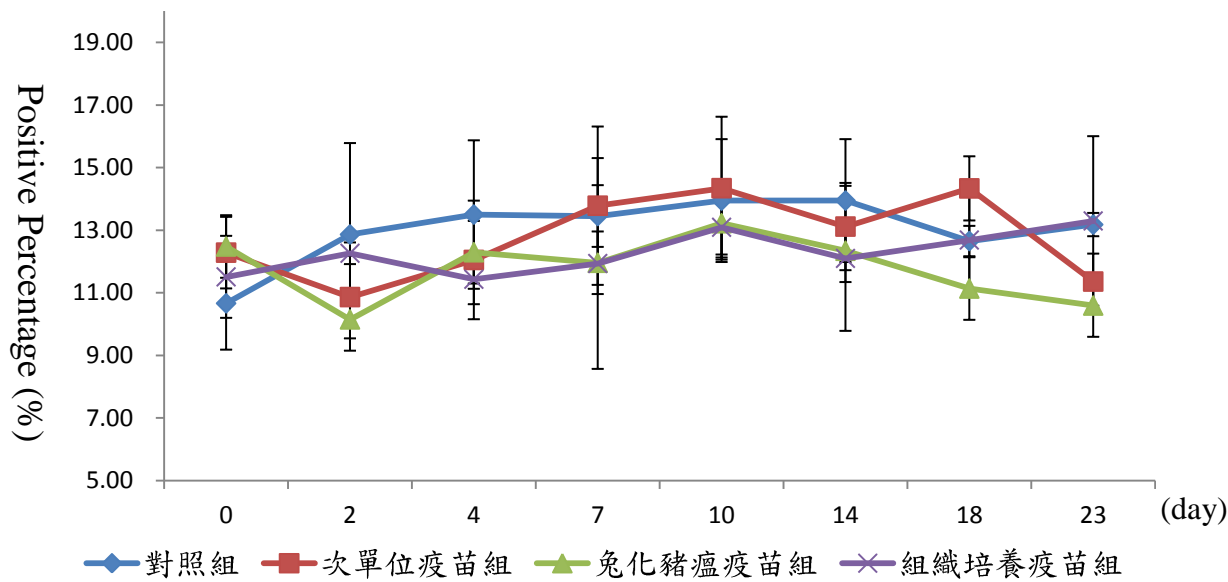


圖 4、各實驗組周邊血液單核細胞中 CD 8 所佔之比例。

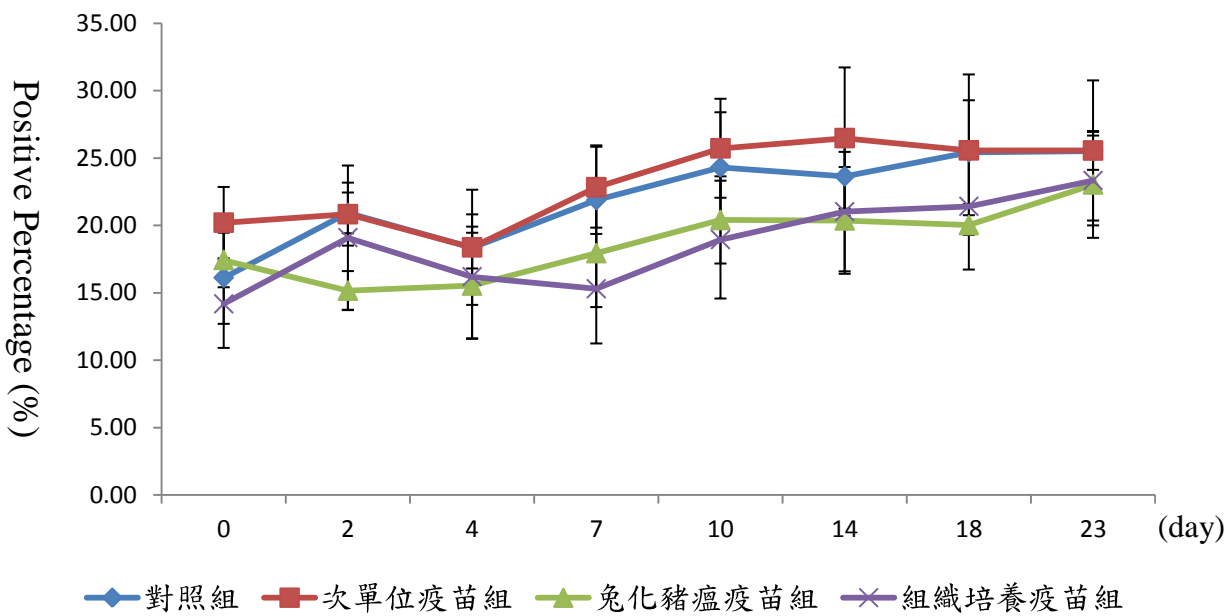


圖 5、各實驗組周邊血液單核細胞中 IgM 所佔之比例。

兔化豬瘟疫苗及豬瘟 E2 次單位疫苗誘發免疫反應之不同機制探討

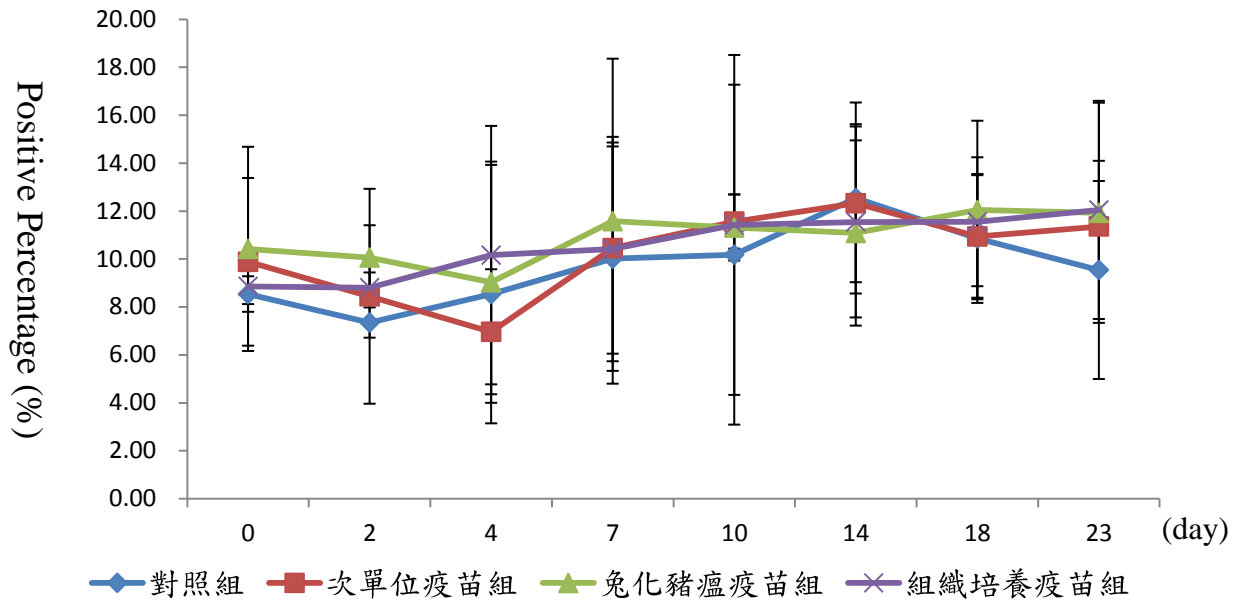


圖 6、各實驗組周邊血液單核細胞中 Macrophage 所佔之比例。

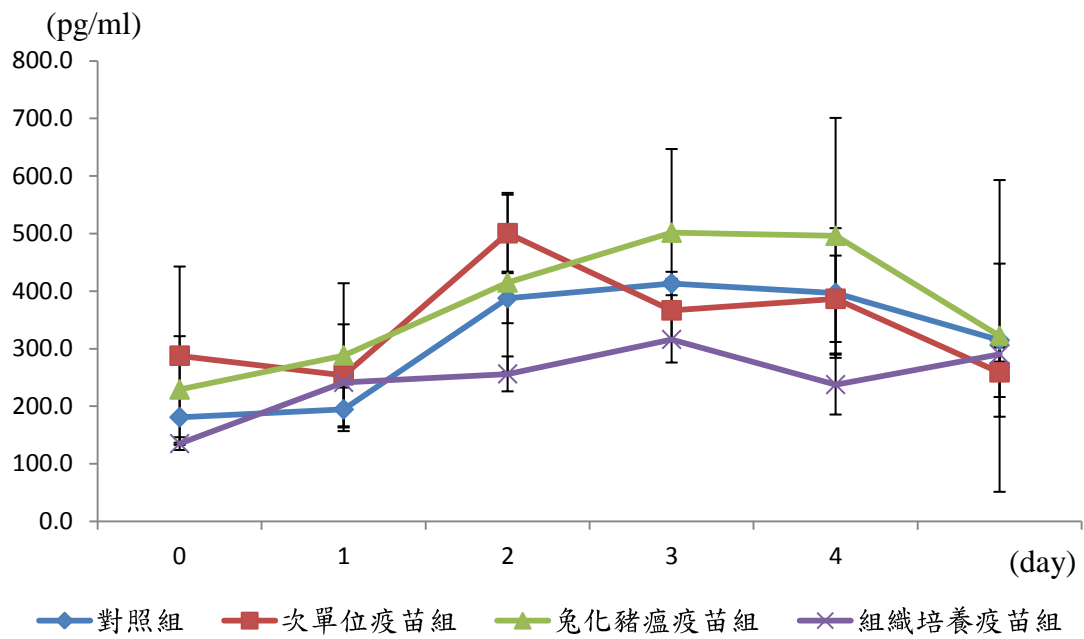


圖 7、各實驗組血液中 IL-1 濃度比較。

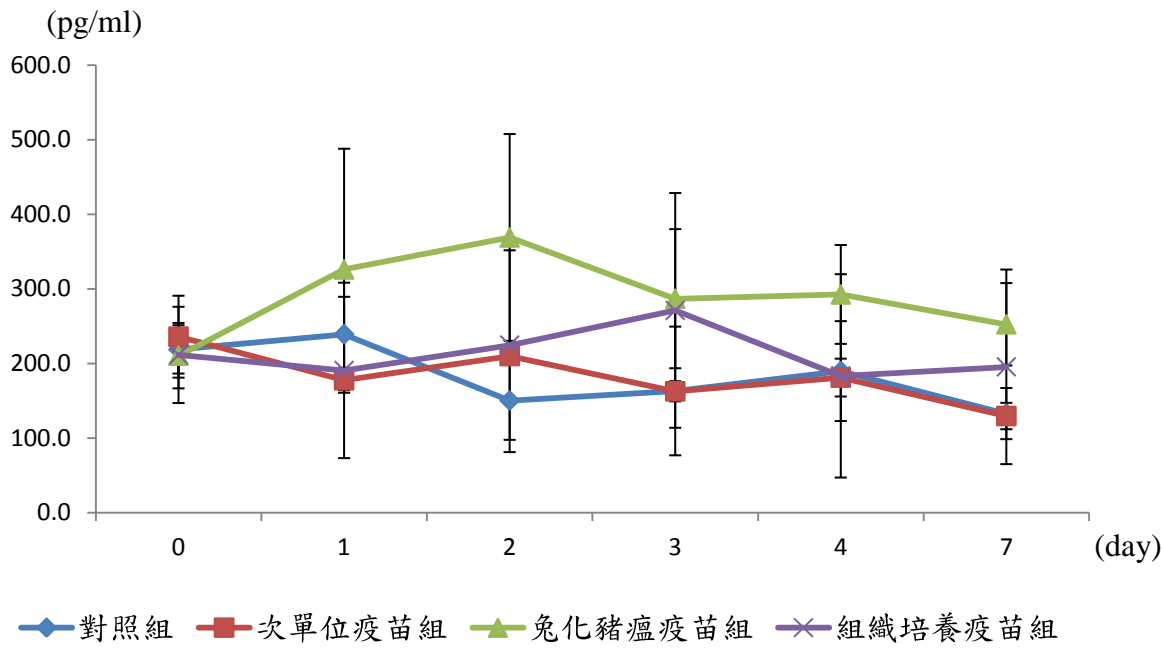


圖 8、各實驗組血液中 IL-4 濃度比較。

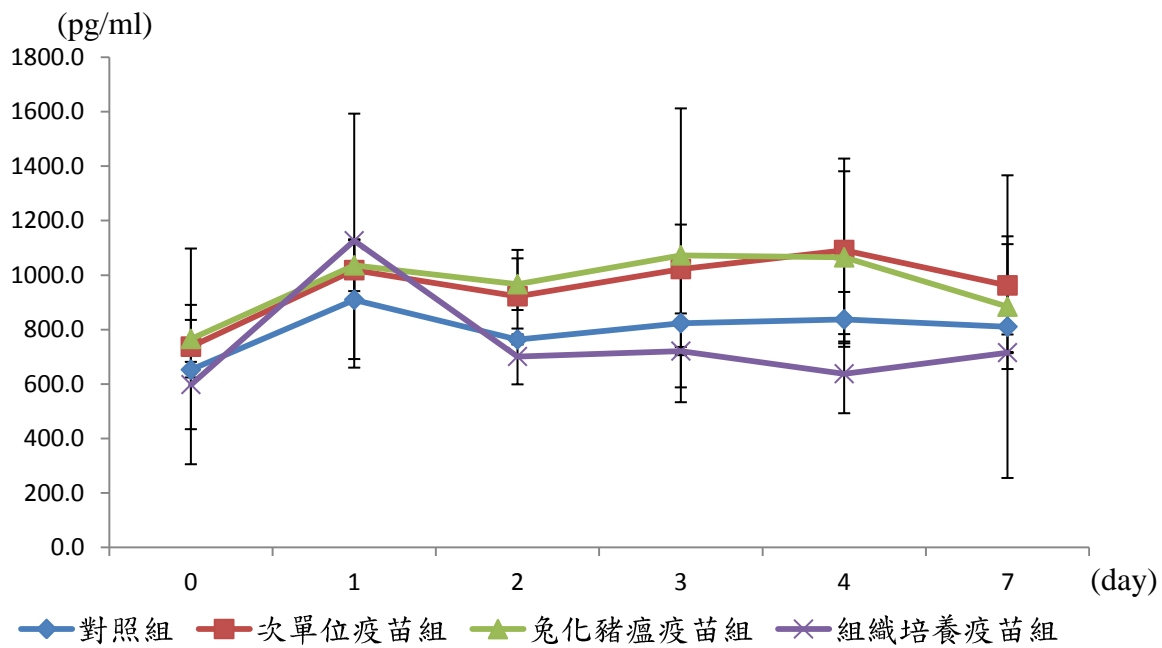


圖 9、各實驗組血液中 GM-CSF 濃度比較。

兔化豬瘟疫苗及豬瘟 E2 次單位疫苗誘發免疫反應之不同機制探討

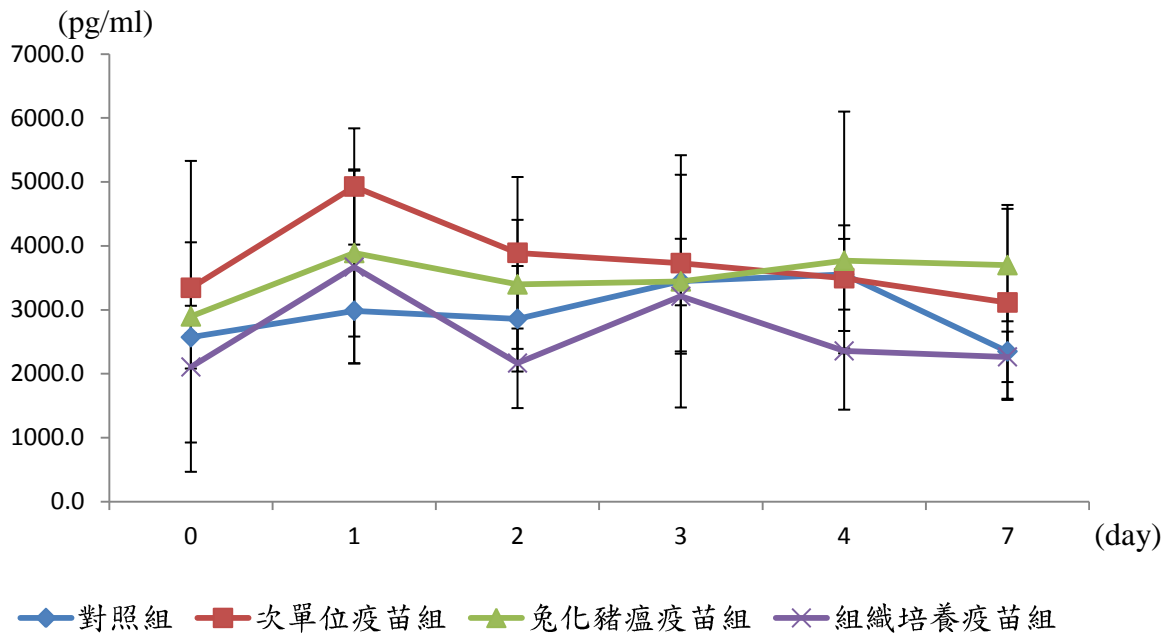
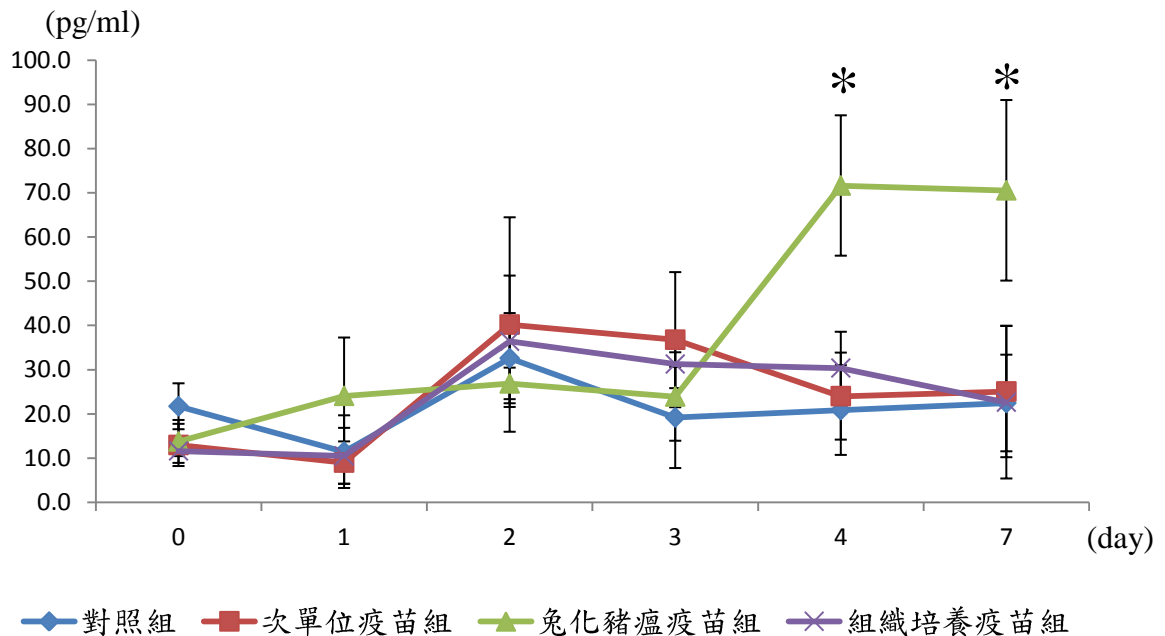
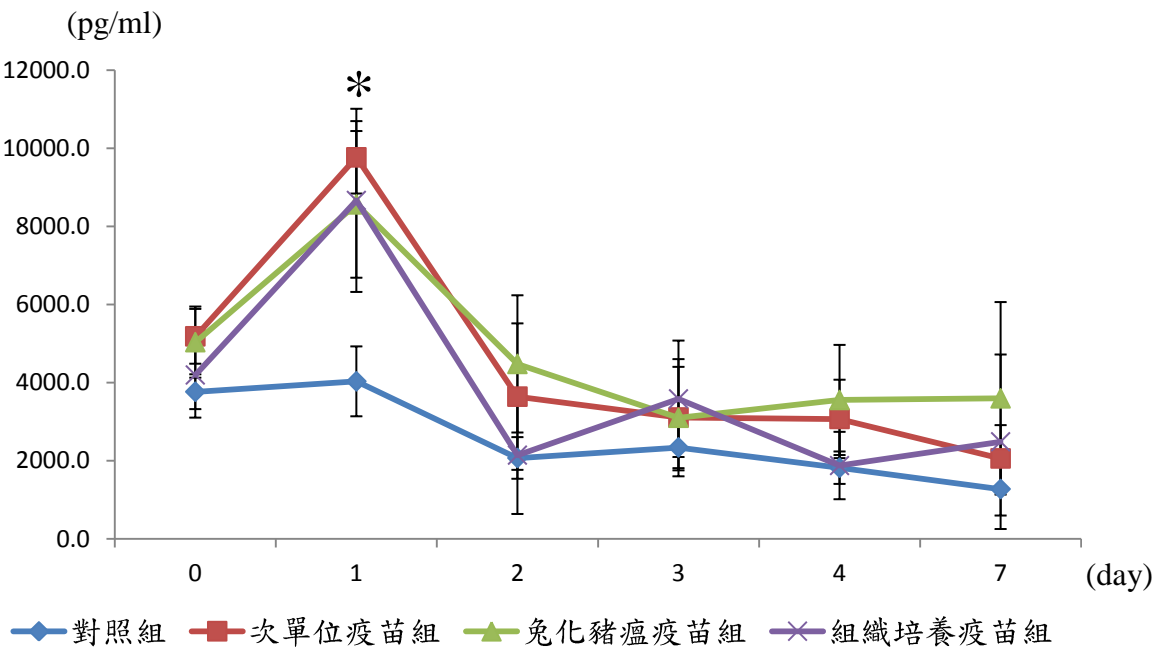


圖 10、各實驗組血液中 TNF- α 濃度比較。



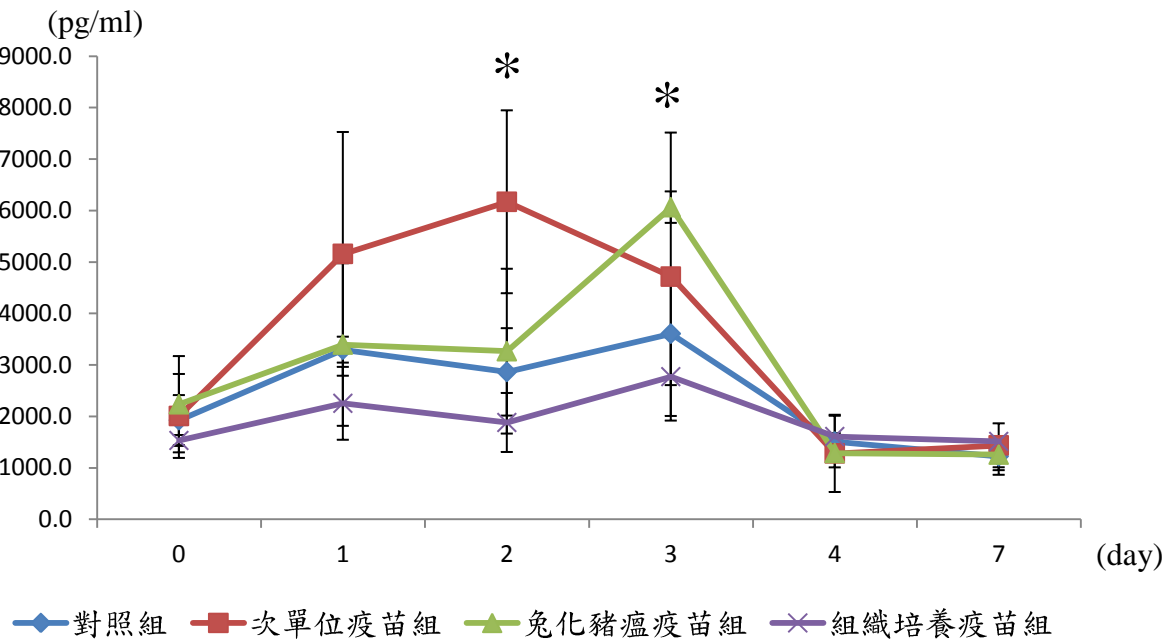
*P value of <0.05 indicated statistical significance.

圖 11、各實驗組血液中 IL-6 濃度比較。



*P value of <0.05 indicated statistical significance.

圖 12、各實驗組血液中 IL-12 濃度比較。



*P value of <0.05 indicated statistical significance.

圖 13、各實驗組血液中 INF- γ 濃度比較。

表 1、各實驗組豬瘟中和抗體力價表現。

	對照組	次單位疫苗組	兔化豬瘟疫苗組	組織培養疫苗
第 0 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 1 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 2 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 3 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 4 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 7 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 10 天	— — —	— — —	— — —	— — —
第 14 天	— — —	— ± ±	— — —	— — —
第 18 天	— — —	— ± ±	— — ±	— ± ±
第 23 天	— — —	± ± ±	± ++	± ++

— 陰性反應 + 陽性反應

參考文獻

1. Konig, M., et al., Classical swine fever virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J Virol*, 1995. 69(10): p. 6479-86.
2. Pauly, T., et al., Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol*, 1995. 76 (Pt 12): p. 3039-49.
3. Mittelholzer, C., et al., Analysis of classical swine fever virus replication kinetics allows differentiation of highly virulent from avirulent strains. *Vet Microbiol*, 2000. 74(4): p. 293-308.
4. Terpstra, C., Hog cholera: an update of present knowledge. *Br Vet J*, 1991. 147(5): p. 397-406.
5. Van Oirschot, J.T., D. De Jong, and N.D. Huffels, Effect of infections with swine fever virus on immune functions. II. Lymphocyte response to mitogens and enumeration of lymphocyte subpopulations. *Vet Microbiol*, 1983. 8(1): p. 81-95.
6. Assier, E., M.C. Boissier, and J.M. Dayer, Interleukin-6: from identification of the cytokine to development of targeted treatments. *Joint Bone Spine*, 2010. 77(6): p. 532-6.
7. Johnson, C., et al., Interleukin-6 and its receptor, key players in hepatobiliary inflammation and cancer. *Transl Gastrointest Cancer*, 2012. 1(1): p. 58-70.
8. Gee, K., et al., The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009. 8(1): p. 40-52.
9. Judson, M.A., et al., Molecular profiling and gene expression analysis in cutaneous sarcoidosis: the role of interleukin-12, interleukin-23, and the T-helper 17 pathway. *J Am Acad Dermatol*, 2012. 66(6): p. 901-10, 910 e1-2.
10. George, P.M., et al., Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther*, 2012. 135(1): p. 44-53.

Comparison of the Immune Response of Pigs Vaccinated with Frozen Dried Lapinized Hog Cholera Vaccine and E2 Subunit Vaccine

CC Hsieh, SJ Chiu, TS Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Classical swine fever virus is the most important pathogen for damaging the immune system for its high affinity to the immune cell, resulting in leucopenia, and lymphocytopenia. The project is aimed to compare the immune response effects of pigs vaccinated with the frozen dried lapinized hog cholera vaccine and the E2 subunit vaccine. The results showed that there was no significant difference in clinical observation, including body temperature, appetite and spiritual. The results of blood exams, such as white blood cells and red blood cells distribution were similar among groups. We observed that the neutralizing antibody against hog cholera virus began to appear on 14th day, and showed all positive on 23rd day post vaccination in both the frozen dried lapinized hog cholera and E2 subunit groups. In addition to the similar ratio of CD 4, CD 8, IgM, and macrophage concentrations in the blood, no differences revealed in the results of analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and other components in the blood as compared the control and vaccinated groups. In addition, the results show that detection of blood IL-1, IL-4, GM-CSF and TNF- α concentrations in each group have no significant difference; detection of IL-6 concentrations in blood in the frozen dried lapinized hog cholera vaccine group was increased significantly on 4 days and 7 days; detection of blood concentrations of IL-12 in each group on 1 day was significantly increased; detection of IFN- γ concentration in blood in the E2 subunit vaccine group was increased significantly on 2 days, and the frozen dried lapinized hog cholera vaccine group on 3 days was also increased significantly. Different vaccines will produce different cytokines, and whether it has the ability to activate other immune cells, or other regulatory pathways to regulate antibody production? More experiments will be further confirmed.

Keywords: *Frozen dried Lapinized hog cholera vaccine, E2 subunit vaccine, immune response*