

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

豬第二型環狀病毒感染對 Concanavalin A 刺激周邊血

液單核細胞增殖的影響

Porcine Circovirus Type 2 effects on Peripheral Blood

Mononuclear Cells by Concanavalin A Stimulation

徐晴嵐

Ching-Lan Hsu

指導教授：鄭謙仁 博士

龐 飛 博士

Advisor: Chian-Ren Jeng, DVM, Ph.D.

Victor Fei Pang, DVM, Ph.D

中華民國 九十八年六月

June, 2009

致謝

轉眼間，碩士生涯即將畫上句點，兩年的日子像漫長的登山縱走，實驗上接二連三的困難，像是連綿的假山頭，讓人錯覺登頂，然而每踏出一步，就是離目標更近一點，最後痛苦過去了，美留下來。本論文的完成，首先感謝鄭謙仁老師在研究上的悉心指導，協助我釐清觀念，而龐飛老師身體力行，事必躬親的精神，以及蕭世烜老師一針見血的建議使我受益匪淺。也要感謝劉涓老師及張志成老師的指導與建議，使論文論述更為完備，接著感謝邱明堂老師及連一洋老師對採樣的大力協助及熱心提供實驗室借我使用，亦要感謝病理組的老師們帶領我看切片，活用書本中的病理知識應用於診斷，從老師們的身上看到，不論作任何工作，都必須專注、用心、恆心盡力而為，從大處著眼，從小處著手。

在實驗室的日子，特別感謝 chia 學長提供我改善實驗的建議，依潔學姊在採樣及實驗操作的大力協助，及俊明學長不遺餘力，不厭其煩的陪我討論，幫忙解決實驗問題，還有感謝有良學長、慧英學姊、俊廷學長、盈君學姊總是在我需要協助時，不吝指導。而充滿歡樂的小小 513 室，裡面有很照顧人的牛牛，認真魔人大鈞，古意俊銘，不打閃光燈看不到的丁丁，貼心可愛的純純和恬恬，以及親切的莞蓉學姊，大家一起念書吵鬧，寫考卷，寫論文，陪伴我面對繁重的課業壓力，還有謝謝細心的君倪協助我做實驗，認真的大媽，搞笑的無力，花俏大鬍子三叔，以及病理組的同學，因為有你們的關心與陪伴，幫助我順利的完成學業，兩年倏忽而逝，過程雖然辛苦，但收獲頗豐。

最感謝全力支持我的父母弟妹，低潮時為我打氣，擔任我的管家，大廚兼司機，讓我沒有後顧之憂，謝謝劉錕一路陪伴，在我沮喪時鼓勵，怠惰時督促，假如我有一些成就，那都是因為有你們的關照扶持，謝謝大家！

摘要

豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2; PCV2)，為全球豬隻新興疾病-離乳後多系統消耗性症候群 (postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) 的主要病原。本病為多因子影響的疾病，而血清中含高量 PCV2 核酸 (3.9×10^5 至 1.8×10^{12} copies/mL) 與臨床發生 PMWS 的嚴重程度有顯著相關性。近年報告指出 Con A 具有促進淋巴球內 PCV2 複製且增加淋巴組織病毒力價的現象，而 PCV2 於血清或淋巴組織中的含量或力價與臨床症狀顯著相關。因此本實驗的目的以 Con A 模擬免疫刺激探討豬第二型環狀病毒如何影響刺激下的細胞增殖反應。實驗設計包括：一、以自然感染帶原豬，分析不同 PCV2 的病毒含量，與 Con A 刺激 PBMC 增殖反應之相關性。二、於實驗感染 SPF 豬，探討含高病毒豬群的 PBMC 及脾臟細胞，PCV2 superinfected 是否影響 Con A 刺激細胞增殖。實驗中細胞增殖反應以流式細胞儀檢測，IFN- γ 及 IL-10 以 ELISA 檢測，病毒量以 TagMan[®] Real-time PCR 測定。細胞的處理分四組包括不處理組，PCV2 組，Con A 刺激組及 Con A/PCV2 處理組。實驗第一部分結果僅 PCV2 superinfected Con A 刺激之細胞增殖反應與血清及病毒量呈負相關，單獨以 PCV2 superinfected 或 Con A 刺激 PBMC 均無顯著差異，而 IL-10 濃度與病毒量成正相關。實驗第二部分結果，於周邊血液細胞，控制組 PCV2 superinfection 有促進 Con A 刺激 PBMC 之細胞增殖反應，但相同處理在攻毒組有抑制細胞增殖的現象，此細胞增殖的抑制與細胞內含高病毒量有關但與細胞之凋亡及壞死無關，此外也可能與培養上清液 IL-10 濃度有關。在脾臟細胞，控制組中細胞增殖反應、病毒含量及 IL-10 分泌無顯著變化，而 PCV2 superinfection 可促進 Con A 刺激脾臟分泌 IFN- γ 。本研究以 Con A 刺激模擬免疫活化模式，觀察高病毒量或於 PCV2 superinfection 可能藉由 IL-10 分泌影響免疫細胞增殖。推論感染豬若經過免疫刺激，則增加病毒複製及 IL-10 分泌，可能使免疫細胞功能受損，而易有臨床症狀的產生。

關鍵詞：PCV2，Concanavalin A，白血球間質素-10，周邊血液單核細胞，淋巴球增殖反應

Abstract

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is associated with a new emerging disease, postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) which causes severe economic losses in swine industry worldwide. PMWS-affected pig is characterized by high PCV2 load in serum, ranging from 3.9×10^5 to 1.8×10^{12} PCV2 copies/mL, which has significantly correlated with severe clinical signs of PMWS. Several reports reveal immune stimulation is an important factor in the induction of PMWS. Con A enhances PCV2 replication and high viral titer in PBMC and in lymphoid tissues, respectively, that has correlated with PMWS as well. The aim of this study is to investigate the impact of PCV2 infection on Con A stimulated cell proliferative response. The experimental designs include: 1. To evaluate the correlation between viral load in serum and Con A stimulated cell proliferation as well as IFN- γ and IL-10 secretions in PBMC from PCV2-carrier pigs. 2. To evaluate whether PCV2 superinfection affect Con A stimulated cell proliferative response in experimental PCV2 infected SPF pigs. Flow cytometry was used to detect cell proliferation response and ELISA was used to evaluate the level of IL-10 and IFN- γ . Viral load was measured by TagMan[®] Real-time PCR. Culture of PBMC or spleen cells were separated into 4 group of treatment as mock, PCV2 superinfection, Con A treated and Con A/PCV2. In the first part of the study, the tendency of inverse correlation between serum PCV2 load and proliferation response of PBMC at Con A/PCV2 group was observed. The positive correlation between IL-10 level and viral load was also noted. In the second part of the study, PBMC proliferation after Con A stimulation could be enhanced by PCV2 superinfection in the control group. However, this enhancement was not observed in the experimental PCV2 infected SPF pigs. In this group, the inhibition of enhanced cell proliferation was correlated to the cellular viral load but was not associated with the process of necrosis or apoptosis and might be associated with high IL-10 level. In spleen, viral load in spleen cells and IL-10 secretions were insignificant but the level of IFN- γ was enhanced at Con A/ PCV2 group. Our data suggested that high viral load could inhibit Con A stimulated cell proliferation and the inhibition maybe associated with induction of IL-10.

Key words: PCV2 , Concanavalin A , IL-10 , PBMC , lymphocyte proliferative response

目錄

中文摘要	I
Abstract	II
目錄	III
圖次	V
表次	VI
第一章 緒言	1
第二章 文獻回顧	3
第一節 豬環狀病毒	3
1-1 環狀病毒的病毒學分類	3
1-2 豬環狀病毒的結構與特性	3
1-3 致裂原 Concanavalin A 影響豬環狀病毒的複製	4
1-4 豬環狀病毒之感染與組織細胞之分布	5
第二節 豬隻離乳後多系統消耗症候群 (post-weaning multisystemic)	6
2-1 歷史背景與流行病學	6
2-2 臨床症狀與病理變化	7
2-3 PMWS 病程發展	7
2-4 PMWS 之致病因子	10
第三節 細胞免疫反應對抗 PCV2	11
3-1 細胞免疫反應	11
3-2 細胞激素調節免疫反應	13
第三章 材料與方法	18
第一節 實驗設計	18
第二節 實驗材料	21
2-1 實驗動物	21
2-2 製備豬第二型環狀病毒	21
2-3 細胞培養液	22
第三節 實驗方法	23
3-1 豬隻血液單核細胞之分離純化與培養	23
3-2 及時定量聚合鏈鎖反應 (Quantitive real-time polymerase chain)	24

3-3 檢測病毒特異性的增殖反應.....	24
3-4 細胞存活率檢測 (Annexin V/ Propidium iodide Apoptotic kit).....	26
3-5 細胞素的檢測.....	26
3-6 統計分析.....	26
第四章 結果.....	28
第一節 自然感染帶原 PCV2 豬之細胞免疫反應與病毒量的相關性.....	28
4-1.1 PBMC 增殖反應與血液中病毒量的相關性：.....	28
4-1.2 IL-10 濃度與病毒量及增殖反應的相關性.....	28
4-1.3 PBMC 上清液 IFN- γ 濃度與血液中病毒量的相關性.....	29
第二節 攻毒 SPF 豬 PBMC 免疫反應與細胞內 PCV2 病毒量之關連.....	29
4-2.1 攻毒豬隻血液病毒量及 IL-10 表現.....	29
4-2.2 PBMC 之增殖反應.....	30
4-2.3 PBMC 細胞內病毒量.....	31
4-2.4 PBMC 細胞存活率與凋亡率.....	32
4-2.5 PBMC 之細胞激素分泌.....	32
4-2.6 細胞病毒量及 IL-10 與 Con A/PCV2 組之增殖反應之關聯.....	33
第三節 攻毒 SPF 豬脾臟細胞免疫反應與細胞內 PCV2 病毒量之關連.....	35
4-3.1 脾臟細胞增殖反應.....	35
4-3.2 脾臟細胞病毒量.....	35
4-3.3 脾臟細胞之細胞激素分泌.....	35
第五章 討論.....	44
第六章 文獻回顧.....	57

圖次

Fig 1. Correlation between the proliferation index (PI) of PBMC with the PCV2 viral load in serum measured by PKH2 assay.	37
Fig 2. Correlation between the proliferation index (PI) of PBMCs with the PCV2 viral load in serum measured by EDU assay.	37
Fig 3. Correlation between the PCV2 viral load with the IL-10 level in serum.	38
Fig 4. Correlation between the IL-10 concentration and the PCV2 load in PBMC.	38
Fig 5. Correlation between the proliferation index (PI) with the IL-10 in serum.	39
Fig 6. Correlation between the IFN- γ level in supernatant with the PCV2 viral load in serum.	39
Fig 7. The mean of proliferation index (PI) of PBMC from PCV2 experimental infected SPF pigs.	40
Fig 8. The mean of PCV2 load in PBMC from PCV2 experimental infected SPF pigs.	40
Fig 9. The mean of viability rate and apoptosis rate of PBMC from PCV2 experimental infected SPF pigs.	41
Fig 10. The mean of concentration of IL-10 in PBMC supernatant.	41
Fig11. The mean of proliferation index of spleen cells from PCV2 experimental infected SPF pigs.	42
Fig 12. The mean of viral load of spleen cells from PCV2 experimental infected SPF pigs.	42
Fig 13. The mean of concentration of IFN- γ in spleen cells supernatant.	43
Fig 14. The mean of concentration of IL-10 in spleen cells supernatant.	43

表次

Table 1	Quantification of PCV2 genomes and IL-10 level in serum evaluated in PCV2 experimental infected pigs and control pigs at 21 DPI.	30
Table 2	The mean of proliferation index and PCV2 load in PBMC from experimental PCV2 infected pigs compared to control pigs.	31
Table 3	The mean concentration of IFN- γ and IL-10 supernatant of PBMC from experimental PCV2 infected pigs.	33
Table 4	The mean of IL-10 level in cultural supernatant from PCV2 experimental infected pigs compared to control pigs by T-test.	34
Table 5	The mean of proliferation index PCV2 load and IL-10 level in supernatant from PCV2 experimental infected pigs compared to control pigs by T-test in PCV2 superinfected Con A stimulation.	34
Table 6	The mean of proliferation index and IFN- γ of spleen cells from PCV2 experimental infected pigs.	36



第一章 緒言

豬第二型環狀病毒 (Porcine circovirus type 2; PCV2)，分類上屬於環狀病毒科，環狀病毒屬，為一不具封套、單股、環狀的 DNA 病毒，其基因體全長約 1.76kb。現已證實此病毒為全球豬隻新興疾病-離乳後多系統消耗性症候群 (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome; PMWS) 的主要病原。台灣豬隻 PCV2 血清抗體陽性率高達 83.5%，顯示 PCV2 已成台灣豬場普遍感染的病原 (Wang et al., 2004)。PCV2 抗原在感染豬隻體內的分佈非常廣泛，包括淋巴球及單核球/巨噬細胞系列的細胞，然而臨床上單純由 PCV2 引起 PMWS 發生的比例不高。血清中含高量 PCV2 核酸 ($3.9 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^{12}$ copies/mL) 與臨床發生 PMWS 的嚴重程度有顯著相關性。田間調查發現帶原豬可高達八成但只有約 15% 發病率，PMWS 被界定為多因子影響之疾病，由帶原豬發展至產生 PMWS 症狀，免疫刺激可能為重要因素。

Con A 為 T 細胞致裂原，可雙向活化免疫細胞與促進 PCV2 完成複製週期，過去實驗研究 Con A 對 PCV2 之感染及複製具有促進的效果：一、PBMC 經過 Con A 刺激下細胞內 PCV2 Cap mRNA copies 及 PCV2 DNA copies 均增加，且主要位於 SWC3⁻ (代表不含單核球之 PBMC) 及 CD3⁺ T 細胞 (Yu et al., 2007b)。二、未經 Con A 刺激下周邊血液淋巴球內 PCV2 抗原及核酸含有率由小於 1%，經過 Con A 刺激 PCV2 抗原含有率上升至 19.7% 及核酸含有率上升至 28.8% (Lin et al., 2008)。三、Con A 促進病毒複製，離體實驗 PBMC 經過 PCV2 感染以 Con A 刺激後第三天有 1.02 % PBMC 呈現 PCV2 抗原陽性反應，且核內 Cap 及 Rep 蛋白顯著增加，代表 Con A 刺激細胞產生之 RNA polymerase II transcription-initiation complex 對 Cap 基因及 Rep 基因之 promoter 均有親和性，而未經 Con A 刺激的細胞，僅有極少量抗原陽性細胞，上清液中的病毒力價 Con A/PCV2 組也顯著大於 PCV2 組 (Lefebvre et al., 2008)。活體攻毒後每隔三天肌肉及皮下注射 Con A 實驗，在攻毒後第 21 天，鼠膝淋巴結中的病毒力價及抗原陽性細胞數目，Con A/PCV2 組顯著大於 PCV2 組 (Lefebvre et al., 2008)。Con A 促進 PCV2 的假說為 Con A 刺激 T 細胞高度分裂，活化細胞產生聚合酶以幫助病毒完成複製週期。此外，Con A 對豬免疫系統具廣泛的活化影響，包含活化 B 細胞 (Andersson

et al.,1972) 及單核巨噬細胞 (Smith et al.,1972) 以及促進 IFN- γ 分泌。本實驗室林俊明學長曾證明健康帶原豬之 Con A 刺激周邊淋巴球對 PCV2 感受性增加 (Lin et al., 2008)。但 PCV2 感染對免疫細胞之影響研究很有限，有報告指出隨著病程趨向末期，PMWS 豬隻鼠膝淋巴結中淋巴細胞增殖與凋亡的比值呈漸進性減少，PCV2 可能破壞淋巴球正常之增生/凋亡動態平衡，使淋巴球數量無法維持。淋巴球的重要功能為細胞免疫反應，反應初始受病毒活化引發特異性增殖，因此可將其視為免疫細胞產生效應之另一指標，本研究以 Con A 刺激模擬免疫活化模式，觀察病毒量以及 PCV2 superinfected 如何影響 Con A 刺激免疫細胞增殖。



第二章 文獻回顧

第一節 豬環狀病毒

1-1 環狀病毒的病毒學分類

環狀病毒科 (Circoviridae) 為小型、無封套、圓形且具有單股環狀 DNA 的數種病毒，其中宿主為動物者，包含豬第一型、豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 1, type 2; PCV1, PCV2)、鸚鵡喙羽症病毒 (psittacine beak and feather disease virus; PBFDV)、鴿環狀病毒 (pigeon circovirus; PiCV) 與鵝環狀病毒 (goose circovirus; GoCV) 等皆被歸類為環狀病毒屬 (Murphy, 1999)。雞貧血病毒 (chicken anemia virus; CAV) 因基因組成之差異，被歸類於同病毒科下的 Gyrovirus 屬 (Bassami et al., 1998)。可感染人類的 Torque teno virus (TTV) 與 Torque teno mini virus (TTMV) 則歸於同病毒的 Anellovirus 屬 (Hino and Miyata, 2007)。宿主為植物者有椰子果葉腐敗病毒 (coconut foliar decay virus; CFDV)，香蕉樹尖端病毒 (Banana bunchy top virus; BBT) 與地下小丁香病毒 (Subterranean clover stunt virus; SCSV) 等皆曾被歸於環狀病毒科，不過現已更名歸於 Nanoviridae (Chae, 2005)。

1-2 豬環狀病毒的結構與特性

豬環狀病毒為直徑 14-19 nm、正二十面體、不具封套、單股的雙向環狀 DNA 病毒，是目前已知可自發性感染哺乳類動物細胞並於其內複製的最小病毒，此病毒對酸性環境、氯仿及高溫 (56°C 及 70°C) 具有抵抗性 (Murphy, 1999)。1974 年 Tischer 等人在污染的豬腎細胞株 (PK-15 cell line) 所發現及分離的無病原性環狀病毒稱豬第一型環狀病毒 (porcine circovirus type 1) (Tischer et al., 1987)。Meehan 等人由患有 PMWS 豬分離具有病原性者為豬第二型環狀病毒 (porcine circovirus type 2)，彼此間無論在基因序列或是病原性上皆有相當大的差異 (Allan et al., 1998; Meehan et al., 1998)。PCV2 基因體具 1768 個核苷酸，不同地區的 PCV2 病毒株之基因相似序列高達 93-99 % (Muhling et al., 2006)，PCV2 含有 6 或 11 個讀碼區 (open reading frames; ORF) (Morozov et al., 1998)，ORF 1 與 ORF2 為目前研究較廣泛的兩個讀碼區，能引發免疫反應，然最近報導 ORF 3 可引起 T 細胞免疫反應

(McNeilly et al., 2001; Stevenson et al., 2007)。ORF 1 主要轉譯出與病毒複製功能有關的 Rep 與 Rep' 蛋白 (replication-related proteins)，使用單株抗體進行免疫螢光染色 ORF 1 轉殖細胞，發現陽性訊號只出現在細胞核內，ORF 2 可轉譯出病毒核衣蛋白 (nucleocapsid protein)，其大小為 28 kDa。將 ORF 2 轉殖細胞，使用單株抗體進行免疫螢光染色標定，發現陽性訊號出現於細胞核內及細胞質內，故認定 ORF 2 所轉譯者為病毒主要的結構蛋白 (McNeilly et al., 2001)。此外，ORF 3 轉譯的蛋白非複製所需，其可能活化 caspase-3 的路徑而導致細胞凋亡 (Liu et al., 2005)。

1-3 致裂原 Concanavalin A 影響豬環狀病毒的複製

環狀病毒的病毒顆粒經由 clathrin-mediated endocytosis 進入宿主細胞，藉由 rolling-circle replication stem-loop cruciform model 進行複製 (Misinzo et al., 2005)。病毒於複製過程中需短暫形成雙股 DNA (Mankertz and Hillenbrand, 2001)，但 PCV2 不攜帶 DNA polymerase 或其基因，因此需依賴宿主細胞內存在於細胞分裂 S 期的 DNA polymerase 來完成複製 (Darwich et al., 2004; Grasland et al., 2005)。過去不少研究指出免疫刺激誘導 PCV2 帶原的健康豬產生 PMWS (Grasland et al., 2005; Krakowka et al., 2001)，使用致裂原的目的在增加細胞活性，因為自活體分離的白血球於實驗室培養後，在沒有致裂原或細胞激素的刺激，將不再分裂且於培養第三天起即大量凋亡 (Lin et al., 2008)。Concanavalin A (Con A)、phytohemagglutinin (PHA) 及 pokeweed mitogen (PWM) 為實驗室常見的致裂原。Con A 及 PHA 主要刺激原始 T 細胞，對 B 細胞影響較輕微，PWM 為依賴 T 細胞之 B 細胞致裂原，同時刺激 T 細胞及 B 細胞。在致裂原刺激進行增殖的機制研究發現，淋巴球於常態下處於休止期，由於致裂原促進細胞由休止期進入 G1 生長週期，但並非直接作用在抗原特異性淋巴球受器 (Ag-specific receptor) (Baumgarten et al., 1983; Hansen et al., 1999; Nielsen and Pedersen, 1997)。近年 in vitro 實驗研究致裂原對 PCV2 之感染及複製具有促進的效果。本實驗室林俊明學長使用 IFA 及 in situ hybridization 發現 Con A 刺激後的周邊血液淋巴球含有高量 PCV2 抗原及核酸含有率，實驗使用健康 PCV2 帶原豬之周邊血液淋巴球，以 Con A 刺激四天後，PCV2 抗原含有率由 $0.5 \pm 0.4\%$ 增至 $19.7 \pm 1.1\%$ ；PCV2 核酸

含有率由 $0.2 \pm 0.1\%$ 上升至 $28.8 \pm 6.0\%$ (Lin et al., 2008)。Yu 等發現 PBMC 經過 Con A 刺激後 PCV2 複製增加，細胞內 PCV2 Cap mRNA copies 及 PCV2 DNA copies 均增加，且主要位於 SWC3-（代表不含單核球之 PBMC）及 CD3+ T 細胞 (Yu et al., 2007b)。使用 PWM 刺激 PBMC 三天 Cap mRNA copies 即顯著增加，但病毒的複製不影響細胞的增殖 (Yu et al., 2008)。調查 PBMC 經過 Con A 刺激後病毒複製的位置，有 2.08 % PBMC 呈現 PCV2 抗原陽性反應，且 CD8+ 細胞占 54 %，CD4+ 細胞占 40 % 及 IgM+ 細胞占 11 %，此外也發現 Con A 刺激能促進鼠膝淋巴結中 PCV2 的複製 (Lefebvre et al., 2008)。以上報告顯示 Con A 活化 T 細胞對 PCV2 複製扮演重要的角色。

1-4 豬環狀病毒之感染與組織細胞之分布

PCV2 主要經由口鼻傳播進入宿主扁桃腺或是局部淋巴結中複製後，再散佈至全身器官及其他淋巴組織。使用免疫組織化學染色及 *in situ* hybridization (ISH) 偵測罹患 PMWS 豬隻組織中 PCV2 抗原分布位置，其中脾臟、扁桃腺及淋巴結中的淋巴濾泡，濾泡周區及髓質之巨噬細胞 (marginal-zone macrophages)，interdigitating dendritic cells 及淋巴球具有陽性訊號 (Ellis et al., 1998; Ellis et al., 1999)。非淋巴系統以肺、肝、腎等器官之訊號最強。上皮來源細胞包含腎小管、呼吸道上皮細胞，胰臟腺泡、腺管上皮及肝細胞，間質或中胚來源者，組織球、血球細胞、血管內皮細胞及脾臟小樑平滑肌細胞等可為陽性細胞，而其訊號主要出現在細胞質 (McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999)。許多文獻報告單核球對環狀病毒的感受性，發現 PCV2 核酸 (genome) 和蛋白質位於組織球、多核巨細胞、單核球/巨噬系列細胞、抗原呈現細胞系列及周邊血液單核球細胞，包括 T 細胞、B 細胞 (Darwich et al., 2004)。於慢性感染 PCV2 對組織的親和性可造成間質性肺炎，間質性腎炎，腸炎以及淋巴漿細胞性肝門脈炎。而分析嚴重臨床症狀的豬，淋巴組織中淋巴球流失與周邊循環中 B 細胞及 T 細胞減少有關，因此 PCV2 改變周邊血液及組織中免疫細胞族群的組成，可能造成免疫的抑制 (Segales et al., 2004)。

有關 PCV2 進入宿主細胞之機制仍待研究。關於 PCV2 如何進入細胞及複製？目前有兩種假說，其一為位於吞噬細胞細胞質中的 PCV2，來自吞噬其他感染細胞，或是來自內胞飲作用使抗原呈現。發生嚴重淋巴濾泡流失的淋巴結，PCV2 抗原訊號主要存在巨噬細胞的細胞質以及 CD 79a 陽性淋巴球內。以電子顯微鏡觀察發現 PCV2 存於巨噬細胞的細胞核與細胞質以及被巨噬細胞吞噬的凋亡淋巴球中 (Shibahara et al., 2000)。另一種假說為巨噬細胞表面可能存有 PCV2 特異性的受器准許病毒進入細胞質中，但仍未證實 (Darwich et al., 2004)。此外，有學者主張淋巴細胞為 PCV2 最初複製之處，分離早期感染豬隻支氣管淋巴結的單核細胞，發現 T 細胞與 B 細胞於病毒複製扮演重要角色，而單核球/巨噬細胞系列細胞攜帶並傳播病毒 (Yu et al., 2007a)。

第二節 豬隻離乳後多系統消耗症候群 (post-weaning multisystemic wasting syndrome ; PMWS)

2-1 歷史背景與流行病學

PMWS 於 1997 年首次有加拿大的 specific pathogen free (SPF) 豬隻發現 (Segales and Domingo, 2002)。北美、南美、歐洲的 PMWS 病例報告逐年增加，目前已證實 PCV2 為造成 PMWS 的必須因子 (Allan and Ellis, 2000; Allan et al., 1999; Jacobsen et al., 2009; Rodriguez-Arriola et al., 2003)，PMWS 已造成全世界養豬產業重大經濟損失。回溯性血清學及組織樣本調查發現 PCV2 感染豬隻約在 1969 年左右發生，於 1985 年產生散發性的 PMWS 病例 (Magar et al., 2000)，根據流病學的調查發現 PMWS 於 1999 年開始廣泛傳播 (Staebler et al., 2005)。在許多國家 PCV2 廣泛的存在各地豬場，污染場中高達 53-92% 的豬隻呈現血清抗體陽性 (Darwich et al., 2004)。最近美國發現兩具有急性高致死率散發型的 PCV2 基因型，此發現係根據 ORF2 轉譯之胺基酸序列第 86-91 之改變可分為 PCV2 group1 (DQ 629116) 以及 PCV2 group2 (DQ 870484) (Cheung et al., 2007; Olvera et al., 2007)，而愛爾蘭檢測於 1997 至 2006 年的糞便檢體發現此兩種基因型已於牧場中循環感染 (Allan et al., 2007)。亞洲也陸續證實有 PMWS 的發生，2004 年台灣豬隻血清抗體陽性已經高達 83.5%，此結果顯示 PCV2 的感染在台灣相當普遍 (Wang et al., 2004)。

2-2 臨床症狀與病理變化

PMWS 發生的年齡為保育後期至肉豬前期，通常為 25-120 日齡的豬隻，其中又以 60-80 日齡為主要發生群。PMWS 患豬臨床上呈現漸進性的體重減輕、精神沉鬱及呼吸困難，常伴隨皮膚蒼白、黃疸及下痢等症狀，偶而會出現咳嗽、發燒、神經症狀及突然死亡的現象 (Quintana et al., 2001)。大多數 PMWS 豬場，豬隻 PCV2 核酸及血清抗體陽性率高達 100%，但只有 15% 豬會出現典型 PMWS 症候。病理學診斷以全身性淋巴結腫大，間質性肺炎，淋巴結、脾臟及胸腺的淋巴流失，組織球浸潤及多核巨細胞形成，組織球中有時可見葡萄串狀嗜鹼性質內包涵體。診斷 PMWS 包含臨床症狀，顯微病變出現淋巴球流失以及偵測到 PCV2 抗原訊號 (Darwich et al., 2004)。

2-3 PMWS 病程發展

2-3.1 病毒載量與發病之相關性

作為診斷 PMWS 依據之一為血清中 PCV2 DNA 達到 10^7 copies/ml (Olvera et al., 2004)。使用 real time-PCR 偵測 PMWS 病豬，其血清、血漿、脾、淋巴結、肺及肝組織，PCV2 DNA 均超過 10^7 copies/ml (Andraud et al., 2008; Brunborg et al., 2004)。在西班牙田野調查具有 PMWS 疫情的牧場，血清中 PCV2 核酸量為 $10^{6.2 \pm 1.8} \sim 10^{7.7 \pm 1.8}$ copies/mL (Hjulsager et al., 2009)。於台灣屏東的牧場，自然感染 PCV2 豬隻發病一週內，血清中 PCV2 核酸量為 $10^{4.24 \pm 0.23}$ copies/mL，而在脾臟為 $10^{5.8 \pm 0.5}$ copies/g。人工攻毒 PCV2 10^4 TCID₅₀/mL 及 PRRSV 兩週後，採取全身器官並定量 PCV2 核酸，計算各器官 PCV2 核酸量平均值可達 $10^{3.86 \pm 0.25}$ copies/g，四週後為 $10^{3.02 \pm 0.2}$ copies/g。人工攻毒後兩週，臨床症狀有間質性肺炎及中度淋巴球流失，然 PCV2 核酸量隨著時間而減少，且有顯著差異 (Chung et al., 2005)。由前述可知，病毒核酸於組織或細胞中的含量與 PMWS 發生有顯著相關性。

近年學者利用定量 Cap mRNA 來調查病毒早期感染在不同組織器官複製能力；於攻毒後第 14 天，脾、淋巴結、肺及肝組織 PCV2 Cap mRNA 及 DNA 均顯著增加，且不同器官間病毒測量有顯著差異。PCV2 DNA 於氣管淋巴結可達 108 copies/ mg、脾臟、肝、肺約可達 10⁶ copies/ mg (Yu et al., 2007a)。PBMC 中 Cap mRNA 只在攻毒後第 13 天觀察到，然而於攻毒後 20 天內，PBMC 與血清中 PCV2 DNA 含量具有顯著相關性 (Yu et al., 2007a)。許多研究發現經過免疫刺激可促進 PCV2 複製及 PMWS 發生。PCV2 MOI 0.1 感染 PBMC，再以 Con A 刺激，發現培養後 18 小時起 PCV2 複製有顯著增加，於 72 小時 PBMC 內 PCV2 spliced Cap mRNA 達 $10^{8.69 \pm 0.09}$ copies/ 10⁵ cells，PCV2 DNA 可達 $10^{9.98 \pm 0.11}$ copies/ 10⁵ cells。此外，PBMC 以及移除單核球 PBMC 的組別，病毒 mRNA 及 DNA 顯著高於 SWC3+ 單核巨噬細胞，顯示淋巴球為 PBMC 活化後 PCV2 複製的細胞群 (Yu et al., 2007b)。

2-3.2 淋巴的流失

PMWS 病豬有淋巴球減少症 (lymphopenia) 及單核細胞增多 (monocytosis)，淋巴器官廣泛性淋巴球流失 (Darwich et al., 2002; Quintana et al., 2001)，周邊血液淋巴球族群，B 細胞、CD8+ 及 CD4+/CD8+ 族群減少 (Darwich et al., 2002a)。根據病程的不同，病豬淋巴結內細胞的變化分為三個時期：感染初期 (initial stage or stage I)，減少的細胞主要為濾泡樹突細胞，B 細胞、CD4+ 細胞及 CD8+ 細胞；於中間期 (intermediate stage or stage II)，CD4+ 細胞及 CD8+ 細胞更為減少，而濾泡樹突細胞及 B 細胞幾乎完全消失；及至末期 (end stage or stage III)，T、B 細胞及 high endothelial venules (HEV) 更嚴重的減少，但單核球/巨噬細胞系列的細胞均明顯增加 (Sarli et al., 2001)。關於淋巴球流失的致病機轉目前仍無定論，調查發現 PMWS 病豬隨著病程嚴重會造成淋巴球增殖能力下降。利用單株抗體 MIB1 標定鼠蹊淋巴結及 TUNEL assay 偵測凋亡反應，細胞增殖與凋亡的比值，代表體內調控細胞數目及保持淋巴球數目平衡的能力。實驗結果發現，由 PMWS 早期至晚期階段，增殖指數持續下降，凋亡指數無顯著變化，兩者比值隨病程趨於嚴重而降低。故推測淋巴球的流失機制為抑制增殖反應，破壞淋巴細胞增殖/凋亡的動態平衡。增殖反應受抑制無法維持細胞族群量，

使淋巴細胞數量持續的減少，造成淋巴結中淋巴球數目失衡現象 (Mandrioli et al., 2004)。

PMWS 病豬，具有淋巴組織與周邊血液之組成改變，可能造成免疫功能改變或免疫抑制，臨床症狀嚴重的豬之鼠膝及腸繫膜淋巴結和扁桃腺以 B 細胞以及 T 細胞流失為主要特徵，且與血液中變化具高度相關。分析 PBMC 有淋巴球總數減少，CD3+/CD4+ 細胞及 IgM+ 細胞顯著減少，單核球總數增加，以及 SLA-II 抗原表達增加 (Segales et al., 2004)。此外，田間調查發生虛弱症狀的病豬與 CD4+ 流失有關，於 PCV2 感染且虛弱症狀的豬表現 IgM+、CD8+ 及 CD4+/CD8+ 細胞流失 (Darwich et al., 2002)。以流式細胞儀偵測發現 PMWS 豬周邊血液 CD3+ 顯著減少的現象，而單核球數目增加與顆粒球增加成顯著正相關 (Segales et al., 2001b)。改變細胞組成可能影響免疫功能，病毒藉由減少抗原呈現的能力，改變細胞激素分泌以及抑制補體造成免疫抑制 (Drew, 2000)。

2-3.3 PMWS 病豬體內細胞素的改變

PMWS 病豬 PBMC 細胞素分泌功能有明顯改變 (Darwich et al., 2004)，八週齡 PMWS 病豬不同淋巴組織細胞激素 mRNA 表達也受影響，胸腺中 IL-10 mRNA 及扁桃腺中 IFN- γ mRNA 的表達均被促進。然而在許多臟器中病毒會抑制細胞激素 mRNA 的表達，包括脾臟中 IL-2 mRNA，扁桃腺與淋巴結的 IL-4 mRNA，脾臟與鼠膝淋巴結的 IL-12 mRNA，鼠膝淋巴結的 IL-10 及 IFN- γ mRNA 表達皆被抑制 (Darwich et al., 2003b)。進一步調查細胞激素基因與蛋白質表現的關連，比較同一牧場 14 週齡 PMWS 病豬及臨床健康帶原豬，使用半定量 RT-PCR 發現 PMWS 病豬 PBMC 細胞激素 mRNA 表達增進者有 IL-1 α 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 及 IFN- γ mRNA；抑制表達的基因有 IL-2、IL-2R α (CD25) mRNA。使用流式細胞儀偵測細胞內蛋白質表現，發現 PBMC 分泌增加的細胞激素有 IL-1 β 、IL-2 及 IL-6；抑制的有 IL-4 及 IFN- γ 。但是 IL-2 及 IFN- γ 細胞激素基因表達與蛋白質表現促進與抑制作用兩者相反。IL-1, IL-6 輕微增加代表單核巨噬系列細胞的活化。IL-4 分泌抑制，可能與抑制某些體液性免疫反應且 PBMC 可能非 PCV2 感染的主要標靶細胞 (Sipos et al., 2004)。

PMWS 病豬的 PBMC，當再次接觸抗原 (recall antigens) 或刺激，細胞激素的分泌明顯不同於健康豬。PCV2 再次感染 PMWS 病豬的 PBMC 時，其 recall PCV2 的反應為促進 IL-1、IL-8、IL-10 及 IFN- γ 分泌，然無論是 PMWS 豬或健康豬，PCV2 均能刺激前驅炎症性細胞素 IL-1 β 及 IL-8 的分泌 (Darwich et al., 2003a)。

2-4 PMWS 之致病因子

2-4.1 免疫刺激及免疫抑制

血清學及 PCR 調查發現田間豬隻有 PCV2 高帶原率，然豬隻因單獨感染 PCV2 引起 PMWS 只佔 15%，帶原豬多因受到免疫改變 (immune modulation) 或與細菌性或其他病毒性病原混合感染而發展成 PMWS (Opriessnig et al., 2007); 大多數攻毒實驗發現單獨給予 PCV2 而不給予其他病毒或免疫刺激的豬隻，不具有明顯症狀及相關病變產生 (Allan et al., 2000b; Krakowka et al., 2001; Krakowka et al., 2000)。此現象可能與 PCV2 可以不活化也不複製的持續存於單核巨噬系列細胞有關 (Vincent et al., 2003)，且 PCV2 缺少複製所需的 DNA polymerase，故須依賴細胞處於 S 期或感染快速分裂的細胞，例如胎兒心肌細胞。基於上述原因，學界已達成 PMWS 是多因子疾病的共識。

免疫刺激是 PCV2 感染豬隻日後發展成 PMWS 的關鍵，以注射疫苗或疫苗佐劑可活化免疫系統為例，PCV2 接種豬隻並給予 *Mycoplasma hyopneumonia* 疫苗與 *Actinobacillus pleuropneumonia* 疫苗，PMWS 病豬的發生率顯著增加 (Allan et al., 2000b; Krakowka et al., 2007)。分別在接種 PCV2 前 21 天及前一天施打 *Mycoplasma hyopneumonia* 疫苗與 APP 疫苗，發生 PMWS 症候較未使用疫苗組嚴重 (Opriessnig et al., 2004a)。佐劑 keyhole limpet hemocyanin/ incomplete Freund's adjuvant (KLH/ ICFA) 與 PMWS 的相關性也有許多報告，發現以 KLH/ICFA 施打之淋巴結，組織病變較未施打組嚴重，病毒量也較多 (Krakowka et al., 2001)。此外，佐劑的劑型 oil-in-water 比氫氧化鋁劑型發生病毒血症的時間長，且淋巴流失較嚴重 (Opriessnig et al., 2007)。

免疫抑制可造成 PMWS 的發生。使用免疫抑制藥物 Cyclosporine，在淋巴結組織的 PCV2 力價高於未使用免疫抑制劑組，然 PBMC IFN- γ mRNA 表達程度較低，免疫未受藥物抑制的組別，淋巴結組織中力價較低 (Meerts et al., 2005)。另一篇攻毒實驗配合 dexamethasone 處理發現，42.85% (3/7) 的小豬具有肉芽種性淋巴炎，顯示免疫抑制可能產生 PMWS 症狀 (Kawashima et al., 2003)。

個體免疫的差異也是致病因素之一，最近發現哺乳豬時期淋巴球表面分子的活化也是 PMWS 危險因子，Grierson 等在 PMWS 牧場收集血液樣本進行 case-control 研究調查發現，以流氏細胞儀長期追蹤偵測細胞表面分子的改變，發現未發病的豬隨著年齡增長，增加的細胞為 T 細胞、B 細胞、CD4+CD8+細胞及 CD4-CD8+細胞，此外 T 細胞表面分子 MHC II 的表現也增加。而患有 PMWS 的豬，於 1-8 週齡淋巴球表面分子較活化的豬群，T、B 細胞表面表達較多的 MHCII，且 CD45RC 陰性 T 細胞表面表達的 CD25+ 顯著多於未發病的豬，推測豬隻於年幼時期淋巴球較活躍，於離乳後發生 PMWS 的比例較高 (Grierson et al., 2007)。

2-4.2 其他病原的共同感染

共同感染其他病毒性或細菌性病原與 PMWS 具有密切關聯 (Opriessnig et al., 2003)。田間調查罹患 PMWS 合併感染 PRRSV (porcine reproductive and respiratory virus) 的病例占 52% (251/484)，Mycoplasma hyopneumoniae 的病例占 36% (172/484)，合併 SIV (swine influenza virus) 占 5.4% (26 /484) (Pallares et al., 2002)。許多 in vitro 攻毒 PCV2 實驗指出共同感染 (co-infection) PPV (porcine parvovirus) (Allan et al., 2004; Kennedy et al., 2000; Kim and Chae, 2003; Yue et al., 2009)、PRRSV (Allan et al., 2000a; Ritzmann et al., 2005)、Mycoplasma hyopneumoniae (Krakowka et al., 2007; Opriessnig et al., 2004b) 均能促進 PCV2 病毒量增加及增進 PMWS 臨床症狀的發生。

第三節 細胞免疫反應對抗 PCV2

3-1 細胞免疫反應

後天免疫反應體液免疫產生抗體控制急性感染，細胞免疫反應 (cell-mediated immunity; CMI) 清除長期病毒感染或是抵抗再次感染 (Carasova et al., 2007; Ladekjaer-Mikkelsen and Nielsen, 2002)。初次接觸病毒純真單核淋巴細胞遇到抗原時活化，早期會合成蛋白質，產生細胞素，細胞素受器等，接著活化淋巴球抗原特異性增殖反應 (clonal expansion)，分化為輔助型，毒殺型細胞或漿細胞，稱效應反應 (effective response)。二次免疫反應 (secondary or recalled immune response) 是指再次暴露相同抗原時，記憶淋巴球 (memory lymphocytes) 活化，製造高親和力的抗體及特異性 T 細胞，更快、更強效清除病原 (Murphy, 1999)。

在 PCV2 不顯性感染的豬隻，會誘導體液免疫促使特異性抗體中和病毒 (Meerts et al., 2005)，然 PCV2 引發的細胞免疫反應目前報告較少，且細胞免疫反應牽涉機制十分廣泛，故學者提出不同的模組探討。Fort 等最近之研究以未吃過初乳一週大進行帝王切開術 (caesarean-derived) 取出的小豬進行攻毒試驗，病毒血症於攻毒後第七天發生持續至第 30 天血清中仍能偵測病毒核酸出現，測量血清中 IFN- α 於攻毒後第五天達到最高後減低，血清病毒量於第 21 天達最高量 105 copies/mL，同時以 ELISPOT 偵測 PCV2 特異性的 INF- γ 分泌細胞 (PCV2-specific INF-secreting cells) 也於此時達到最高，於攻毒後第 29 天中和抗體出現，而病毒量降低至 102 copies/mL 血清，但所有實驗豬隻無臨床症狀產生。顯示於感染 PCV2 引起於早期先天免疫 (innate immune response) 反應為 IFN- α 分泌，接著發生病毒血症 (viremia) 情形，此時後天免疫 (adaptive immune response) 發生，細胞免疫 INF- γ 分泌細胞增加，促進中和抗體產生，血清病毒量減低，達到清除病原的效果 (Fort et al., 2008)。另一模組使用免疫抑制藥物 Cyclosporine，發現 INF- γ mRNA 與 PCV2 力價具有負相關，於 3-2.2 詳述。應用細胞性免疫反應對抗病毒感染對設計有效的疫苗而言非常重要。過去豬瘟病毒的研究顯示，豬瘟病毒可誘導病毒特異性 CD4⁺ 及毒殺性 T 細胞 (CTL) 反應辨識 E2 結構蛋白及 NS3 非結構蛋白，據此設計 E2 次單位或基因重組豬瘟疫苗，發展有效疫苗 (Rau et al., 2006)。目前於北美及歐洲以於田間使用的 PCV2 不活化疫苗 CIRCOVAC®，實驗發現能減少病毒場內循環及仔豬排毒，但有關疫苗抑制 PCV2 機制以及對豬之保護效力仍有待研究 (Opriessnig et al., 2003)。

3-2 細胞激素調節免疫反應

3-2.1 第二型干擾素- γ (Interferon- γ ; IFN- γ) 之功能簡介

IFN- γ 屬於第二型干擾素，由 Th1 CTL 及 NK 細胞分泌，是 Th1 細胞主要的細胞激素，被視為趨向 Th1 路徑活化細胞毒殺的指標，其功能為促進 B 細胞分化合成 IgG2a，活化巨噬細胞及體細胞表達 MHC class I / II 促進抗原處理及呈現以及 NK 細胞活化。IFN- γ 主要扮演免疫調節的角色，協同其他免疫反應建立抗病毒之狀態。其抗病毒之機制為誘導某些酶反應，包含以下：一、病毒雙股 RNA (dsRNA) 為病毒複製所須的中間產物，能激活特殊之蛋白激酶，雙股 RNA 調節型蛋白激酶 (protein kinase dsRNA-regulated; p1 Eif-2 kinase; P68 kinase; PKR) 為一種 serine/ threonine kinase，主要的功能抑制病毒蛋白合成，活化 PKR 使 P1 次單位磷酸化，接著磷酸化 eukaryotic translation initiation factor (eIF-2) 的 α 次單位 (α subunit)，觸發 eIF-2 α 合成 eIF2 α 磷酸化可以有效的抑制 eIF2 β 的活性，而 eIF2 β 是 eIF2 三聚體中能夠發揮鳥苷酸交換作用的因子，因此 eIF2 β 活性的降低將會抑制轉譯起始，故 IFN- γ 誘導之 PKR 抑制病毒蛋白的合成 (Murphy, 1999)。此外 PKR 活化 NF- κ B，調控 TNF- α mRNA，誘導 fas-mediated apoptosis。二、雙股 RNA 特異型腺苷酸脫胺基酶 (dsRNA-specific adenosine deaminase, ADAR) 催化 dsRNA 上腺苷酸 (adenosine) 脫胺成肌核甘 (Inosine)，當細胞轉譯時將肌核甘轉成鳥嘌呤 (guanosine) 時，造成病毒 mRNA A \rightarrow I 編碼而轉譯錯誤，製造出無功能性之病毒蛋白達到抑制病毒複製的效果 (Nika et al., 2001)。三、IFN- γ 誘導之鳥苷酸結合蛋白 (guanylate binding proteins; GBP) 為 GTPases 具有抑制 vesicular stomatitis virus 及 encephalomyocarditis virus 複製的報告，但有關 GBP 抗病毒機制目前仍不清 (Carter et al., 2005)。此外，IFN- γ 抑制病毒在細胞間傳遞及複製，並能增進病原的辨識，抗原的加工及呈現等。病毒刺激與其他細胞素作用，例如：TNF- α 、IL-4、第一型干擾素、LPS 等。IFN- γ 的負向調節者 (negative regulators) 有 IL-10、IL-4、TGF- β 、glucocorticoids (Katze et al., 2002)。以 IFN- γ -/- 或 IFNGR1-/- 小鼠研究 IFN- γ 功能缺損之影響，發現小鼠無法抵抗寄生蟲、細菌及病毒感染。此外，在胎期重複感染或是 IFN- γ 製造不足時，個體展現嗜中性球移動力減少以及 NK 活性下降的現象，不過當身體沒有足夠能力清除病原時，IFN- γ 有輕微抑制炎症反應的情況 (Schroder et al., 2004)。

3-2.2 IFN- γ 影響 PCV2 感染

細胞激素被視為一種化學媒介子 (chemical mediators)，免疫細胞間利用細胞激素傳遞訊號，故可藉由分析細胞激素分泌代表細胞功能，以及免疫細胞族群之交互作用，直接反應 T 細胞對抗原產生之免疫能力的強弱 (Wood and seow, 1996; Mateu de Antonio et al., 1998)。Meerts 等發表以 IFN- γ mRNA 作後天免疫反應指標研究 PCV2 對免疫系統產生的影響，以鼠膝淋巴結病毒力價作病毒複製之指標。實驗結果發現個體間變異大，然 IFN- γ mRNA 之表現與 PCV2 於鼠膝淋巴結複製具有某些消長關係，活體外攻毒 8 頭 19 天大比利時藍瑞斯飼品之 gnotobiotic pig，分析攻毒後第 15 天，淋巴組織的病毒量、表達 IFN- γ mRNA 的程度及抗體、中和抗體力價情況，並依情況不同區分為三種形態：一、在鼠膝淋巴結未檢測到 PCV2 力價之兩頭豬，PBMC 表達最高 IFN- γ mRNA 及高量中和抗體，顯示表達 IFN- γ mRNA 及產生中和抗體免疫型態能有效控制病毒複製。二、具有低至中度 PCV2 力價之五頭豬，PBMC 未偵測到 IFN- γ mRNA 之表達，但有少量中和抗體。三、有一頭豬病毒力價於攻毒後第 15 至 21 天內逐漸增加，其 PBMC 未偵測到 IFN- γ mRNA 之表達，也缺乏中和抗體 (Meerts et al., 2005)。

另一方面，PCV2 可調控 IFN- γ 之表現，以流式細胞儀比較同場 14 週齡 PMWS 患豬及臨床健康帶原豬，發現 PMWS 患豬抑制 PBMC 細胞內 IFN- γ 表現 (Sipos et al., 2004)。活化的免疫細胞也具有類似的情況，PBMC 經致裂原 (phytohemagglutinin, PHA) 刺激，IL-2、IL-4 及 IFN- γ 的分泌均顯著低於健康豬 (Darwich et al., 2003a)。此外 in vitro 攻毒實驗中，基因重組第一型及第二型干擾素均能加強 PCV2 於 PK-15 及 3D4/3 的感染及製造，使用 500 U/mL IFN- γ 處理過的 PK-15 與 PBMC 共同培養後，病毒力價高於控制組 10 倍。觀察感染的細胞及細胞內子代病毒的製造均增加，但 VLP 與細胞膜結合並未增加，根據以上結果推論 IFN- γ 並非促進細胞膜上 PCV2 receptor 表達，以及增進病毒與細胞結合，而是影響細胞內化路徑 (internalization cascade)，促進 virion 在細胞內的結合。此外，IFN- γ 能活化或增加細胞質或細胞膜穿透因子 (spanning factor)，故能增加病毒-受器複合體的胞飲作用 (Meerts et al., 2005)。

3-2.3 白血球間質素-10 (Interleukin-10 ; IL-10) 調節免疫功能

IL-10 具有抑制細胞性免疫反應，促進體液性免疫反應的特性，可調控其他細胞激素，減弱炎症反應，主要由 Th2 細胞分泌。IL-10 的製造與 promoter polymorphisms 基因表現有關，具有抑制 CD4 T 細胞及 CD8 T 細胞增生的特性，對 B 細胞具有調控抗體類型轉換 (isotype switching) ，也會改變抗原呈現細胞的功能，抑制 Th1 及巨噬細胞細胞激素釋放 (Marinic et al., 2006)。臨床研究指出 IL-10 為引起免疫抑制之重要宿主因子，導致無法有效控制感染，加重 C 型肝炎病毒易感性及慢性感染 (Paladino et al., 2006; Persico et al., 2006)，增加慢性 B 型肝炎病毒感染的嚴重性 (Miyazoe et al., 2002)。後天免疫缺損病毒感染及慢性 C 型肝炎病毒感染病人，取其 PBMC 中和 IL-10 試驗以抗體阻斷 IL-10/ IL-10R 路徑，有回復 CD4 T 細胞反應 (Clerici et al., 1994; Knapp et al., 2003)，而減低 IL-10 polymorphisms 基因表達與延緩 AIDS 發病有關 (Shin et al., 2000)。研究 IL-10/ IL-10R 路徑與慢性病毒感染的關聯，為使用 LCMV 13 株感染小鼠製造慢性感染模式，加入對 IL-10 受體具親和性的抗體阻斷 IL-10 訊號路徑，或是使用 IL-10^{-/-} 基因缺陷小鼠感染 LCMV 13 株，發現隨著病程發展病毒量減少，LCMV 病毒特異性的 CD4 T 細胞及 CD8 T 細胞增加及記憶細胞形成。此外，於攻毒開始即給於抗體控制病毒感染的效果較攻毒後第 12 天良好，病毒量較低，實驗結果顯示病毒感染誘導 IL-10 對免疫之抑制可能發生在早期改變 APC 功能。免疫抑制的證據還有於早期感染誘導之 Tr1 製造 IL-10 細胞 (IL-10-producing Tr1 cell) 對病毒特異性 CD8⁺ T 細胞具有長期抑制的影響 (Ejraes et al., 2006)。總結病毒誘導 IL-10 引起慢性感染可能模式為，當宿主感染病毒時 APC 活化原始 T 細胞，病毒誘導 DC、巨噬細胞及調控型 T 細胞分泌 IL-10，對 T 細胞影響包括減弱效應 T 細胞分化以及減少記憶細胞形成，使病毒得以持續存在，病程進入慢性感染，最終使 T 細胞逐漸耗盡 (Brooks et al., 2006)。

3-2.4 PCV2 與 IL-10 之相關性

許多細胞內病原利用誘導 IL-10 抑制免疫的特性，像 HIV，cytomegalovirus 以及 Mycobactreia 等 (Redpath et al., 2001)，而近年研究指出 PCV2 誘導 IL-10

(Darwich et al., 2003; Sipos et al., 2004)。於罹患 PMWS 豬之重要特色為周邊血液血液像前出現淋巴球減少症 (lymphopenia) 以及淋巴組織淋巴球流失，然 IL-10 是否為 PCV2 造成淋巴流失的原因仍有待釐清。總結過去離體 PCV2 攻毒實驗或分析 PMWS 病例歸納 IL-10 所扮演的角色：一、血清中 IL-10 增加可能與 PMWS 有關，但無法證實 IL-10 促使 PMWS 產生還是 PMWS 疾病的結果 (Stevenson et al., 2006)。二、PCV2 可引起病毒特異性 IL-10 分泌 (Darwich et al., 2008)。三、對其他細胞激素的影響有 PCV2-specific IL-10 可抑制 pseudovirus-recalled IFN- γ 及 IL-2 反應 (Kekarainen T, et al., 2007)。Stevenson 等 (Stevenson et al., 2006) 報導血清中 IL-10 濃度的提升與 PMWS 有關，實驗設計攻毒三週大 gnotobiotic 豬，以 KLH/ICFA 免疫刺激，於攻毒後第十天，發現產生 PMWS 豬隻，血清中的 IL-10 濃度顯著高於 subclinically 豬隻及未攻毒組。

Darwich 等 (Darwich et al., 2008) 以曾有 PCV2 感染但無 PMWS 之一貫場，將無 PCV2 小豬攻毒後無 PMWS 產生，於此 subclinically 的模式下研究感染宿主之免疫型態。結果顯示於攻毒後第三週以 PCV2-superinfected PBMC 產生 PCV2-specific IL-10 分泌，血清中病毒量也於此時達到高峰 (10^{4.8} copies/ml)，抗體的變化由攻毒後第三週至第七週 PCV2-specific IgG 持續上升，而 IgM 下降，代表減少 IgM 製造轉而朝向 IgG 反應。於攻毒後第十週 IL-10 不分泌而血清中病毒量低落，綜合前述顯示 PCV2 特異性之 IL-10 反應產生可能與血清中含高病毒量有關。

IL-10 調控其他細胞激素分泌，田間調查八週齡 PMWS 患豬於不同的淋巴組織中細胞素基因表現 mRNA，PMWS 患豬刺激 IL-10 產生，且在胸腺可觀察到 IL-10 mRNA 表達增加，推測患有 PMWS 時 T 細胞可能發生功能缺失，藉由分泌 IL-10 調控其他細胞，造成胸腺萎縮或細胞流失。此外，脾臟中 IL-2 mRNA 的表達受抑制，扁桃腺與淋巴結中的 IL-4 mRNA 表達也受抑制 (Darwich et al., 2003)。攻毒實驗產生 subclinically 豬隻 PCV2-superinfected PBMC 之上清液產生高量 IL-10 但未產生 IFN- γ 、IL-2 及 IL-4，可能與 IL-10 抑制有關 (Darwich et al., 2008)。過去研究 PMWS 及 subclinically 豬隻 IL-4 分泌受抑制 (Sipos et al., 2004)。In vitro 共同培養 PCV2 以及 PBMC 時抑制 PHA 刺激引起的 IL-2 及 IL-4 分泌 (Darwich et

al., 2003b), 以半定量 RT-PCR 偵測白血球內 IL-1 α mRNA 以及 IL-10 mRNA 增加, 而 IL-2 R α (CD25) mRNA 及 IL-2 mRNA 表達被抑制, IL-2 是促使 T 細胞從 G1 期轉至 S 期的關鍵因子, 當其與 T 細胞表面高親和性的 IL-2 受體結合後產生胞內訊號, 驅動 T 細胞的分裂及分化, 病毒誘導 IL-10 表達抑制 IL-2, 而 IL-2 與 CTL 細胞之成熟分化有關 (Sipos et al., 2004)。PCV2 及某些 CPG-ODNs 會促進周邊血液中單核球 SWC3+ 分泌 IL-10 及促進骨髓細胞分泌 IL-12, 實驗發現 PCV2 與 pseudovirus (PR) 共同刺激 PBMC 比單純以 PR 刺激誘發的 IL-2 及 IFN- γ 分泌減少, 認為 PCV2 抑制 PR recalled response (Kekarainen T, et al., 2007)。



第三章 材料與方法

第一節 實驗設計

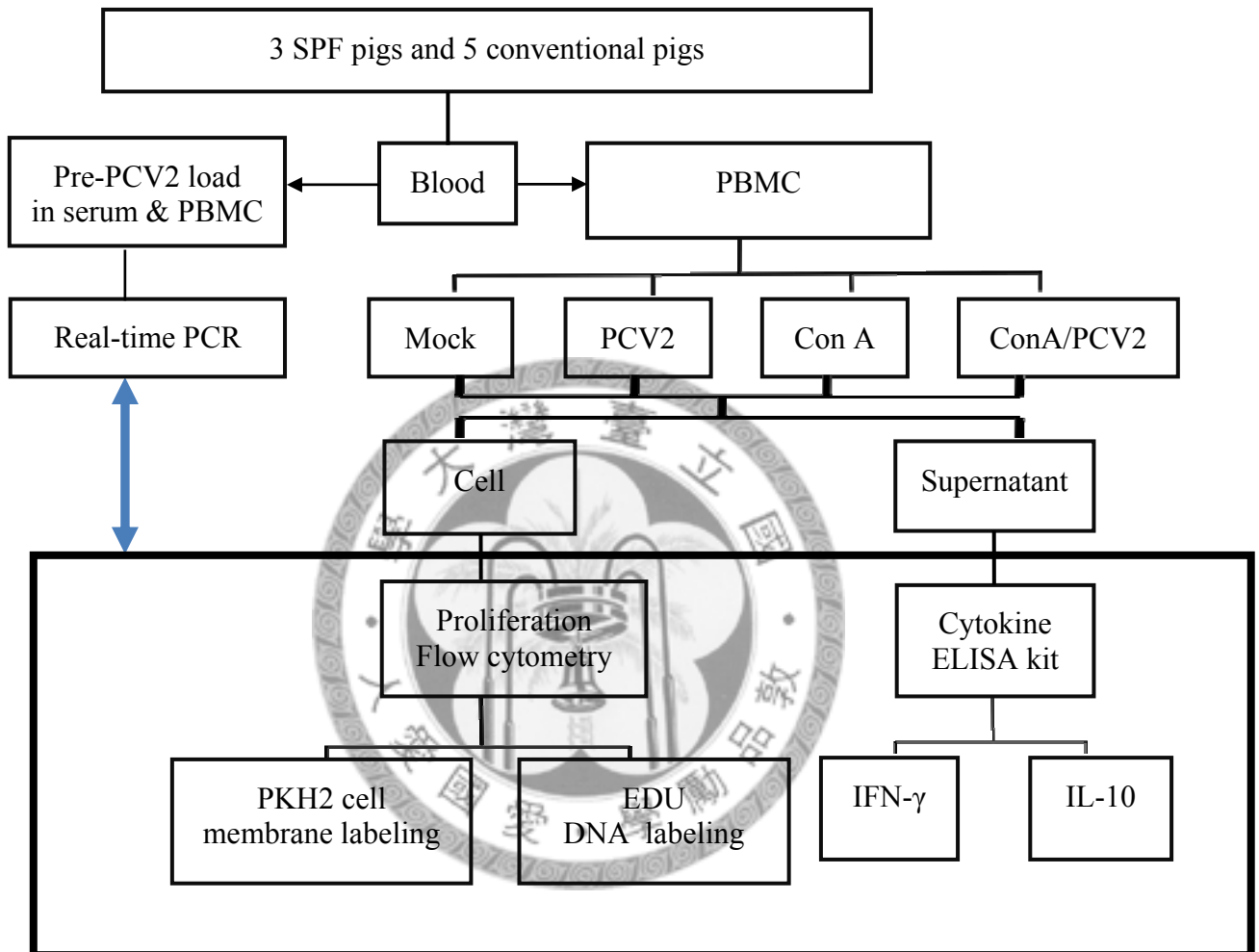
豬隻持續感染 PCV2 並遭受免疫刺激易發展成 PMWS，而病豬體內含有高 PCV2 病毒量且促進 IL-10 與 PMWS 有關。實驗目的在了解 PCV2 感染如何影響 Con A 刺激 PBMC 增殖。本實驗首先以自然感染帶原豬，分析帶原不同 PCV2 病毒量，與 Con A 刺激 PBMC 增殖反應及與 IFN- γ 之相關性。第二部分研究攻毒 SPF 豬，探討 PCV2 superinfected 對 Con A 刺激細胞的影響以及 IL-10 扮演的角色。本實驗嘗試以 Con A 模擬免疫活化，了解 PCV2 感染如何影響免疫細胞增殖，進而造成 PMWS 發生。

實驗的第一部分為分析帶原健康豬隻，細胞免疫反應與血清中 PCV2 核酸量的相關性。使用 11 頭帶原豬分別來自 SPF 場 6 頭及一貫場 5 頭。分離血清及周邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)，細胞處理分四組包括 PCV2 處理，Con A 處理，Con A 及 PCV2 處理以及對照組。使用 EDU cytometry assay 分析 PCV2 特異性細胞增殖反應。以 ELISA kit 分析培養液中細胞激素 IFN- γ 及 IL-10 的含量。以 real time-PCR 定量分析血清及細胞內 PCV2 核酸量，使用 SAS 軟體進行統計分析。

實驗的第二部分分析 PCV2 攻毒豬隻，細胞免疫是否影響細胞內 PCV2 的含量。實驗使用 6 頭 SPF 豬，3 頭為對照組；3 頭於 9 週齡經由點鼻給予 106 TCID₅₀ PCV2 病毒液，於 12 週齡犧牲，採取 PBMC 及脾臟細胞，比較 PCV2-treated 與/或 Con A-treated 血中及脾臟單核細胞之增殖反應，細胞素濃度，並測定脾臟單核細胞及 PBMC 細胞內病毒量。

實驗設計流程圖

Experimental design I



第二節 實驗材料

2-1 實驗動物

實驗使用桃園縣某一貫場養殖的三品種豬，實驗進行前經 RT-PCR 檢測為 PRRSV(-)，以 multiplex-PCR 檢測確定豬隻不帶有 PCV1 但為 PCV2 帶原共 5 頭。SPF 豬飼養於屏東科技大學實驗動物房，3 頭於 9 週齡攻毒，3 頭作控制組，6 頭豬均於 12 週齡犧牲，以 Real-time PCR 檢測發現控制組三頭豬血清中不含病毒核酸，但於 PBMC 檢測到低量病毒核酸。第一部分實驗之自然感染豬使用 3 頭未攻毒 SPF 豬及來自一貫場豬 5 頭，共 8 頭。第二部分實驗使用 SPF 豬 3 頭有攻毒，3 頭未攻毒作控制組。

2-2 製備豬第二型環狀病毒

本實驗所使用的 PCV2 病毒株由本實驗室陳菀蓉學姊所分離。樣本來自屏東某豬場 PMWS 發病豬的脾臟及淋巴結，樣本製成乳劑後，使用 PK-15 細胞進行病毒純化、分離，並且以 glucosamine 處理增殖分離所得的 PCV2，確認病毒感染的方法為免疫螢光染色法 (immunofluorescent assay; IFA)。病毒力價測定是使用 50% 組織培養感染劑量 (50% tissue culture infection dose; TCID₅₀) 計算。首先將 PK-15 cell line 培養於 96 孔培養盤，隔夜培養後，觀察細胞長至八分滿，去除培養液。將待測的病毒液以細胞培養液作 10 倍連續稀釋，接種於 96 孔培養盤，每個稀釋倍數接種 8 孔，每孔 100 ul，最後一排作對照組。感作 4 小時後倒去病毒液，給予 glucosamine 刺激 20 分鐘，HBSS 洗去 glucosamine，將 96 孔培養盤培養於 37°C、5% CO₂ 生長箱培養一天，以 IFA 觀察細胞感染情形，力價計算公式為：

病毒稀釋倍率高於 50% 感染率 - 50%

TCID₅₀ = _____

病毒稀釋倍率高於 50% 感染率 - 病毒稀釋倍率低於 50% 感染率

所得 PCV2 力價為 10 4.6 TCID₅₀。

2-3 細胞培養液

2-3.1 周邊血液單核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) 清洗液 (RPMI wash buffer)

溶液的配方為含有 2 μM L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 及 0.25 μg/mL amphotericin B (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) 的 RPMI-1640 細胞清洗液 (Gibco)。

2-3.2 0.02% EDTA-PBMCs 細胞清洗液 (0.02% EDTA-RPMI wash buffer)

溶液的配方為含有 0.02% EDTA (Merck, Darmstadt, USA)、2 μM L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 及 0.25 μg/mL amphotericin B (Gibco) 的 RPMI-1640 細胞清洗液 (Gibco)。

2-3.3 0.2% EDTA-PBMCs 細胞清洗液 (0.2% EDTA-RPMI wash buffer)

溶液的配方為含有 0.2% EDTA (Merck)、2 μM L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 及 0.25 μg/mL amphotericin B (Gibco) 的 RPMI-1640 細胞沖脫液 (Gibco)。

2-3.4 PBMCs 細胞培養液 (RPMI culture buffer)

溶液的配方為含有 10% 胎牛血清 (Gibco)、2 μM L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin 及 0.25 μg/mL amphotericin B (Gibco) 的 RPMI-1640 細胞培養液 (Gibco)。

2-3.5 Ficoll-paque TM (Pharmacia, Piscataway, NJ)

本溶液密度為 1.007 g/mL，利用密度原理，藉由離心的方式將血液內不同密度的細胞加以梯次分層。

2-3.6 Ammonium chloride potassium chloride (ACK) lysing buffer

溶液的配方為 155 mM NH₄Cl、1mM KHCO₃ 以及 0.5 Mm EDTA，PH7.2，用於溶解夾雜在白血球層內的紅血球。

2-3.7 Dulbecco's Modified Eagle Medium-cultured (DMEM-C)

溶液的配方為含有 10% 胎牛血清 (Gibco)、4 μ M L-glutamine、100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin 及 0.25 μ g/mL amphotericin B (Gibco) 的 DMEM 的細胞培養液 (Gibco)，用於培養 PK-15 細胞。

2-3.8 Hank's balanced salt solution (HBSS)

HBSS 含有 phenol red 並且可以作為緩衝溶液，因此用以清洗測定力價過程中使用的 glucosamine。Glucosamine 的強酸性會傷害 PK-15 細胞，可藉由 HBSS 顏色由黃轉紅得知已將 glucosamine 清洗乾淨。

第三節 實驗方法

3-1 豬隻血液單核細胞之分離純化與培養

準備濃度為 1% EDTA (Merck) 的抗凝針筒，採取頸靜脈竇的血液，血液於 4°C、300 xg 離心 30 分鐘，收集血液的白血球 (buffy coats)。再將白血球以 1:1 比例的 0.02% EDTA-RPMI wash buffer 混合稀釋後，緩慢輕置於等量的 Ficoll-paque TM 上方，於 20°C、250 xg 離心 30 分鐘。離心後因白血球密度不同分為三層，中間白色細胞層即為周邊血液單核細胞層 (PBMCs)。將收集的 PBMCs 洗清三次，首先以 0.02% EDTA-RPMI wash buffer 稀釋至 14 c.c，於 4°C、120 xg 離心 10 分鐘，去除上清液。將離心後的細胞再加入 7 c.c ACK lysing buffer 混合均勻溶解殘餘的紅血球，作用 3 分鐘後與 0.02% EDTA-RPMI wash buffer 混合均勻，於 4°C、100 xg 離心 10 分鐘，去除上清液。最後一次使用不含 0.02% EDTA 的 RPMI wash buffer 於 4°C、80xg 離心 10 分鐘。去除上清液，收集洗清的 PBMCs，計算細胞數，放入 12 孔盤，每孔一律置入 1 mL 以 RPMI culture buffer 稀釋為 1×10^6 cells/mL 之細胞液。為檢測病毒特異性的增殖反應，實驗設計分為對照組及實驗組，共四組，包括對照組：(1) 為 non-treated 的 mock 組，實驗組：(2) PCV2-treated 組，給予 PCV2 病毒液 (m.o.i=0.1)。(3) Con A 組，給予 5 μ g/mL 的 Con A-treated。(4) ConAPCV2 組，同時給予 Con A-treated 和 PCV2-treated。實驗的流程為完成 PBMCs 分離，同時進行給予偵測增殖反應的標定物質，以及 PCV2 攻毒、致裂原刺激的步驟後，將細胞培養於 37°C、5% CO₂ 生長箱培養三天。

3-2 及時定量聚合鏈鎖反應 (Quantitative real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)

收集第 0 天以及培養後第 3 天之 PBMCs 及脾臟中的單核細胞，將細胞數調整為為 1×10^6 cells/ mL，以 DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 萃取 DNA。Real-time PCR 反應試劑包括 $5 \mu\text{M}$ TagMan probe (5'-6FAM-TGCTAATTTTGCAGACCCGGAAACCAC-BHQ 1)、 $4 \mu\text{l}$ 5 倍稀釋的 Light cycler faststart DNA master 雜合套組 (Roche diagnostics, Manneim, Germany)、 $1 \mu\text{l}$ $10 \mu\text{M}$ 的引子 (sense: 5'-TCCGCGGGCTGGCTGGGCTGAACT-3' ; antisense: 5'-AACGGGGTCTGATTGCTGGTAATC) 及 $9.4 \mu\text{l}$ DDW，反應試劑共 $20 \mu\text{l}$ ，以 LightCycler 進行反應。反應設定為：第一階段是 94°C 作用 10 分鐘，第二階段為 94°C 作用 10 秒使雙股 DNA 打開形成模板， 60°C 作用 20 秒及 70°C 作用 1 秒使引子黏合和製作延展，第二階段共 45 循環。第三階段冷卻至 40°C 作用 30 秒。(LightCycler operators manual, version 3.0, Roche)。陽性控制組為 101 copies/ μl plasmid DNA，陰性控制組為 DDW。

3-3 檢測病毒特異性的增殖反應

3-3.1 細胞膜螢光染色 PKH2 green fluorescent cell linker kit

PKH2 為螢光物質，利用其尾端之長鏈脂肪基 (long aliphatic tails) 與細胞膜的磷脂鍵結來標定細胞，其 Excitation wavelength 為 490 nm ，Emission wavelength 為 504 nm 。染色過程添加緩衝液 diluent A，包含等張不含鹽有機物，可在染色過程中維持細胞生存，其好處為不破壞細胞且操作較簡易。

本試劑利用螢光物質 PKH2 平均分佈在細胞膜上的特性，當細胞增殖一分為二後，PKH2 也隨之分散在增殖的子代細胞的細胞膜上，PBMC 進行染色步驟如下：首先將 PBMCs 以不含 0.02% EDTA 的 RPMI wash buffer 稀釋細胞為 2×10^7 cells/ml，於 4°C 、 400 xg 離心 5 分鐘，去除上清液，殘留上清液需少於 $25 \mu\text{L}$ M，加入 1 ml diluent A 混合均勻。準備 $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ PKH2 1 ml ，之後將細胞液迅速加入 PKH2 溶液中，於 25°C 感作 2-5 分鐘後，加入 2 ml 1% BSE 感作 1 分，

停止反應。加入 4 ml 不含 0.02% EDTA 的 RPMI wash buffer，於 4°C、400 xg 離心 10 分鐘，丟棄上清液。將細胞換到微量離心管於 4°C、100 xg 離心 10 分鐘，丟棄上清液，重複此步驟清洗三次後，調整至最終濃度。進行鋪盤，給予處理，培養 3 天後（此部分同 3-1 步驟），以 Flow cytometry 分析。計算 Proliferation index 公式：

$(\% \text{ Proliferation to treatments} \times \text{cell numbers in the gate}) \div (\% \text{ Proliferation to mock} \times \text{cell numbers in the gate})$ ，所有組別均先經由 Propidium iodide 染色排除死亡細胞。

3-3.2 染色體螢光染料套組 Click-iT™ EDU cytometry assay kits

細胞複製時加入 pyrimidine deoxynucleosides 與核酸結合，藉由螢光或放射性標記 pyrimidine deoxynucleosides，可定量增殖細胞中 DNA 合成。以同位素 [H3] Thymidine 為過去最常使用標記物質，然其具有放射性，使用自動放射線照相 (autoradiography) 測定緩慢，使用顯微照相測定遇到低解析度或訊號微弱的問題。EDU cytometry assay 為最近發展快速標記 DNA 合成之新方法，於離體實驗檢測過程中有固定細胞之步驟，固定好之細胞保存較久，且所偵測之增殖反應不受細胞凋亡影響，目前已應用於活體小鼠腦細胞增殖之標定 (Salic and Mitchison, 2008)。EDU 為 5-ethynyl-2-deoxyuridine，可將同位素 thymidine 化學結構的 ethynyl 取代 methyl。其末端炔基 (alkyne group) 可與 DNA 雙股間的有機胺 (organic azides) 鍵結，原理在 DNA 複製時標記增加合成的 DNA，配合螢光物質標定來偵測細胞增殖。實驗使用之螢光物質為 (Alexa fluor® 488 azide, invitrogen)，其 Excitation wavelength 為 488 nm，Emission wavelength 為 530 nm。

EDU (Click-iT™, invitrogen) 分子結構上的炔基易與核酸序列之聚胺結合，故細胞進行有絲分裂時，EDU 極易與打開之雙股 DNA 中之核酸鍵結，各組均於培養第二天同時給予 EDU 10 μM 作用 24 小時後，收集細胞，加入 100 μL saponin 將細胞膜打洞，加入 EDU 反應液，每份反應液可與 106 個細胞作用，包含 438 μL Click-iT™ 反應液，10 μL 硫酸銅溶液，2.5 μL fluorescent dye azide (Alexa fluor® 488 azide, invitrogen)，50 μL reaction buffer additive，共 500

μL。EDU 反應液與細胞室溫避光反應 30 分鐘進行呈色，使用 3 mL saponin 清洗一次後，使用流式細胞儀分析，於 Histogram 圖中，選用對數放大 FL-1，可見依散射光強度不同出現兩個尖峰，分別為未增殖 (M1) 及增殖 (M2) 的兩個細胞群，依據 M2 與 M1 的比值，計算增殖指數 (proliferation index; PI) 作為增殖反應強弱的指標。計算 PI 公式：

$(\% \text{ cell numbers by treatments in M2} \times \text{median value in M2}) \div (\% \text{ cell numbers by treatments in M1} \times \text{median value in M1})$ 。

3-4 細胞存活率檢測 Annexin V/ Propidium iodide Apoptotic kit

將 1×10^6 個周邊血液單核球培養在 12 孔盤中，每孔給予 2 c.c 培養液，再給予 Con A 5 μg/ml 或 PCV2 m.o.i 0.1 處理。於第 3 天收取細胞。細胞存活率及凋亡率的檢測為以 AV 及 PI 凋亡檢測套組染色後，再使用流式細胞儀分析之。步驟為細胞離心後，倒去上清液，使用 2μl AV 及 2μl PI 加入 100μl 緩衝液與細胞在室溫下反應 1 分鐘。加入 1 c.c 流氏液後，AN 散射光波長為 450-490 nm，以 FL-1 分析，而 PI 散射光波長為 610 nm，以 FL-3 分析之。使用 FACSCalibur (BD biosciences, USA) 及 CellQuest 軟體分析 10,000 細胞中，存活及凋亡細胞所佔的百分比。AV-/PI- 代表存活的細胞，AV+/PI- 代表凋亡的細胞，AV-/PI+ 及 AV+/PI+ 代表死亡細胞所佔的比率。

3-5 細胞素的檢測

上清液中 IL-10 以及 IFN-γ 濃度以 ELISA kit (Invitrogen biosciences) 檢測。首先以套組之豬重組細胞激素製備最高濃度 500 pg/mL，連續兩倍稀釋得到 7.8-500 pg/mL，共 7 管不同濃度之陽性對照。取出套組中底部覆蓋細胞激素抗體之 96 孔盤，將標準稀釋液加入 96 孔盤 100μL/ 孔後，7 管陽性對照每孔加入 100μL，待測樣本每孔加入 50μL 上清液樣本以及 50μL 標準稀釋液。使用分注器將 Biotin 連接之二抗每孔加入 50μL 作用 2 小時。每孔清洗 4 次，加入 100μL streptavidin-HRP 與二抗結合 (conjugation) 作用 30 分鐘。每孔清洗 4 次，避光環境下每孔加入 100μL stabilized chromogen，內含四甲基聯苯胺

(teteramethylbenzidine, TMB) 受質，作用不超過 30 分鐘，加入 100 μ L 終止液。

3-6 統計分析

病毒特异性增殖反應及細胞激素與病毒量之相關性，以及攻毒豬隻細胞免疫反應等數據，以變異係數分析之 GLM 模式 (Analysis of Variance, ANOVA, Statistical analysis system, SASR software for windows 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 進行分析，當 P 值 < 0.1 時，表示有趨勢; 當 P 值 < 0.05 時，表示有顯著差異; 當 P 值 < 0.001 時，表示有極顯著差異。



第四章 結果

第一節 自然感染帶原 PCV2 豬之細胞免疫反應與病毒量的相關性

4-1.1 PBMC 增殖反應與血液中病毒量的相關性：

4-1.1.1 標定細胞膜之細胞增殖反應 (PKH2 cytometry assay)

血液樣本來自 4 頭 PCV2 帶原臨床健康豬，標定細胞膜檢測增殖反應是否影響血清中 PCV2 病毒量，PBMC 分為 PCV2、Con A、Con A/PCV2 及不處理 (mock) 組，以 PKH2 標定細胞膜，利用 PKH2 其分子結構中脂肪族和細胞膜磷脂層結合的特性，使用流式細胞儀偵測每一個細胞散射光強度，得到增殖的細胞群並計算出增殖指數 (proliferation index ; PI)。實驗結果顯示 Con A/PCV2 組增殖指數與血清中病毒量呈現負趨勢 ($P < 0.1$, $P = 0.0814$)，其他組增殖指數與血清中病毒量無相關性 (Fig.1)，顯示 Con A 刺激 PCV2 superinfection 引起之增殖反應，有隨血清病毒量增加而受抑制的趨勢，當增殖反應良好時，血清中病毒量偏低。

4-1.1.2 標定細胞增加合成的核酸之增殖反應 (EDU cytometry assay)

標定細胞增加合成核酸增殖反應是否影響血清中 PCV2 病毒量，8 頭 10~12 週齡之臨床健康帶原 PCV2 豬，5 頭豬來自一貫場，3 頭豬來自 SPF 豬場，採取 PBMC，以 Con A/PCV2 處理，PBMC 增殖反應與血清中病毒量呈顯著負相關 ($P < .05$, $y = -253.95x + 1424.39$, $P = 0.0007$, $R = 0.87$) (Fig.2)，其他組增殖指數與血清中病毒量無相關性，且線性關係之斜率數值低，顯示 Con A 刺激 PCV2 superinfection 才能引起之增殖反應，有隨血清病毒量增加而受抑制，顯示增殖反應良好時，血清中病毒量較低，此結果與 4-1.1.1 一致。

4-1.2 IL-10 濃度與病毒量及增殖反應的相關性

某些胞內寄生菌及病毒有藉由促進分泌 IL-10 造成細胞免疫抑制的報告，據此本實驗以 IL-10 濃度，作為偵測病毒抑制細胞反應之依據，結果血清中 IL-10

濃度，與血清中病毒量呈正向趨勢 ($P < 0.1$, $P = 0.051$, $y = 1.14x + 0.4$) (Fig.4)。檢測 PBMC 培養上清液，Con A/PCV2 組 IL-10 濃度與細胞內病毒量呈顯著正相關 ($P < .05$, $P = 0.0097$, $y = 193.8x - 682.59$, $R = 0.69$) (Fig.4)。統計分析 IL-10 濃度與 PBMC 增殖反應的結果，於 Con A/PCV2 組，不論血清或培養上清液，IL-10 濃度與 PBMC 增殖反應，均未達統計上的意義 (Fig.5)。而 IL-10 濃度與 IFN- γ 濃度不具有統計學上顯著相關性。顯示本實驗之帶原 PCV2 低量，臨床健康豬體內 IL-10 濃度有隨血清病毒量增加的趨勢。In vitro Con A 刺激 PBMC 模式中，Con A/PCV2 組 IL-10 濃度有隨細胞內病毒量上升而顯著增加分泌。然 IL-10 抑制細胞增殖作用統計分析相關性不顯著。

4-1.3 PBMC 上清液 IFN- γ 濃度與血液中病毒量的相關性

使用 IFN- γ ELISA kit 分析上清液 IFN- γ 濃度，IFN- γ 能抑制病毒複製，故作為 PBMC 細胞抗病毒的功能的表徵，所得結果各處理組與血清中病毒量，未達到統計上的顯著相關，且線性關係之斜率偏低 (Fig.6)，顯示本實驗條件下，IFN- γ 與血清病毒量無統計學上之意義。

第二節 攻毒 SPF 豬 PBMC 免疫反應與細胞內 PCV2 病毒量之關連

4-2.1 攻毒豬隻血液病毒量及 IL-10 表現

根據第一節所述，自然感染帶原 PCV2 豬 PBMC，Con A/PCV2 組增殖反應，隨血清中病毒量增加而受抑制，且隨著血清病毒含量增加，血清中 IL-10 濃度有增高的趨勢，但抑制增殖反應不顯著。因此實驗第二部分以攻毒豬，進行相同實驗，檢測病毒複製能否影響 PBMC 增殖。實驗豬共 6 頭來自 SPF 豬場，3 頭攻毒，3 頭未攻毒為控制組。檢測血清病毒量，3 頭未攻毒 SPF 豬隻，血清中病毒量低於 Real-time PCR 的最低限度，而 3 頭攻毒後第 21 天的 SPF 豬，血清中可檢測到高量的 PCV2，平均值為 $10^{5.18 \pm 0.34}$ copies/ml。檢測細胞內病毒量，發現未攻毒 SPF 豬隻含有低量病毒為 $10^{4.54 \pm 0.23}$ copies/ 10^6 cells，攻毒豬隻則含有 $10^{7.07 \pm 0.23}$ copies/ 10^6 cells。

0.17 copies/ 10^6 cells。以 ELISA 套組檢測血清 IL-10 表現，僅於攻毒豬隻有低量 IL-10 (Table 1)。

Table 1 Quantification of PCV2 genomes and IL-10 level in serum evaluated in PCV2 experimental infected pigs and control pigs at 21 DPI.

Serum estimation	SPF pigs (n=3) (control)	21 DPI, SPF pigs (n=3) (PCV2 challenge)
PCV2 load	0	5.18 ± 0.34
IL-10	0	12.48 ± 8.5

PCV2 load: the mean of PCV2 genomes in serum. Values are presented as the mean of \log_{10} DNA copy number \pm standard deviation (S.D.) per ml serum. IL-10: the mean of IL-10 concentration in serum. Values are presented as the mean of microgram (pg) \pm standard deviation (S.D.) per ml supernatant.

4-2.2 PBMC 之增殖反應

採血分離 PBMC 經 Con A 與/或 PCV2 處理培養三天後，使用 EDU cytometry assay 計算出增殖指數 (proliferation index; PI)。實驗結果顯示於控制組，PCV2 組與 mock 組之 PI value 無顯著差異，而 Con A/PCV2 組之 PI value 極顯著大於 Con A 組 ($P < .0001$)；於攻毒組中，PCV2 組與 mock 組之 PI value 無顯著差異。比較攻毒組與控制組之 PI value，攻毒組之 ConA/PCV2 組極顯著小於控制組之 ConA/PCV2 組 ($P < .0001$) (Table 2) (Fig.7)。實驗結果顯示，PCV2 superinfection 對周邊血液單核細胞之 PI value 無顯著影響，但 PCV2 superinfection 會促進 Con A 刺激細胞增殖反應，然於本實驗攻毒組反而有抑制細胞增殖反應現象。顯示低病毒時，PCV2 superinfection 促進 Con A 刺激細胞增殖，然而當豬體內含高病毒量時，PCV2 superinfection 反而抑制 Con A 刺激細胞增殖反應。

4-2.3 PBMC 細胞內病毒量

PBMC 培養第 3 天細胞內病毒核酸含量，在控制組中，ConA/PCV2 組細胞內 PCV2 核酸量顯著顯著大於 Con A 組 ($P < .05$, $P = 0.0007$) mock 及培養前細胞內病毒量 ($P < .05$)。於攻毒組，PCV2 組顯著大於 mock 組及培養前細胞內病毒量 ($P < .05$)，ConA/PCV2 組與 Con A 組均極顯著高於 PCV2 組 ($P < .0001$)，但兩者間無顯著差異。比較攻毒組與控制組之病毒量，攻毒組 PCV2 組、Con A 組與 ConA/PCV2 組均極顯著大於控制組之各組 ($P < .0001$) (Table 2) (Fig.8)。

總結上述 4-2.1、4-2.2 實驗結果，PCV2 superinfection 對周邊血液單核細胞之 PI value 無顯著影響。而於未攻毒控制組，經 Con A 刺激下，PCV2 superinfection 促進 PBMC 增殖以及細胞內病毒量增加，顯示 Con A 可雙向活化細胞增殖及病毒複製。於攻毒組，Con A 刺激下 PBMC 之增殖反應顯著低於控制組，此可能與細胞內病毒顯著增加有關；病毒核酸量高達 10^8 copies/ 10^6 PBMC，顯示細胞內過多病毒顆粒可能干擾細胞生理功能。此外，於未攻毒豬隻身上血清中未偵測到 PCV2，然細胞內帶有低量病毒，顯示細胞內 PCV2 可能在此時並未進行複製，或未釋放至細胞外。

Table 2 The mean of proliferation index at the 3rd day and PCV2 loading in PBMC.

Treatments	Proliferation index, mean \pm S.D.		PCV2 DNA copy number, mean \pm S.D.	
	SPF pigs (control)	21 DPI, SPF pigs (PCV2 challenge)	SPF pigs (control)	21 DPI, SPF pigs (PCV2 challenge)
Mock	0.85 \pm 0.43 ^a	1.02 \pm 0.65 ^a	3.85 \pm 0.23 ^a	6.23 \pm 0.66 ^b
PCV2	0.17 \pm 0.16 ^a	0.14 \pm 0.05 ^a	4.70 \pm 0.17 ^{ab}	7.52 \pm 0.49 ^c
Con A	614.11 \pm 255.1 ^b	481.70 \pm 85.97 ^b	3.79 \pm 0.2 ^a	10.53 \pm 0.5 ^d
ConA/PCV2	1429.12 \pm 117.48 ^c	607.86 \pm 390.8 ^b	5.52 \pm 0.48 ^b	10.68 \pm 0.52 ^d

Viral replication was evaluated by measuring the level of PCV2 DNA using real-time PCR assay. Copy number reported as the log₁₀ copies/10⁶ PBMCs at each treatment. Values of proliferation index are presented as the mean of percentages of live cells and the mean \pm standard deviation. Mock: PBMCs cultures were mock-infected cells. PCV2: PBMCs cultures were PCV2-infected cells. Con A: PBMCs cultures were stimulated with 5 mg/ml of ConA. ConA/PCV2: PBMCs cultures were stimulated with 5 mg/ml of ConA at the same time when PCV2 was added to the cells. Different superscripts (a, b, c, d) within each column indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

4-2.4 PBMC 細胞存活率與凋亡率

為釐清 4-2.1 相對於控制組 Con A/PCV2 組的促進細胞增殖反應，攻毒組 PBMC 增殖反應不顯著的現象，是否由於此處理造成細胞死亡，故使用 annexin V/ propidium iodide Apoptotic kit 進行細胞壞死凋亡率檢測，於 FSC/SSC dot plot 圖中圈選 PBMC 細胞群設定為 R1 gate，使用 FL-1/ FL-3 dot plot 圖設定十字象限範圍。流氏細胞儀分析 10,000 個細胞中，PBMC 細胞群平均佔 31%。雙染 AN 及 PI 結果顯示 AN⁻/PI⁻ 代表之活細胞族群佔約 80%。Con A 刺激與/或 PCV2 superinfection 與 mock 組之存活率無明顯差異。AN⁺/PI⁺、AN⁻/PI⁺ 代表晚期凋亡或壞死細胞，佔約 16.5%，AN⁺/PI⁻ 代表早期凋亡的細胞佔約 2.5%。各組中細胞凋亡比率無顯著差異，代表不同處理對細胞壞死凋亡比率無影響 (fig. 9)。

4-2.5 PBMC 之細胞激素分泌

細胞激素分泌可代表細胞功能的表現，而 IFN- γ 可能抑制病毒複製，因此本實驗嘗試分析 PBMC 病毒含量是否影響細胞分泌 IFN- γ 之功能。PBMC 經 Con A 刺激與/或 PCV2 superinfection 培養三天，收集上清液分析其含有 IFN- γ 濃度，不論在控制組還是攻毒組中，ConA/PCV2 組 IFN- γ 含量均稍微高於 Con A 組，但兩者間無顯著 (Table 3)，顯示細胞分泌 IFN- γ 功能不受病毒含量影響。

IL-10 可抑制細胞性免疫功能，分析 PBMC 內之病毒含量是否影響細胞分泌 IL-10 功能。於控制組中，ConA/PCV2 組 IL-10 分泌濃度顯著高於 PCV2 組 ($P < .05$, $P = 0.0493$)，其他處理組間則無顯著差異。於攻毒組中，PCV2 組與 mock 組之 IL-10 濃度無顯著差異，然而 ConA/PCV2 組 IL-10 分泌濃度顯著高於 Con A 組 ($P < .05$, $P = 0.0031$)，代表攻毒組 Con A 刺激下 PCV2 superinfection 可能促進 IL-10 分泌。比較攻毒組與控制組 IL-10 濃度，攻毒組之 ConA/PCV2 組 IL-10 濃度顯著高於控制組 ConA/PCV2 組 ($P < .05$, $P = 0.0045$) (Table 3) (Fig.10)，顯示細胞內含有較高病毒量可能與 IL-10 分泌的促進有相關。

Table 3 The mean concentration of IFN- γ and IL-10 supernatant of PBMC from PCV2 experimental infected pigs.

Treatments	IFN- γ mean \pm S.D.		IL-10 mean \pm S.D.	
	SPF pigs (control)	21 DPI, SPF pigs (PCV2 challenge)	SPF pigs (control)	21 DPI, SPF pigs (PCV2 challenge)
Mock	4.93 \pm 0.31 ^a	5.85 \pm 1.57 ^a	0 ^a	9.41 \pm 7.08 ^a
PCV2	5.84 \pm 0.39 ^a	6.21 \pm 1.2 ^a	32.78 \pm 10.41 ^a	92.33 \pm 43.86 ^{ab}
Con A	348.96 \pm 171.9 ^b	324.09 \pm 295.7 ^b	100.29 \pm 44 ^{ab}	197.81 \pm 136.4 ^b
ConA/PCV2	460.36 \pm 214.6 ^b	569.33 \pm 258.1 ^b	210.23 \pm 105.2 ^b	475.29 \pm 360.3 ^c

Different superscripts (a, b, c, d) within each column indicate significant difference of the mean. Values are presented as the mean of concentration and the mean of pg \pm standard deviation.

4-2.6 細胞病毒量及 IL-10 與 Con A/PCV2 組之增殖反應之關聯

綜合前述，相較於未攻毒豬（控制組），攻毒豬 Con A/PCV2 組增殖反應低弱，而血清與細胞內 PCV2 以及 IL-10 含量均較高。統計分析 Con A/PCV2 組之增殖反應與血清病毒量，有顯著負相關 ($P < .05$, $P=0.014$, $y = -164.23x + 1444.13$, $R=0.81$)，與細胞內病毒量有顯著負相關 ($P < .05$, $P=0.016$, $y = -330.95x + 2939.81$, $R=0.79$)。增殖反應與血清 IL-10 濃度與未達統計意義 ($P=0.35$, $y = -27.82x + 1192.17$, $R=0.21$)，與上清液 IL-10 濃度負相關性未達統計意義 ($P=0.8$, $y = -0.23x + 1099.56$, $R=0.01$)

顯示抑制 Con A/PCV2 組增殖反應與血清及細胞內含高病毒量有關，血清 IL-10 分泌與抑制 Con A/PCV2 組增殖反應無統計上相關意義，in vitro 實驗條件，上清液 IL-10 不干擾 Con A/PCV2 組增殖反應，因此干擾攻毒組 Con A/PCV2 組增殖反應，血清及細胞內高病毒量為重要因素，而在攻毒 SPF 豬活體內血清 IL-10，以及離體細胞培養上清液 IL-10 濃度，與抑制增殖反應在未達統計學有意義之相關性。然在 3 頭未攻毒豬血清均未檢測到 IL-10，3 頭攻毒豬均有檢測到低量 IL-10，且以 T-test 比較攻毒組與控制組培養上清液 IL-10 濃度，攻毒組均顯著比控制組高 (Table 4)。在 Con A/PCV2 組攻毒組有顯著較高的 IL-10 及病毒量，且增殖指數顯著低弱 (Table 5)。因此 PCV2 可能藉由促進 IL-10 造成抑制細胞免疫的作用，有待進一步釐清。

Table 4 The mean of IL-10 level in cultural supernatant from PCV2 experimental infected pigs compared to control pigs by T-test.

Con A/PCV2-treated PBMC	SPF pigs (control)	21 DPI, SPF pigs (PCV2 challenge)	P value T-test
proliferation index mean±S.D.	1429.12 ± 117.48	607.8 ± 390.80	0.025
cellular PCV2 DNA copy number mean±S.D.	4.53 ± 0.22	7.07 ± 0.17	<0.0001
supernatant IL-10 (pg/ml) mean±S.D.	240.74 ± 72.92	532.22 ± 351.83	0.027

Viral inhibition was evaluated by measuring the level of IL-10 using ELISA assay. Pg/ml reported as the microgram per ml supernatant at each treatment. Values of IL-10 levels are presented as the mean of pg/ml and the mean ± standard deviation.

Table 5 The mean of proliferation index PCV2 load and IL-10 level in supernatant from PCV2 experimental infected pigs compared to control pigs by T-test in PCV2 superinfected Con A stimulation.

Treatments (pg/ml)	SPF pigs (control)	21 DPI, SPF pigs (PCV2 challenge)	P value T-test
Mock	0.34 ± 1.02	28.89 ± 43.3	0.065
PCV2-treated	22.67 ± 9.53	76.5 ± 30.85	0.000137
Con A-treated	102.08 ± 31.70	195.12 ± 102.87	0.019
Con A/PCV2-treated	240.74 ± 72.92	532.22 ± 351.83	0.027

Proliferation index is the mean of percentages of live cells and the mean ± standard deviation. Copy number is reported as the log₁₀ copies/10⁶ PBMCs at each treatment. presented as the copies and the mean ± standard deviation. Values of IL-10 levels are presented as the mean of pg/ml and the mean ± standard deviation.

第三節 攻毒 SPF 豬脾臟細胞免疫反應與細胞內 PCV2 病毒量之關連

4-3.1 脾臟細胞增殖反應

感染 PCV2 患豬在不同組織之病毒含量不同，本實驗欲了解 PCV2 的感染對組織造成影響是否不同。脾臟細胞內含有病毒時，是否影響脾臟單核細胞抗原特异性增殖反應 (clonal expansion)? 比較攻毒組與控制組之 PI value，攻毒組之 Con A 組顯著小於控制組之 Con A 組 ($P < .05$, $P = 0.0101$)。不論於攻毒組還是控制組，PCV2 組與 mock 組之 PI value 無顯著差異，比較 ConA/PCV2 組與 Con A 組，PI value 也無顯著差異 (Fig.11)。

4-3.2 脾臟細胞病毒量

分析細胞內病毒量，攻毒組各組脾臟細胞內病毒量均極顯著高於控制組 ($P < .0001$)，攻毒組中 Con A 組與 ConA/PCV2 組兩者間病毒量無顯著差異，但顯著大於 PCV2 組 ($P < .05$, $P = 0.0008$; $P < .05$, $P = 0.0334$)。控制組 ConA/PCV2 組與 Con A 組、PCV2 組無顯著差異，但顯著大於 mock 組 ($P < .05$, $P = 0.0319$)，PCV2 組與 mock 組之病毒量無顯著差異 (Fig.12)。

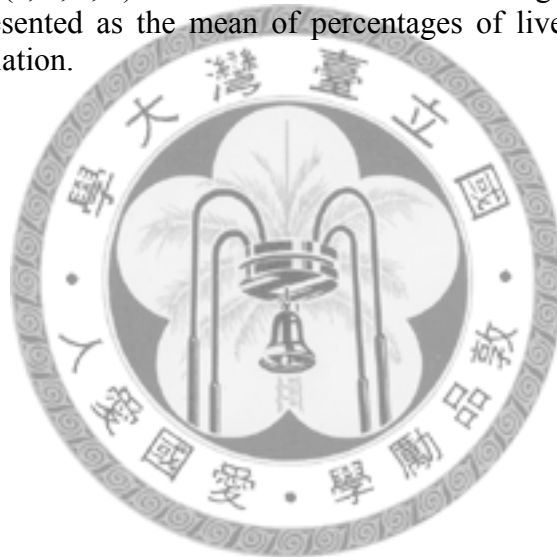
4-3.3 脾臟細胞之細胞激素分泌

於控制組中，ConA/PCV2 組之 IFN- γ 濃度顯著高於 Con A 組，PCV2 組及 mock 組 ($P < .05$, $P = 0.0103$; $P < .0001$; $P < .0001$)。攻毒組之 ConA/PCV2 組 IFN- γ 濃度顯著低於控制組之 ConA/PCV2 組 ($P < .05$, $P = 0.0019$)，但攻毒組之 ConA/PCV2 組與 Con A 組間無顯著差異 (Fig.13)。細胞激素 IL-10 不論於攻毒組還是控制組，IL-10 濃度於所有處理組間均無顯著差異 (Fig.14)。總結 4-3.1 及 4-3.2 實驗結果發現，於控制組之 ConA/PCV2 組之 IFN- γ 濃度顯著高於 Con A 組，但 PI value 及細胞內病毒量與 Con A 組無顯著差異。攻毒組與控制組比較，攻毒組之 ConA/PCV2 組 PI value 及 IFN- γ 濃度均顯著低於控制組 (Table 6)，但病毒量極顯著高於控制組。

Table 6. The mean of proliferation index and IFN- γ of spleen cells from PCV2 experimental infected pigs.

Treatments	Proliferation index mean \pm S.D.		IFN- γ mean \pm S.D.	
	SPF pigs (control)	SPF pigs (PCV2 infected) 21 DPI	SPF pigs (control)	SPF pigs (PCV2 infected) 21 DPI
Mock	4.48 \pm 2.89 ^a	4.49 \pm 1.04 ^a	7.8 \pm 3.78 ^a	15.94 \pm 6.26 ^a
PCV2	6.10 \pm 6.65 ^a	0.38 \pm 0.25 ^a	8.63 \pm 3.74 ^a	22.42 \pm 17.36 ^a
Con A	712.19 \pm 276.9 ^b	145.11 \pm 52.795 ^b	309.74 \pm 64.6 ^b	230.3 \pm 55.97 ^b
Con A/ PCV2	310.64 \pm 232.34 ^b	15.43 \pm 10.8 ^a	605.42 \pm 329.18 ^c	227.86 \pm 89.21 ^b

Different superscripts (a, b, c, d) within each column indicate significant difference of the mean. Values are presented as the mean of percentages of live cells and the mean of copies \pm standard deviation.



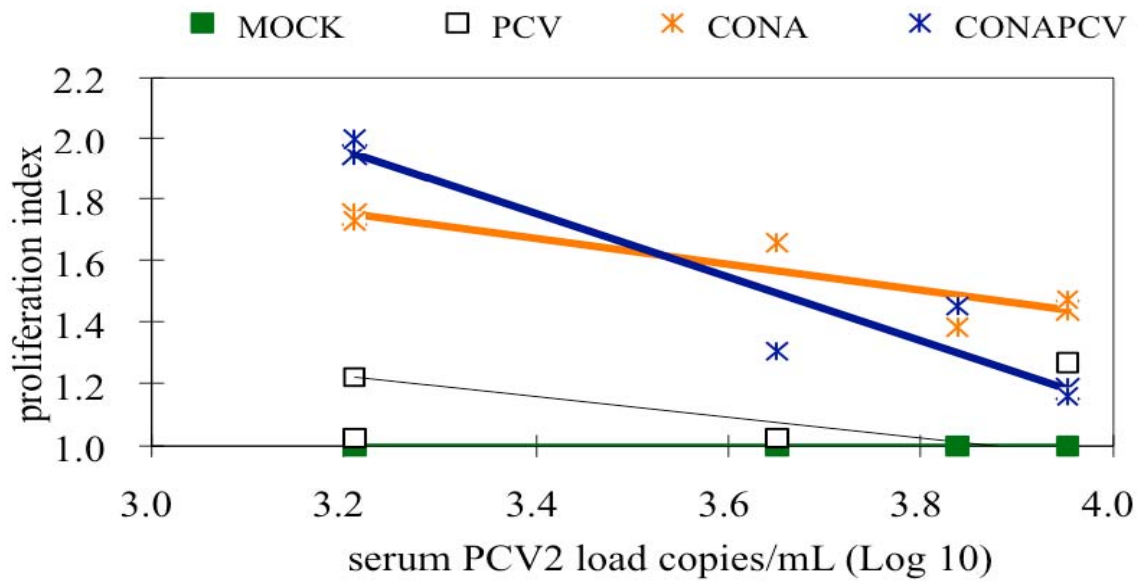


Fig 1. Correlation between the proliferation index (PI) of PBMC with the PCV2 viral load in serum from 4 healthy PCV2 carrier pigs. PI measured by PKH2 flow cytometry assay. The tendency of inverse correlation was noted between the PCV2 load in serum and the PI of PBMC in the Con A/PCV2-treated group ($P < 0.1$, $P = 0.0814$).

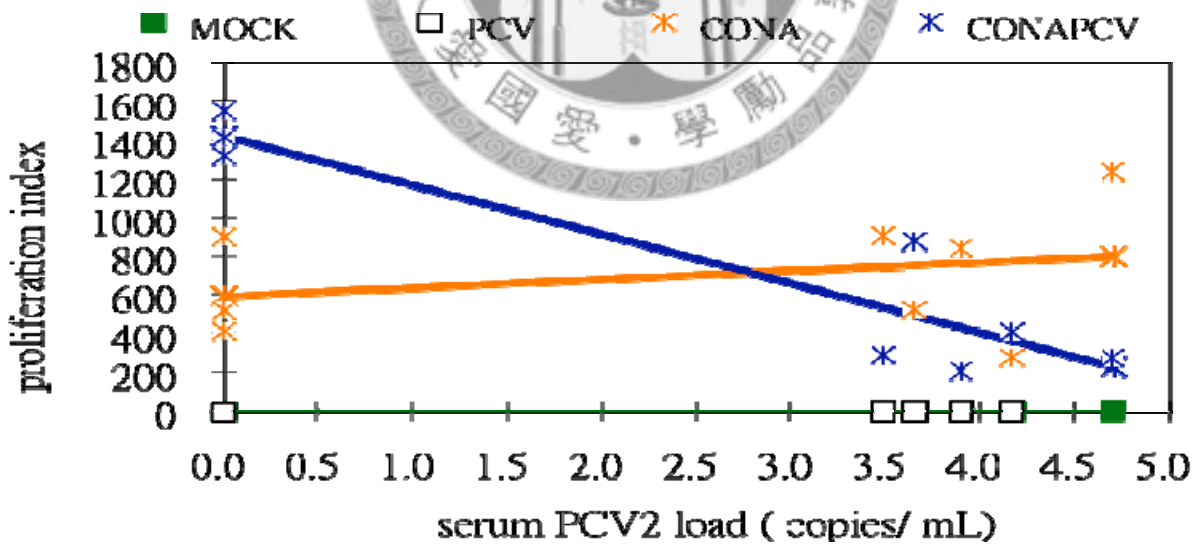


Fig 2. Correlation between the proliferation index (PI) of PBMC with the PCV2 viral load in serum from 3 SPF pigs and 5 conventional pigs of healthy PCV2 carrier pigs. PI measured by EDU flow cytometry assay. The tendency of inverse correlation was statistic significant between the PCV2 load and the PI of PBMC in the group of Con A/PCV2-treated ($P < .05$, $y = -253.95x + 1424.39$, $P = 0.0007$, $R = 0.87$).

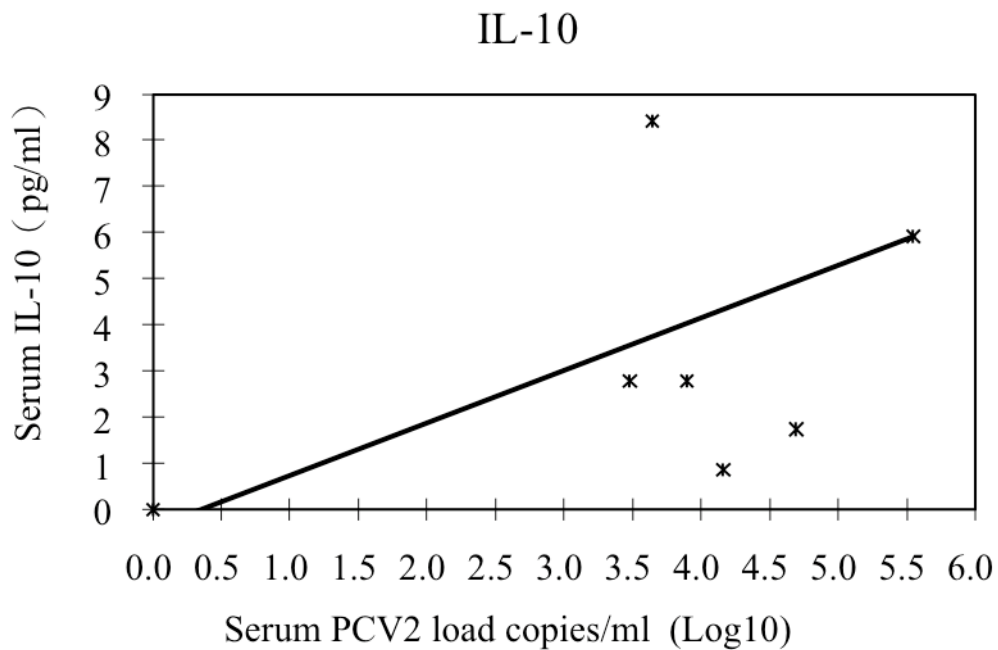


Fig 3. Correlation between serum IL-10 and PCV2 load in serum. There is no correlation between the PCV2 load and the IFN- γ level in the group of Con A/ PCV2-treated ($P < 0.1$, $P = 0.051$, $R = 0.44$, $y = 1.14x + 0.4$).

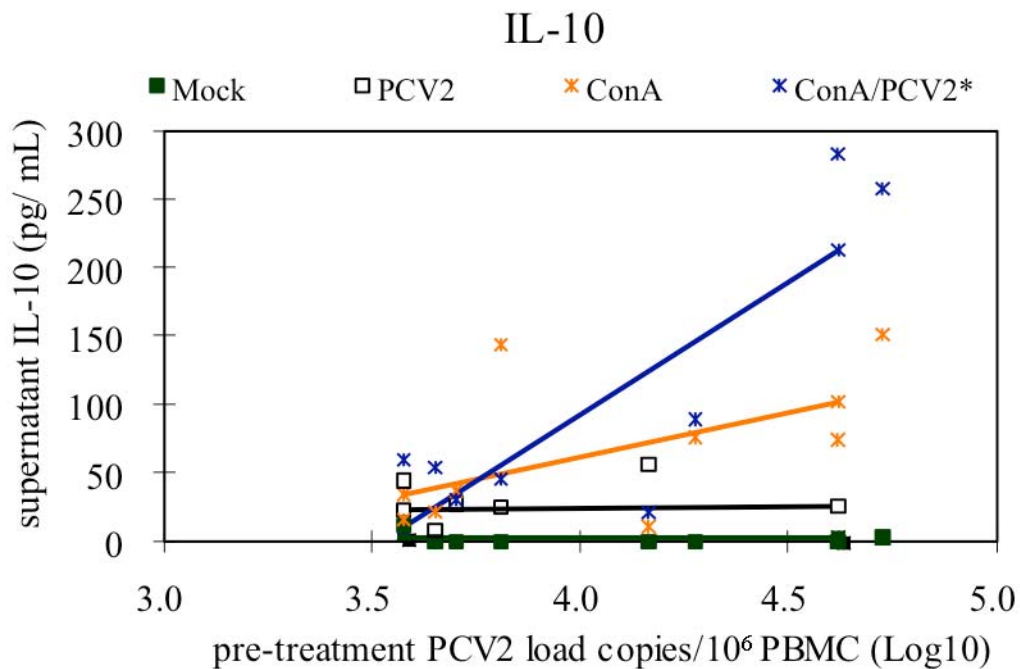


Fig 4. Correlation between the IL-10 concentration in supernatant and the PCV2 viral load in PBMC. Con A/PCV2 treated have significant positive correlation with viral load ($P < .05$). The following is equation of trendline of Con A/PCV2-treated: $P < .05$, $P = 0.0097$, $y = 193.8x - 682.59$, $R = 0.69$.

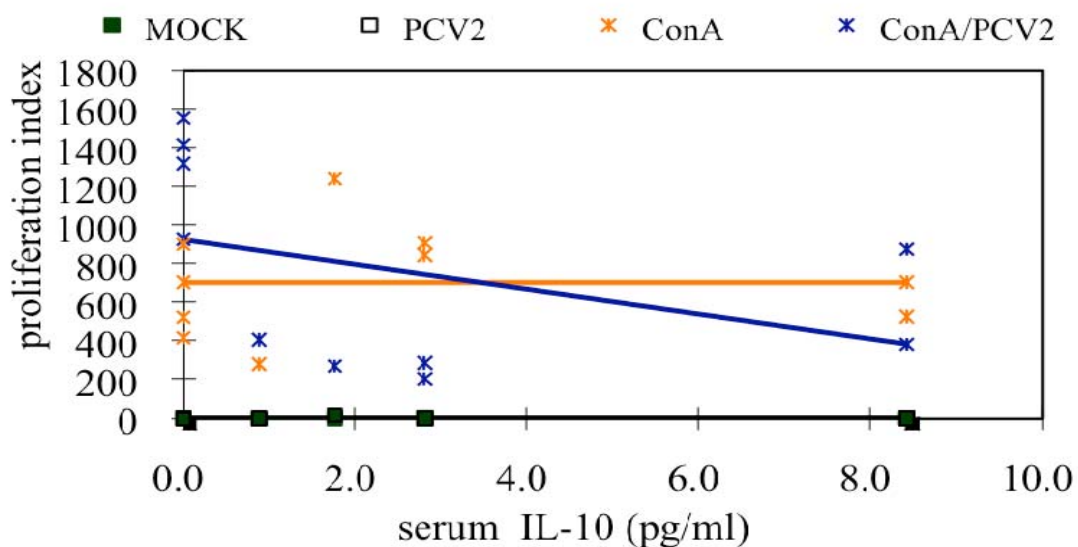


Fig 5. Correlation between the proliferation index (PI) with the IL-10 in serum. No significant correlation was noted between the IL-10 with the PI from PCV2, Con A, PCV2 and Con A-treated PBMC. The followings are equation of trendlines: PCV2-treated: $y = 0.04x + 3.32$; Con A-treated: $y = 0.3x + 704.4$; Con A/PCV2-treated: $y = -64.33x + 927.02$.

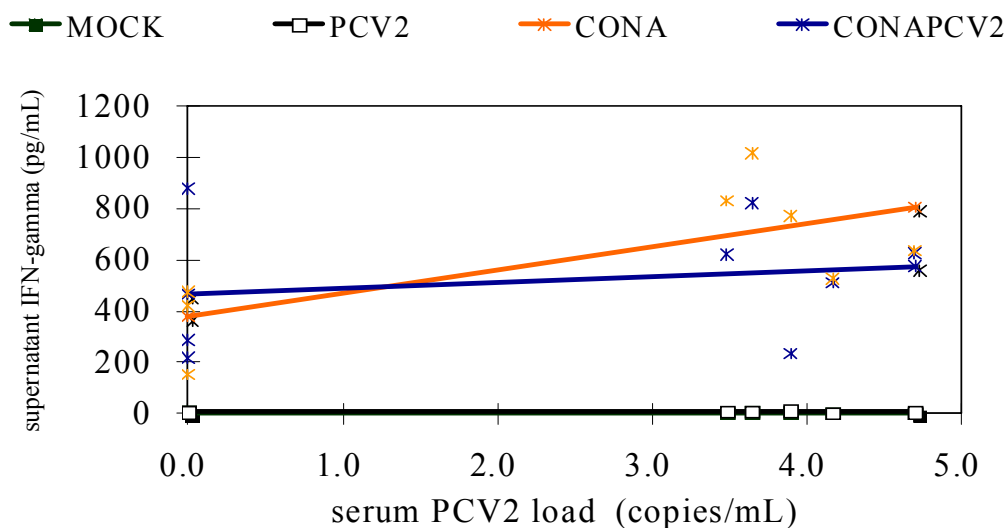


Fig 6. Correlation between the IFN- γ level with PCV2 viral load in serum. There is no correlation between the PCV2 load and the IFN- γ level in the group of Con A/ PCV2-treated.

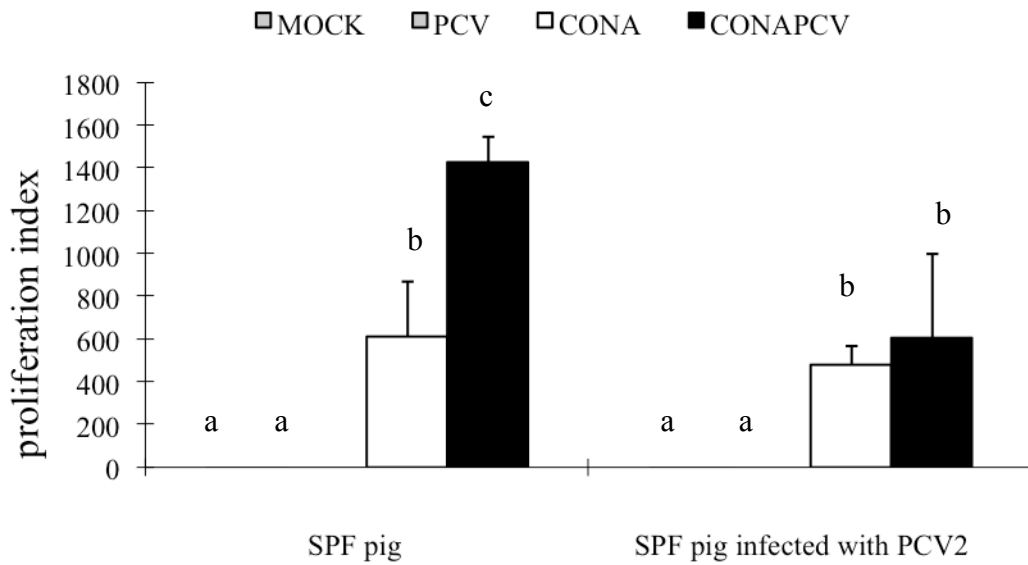


Fig 7. The mean of proliferation index (PI) of PBMC from PCV2 experimental infected SPF pigs. The PI was measured by EDU flow cytometry assay. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

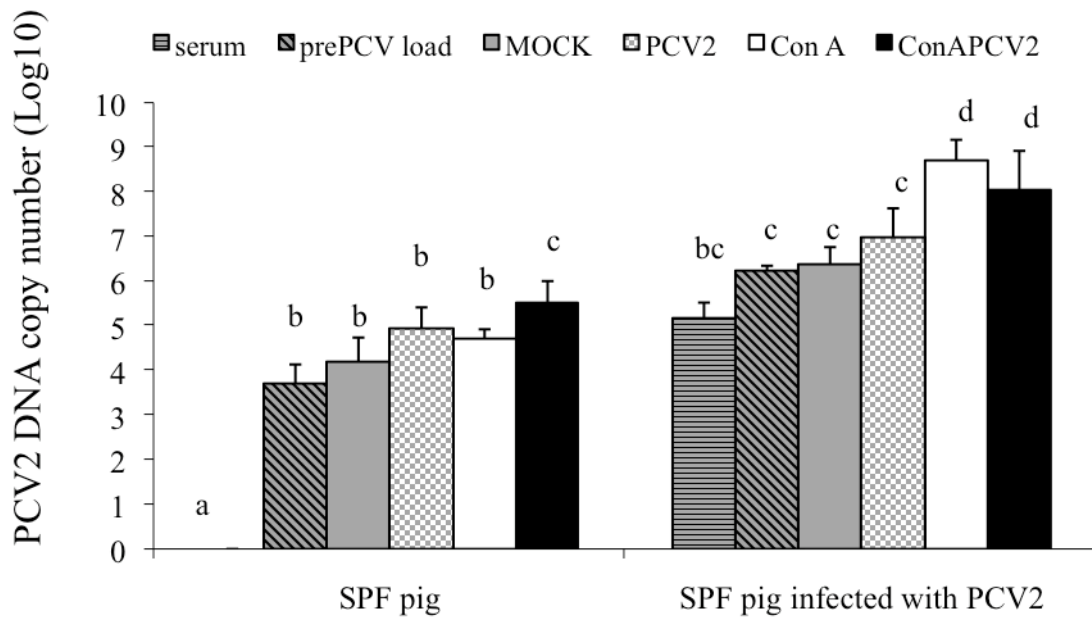


Fig 8. The mean of PCV2 load in PBMC from experimental PCV2 infected SPF pigs. PrePCV load is the original viral load in PBMC. Mock load is cells incubation with medium for 3 days. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

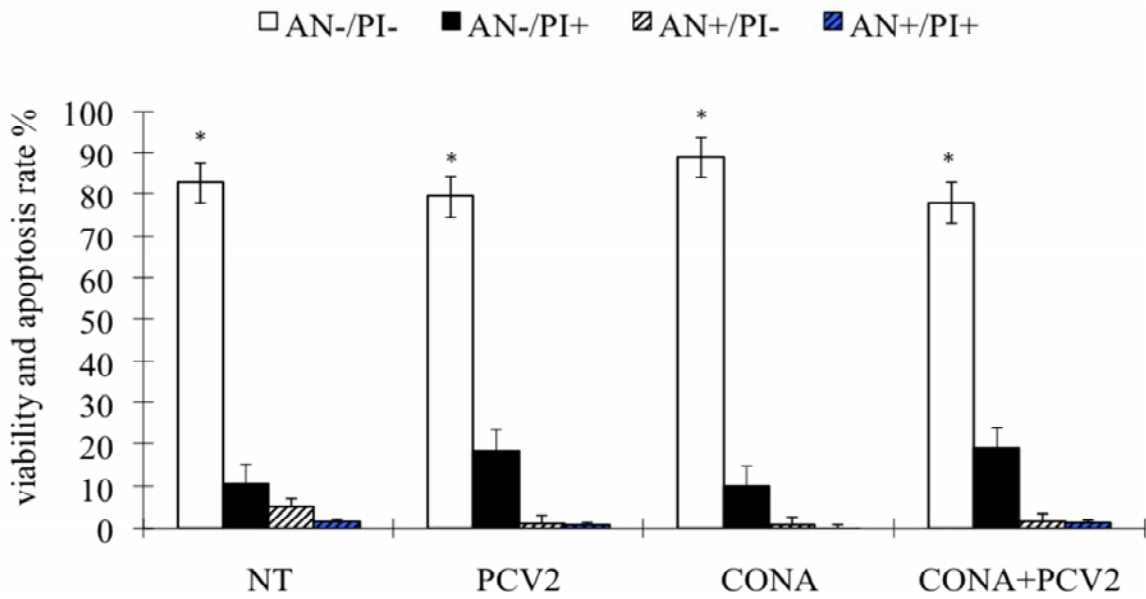


Fig 9. The mean of viability rate and apoptosis rate of PBMC from PCV2 experimental infected SPF pigs. To measure by annexin V and propidium iodide double stain flow cytometry assay. *Values with the label in the same treatment differ significantly ($P < .05$). AN-/PI-: viability rate, AN+/PI-: apoptotic rate, PI+: necrosis rate.

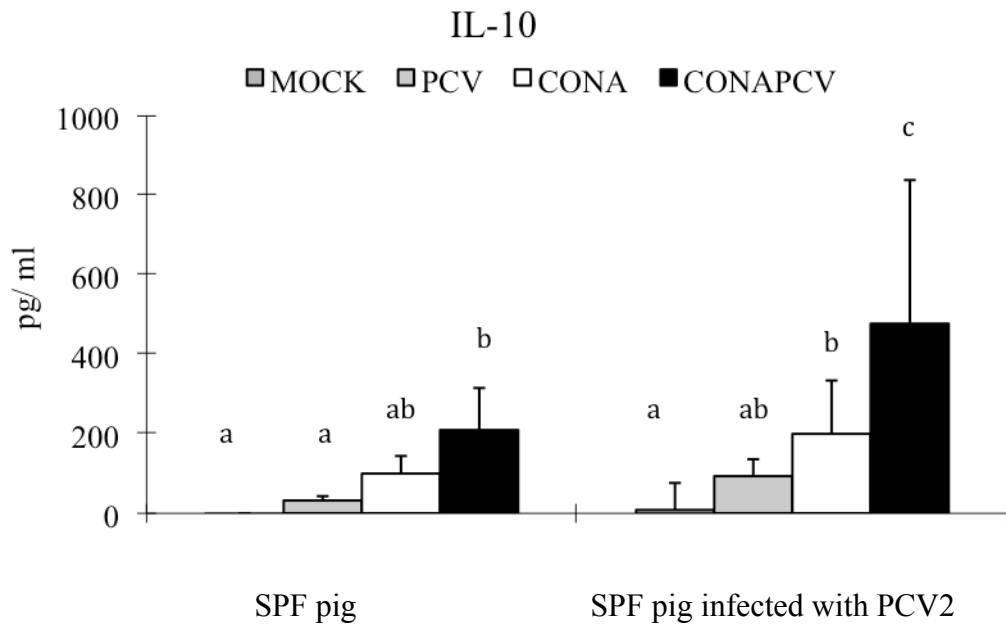


Fig 10. The mean of IL-10 concentration in PBMC supernatant. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

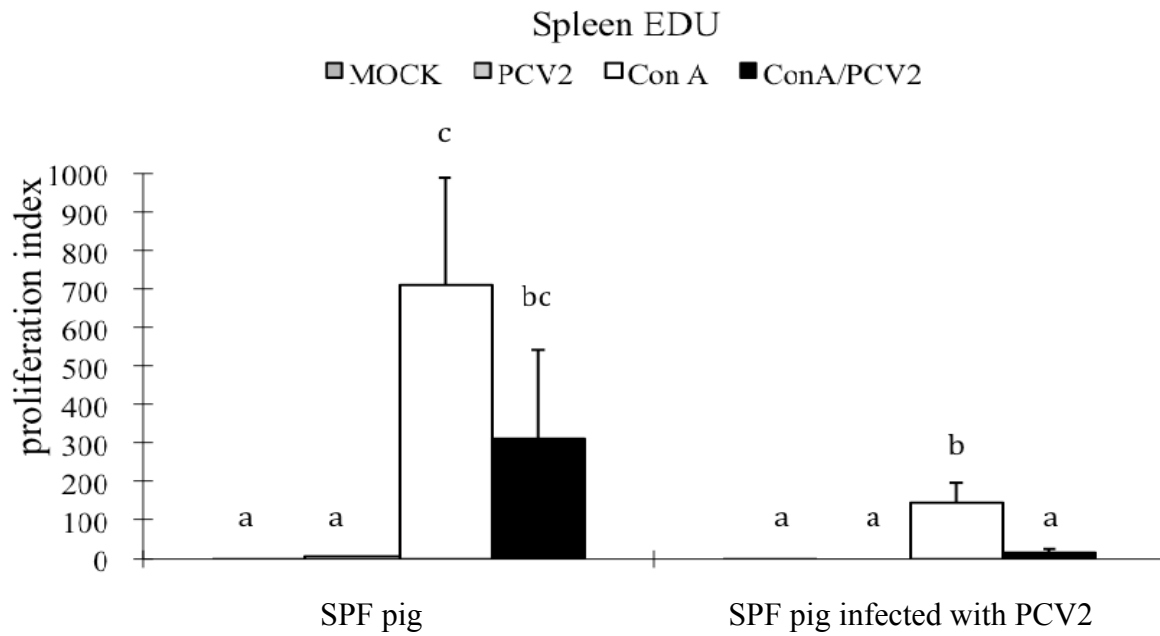


Fig 11. The mean of proliferation index of spleen cells from PCV2 experimental infected SPF pigs. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

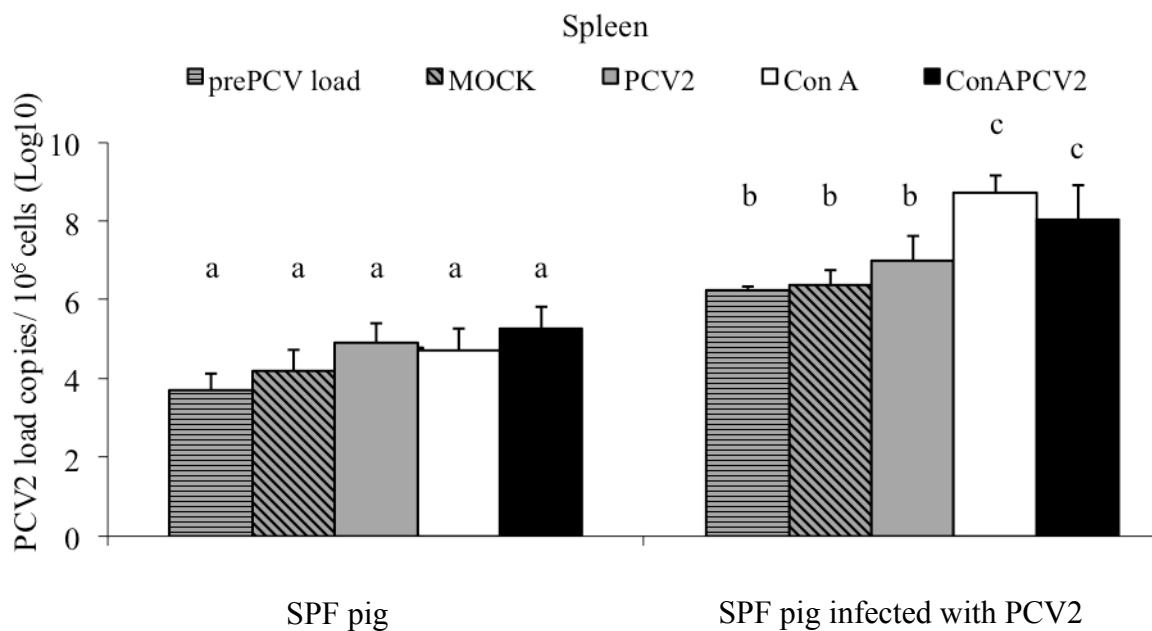


Fig 12. The mean of viral load of spleen cells from PCV2 experimental infected SPF pigs. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

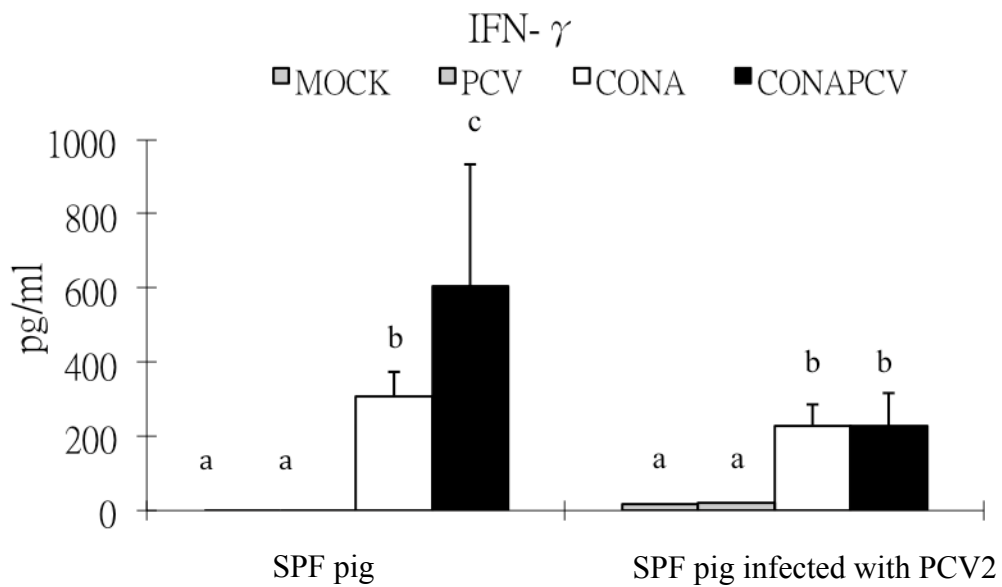


Fig 13. The mean of concentration of IFN- γ in spleen cells supernatant from PCV2 experimental infected SPF pigs. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

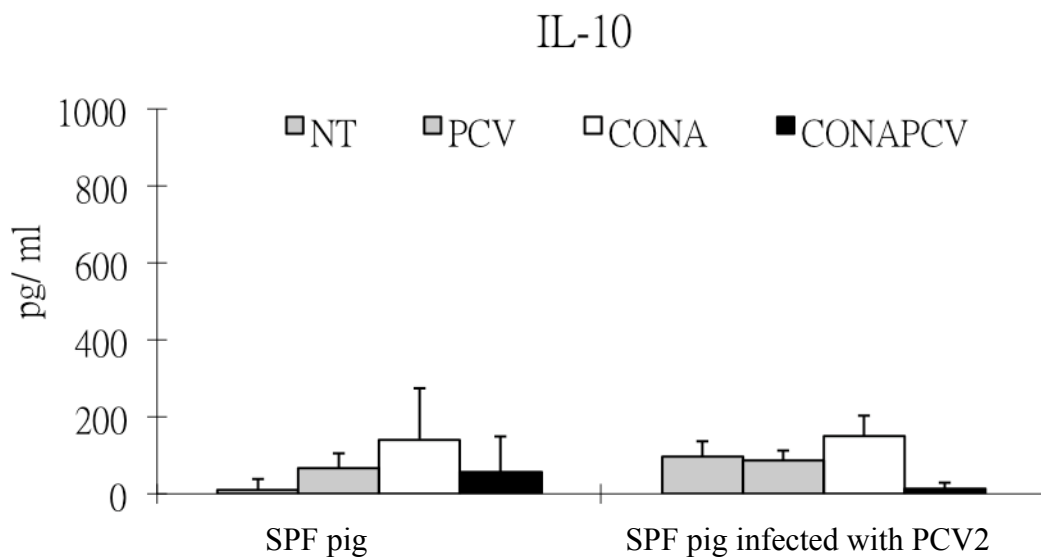


Fig 14. The mean of concentration of IL-10 in spleen cells supernatant from PCV2 experimental infected SPF pigs. Different superscripts (a, b, c, d) indicate significant difference of mean at the 3rd cultural day.

第五章 討論

本實驗的目的在探討豬第二型環狀病毒如何影響 Con A 刺激 PBMC 增殖。PCV2 為 PMWS 的主要病原，而 PCV2 廣泛存在各地豬場，在污染場中高達 53-92% 的豬隻呈現血清抗體陽性，且臨床症狀輕重與患豬血清中病毒含量有關。然現場中單純由 PCV2 感染引起 PMWS 卻只佔 15% 的豬隻，大多數感染豬不產生或僅有輕度臨床症狀與組織病變為本病毒感染的特點，影響症狀產生的關鍵為免疫刺激 (Meerts et al., 2006)。近年報告指出 Con A 具有促進淋巴球內 PCV2 複製且增加淋巴組織病毒力價的現象 (Lefebvre et al., 2008; Yu et al., 2007b)，而 PCV2 於血清或淋巴組織中的含量或力價與臨床症狀顯著相關 (Brunborg et al., 2004)，因此以 Con A 模擬免疫刺激，被視為研究於免疫活化時，PCV2 致病 PMWS 的便利工具。本實驗首先以自然感染帶原豬，分析帶原不同 PCV2 病毒量，與 Con A 刺激 PBMC 增殖反應及與 IFN- γ 之相關性。第二部分研究攻毒 SPF 豬，探討 PCV2 superinfected 對 Con A 刺激細胞的影響以及 IL-10 扮演的角色。

過去許多文獻指出 PCV2 感染單核巨噬系列細胞 (Gilpin et al., 2003; Vincent et al., 2003)，且能長期持續存於巨噬細胞及樹突細胞 (dendritic cell) (Vincent et al., 2003)，因此 PCV2 病毒血症代表病毒可能藉由血液循環侵入身體各處器官，病毒血症中的病毒量或病毒力價高低為免疫反應控制本病毒複製或感染的指標之一。由於 PCV2 複製需依賴細胞快速增殖以完成其感染性週期，因此本實驗第一部分為使用含有各族群 (subpopulation) 免疫細胞之 PBMC，以 Con A 刺激模擬免疫細胞活化大量增生之模式，探討 PCV2 superinfected PBMC 之增殖反應是否受血清病毒量影響。實驗第一部分結果為隨著血清病毒量增加，IL-10 濃度有增加趨勢，而 PCV2 superinfected 抑制 Con A 刺激 PBMC 增殖也有隨血清病毒量增加，抑制越顯著。以下針對每個免疫決定因子逐一探討與血液 PCV2 病毒量之關係及可能代表的意義。

第一節 自然帶原豬

5-1.1 血清含高量病毒，則 PCV2 superinfected 強烈抑制 Con A 刺激 PBMC 增殖反應

探討臨床健康但具有不同程度病毒血症之豬隻其血清中病毒量與細胞免疫反應的關連。病毒血症為病毒及其產物進入血液中，故 PMWS 診斷依據之一即血清中 PCV2 DNA 達到 10^7 copies/ mL，血清病毒量配合 PMWS 症狀程度分級，嚴重級血清 PCV2 核酸介於 $3.9 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^{12}$ copies/ mL (Olvera et al., 2004)，本實驗之攻毒豬依此標準介於中度範圍。PMWS 是多因子疾病，免疫刺激被認為是必要因素之一，本實驗以 Con A 作為離體實驗之刺激因子，Con A 為 T 細胞致裂原，可雙向活化免疫細胞與促進 PCV2 完成複製週期 Con A 刺激，分別利用免疫螢光物質標記 PKH2 標定細胞膜，以 EDU 標定增加合成的細胞核酸，並以流式細胞儀分析計算增殖指數，比較與血清病毒量之關連。結果顯示單純 PCV2 再刺激不引起病毒特異性細胞增殖反應，代表本實驗條件下時，PCV2 再刺激可能不引發免疫細胞產生病毒特異增殖反應，推測可能是給予病毒 MOI 不足，但在 Yu 等 (Yu et al., 2008) 實驗給予 0.1 MOI 刺激，仍無法引起病毒特異性增殖反應，此外 PCV2 是目前已知最小的病毒，可能無法有強力的免疫原 (immunogenicity)，因此研究 PCV2 之 T 細胞抗原決定位，只有少數 PCV2 產物引起 T 細胞增殖 (Stevenson et al., 2007)。單純 PCV2 superinfected 可能不足以刺激特異性細胞增殖，此部份將於後面段落作較詳細探討。PKH2 實驗結果發現，隨血清中病毒量增加，PCV2 superinfected 抑制 Con A 刺激 PBMC 增殖有增強的趨勢 ($P < 0.1$)。以不同方法 EDU 檢測增殖，結果亦有隨血清中病毒量增加而抑制增強的現象 ($P < .05$)。分析血液中 (包含 PBMCs 與血清) 含有病毒的 8 頭自然感染豬，有 3 頭豬血清無病毒核酸，但 PBMC 含有低量病毒核酸，PCV2 superinfected 促進 Con A 刺激引發高度 PBMC 分裂增殖反應，而其餘 5 頭豬血清中病毒量介於 $10^{3.5} \sim 10^{4.7}$ copies/ mL，PCV2 superinfected 抑制 Con A 刺激 PBMC 分裂增殖反應，增殖反應明顯低落。總結上述，當豬血清病毒達相當含量，PCV2 superinfected 能抑制 Con A 的作用且呈負相關性。

本實驗以 Con A 刺激模擬免疫活化，跟據實驗結果認為帶原病毒豬免疫細胞處於活化狀態下，若再暴露 (re-stimulation) PCV2 能產生較強烈之增殖反應，代表免疫細胞能辨識 PCV2，產生有效的免疫反應，進而清除感染病毒的細胞，及抑制病毒的複製，而讓血清中的病毒存量相對減少；反之，PCV2 superinfected 抑

制免疫細胞，造成血清病毒量高。Darwich 等 (Darwich et al., 2008) 指出於 subclinical 豬隻可經鼻分泌物及糞排毒達感染後十週，顯示臨床無症狀之感染豬隻，免疫仍遭受某些損害而無法清除 PCV2，才有持續排毒現象。PMWS 特色有二：一、淋巴流失且改變 PBMC 及淋巴組織免疫細胞組成。嚴重 PMWS 病例於組織病理學可發現中濾泡區 B 細胞流失及濾泡間區 T 細胞流失及被組織球取代；周邊血液淋巴球流失及單核球取代 (Segales et al., 2004)。二、PCV2 於血清或淋巴組織中的含量或力價與臨床症狀顯著相關 (Brunborg et al., 2004)，過去研究仍無法確定由 subclinical 發展成 PMWS 病毒如何干擾免疫系統及演變為大量免疫細胞之流失，亦無法證明病毒能引起細胞凋亡，不同於前人以發病豬為實驗對象，本實驗以無臨床症狀的帶原豬，PBMC 於 Con A 刺激下發現 PCV2-superinfected PBMC 增殖反應與血清中的病毒量呈顯著負相關。顯示在宿主体內免疫活化時，PCV2 再暴露可能干擾免疫細胞的增殖，進而影響細胞性免疫反應毒殺感染細胞，一旦免疫系統無法有效作用，即產生持續感染，病毒特异性 CD8⁺ 細胞將逐漸損失增殖能力及毒殺能力，以及抑制 CD8⁺ 細胞分泌多種細胞激素的能力，最終耗盡及不反應 (Appay et al., 2000; Wherry et al., 2003)，本實驗分析發現 Con A 刺激 PCV2-superinfected PBMC 抑制細胞增殖反應現象，可能為本病造成免疫受損之部分機制。試著以實驗發現抑制增殖反應的現象，解釋產生疾病的機制如下述：攻毒實驗發現，PCV2 可持續散佈至血液循環中期限可達攻毒後第八週 (Darwich et al., 2008)，故不顯性 PCV2 感染豬病毒可持續存在血液中，隨血液中病毒量增加，及配合外在免疫刺激或共同感染，本實驗發現之現象：損害病毒特异性細胞增殖反應將加劇，進而產生末期 PMWS 症狀，結果造成豬之周邊血液的檢測發現 B 細胞及 T 細胞族群 CD4⁺ 細胞及 CD8⁺ 細胞大量流失，並可偵測到細胞內 PCV2 抗原訊號 (Segales et al., 2001a; Segales et al., 2004)。免疫細胞耗盡產生之後果牽涉廣泛，例如：CD4 細胞藉由細胞激素維持 CTL 及抗體反應，使其發揮效應抑制病毒複製，因此免疫細胞耗盡之衰弱豬，將無法無法發揮免疫效應清除病毒。

曾有報告推論隨著病毒血症趨於嚴重，抑制 PBMC 增殖情形也增加，致病原因可能是病毒損害免疫細胞增殖/凋亡動態平衡，進而影響體內免疫細胞數量的維持。此解釋根據的文獻利用單株抗體 MIB1 標定罹患 PMWS 豬之鼠蹊淋巴結，發

現增殖指數隨組織病變及臨床症狀趨於嚴重而顯著下降，淋巴球增殖能力隨著 PMWS 病程趨向嚴重而被抑制 (Nielsen et al., 2003)。本研究不同於前人之處為使用 PBMC 活細胞進行調查，其優點在於實驗結果為直接反應免疫細胞與病毒的交互作用。過去研究使用免疫組織化學染色的限制在於一、使用顯微鏡人工判定陽性訊號較易受主觀意識影響而產生誤差。二、組織經福馬林固定後 methylene bridges 形成之 cross-link proteins 掩蓋抗原位置，雖經過加熱或處理以 trypsin, pepsin 或 protease 等 Antigen retrieval 步驟，過程中仍會流失部分訊號 (Mizoue et al., 1997)。

5-1.2 PCV2 藉 IL-10 造成細胞增殖的抑制

細胞激素能夠作為細胞與病毒間交互作用的指標，近年研究發現 PCV2 可促進 IL-10 分泌，經由 PCV2 攻毒實驗發現於攻毒後第 21 天血清中之 IL-10 濃度與血清中病毒量有相關性 (Darwich et al., 2007) 也與隨後 PMWS 症狀之產生有關 (Stevenson et al., 2006)。IL-10 對病畜臨床上的影響由 Darwich 等報告，罹患 PMWS 豬胸腺中過度表達 IL-10 與淋巴組織淋巴流失具有相關性 (Darwich et al., 2003b)，然目前對 PCV2 造成淋巴流失之作用機制現象仍無法完全釐清，只推測 IL-10 可能為影響因子之一。有關 IL-10 如何進行對免疫細胞之抑制作用？免疫學家研究 IL-10 發揮免疫抑制之相關機制是使用急性淋巴脈絡叢腦膜炎 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 攻毒基因缺陷小鼠模組，以 LCMV 病毒刺激 DC、巨噬細胞及調控型 T 細胞分泌 IL-10，發現其減弱效應型 T 細胞分化以及減少記憶細胞形成，使病毒無法被清除而造成持續感染，病程逐漸進入慢性期。Taga 等 (Taga et al., 1992) 發現 IL-10 有抑制致裂原刺激 PBMC 之增殖反應及細胞激素的分泌。實驗發現 Con A, PHA 及抗 CD3 單株抗體刺激的人類 T 細胞增殖反應均被 IL-10 抑制，以及抑制 PHA 刺激 PBMC 分泌 IFN- γ 及 IL-2，且重組 IL-2 可回復 IL-10 抑制之增殖反應，故推論 IL-10 藉由抑制 IL-2 分泌抑制 T 細胞增殖反應 (Taga et al., 1992)。實際的例子在 Parainfluenza virus type 3 (PIV3) 病毒感染人之 PBMC 顯著誘導 IL-10 分泌增加，且以重組 IL-2 進行 IL-2-driven proliferation assay 並加入重組 IL-10，相對於未感染 PIV3 組別受 IL-2 刺激有細胞增殖反應，感染 PIV3 的 PBMC 不增殖 (Sieg et al., 1996)。此外，IL-10

藉由作用削弱 accessory cells 能力來抑制 accessory cell-dependent T 細胞增殖反應 (Taga et al., 1992)。相關的機制包含病毒誘導之 IL-10 可藉由減低單核球表達 MHC II 而使抗原呈現能力削弱，間接減低病毒特異性 T 細胞增殖反應 (dewaal et al., 1991)。另一例子為 IL-10 抑制巨噬細胞增殖，而巨噬細胞屬於抗原呈現細胞，基因序列分析發現 IL-10 活化位於 p19^{INK4D} promoter 上 Stat3 之結合位基因，誘導 p19^{INK4D} 表現需要 Stat3 與 IL-10 受器之 tyrosine 結合產生，表達 p19^{INK4D} 可抑制巨噬細胞增殖反應 (O'Farrell et al., 2000)。

本實驗結果以感染豬隻檢測血清中 IL-10 濃度隨血清病毒量增加而濃度增高之趨勢 (P < 0.1)。且經 PCV2 superinfected, Con A 刺激 PBMC 分泌 IL-10 濃度與 PBMC 細胞內病毒量呈顯著正相關 (P < .05)。將細胞培養上清液 IL-10 濃度與 PBMC 增殖反應作相關性分析發現，雖線性關係斜率為負，但未達統計上顯著相關，可能與本實驗樣本有限，體內病毒量範圍偏低，因此無法證實 IL-10 與增殖反應有負相關。過去學者推論 PCV2 存在於單核球及樹突細胞中但並不直接影響細胞功能，然而根據實驗結果 PCV2 於臨床健康豬不僅單純潛伏在 PBMC 中，推測可能藉由促進 IL-10 分泌抑制免疫細胞增殖反應，而使細胞數量無法維持平衡狀態，進而造成淋巴流失，抑制病畜免疫能力，惟需進行較多樣本數之調查證實此假設。

5-1.3 血清病毒量與 IL-10 與 IFN- γ 分泌無關

IFN- γ 常為細胞免疫功能抗病毒反應的指標，本實驗結果發現無論有無 Con A 刺激，培養上清液中 IFN- γ 濃度與細胞內 PCV2 病毒量無顯著相關，應用本實驗結果，可解釋田間調查發現 PMWS 改變 PBMC 細胞激素之分泌現象。病豬與臨床健康豬比較，PBMC 受致裂原 (phytohemagglutinin, PHA) 刺激後，分泌 IFN- γ 、IL-2 及 IL-4 的能力受抑制 (Darwich et al., 2003)。IFN- γ 受血清病毒量影響包含：一、由於細胞激素代表淋巴細胞族群間之交互作用，因此也受細胞族群改變影響細胞激素之分泌。由實驗結果推測 IFN- γ 分泌受抑制情形應與血清中病毒含量有關，而血清病毒量又與 PMWS 病程有關，隨著病程發展淋巴細胞流失族群不同，於攻毒試驗中 CD3 於攻毒後第 14 天開始流失，於攻毒第 21 天後 $\gamma\delta$ T 細

胞、CD8 與自然殺手細胞 NK 逐漸流失 (Nielsen et al., 2003) , 因此於進行淋巴細胞族群組成調查, 可提供更多本實驗結果之證據。二、動物體內細胞激素具有相互調控的網路特性, IFN- γ 可能受其他細胞激素調控而造成抑制, 可能也與 IL-10 之抑制有關。

PCV2-specific IL-10 能抑制其他細胞激素分泌, 細胞攻毒實驗發現 PCV2 CpG-ODNs 誘導 PBMC 分泌 IL-10, 然而於 PCV2 與 PR 共同感作 PBMC 時, PR-recalled 之 IFN- γ 、IL-12 及 IL-2 分泌下降, 因此推論 PCV2-specific IL-10 抑制 PR-recalled 抗原的反應 (Kekarainen et al., 2007) 。基於上述實驗結果所得的假設為 PCV2 感染發展 PMWS 過程中, 能促進 IL-10 分泌抑制免疫系統 Th1 反應 (Fort et al., 2009; Kekarainen et al., 2007) 。Th1 反應為促進 IFN- γ 分泌活化細胞免疫反應, 而 PCV2 促進 IL-10 有抑制 Th1 來源之細胞激素的現象。故本研究進行 IL-10 濃度、血液病毒量、增殖反應及 IFN- γ 濃度之相關調查, 不同前人研究使用無帶原豬隻, 為本實驗使用自然感染 PCV2 且臨床健康豬隻, 更能代表田間真實情況。前述 Con A 刺激下 PBMC 分泌 IFN- γ 濃度隨細胞內 PCV2 病毒量增加有下降之負趨勢, 而經 Con A 刺激下分泌 IL-10 濃度與細胞內病毒量與呈顯著正相關 ($P < .05$) 。故嘗試釐清 IL-10 與 IFN- γ 間是否具有負相關現象, 然分析結果 IL-10 濃度與 IFN- γ 濃度雖有負趨勢, 但不具有統計學上顯著相關, 顯示 IFN- γ 除了受病毒量及 IL-10 調控外, 可能還有其他因子影響。

總結上述, 假設感染豬隻若產生強烈細胞免疫反應, 包含病毒特異性增殖反應以及 IFN- γ 分泌則能有效控制病毒複製, 降低血清中病毒量。本實驗在 Con A 刺激造成之 T 細胞活化條件下, 才能符合此假設。進一步歸納 PCV2 對細胞免疫的影響: 血液中病毒量與 IL-10 濃度可能會抑制 Con A 刺激下 PCV2-superinfected PBMC 細胞增殖反應, 推論當病毒散佈 (shedding) 至血液循環中, 隨著血液 (血清或單核細胞) 中病毒酸量增加, 促進 PCV2 病毒特異性 IL-10 分泌調控 PBMC, 抑制 Con A/PCV2 刺激之增殖反應, 可知病毒使病畜細胞免疫反應受損, 於患豬免疫活化的情況下較顯著。

第二節 攻毒 SPF 豬

前述實驗得知自然感染豬隨血清病毒量增加，促進分泌 IL-10 以及 PCV2 superinfected 抑制 Con A 刺激 PBMC 的增殖增加。實驗第二部分進一步以 SPF 豬攻毒，製造帶有高病毒量個體，以 Con A 刺激模擬免疫細胞活化大量增生之模式，檢測 PCV2 superinfected 對 Con A 刺激 PBMC 及脾臟細胞的增殖反應的影響，本實驗使用 6 頭 SPF 豬，3 頭為對照組，此未攻毒豬於血清中均未測得病毒，但細胞內含有低量病毒；3 頭作攻毒組經由點鼻給予 10^6 TCID₅₀ PCV2 病毒液，於攻毒後第 21 天採脾臟及 PBMC，以模擬 PMWS 個體免疫反應於不同器官之表型。測定處理前後細胞內病毒量及經 Con A 刺激周邊血液以及脾臟的細胞增殖，並檢測細胞激素分泌，進一步釐清 PCV2 superinfected 影響 Con A 作用。

5-2.1 未攻毒豬之 PCV2 superinfected 促進 Con A 刺激之細胞增殖反應及細胞內 PCV2 病毒複製

增殖反應結果於單獨 PCV2 superinfected 無特异性增殖，然 Con A/PCV2 組之增殖指數 (PI value) 極顯著大於 Con A 組 ($P < .0001$)，顯示 PCV2 superinfected 加強 Con A 刺激的 PBMC 增殖反應，且顯著增幅細胞內病毒量，推測細胞內增加的病毒可能來自病毒複製增加，過去的文獻指出 PCV2 在 PBMC 中的複製與細胞週期顯著相關，故推測 Con A 刺激細胞進入 S 期，促進病毒複製增加。有研究以健康帶原豬淋巴球受 Con A 刺激後使用流式細胞儀及原位雜和試驗可偵測到細胞內病毒抗原陽性反應、核酸及病毒核酸量明顯的增加 (Lin et al., 2008)。另一篇文獻以 PCV2 陰性豬所得之 PBMC 加入 Con A 刺激 72hr 製作成細胞抹片後，以雙重免疫螢光染色細胞內 PCV2 抗原及 CD marker，發現雙染陽性者以 CD8⁺ 為數最多、CD4⁺ 以及 IgM⁺ 共占 51%，PCV2 抗原訊號出現在以淋巴球為主之細胞族群 (Lefebvre et al., 2008)。本實驗以 Con A 刺激 PBMC，PCV2 superinfected 促進 Con A 的效果，PBMC 分裂增加，同時使細胞內 PCV2 進行複製。由於實驗結果單純以 PCV2 superinfection，顯示 PCV2 無法引起細胞再次暴露於相同病毒或抗原之二次免疫反應 (secondary immune response or recalled response)，淋巴細胞增殖反應與不處理組無統計上之顯著差異，對於此

現象之推論為 Con A 刺激大量淋巴球的增殖時，PCV2 於有利複製情況下，進行複製時所產生的某些產物具有免疫原性可能引起病毒特異性增殖反應。Stevenson 等 (Stevenson et al., 2007) 分析 PCV2 之 T 細胞抗原決定位，以合成之 ORF1，ORF2 及 ORF3 編碼的胜肽刺激 PBMC，以淋巴球增殖反應決定免疫優勢抗原決定位 (immunodominant epitope)，結果發現個體間差異大，64 個胜肽中只有 ORF1 (amino acid residues 81-100; 201-220) 及 ORF2 (amino acid residues 31-50) 引起淋巴球增殖反應，可見 T 細胞發生 PCV2 特異增殖反應受限於與特定編碼的胜肽結合。在本實驗中，促進淋巴球增殖之現象，具有兩變因：Con A 刺激以及 PCV2 superinfection，故進一步實驗可設計為細胞以不同先後順序之 Con A 及 PCV2 處理後調查增殖反應。

5-2.2 攻毒後抑制 PCV2 superinfected Con A 刺激之增殖反應

與未攻毒的豬作對照，SPF 豬攻毒於攻毒後第 21 天採血，以 Real time PCR 偵測其血清或細胞內病毒核酸量均顯著高於控制組，攻毒組之 PBMC 以 PCV2 superinfected Con A 刺激，細胞內病毒核酸高達 10^{10} copies/ 10^6 cells 而 PCV2 superinfected Con A 刺激的細胞增殖反應顯著低落。顯示細胞中含高病毒核酸時，PCV2 superinfected 無法促進 Con A 刺激增殖。由於活細胞實驗必需考慮經過處理造成之細胞死亡增加，可能造成上述實驗結果，故進行細胞存活率與凋亡率檢查，使用 annexin V /propidium iodide Apoptotic kit 檢測結果 PCV2 再感染對 PBMC 存活率無顯著影響，細胞凋亡率在各處理組間也無顯著差異 (fig.9)，可知 PBMC 受抑制細胞增殖減少為病毒效應及而非於實驗處理過程造成誤差。細胞增殖反應低於未攻毒豬，可能因細胞內病毒核酸含量很高，干擾細胞生理機制，此外，蒐集培養上清液測試發現含有高濃度 IL-10，Con A/PCV2 組之 IL-10 濃度顯著高於控制組，也可能抑制細胞增殖，病毒造成免疫抑制可藉由細胞激素加強 (Drew, 2000)，Taga 等曾提出 IL-10 對致裂原之抑制作用 (Taga et al., 1992)。

總結上述單獨以 PCV2 刺激 PBMC 不引起病毒特異性增殖反應且細胞內病毒量不增加，顯示實驗給予 PCV2 可能不影響 PBMC。然 Con A 刺激 PBMC 後增殖

反應增加且細胞內病毒量增加，顯示然 Con A 刺激可能雙向刺激細胞增殖，以及促進細胞內病毒複製的現象。PCV2 superinfected 在攻毒豬隻與未攻毒豬隻（控制組）之間造成不一樣影響，於控制組 PCV2 superinfection 加強 Con A 刺激的 PBMC 增殖反應且增加病毒複製；而於攻毒組無此現象，Con A/PCV2 處理 PBMC 之增殖反應低落，細胞內雖含有高病毒量，PCV2 superinfected 未增加病毒複製，攻毒顯然是造成兩者差異的重要因素，由於攻毒組中 PBMC 細胞內的病毒量很高，過多的病毒改變細胞生存環境，抑制宿主核酸形成，減少 RNA 合成酶而造成轉錄因子不活化，影響 RNA 轉錄進而影響細胞所需的蛋白質，而過量病毒 mRNA 與細胞 mRNA 競爭宿主細胞的 ribosome 會抑制細胞生存所需蛋白質合成 (Murphy, 1999)，可能也是抑制細胞增殖的原因。此外，檢測攻毒組細胞培養上清液出現高濃度 IL-10，顯示 PCV2 藉促進 IL-10 分泌抑制細胞增殖反應。IL-10 抑制細胞增殖可藉由抑制 IL-2 作用或抑制 accessory cell-dependent T 細胞。

實驗結果細胞的特異性增殖反應需在帶原低病毒量，且細胞經 Con A 刺激下，才有 PCV2 superinfected PBMC 的增殖反應，且 PBMC 內之病毒量也顯著增加。而 Con A 於 PCV2 複製扮演的角色為何？Con A 為 T 細胞致裂原，以活化 T 細胞為主之增殖反應，豬 PBMC 經 Con A 刺激增殖的淋巴球族群主要為 CD4⁺ CD8⁺、CD4⁻ CD8^{αhi}、CD4⁻ CD8^{αlo} 及 $\gamma\delta$ TCR⁺ (Dorn et al., 2002)，過去以 Con A 刺激 PBMC 或 PBL 的研究均發現 PCV2 的複製與細胞週期具顯著相關性 (Lefebvre et al., 2007; Lin et al., 2008)。本實驗不經 Con A 刺激僅以 PCV2 再暴露的細胞增殖反應與血清病毒量，不具統計上的顯著意義。此結果與其他有關的實驗報告相類似，該研究以周邊血液淋巴球經 PCV2 處理且未經致裂原刺激，以 H³-Thymidin 攝入量檢測細胞增殖能力，其結果並未產生顯著變化。然而若細胞經 Con A/PCV2 刺激，增殖反應可達 13000 cpm/ 10⁶ 周邊血液淋巴球 (Lin et al., 2008)。總結上述實驗結果，PCV2 特異性細胞增殖僅能在 Con A 刺激下觀察到之現象，可能與 Con A 雙向刺激 PBMC 與 PCV2 有關，由於 PCV2 能長期持續存於巨噬細胞及樹突細胞而不影響細胞活性，故 Con A 可能活化細胞與病毒兩者間的交互作用。臨床上的證據為免疫刺激為 PCV2 發展 PMWS 所需之共同因子 (co-factor)，人工攻毒 PCV2 產生 PMWS 之實驗模組中，有以 KLH/IFA 或 PPV 混合感染下能成功再現 (reproduce) PMWS 之例子。

5-2.3 未攻毒豬隻脾臟細胞於 PCV2-superinfected 促進 Con A 刺激脾臟細胞， 分泌 IFN- γ

當病毒血症發生，病毒可藉由血液快速分布至親和的組織器官中複製，過去調查淋巴球與單核巨噬系列細胞的交互作用主要發生在組織器官中 (Darwich et al., 2004)，脾臟細胞含有淋巴濾泡，單核巨噬系列細胞，抗原呈現細胞佔有比例約比 PBMC 高出五成，故理論上脾臟細胞反應較 PBMC 能精確代表感染動物體內的免疫情況。實驗結果發現脾臟對抗 PCV2 之免疫表型與 PBMC 有明顯差異，控制組使用 Con A 刺激 PCV2-superinfected 脾臟細胞，上清液 IFN- γ 濃度比 Con A 組高，然而相對 Con A 組，Con A/PCV2 組細胞內病毒量未顯著增加。反之於攻毒組，Con A/PCV2 處理，細胞內病毒量高達 108 copies/ 106 個脾臟細胞，有顯著高於控制組，而增殖反應低落，上清液 IFN- γ 濃度也顯著較低，根據實驗結果推測脾臟細胞內病毒過多影響正常細胞生理機制，抗原過多影響 T 細胞增殖反應，阻礙 IFN- γ 表達，可能與阻斷 IFN- γ 表達，破壞 IFN- γ 的受器，干擾 IFN- γ 細胞內訊號傳遞路徑，或是降低 IFN- γ ISG (IFN-stimulate gene) 表現有關。

實驗結果顯示控制組之免疫表現型態，可能為較有利於抑制病毒複製，Con A 刺激 PCV2 superinfection 脾臟細胞後促進 IFN- γ 分泌，抑制 PCV2 複製。Meerts 等發表以發現攻毒後未檢測到 PCV2 力價之兩頭豬，PBMC 表達最高 IFN- γ mRNA 以及中和抗體開始上升，顯示表達較多 IFN- γ mRNA 較能有效控制病毒複製 (Meerts et al., 2005)。第二型干擾素 IFN- γ 為 T 細胞來源，是重要抗病毒之免疫因子。當病毒依賴宿主進行複製或隨血液細胞散播至身體各處，藉由抑制受感染細胞，抑制病毒複製為宿主阻止病毒於體內散播常見的免疫機制。受病毒感染的細胞，藉由分泌干擾素抵抗再次感染稱為 viral interference (Murphy, 1999)，文獻指出 IFN- γ 抗病毒機制為誘發特定酶反應抑制病毒蛋白合成或複製，詳細機制於 3-2.1 探討。PKR 為抑制病毒蛋白合成之蛋白酶，受病毒中產物 dsRNA 激活，而 PKR 亦可藉由抑制細胞生長及增殖反應，達到抑制病毒在細胞之間傳播的效果。故可解釋本實驗 Con A/PCV2 組脾臟細胞增殖較低於 Con A 組現象，可能與上清液高濃度 IFN- γ 有關，IFN- γ 抑制細胞生長其機制為提升

PKR、p21、p27 及 Mad 1 表現 (Ramana et al., 2000; Schroder et al., 2004)，PKR 及 Mad 1 降低 c-myc 表現來阻斷細胞週期，PKR 活化 retinoblastoma (Rb)-independent 路徑抑制 c-myc (Raveh et al., 1996)。c-myc 誘導 S 期所需的轉錄基因以及活化 cyclin 促使細胞週期由 G1 進入 S 期 (Obaya et al., 1999)。此外，IFNs 促進 Ink4 及 Cip/Kip CKIs 蛋白合成，藉由 CKIs (p21、p27) 抑制 cyclin 來阻礙細胞週期。另一方面，IFN- γ 也能誘發感染細胞啟動內在的自殺裝置發生程序性的死亡，細胞發生凋亡反應，影響細胞凋亡機制為 IFN- γ 提升 IRF-1，IFN- γ 誘導 IRF-1 造成 DNA 損害誘導 caspase 1 活化 IL-1 及 IL-18 產生，造成巨噬細胞 proapoptotic effect (Tamura et al., 1997)。過度表達 IFNGR 的細胞，促使 IFN- γ 對細胞的反應由抗凋亡轉變成凋亡 (Bernabei et al., 2001)，其他 IFN- γ 誘導之凋亡分子 (proapoptotic molecules) 還有：Fas/Fas ligand、TNF- α 及 DAPs 表現 (Schroder et al., 2004)。故進一步實驗可檢測脾臟細胞 IFN- γ 誘導之凋亡反應來釐清抑制增殖之原因。

第三節 單純以 PCV2 再刺激不引起病毒特異性反應之可能原因

所有實驗中，單純以 PCV2 superinfection 不影響 PBMC 及脾臟細胞增殖及改變 IFN 分泌。上述結果顯示單純以 PCV2 再次感染不影響細胞免疫反應，有以下幾點原因：一、由於病毒液力價不高，因此實驗室攻毒 MOI < 0.1，可能不足以影響免疫細胞。二、T 細胞只辨識少數抗原決定位，根據實驗僅有 3 個非結構蛋白，分別來自 ORF1 及 ORF3 能引起 T 細胞輕微特異性增殖反應 (Stevenson et al., 2007)。三、本實驗攻毒後第三週偵測 PBMC 和脾細胞的增殖反應，然最近的攻毒實驗報告發現在攻毒超過 28 天才出現 PCV2 特異性的 PBMC 增殖反應 (Stevenson et al., 2007)。可見宿主細胞的免疫活化受到嚴格限制，然此部份僅解釋攻毒實驗結果。同樣依賴細胞週期發生複製的病毒 PPV 之慢性感染長期監測細胞免疫的攻毒實驗中，SLA 豬 (haplotype H7/H7) 攻毒後於第 101 天發生病毒特異性的淋巴球增殖反應，增殖的細胞亞群為 CD4⁺ CD8⁺ 代表免疫記憶反應，但於 in vitro PPV 再刺激無法活化 CTL (Ladekjaer-Mikkelsen and Nielsen, 2002)，因此本實驗偵測的時間點可能為影響因素之一。四、引發記憶免疫需要重複暴露抗原，於本實驗離體免疫細胞只給予一次 PCV2 superinfection，可能不足以引起記

憶反應。病毒引發之 CD8⁺ 記憶及二次反應以 A 型流感病毒研究較詳盡，報導指出當記憶型 T 細胞達到一定數目，病毒抗原劑量決定二次反應；若記憶反應低落，記憶型 T 細胞數目為決定二次反應主要因素 (Kedzierska et al., 2006)。五、目前已知 PCV2 藉由垂直傳染，而先天感染造成持續性感染，由於幼年淋巴球分化期遭病毒引發免疫耐受性，則免疫系統不產生病毒特異性反應 (Liess, 1988)，本批實驗豬來自 PCV2 污染場，可能具有先天感染使 T 細胞無法辨識具有耐受性的病毒抗原 (anergic)。六、持續感染造成 T 細胞無效應，慢性小鼠腦膜炎病毒 (LCMV) 感染 CD4^{-/-} 基因缺損小鼠，發現無效應之病毒特異性 CD8 (effector-function-negative virus-specific CD8) 的存在，然其毒殺感染細胞能力低落，以及不產生脾臟 IFN- γ 分泌細胞，無法清除病毒 (Zajac et al., 1998)。其他造成無免疫效應的假說還有：慢性感染或持續感染時，CD4 對再感染 (superinfection) 不反應，且產生無效應之 CD4 不製造 IL-2，然 CD8 需要 Th1 分泌 IL-2 促進成熟分化，而因此造成 CD8 的流失 (Brooks et al., 2005)；於全身性感染 LCMV 時，專業型抗原呈現細胞 (APC) 被破壞，大量之非專業 APC 出現並含有病毒抗原，誘導無功能性的 CD8 T 細胞產生 (Borrow et al., 1995)。由於實驗豬於 5 週齡至實驗結束血清或細胞均檢測到低量病毒核酸，且病毒量無顯著隨年齡變化趨勢，因此根據文獻分類本實驗帶原豬屬於慢性非進行性感染模式 (Murphy, 1999)，可能產生無效應的免疫細胞，造成本實驗中病毒特異性增殖反應及細胞激素分泌低弱。

第四節 總結

本實驗的目的在探討豬第二型環狀病毒如何影響 Con A 刺激 PBMC 及脾臟細胞增殖。實驗第一部分以自然感染帶原豬，分析帶原不同 PCV2 病毒量細胞反應，發現血清不含病毒豬之 PBMC，單獨以 PCV2 superinfected 或 Con A 刺激 PBMC 均無顯著差異。但於 PCV2 superinfected 促進 Con A 刺激增殖反應時，反之於血清含高病毒量時，此現象消失且增殖反應隨病毒含量增加而受抑制，且血清及培養上清液出現 IL-10。因此第二部分研究攻毒 SPF 豬，探討含高病毒豬群的 PBMC 及脾臟細胞增殖，PCV2 superinfected 是否影響 Con A 刺激細胞。發現未攻毒者之 PBMC，PCV2 superinfected 促進 Con A 刺激的增殖反應且促進病毒複製。攻毒豬隻無此現象，相對於未攻毒者病毒含量及培養上清液之 IL-10 濃度

很高而增殖反應低弱，此外 PCV2 superinfected 有抑制 Con A 刺激脾臟增殖反應。顯示 Con A 刺激 PBMC 增殖反應受豬帶原病毒量影響，高病毒量時 PCV2 superinfected 促進 IL-10 分泌，可能造成增殖反應低弱。Taga 等人曾報告 IL-10 抑制 Con A，PHA 及抗 CD3 單株抗體刺激的人類 T 細胞增殖反應，認為 IL-10 藉由抑制 IL-2 分泌抑制 T 細胞增殖反應 (Taga et al., 1992)。本研究以 Con A 刺激模擬免疫活化模式，觀察到病毒量以及 PCV2 superinfected 可能藉由 IL-10 分泌影響免疫細胞增殖。推論感染豬若經過免疫刺激，病毒複製增加及 IL-10 分泌，可能使免疫細胞功能受損，造成臨床症狀更易發生。



第六章 文獻回顧

- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999, Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121, 1-11.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Botner, A., McCullough, K., Nauwynck, H., Kennedy, S., Meehan, B., Charreyre, C., 2004, PMWS: experimental model and co-infections. *Vet Microbiol* 98, 165-168.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000a, Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145, 2421-2429.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1998, Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10, 3-10.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., 2000b, Immunostimulation, PCV-2 and PMWS. *Vet Rec* 147, 170-171.
- Allan, G.M., McNeilly, F., McMenamy, M., McNair, I., Krakowka, S.G., Timmusk, S., Walls, D., Donnelly, M., Minahin, D., Ellis, J., Wallgren, P., Fossum, C., 2007, Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest* 19, 668-673.
- Andraud, M., Grasland, B., Durand, B., Cariolet, R., Jestin, A., Madec, F., Rose, N., 2008, Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV-2) within- and between-pen transmission in pigs. *Vet Res* 39, 43.
- Ansari, A.A., Pereira, L.E., Mayne, A.E., Onlamoon, N., Pattanapanyasat, K., Mori, K., Villinger, F., 2007, The role of disease stage, plasma viral load and regulatory T cells (Tregs) on autoantibody production in SIV-infected non-human primates. *J Autoimmun* 28, 152-159.

- Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., Havlir, D.V., Richman, D.D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., 2000, HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192, 63-75.
- Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., Raidal, S.R., 1998, Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249, 453-459.
- Baumgarten, E., Brand, M.D., Pozzan, T., 1983, Mechanism of activation of pyruvate dehydrogenase by mitogens in pig lymphocytes. *Biochem J* 216, 359-367.
- Bernabei, P., Coccia, E.M., Rigamonti, L., Bosticardo, M., Forni, G., Pestka, S., Krause, C.D., Battistini, A., Novelli, F., 2001, Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol* 70, 950-960.
- Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B., Oldstone, M.B., 2006, Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12, 1301-1309.
- Brunborg, I.M., Moldal, T., Jonassen, C.M., 2004, Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 122, 171-178.
- Carasova, P., Celer, V., Takacova, K., Trundova, M., Molinkova, D., Lobova, D., Smola, J., 2007, The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res Vet Sci* 83, 274-278.
- Carter, C.C., Gorbacheva, V.Y., Vestal, D.J., 2005, Inhibition of VSV and EMCV replication by the interferon-induced GTPase, mGBP-2: differential requirement for wild-type GTP binding domain. *Arch Virol* 150, 1213-1220.
- Chae, C., 2005, A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169, 326-336.
- Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R.B., Rowland, R.R., Dunham, A.G., 2007, Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 152, 1035-1044.
- Chung, W.B., Chan, W.H., Chaung, H.C., Lien, Y., Wu, C.C., Huang, Y.L., 2005, Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome

- virus and porcine circovirus type 2 in naturally-infected and challenged pigs. *J Virol Methods* 124, 11-19.
- Clerici, M., Wynn, T.A., Berzofsky, J.A., Blatt, S.P., Hendrix, C.W., Sher, A., Coffman, R.L., Shearer, G.M., 1994, Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 93, 768-775.
- Darwich, L., Balasch, M., Plana-Duran, J., Segales, J., Domingo, M., Mateu, E., 2003a, Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 84, 3453-3457.
- Darwich, L., Pie, S., Rovira, A., Segales, J., Domingo, M., Oswald, I.P., Mateu, E., 2003b, Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 84, 2117-2125.
- Darwich, L., Segales, J., Mateu, E., 2004, Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149, 857-874.
- Darwich, L., Segales, J., Resendes, A., Balasch, M., Plana-Duran, J., Mateu, E., 2008, Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Res Vet Sci* 84, 194-198.
- Drew, T.W., 2000, A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res* 31, 27-39.
- Ejrnaes, M., Filippi, C.M., Martinic, M.M., Ling, E.M., Togher, L.M., Crotty, S., von Herrath, M.G., 2006, Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *J Exp Med* 203, 2461-2472.
- Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., Haines, D., 1998, Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39, 44-51.
- Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S., McNeilly, F., 1999, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11, 3-14.

- Fort, M., Fernandes, L.T., Nofrarias, M., Diaz, I., Sibila, M., Pujols, J., Mateu, E., Segales, J., 2008, Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Grasland, B., Loizel, C., Blanchard, P., Oger, A., Nignol, A.C., Bigarre, L., Morvan, H., Cariolet, R., Jestin, A., 2005, Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet Res* 36, 685-697.
- Grierson, S.S., King, D.P., Tucker, A.W., Donadeu, M., Mellencamp, M.A., Haverson, K., Banks, M., Bailey, M., 2007, Ontogeny of systemic cellular immunity in the neonatal pig: Correlation with the development of post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119, 254-268.
- Hansen, T.V., Rehfeld, J.F., Nielsen, F.C., 1999, Mitogen-activated protein kinase and protein kinase A signaling pathways stimulate cholecystokinin transcription via activation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein. *Mol Endocrinol* 13, 466-475.
- Hino, S., Miyata, H., 2007, Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol* 17, 45-57.
- Hjulsager, C.K., Grau-Roma, L., Sibila, M., Enoe, C., Larsen, L., Segales, J., 2009, Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Vet Microbiol* 133, 172-178.
- Jacobsen, B., Krueger, L., Seeliger, F., Bruegmann, M., Segales, J., Baumgaertner, W., 2009, Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. *Vet Microbiol*.
- Katze, M.G., He, Y., Gale, M., Jr., 2002, Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2, 675-687.
- Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Horino, R., Katsuda, K., Onodera, T., Shoji, T., Kubo, M., Haritani, M., Murakami, Y., 2003, Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. *J Comp Pathol* 129, 294-302.
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2000, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting

- syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122, 9-24.
- Kim, J., Chae, C., 2003, Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67, 133-137.
- Knapp, S., Hennig, B.J., Frodsham, A.J., Zhang, L., Hellier, S., Wright, M., Goldin, R., Hill, A.V., Thomas, H.C., Thursz, M.R., 2003, Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 55, 362-369.
- Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Rings, D.M., Allan, G., 2007, *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins and porcine circovirus type 2 (PCV2) infection: induction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the gnotobiotic swine model of PCV2-associated disease. *Can Vet J* 48, 716-724.
- Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001, Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38, 31-42.
- Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000, Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37, 254-263.
- Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., 2002, A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with porcine parvovirus. *Viral Immunology* 15, 373-384.
- Lefebvre, D.J., Meerts, P., Costers, S., Misinzo, G., Barbe, F., Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., 2008, Increased porcine circovirus type 2 replication in porcine leukocytes in vitro and in vivo by concanavalin A stimulation. *Vet Microbiol* 132, 74-86.
- Liess, B., 1988, [Virus persistence--a key phenomenon of BVD virus infection]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 95, 264-266.
- Lin, C.M., Jeng, C.R., Chang, H.W., Guo, I.C., Huang, Y.L., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Pang, V.F., 2008, Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection

- in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 124, 355-366.
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005, Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 79, 8262-8274.
- Magar, R., Muller, P., Larochelle, R., 2000, Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res* 64, 184-186.
- Mandrioli, L., Sarli, G., Panarese, S., Baldoni, S., Marcato, P.S., 2004, Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 97, 25-37.
- Mankertz, A., Hillenbrand, B., 2001, Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* 279, 429-438.
- Marinic, I., Gagro, A., Rabatic, S., 2006, [Regulatory T cells]. *Acta Med Croatica* 60, 447-456.
- McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B.M., Foster, J.C., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Adair, B.M., Allan, G.M., 1999, A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods* 80, 123-128.
- McNeilly, F., McNair, I., Mackie, D.P., Meehan, B.M., Kennedy, S., Moffett, D., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2001, Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol* 146, 909-922.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998, Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9), 2171-2179.
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006, Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res* 2, 6.
- Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A., Nauwynck, H.J., 2005, Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 18, 333-341.

- Misinzo, G., Meerts, P., Bublot, M., Mast, J., Weingartl, H.M., Nauwynck, H.J., 2005, Binding and entry characteristics of porcine circovirus 2 in cells of the porcine monocytic line 3D4/31. *J Gen Virol* 86, 2057-2068.
- Miyazoe, S., Hamasaki, K., Nakata, K., Kajiya, Y., Kitajima, K., Nakao, K., Daikoku, M., Yatsushashi, H., Koga, M., Yano, M., Eguchi, K., 2002, Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 97, 2086-2092.
- Mizoue, T., Kawamoto, H., Arita, K., Kurisu, K., Tominaga, A., Uozumi, T., 1997, MIB1 immunopositivity is associated with rapid regrowth of pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)* 139, 426-431; discussion 431-422.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S., 1998, Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36, 2535-2541.
- Muhling, J., Raye, W.S., Buddle, J.R., Wilcox, G.E., 2006, Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. *Aust Vet J* 84, 421-425; discussion 416.
- Murphy, F.A., 1999, *Veterinary virology*, 3rd Edition. Academic Press, San Diego, x, 629 p. pp.
- Nielsen, H.B., Pedersen, B.K., 1997, Lymphocyte proliferation in response to exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75, 375-379.
- Nielsen, J., Vincent, I.E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003, Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 92, 97-111.
- Nika, J., Rippel, S., Hannig, E.M., 2001, Biochemical analysis of the eIF2beta gamma complex reveals a structural function for eIF2alpha in catalyzed nucleotide exchange. *J Biol Chem* 276, 1051-1056.
- O'Farrell, A.M., Parry, D.A., Zindy, F., Roussel, M.F., Lees, E., Moore, K.W., Mui, A.L., 2000, Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. *J Immunol* 164, 4607-4615.
- Obaya, A.J., Mateyak, M.K., Sedivy, J.M., 1999, Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18, 2934-2941.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007, Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175-185.

- Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 2004, Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117, 75-80.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Yu, S., Evans, R.B., Cavanaugh, D., Gallup, J.M., Pallares, F.J., Thacker, E.L., Lager, K.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004a, Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* 98, 209-220.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007, Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19, 591-615.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004b, Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41, 624-640.
- Opriessnig, T., Yu, S., Gallup, J.M., Evans, R.B., Fenaux, M., Pallares, F., Thacker, E.L., Brockus, C.W., Ackermann, M.R., Thomas, P., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2003, Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* 40, 521-529.
- Paladino, N., Fainboim, H., Theiler, G., Schroder, T., Munoz, A.E., Flores, A.C., Galdame, O., Fainboim, L., 2006, Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. *J Virol* 80, 9144-9150.
- Pallares, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J., 2002, Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 14, 515-519.
- Persico, M., Capasso, M., Persico, E., Masarone, M., Renzo, A., Spano, D., Bruno, S., Iolascon, A., 2006, Interleukin-10 - 1082 GG polymorphism influences the occurrence and the clinical characteristics of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 45, 779-785.
- Quintana, J., Segales, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodriguez-Arriola, G.M., Chianini, F., Folch, J.M., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2001,

- Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Rec* 149, 357-361.
- Ramana, C.V., Grammatikakis, N., Chernov, M., Nguyen, H., Goh, K.C., Williams, B.R., Stark, G.R., 2000, Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 19, 263-272.
- Rau, H., Revets, H., Balmelli, C., McCullough, K.C., Summerfield, A., 2006, Immunological properties of recombinant classical swine fever virus NS3 protein in vitro and in vivo. *Vet Res* 37, 155-168.
- Raveh, T., Hovanessian, A.G., Meurs, E.F., Sonenberg, N., Kimchi, A., 1996, Double-stranded RNA-dependent protein kinase mediates c-Myc suppression induced by type I interferons. *J Biol Chem* 271, 25479-25484.
- Redpath, S., Ghazal, P., Gascoigne, N.R., 2001, Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 9, 86-92.
- Ritzmann, M., Wilhelm, S., Zimmermann, P., Etschmann, B., Bogner, K.H., Selbitz, H.J., Heinritzi, K., Truyen, U., 2005, [Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112, 348-351.
- Rodriguez-Arrioja, G.M., Segales, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2003, Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50, 99-101.
- Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arrioja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S., Domingo, M., 1999, Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120, 59-78.
- Salic, A., Mitchison, T.J., 2008, A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2415-2420.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004, Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75, 163-189.
- Segales, J., Alonso, F., Rosell, C., Pastor, J., Chianini, F., Campos, E., Lopez-Fuertes, L., Quintana, J., Rodriguez-Arrioja, G., Calsamiglia, M., Pujols, J., Dominguez,

- J., Domingo, M., 2001a, Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81, 37-44.
- Segales, J., Alonso, F., Rosell, C., Pastor, J., Chianini, F., Campos, E., Lopez-Fuertes, L., Quintana, J., Rodriguez-Arrioja, G., Calsamiglia, M., Pujols, J., Dominguez, J., Domingo, M., 2001b, Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 81, 37-44.
- Segales, J., Domingo, M., 2002, Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24, 109-124.
- Segales, J., Domingo, M., Chianini, F., Majo, N., Dominguez, J., Darwich, L., Mateu, E., 2004, Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol* 98, 151-158.
- Shibahara, T., Sato, K., Ishikawa, Y., Kadota, K., 2000, Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci* 62, 1125-1131.
- Shin, H.D., Winkler, C., Stephens, J.C., Bream, J., Young, H., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Vlahov, D., Buchbinder, S., Giorgi, J., Rinaldo, C., Donfield, S., Willoughby, A., O'Brien, S.J., Smith, M.W., 2000, Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14467-14472.
- Sieg, S., King, C., Huang, Y., Kaplan, D., 1996, The role of interleukin-10 in the inhibition of T-cell proliferation and apoptosis mediated by parainfluenza virus type 3. *J Virol* 70, 4845-4848.
- Sipos, W., Duvigneau, J.C., Willheim, M., Schilcher, F., Hartl, R.T., Hofbauer, G., Exel, B., Pietschmann, P., Schmoll, F., 2004, Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99, 63-71.
- Staebler, S., Sydler, T., Buergi, E., McCullough, K., McNeilly, F., Allan, G., Pospischil, A., 2005, PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *Vet J* 170, 132-134.

- Stevenson, L.S., Gilpin, D.F., Douglas, A., McNeilly, F., McNair, I., Adair, B.M., Allan, G.M., 2007, T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunol* 20, 389-398.
- Stevenson, L.S., McCullough, K., Vincent, I., Gilpin, D.F., Summerfield, A., Nielsen, J., McNeilly, F., Adair, B.M., Allan, G.M., 2006, Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* 19, 189-195.
- Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T.W., Taki, S., Taniguchi, T., 1997, DNA damage-induced apoptosis and Ice gene induction in mitogenically activated T lymphocytes require IRF-1. *Leukemia* 11 Suppl 3, 439-440.
- Tischer, I., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S., 1987, Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96, 39-57.
- Taga, K., J. Chretien, B. Cherney, L. Diaz, M. Brown, and G. Tosato. 1994. Interleukin-10 inhibits apoptotic cell death in infectious mononucleosis T cells. *J. Clin. Invest.* 94:251.
- Taga, K., and G. Tosato. 1992. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J. Immunol.* 148:1143. 52.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003, Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* 77, 13288-13300.
- Wang, C., Huang, T.S., Huang, C.C., Tu, C., Jong, M.H., Lin, S.Y., Lai, S.S., 2004, Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. *J Vet Med Sci* 66, 469-475.
- Wherry, E.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., Ahmed, R., 2003, Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77, 4911-4927.
- Yu, S., Halbur, P.G., Thacker, E., 2008, Effect of porcine circovirus type 2 infection and replication on activated porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*.
- Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007a, Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 261-272.

- Yu, S., Vincent, A., Opriessnig, T., Carpenter, S., Kitikoon, P., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007b, Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet Microbiol* 123, 34-42.
- Yue, F., Cui, S., Zhang, C., Yoon, K.J., 2009, A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. *Virus Genes*.
- Zajac, A.J., Blattman, J.N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D.J., Suresh, M., Altman, J.D., Ahmed, R., 1998, Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188, 2205-2213.

