

國立臺灣大學獸醫專業學院
分子暨比較病理生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Molecular and Comparative Pathobiology
School of Veterinary Medicine
National Taiwan University
Master Thesis

活體外第二型豬的環狀病毒和豬瘟疫苗毒
對單核球來源樹突細胞的影響

The Effects of Porcine Circovirus type 2 (PCV2) and
Lapinized Philippines Coronel Virus (LPCV) on
Monocyte-Derived Dendritic Cells (MoDCs) *in vitro*

吳雨軒

Yu-Hsuan Wu

指導教授：鄭謙仁 博士

龐 飛 博士

Advisor: Chian-Ren Jeng, D. V. M, Ph.D.

Victor Fei Pang, D. V. M, Ph.D.

中華民國 103 年 6 月

June 2014

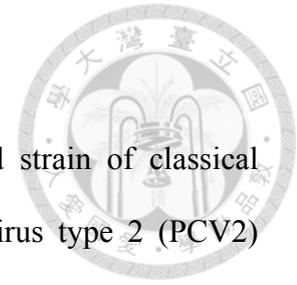
中文摘要



兔化豬瘟疫苗(Lapinized Philippines Coronel, LPC)為豬瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)的減毒株，目前已有研究指出第二型豬環狀病毒(Porcine Circovirus type 2, PCV2)的感染會減少LPC疫苗的保護效力，為了探討PCV2影響LPC疫苗的可能機制，本研究使用單核球來源之樹突細胞(Monocyte-derived dendritic cells, MoDCs)進行活體外的相關分析，以探討PCV2和豬瘟病毒株(LPC Virus, LPCV)之間的交互作用。結果顯示，當PCV2和LPCV共同感染時，在早期可檢測到IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- α 和TNF- α 有較高的mRNA表現量，在蛋白質層次也檢測到IL-8、IL-12p40和INF- γ 有較高的表現量，另外也發現PCV2的感染會使MoDCs的存活率減低，凋亡率和壞死率升高。從本研究的實驗結果推論PCV2所誘導的免疫反應，特別是高表現的量的INF- γ 以及誘導MoDCs的凋亡或許可以解釋PCV2影響LPC疫苗效價的部分原因。

關鍵字：豬瘟病毒、兔化豬瘟疫苗、豬第二型環狀病毒、豬單核球來源樹突細胞、體外培養

Abstract



The Lapinized Philippines Coronel (LPC) vaccine, an attenuated strain of classical swine fever virus (CSFV), it has been noted that porcine circovirus type 2 (PCV2) infection adversely affects the protective efficacy of LPC vaccine. In order to investigate the possible mechanisms of the PCV2-derived interference, an *in vitro* model was established to study the interaction of LPC virus (LPCV) and PCV2 in Monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). The results showed that IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α and TNF- α mRNA expression can be detected in early stage of PCV2 and LPCV co-infection in MoDCs. In addition, higher protein level of IL-8, IL-12p40 and INF- γ was also compatible present. Finally, apoptosis and low survival rate can be induced by PCV2 and PCV2/LPCV in the late stage culture of MoDCs. The results of the present study may partially explain how PCV2 infection interferes with the efficacy of LPC vaccine.

Key words: classical swine fever virus, porcine circovirus type 2, Lapinized Philippine Coronel vaccine, monocyte-derived dendritic cells , *in vitro*



目錄

中文摘要	i
英文摘要	ii
目錄	iii
表次	v
圖次	vi
第一章 序言	1
第二章 文獻回顧	2
第一節 豬瘟病毒	
1-1 病毒學分類	2
1-2 歷史背景與流行病學	3
1-3 豬瘟病毒的傳播方式	4
1-4 臨床症狀與病理變化	5
1-5 致病機轉	6
1-6 豬瘟病毒的標的細胞與免疫調控	6
1-7 兔化豬瘟疫苗與次單位豬瘟疫苗	8
第二節 豬第二型環狀病毒	
2-1 病毒學分類	9
2-2 歷史背景與流行病學	10
2-3 豬環狀病毒傳播方式	11
2-4 臨床症狀與離乳後多系統性消耗症候群	11
2-5 豬環狀病毒標的細胞與免疫調控	12
第三節 豬相關病毒共同感染之免疫干擾	
3-1 豬第二型環狀病毒與相關病毒共同感染	13
3-2 豬第二型環狀病毒影響兔化豬瘟疫苗之效價	16
第四節 豬單核球來源之樹突細胞研究模式	
4-1 豬單核球來源樹突細胞簡介	19
第三章 材料與方法	22
第一節 實驗設計	
1-1 實驗設計與流程圖	22
第二節 實驗材料	
2-1 實驗動物	23
2-2 血球分離相關藥品	23
2-3 細胞培養液和試劑	24
2-4 豬第二型環狀病毒與兔化豬瘟疫苗病毒株	25
2-5 核酸萃取及聚合酶鍊鎖反應之藥品	25
2-6 流式細胞儀相關藥品	25
2-7 酵素連結免疫分析法	26
2-8 免疫螢光染色相關試劑	27
2-9 儀器	27
第三節 實驗方法	
3-1 細胞分離與培養	27



3-1.1 豬周邊血液單核細胞的分離與純化	27
3-1.2 MACS 磁珠系統分選 SWC3 ⁺ 細胞與培養	28
3-2 豬第二型環狀病毒對兔化豬瘟疫苗在樹突細胞的影響	29
3-2.1 以免疫螢光染色法檢測病毒對樹突細胞的感染率	29
3-2.2 以流式細胞儀檢測細胞表面抗原	30
3-2.3 以 AV-FITC/PI 染色檢測細胞凋亡和壞死率	31
3-2.4 S. aureus-FITC 檢測細胞攝取顆粒性抗原的能力	32
3-2.5 DQ TM -OVA 檢測細胞攝取可溶性抗原的能力	32
3-2.6 以酵素連結免疫分析法檢測細胞激素蛋白表現量	33
3-2.7 以 Real-time PCR 偵測細胞激素 mRNA 表現量	34
3-3 統計分析	35
第四章 結果	
第一節 細胞純化	37
第二節 豬第二型環狀病毒對兔化豬瘟疫苗在單核球來源樹突細胞的影響	
2-1 病毒對單核球來源之樹突細胞感染率	37
2-2 單核球來源之樹突細胞相關細胞表面抗原表現結果	38
2-3 感染病毒後細胞之存活率、壞死率與凋亡率	38
2-4 細胞攝取抗原之能力	41
2-5 單核球來源之樹突細胞相關細胞激素蛋白質的表現量	42
2-6 單核球來源之樹突細胞相關細胞激素 mRNA 的表現量	44
第五章 討論	54
第六章 參考資料	63

Table 1. 引子序列

表次



36

圖次



- Fig.1. 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種 47
於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)免疫螢光染色(IFA)
- Fig.2. 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種 48
於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)後的感染率(Infection Rate)
- Fig.3. 單核球來源之樹突細胞(MoDCs)細胞表面抗原 CD14、CD80、 49
CD86、MHC I 和 MHC II 在接種豬的第二型環狀病毒(PCV2)和
兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)後的第 48 小時之表現情形
- Fig.4. 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種 50
於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)後細胞存活、凋亡及死亡的情
形
- Fig.5. 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種 51
於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)後細胞攝取抗原的能力
- Fig.6. 單核球來源之樹突細胞(MoDCs)在豬的第二型環狀病毒(PCV2) 52
和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)感染後所誘導的細胞激素
(Cytokine)和 Toll-like receptor(TLR)之 mRNA 相對表現量
- Fig.7. 單核球來源之樹突細胞(MoDCs)在豬的第二型環狀病毒(PCV2) 53
和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)感染後所誘導的細胞激素
(Cytokine)蛋白質表現量



第一章 序言

豬瘟為豬隻高致死性之病毒性疾病，臨床上以發燒及全身臟器出血為主徵，感染率與死亡率均高達 95%。豬瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)對免疫細胞具有特殊的親和性，會造成白血球減少症及淋巴細胞的流失等，故免疫系統的傷害是該疾病最重要的致病機制。從日據時代以來，豬瘟病毒始終嚴重困擾著國內養豬產業，並造成嚴重經濟損失。此現象持續至李崇道及林再春博士研發出兔化豬瘟疫苗(Lapinized Philippines Coronel Vaccine, LPCV)後，方使整體豬瘟疫情獲得控制。由於此疫苗可藉由誘發體液性與細胞性免疫反應達到完全保護的功效，因此，LPC 疫苗長久已被視為防治與控制豬瘟的重要利器。近年，隨著第二型豬環狀病毒(Porcine Circovirus type 2, PCV2)的入侵，國內養豬場幾乎皆已受到此病毒的侵襲。此病毒可導致離乳仔豬罹患離乳後多系統性消耗症候群(PMWS)和表現嚴重的免疫抑制，而 PMWS 是最普遍的 PCV2 相關疾病(PCV2-associated diseases, PCVAD)。PCVAD 在全球的養豬產業中常造成嚴重的經濟損，PMWS 通常好發於出生後 20-120 天的豬隻，尤其是出生後 60-80 天的豬隻罹患 PMWS 的機率最高，這段時間剛好和兔化豬瘟疫苗(LPC)的免疫適應期重疊，這對 LPC 疫苗所誘導的免疫保護有不利的影響。本實驗室在先前已觀察到 PCV2 感染會降低兔化豬瘟減毒疫苗效力的情形，在實驗當中，如果沒有先感染 PCV2，在遇到野生型(wild-type)豬瘟病毒時，LPCV 可以給予豬隻完全的保護，不會出現發燒、病毒血症和病毒釋出於唾液或糞便等臨床症狀。但如果已有 PCV2 的存在時，幾乎多數的豬隻即使有接種 LPCV，還是會出現發燒等臨床症狀，此結果證明 LPCV 的效力會因為 PCV2 而減低。雖然上述研究結果在臨床上對於豬隻或許不會引起直接的影響，但對於一個群體的免疫防治計畫卻出現很大的漏洞，wild-type 的豬瘟病毒很有可能因此進入農場，造成潛伏性的感染甚至引起疫情的爆發。目前，對於 PCV2 的免疫抑制能力以及干擾其他病毒功能之機制尚未清楚，因此為釐清兩種病毒之間的交互作用，為此論文研究之目標。

第二章 文獻回顧



第一節 豬瘟病毒

1-1 病毒學分類

豬瘟病毒(Classic swine fever virus, CSFV)是一種小型,具有套膜的正單股RNA病毒,屬於黃病毒科(Flaviviridae),瘟疫病毒屬(Pestivirus)。瘟疫病毒屬包括四種病毒:豬瘟病毒(CSFV)、第一型牛病毒性下痢病毒(bovine viral diarrhea, BVDV)-1、第二型牛病毒性下痢病毒(BVDV-2)及羊先天髓鞘形成不全病毒(Border disease virus, BDV) (Becher et al., 1999)。豬瘟病毒在 pH 5-10 的環境下能穩定生存,當 pH 值小於 5、使用有機溶劑(例如乙醚或氯仿)、清潔劑及氫氧化鈉(2%)可去除豬瘟病毒之活性。然而,豬瘟病毒在冷、潮濕和蛋白質豐富的環境條件下可存活於 20°C 兩個星期,4°C 則可存活六個星期以上(Haas et al., 1995)。

豬瘟病毒的基因長度大約為 12.3kb,其中在 5'非轉譯區包括 375 nt 的內部核糖體進入位(Internal Ribosome Entry Site, IRES)、一個開放性閱讀框架(Open reading frame, ORF),其編碼長度約為 3898 個胺基酸大小的蛋白質(polyprotein)和包括 230 nt 的 3'非轉譯區。此蛋白質經由病毒本身的轉譯和宿主水解蛋白質(protease)的酵素處理後,可形成四個結構性和八個非結構性且具有功能的蛋白質: NH₂-N^{pro}-C-E^{ms}-E1-E2-p7-NS2.3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH (Lindenach et al., 2001; Le Potier et al., 2006)。這些結構性和非結構性蛋白的功能已經被研究和描述,而當病毒顆粒經由宿主細胞的胞釋作用釋出時,在形態學上通常不會造成細胞的損傷(Lindenach et al., 2001; Le Potier et al., 2006)。在豬瘟病毒的複製過程中, N^{pro} 蛋白是第一個被編碼出的非結構性蛋白,在此過程中, N^{pro} 蛋白和 C 蛋白之間會自動裂解開來,分裂的位置會直接突變形成具有水解蛋白功能的 Glu-22、His-49 和 Cys-69(Lindenach et al., 2001)。結構性蛋白包括核糖蛋白衣(nucleocapsid) C 蛋白以及套膜糖蛋白(envelope glycoprotein) E^{ms}、E1 和 E2,其中 C 蛋白是使 E^{ms} 糖蛋白進入到內質網中的起始信號(Lindenach et al., 2001), E^{ms} 糖蛋白會強力與細胞表面受體結合,降解核糖核酸,此蛋白對淋巴球具有毒性,在感染豬瘟病毒的期間也會誘導中和抗體的表現(van Gennip et al., 2005)。另外, E2 糖蛋白會與細胞表面

受體結合並誘導中和抗體，但是 E2 糖蛋白結合的受體和 E^{ms} 糖蛋白結合的受體不同 (Hulst et al., 1997)。NS3 蛋白具有 RNA 解旋酶、絲氨酸水解蛋白和 RNA-stimulated NTPase 的活性，其中絲氨酸水解蛋白會裂解 NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B (Lindenach et al., 2001)。NS4A 蛋白係 NS3 絲氨酸水解蛋白的輔因子。NS5A 蛋白推測為在 RNA 複製時之磷酸化蛋白。NS5B 蛋白為核糖核酸聚合酶，負責將 RNA 引子模板延伸製作成雙股 RNA (Xiao et al., 2003)。

1-2 歷史背景與流行病學

豬瘟病毒的基因型(genotypes)分為 1、2、3 共三種，依照 E2 和 NS5B 的部分序列，每個基因型又可區分為三到四種亞型(sub-genotype)：1.1、1.2、1.3；2.1、2.2、2.3；3.1、3.2、3.3、3.4 (Paton et al., 2000)，有關豬瘟病毒在基因庫中的分子流行病學是非常重要的，在爆發疫情的地區可以幫助瞭解病毒的來源為何，並且能針對此病毒提出適當的撲滅計畫(Vileck et al., 2006)。一般而言，作為經濟動物使用的豬隻在澳洲、紐西蘭、北美洲和歐洲西部，豬瘟已經被清除(Paton et al., 2000)，然而，近十年在歐洲中部和東部、拉丁美洲及某些亞洲國家豬瘟又再度出現；在歐洲，所有的豬瘟在 1970 年前發現時皆為第一基因型，但是在 1980 年到 1990 年這段時期，開始從各個歐洲國家分離出不同的基因型，例如 sub-genotype 2.1、2.2 和 2.3 (Paton et al., 2000; Stergeman et al., 2000; Biagetti et al., 2001)。

目前在某些歐洲國家爆發的豬瘟病毒，被懷疑和野生豬隻的遷徙有關(Paton et al., 2000; Leifer et al., 2010)，在拉丁美洲只有第一型豬瘟病毒被發現的相關研究報導，在此地區流行的是 sub-genotype 1.1、1.2 和 1.3 (Paton et al., 2000; Pereda et al., 2005; Sabogal et al., 2006)。另外也從古巴分離出 sub-genotype 1.2，從宏都拉斯和瓜地馬拉則分離出 sub-genotype 1.3，目前也持續從阿根廷、巴西、哥倫比亞和墨西哥分離出 sub-genotype 1.1 和疫苗病毒株(Pereda et al., 2005)。在亞洲地區，豬瘟病毒相當普遍存在，亞洲地區不同的國家中都曾分離出第 1、2、3 型的豬瘟病毒(Sarma et al., 2011; Blacksell et al., 2005; Desai et al., 2010)。然而，台灣在 1996 年以前發現的豬瘟病毒株幾乎皆為 sub-genotype 3.4，直到 1994 年分離出 sub-genotype 2.1 和 2.2 開始逐漸取代 sub-genotype 3.4(Pan et al., 2005)。



1-3 豬瘟病毒的傳播方式

豬瘟病毒主要的傳播方式分為兩種，分別為垂直傳染和水平傳染；垂直傳染中：病毒在妊娠母豬體內經由胎盤傳染給胎兒，並可能導致流產、死胎、木乃伊胎及仔豬持續帶有豬瘟病毒(Le Potier et al., 2006; Dewulf et al., 2005)。水平感染：糞口傳染為最普遍的傳播途徑，豬隻可經由直接接觸、口鼻腔分泌物、結膜、尿液及糞便受到感染。在歐洲，野豬是很重要的帶原者，豬瘟病毒會從野豬傳染到家豬，主要是因為家豬間接食用到野豬的內臟或飼料受到野豬汙染，甚至是獵人所使用過的器具(Dewulf et al., 2005; Leifer et al., 2010)。人類、齧齒類、寵物、節肢動物和運送過豬隻的車輛都可能機械性的帶原病毒，將豬瘟病毒從疫區帶到非疫區使豬瘟疫情爆發。如病毒是經由人的方式傳播，最常發生在獸醫、豬人工授精操作者、篩檢者和生意人的衣服或物品受到被動性的汙染(Le Potier et al., 2006; Dewulf et al., 2005)。運輸工具方面，如卡車、拖吊車和客車，皆能攜帶受到病毒汙染的糞便和尿液移動一段很長的距離(Dewulf et al., 2005)。

目前已經有實驗證明馬蠅也是相當重要的傳播因子，馬蠅可將豬瘟病毒從受到感染的豬隻帶到未受感染的豬隻身上(Dewulf et al., 2005)。事實上，也有實驗證明空氣傳播也是豬瘟病毒傳播的途徑之一(Weesendorp et al., 2009)。十隻受到豬瘟病毒感染的豬能在空氣層中生產超過 10^3 TCID₅₀/m³ 具有感染性的豬瘟病毒，和 400 m³/h 的空氣流通率，每隻豬每天估計最大量能散佈 $10^{6.1}$ TCID₅₀ 的病毒量在空氣層中(Weesendorp et al., 2009)。豬瘟病毒能散播不同的致死性病毒株，主要的原因是當豬隻受到強毒株的豬瘟病毒感染時所排出的唾液、糞便、尿液和口腔結膜都含有超過 10^5 TCID₅₀/ml/day 的病毒量，甚至鼻腔內的液體病毒量達到 10^7 TCID₅₀/ml/day 以上。當感染中等毒性的豬瘟病毒時，病毒同樣也會在分泌物和排泄物中慢性排出，雖然慢性感染所排出的病毒量較低，但病毒排出可維持 30 天以上，且最後排出的病毒總量大於強毒株誘導的急性期所排出的病毒量。然而，當豬隻感染較低毒性的豬瘟病毒株或正處於恢復期時，所排出的病毒量較少且時間較短；目前豬瘟病毒的傳播還是以慢性感染豬隻，並長時間地排出大量病毒為主(Weesendorp et al., 2009)。



1-4 臨床症狀與病理變化

感染豬瘟病毒所造成的死亡率和臨床症狀不僅和病毒株的毒性有關，和宿主本身的體重、年齡、健康狀況及免疫情形也有關聯(Moennig et al., 2003)。當豬隻感染強毒株所引起的急性全身性出血熱時，幾天內就會死亡，其他急性期的症狀為高燒、食慾不振、嗜睡、結膜充血、腹瀉及耳朵、鼻子、腿部和尾巴的皮膚出現紅黑色的斑點(Moennig et al., 2003)。當豬隻感染中等毒性病毒株時，根據病程的發展可能會導致死亡、慢性感染或康復等不同的情況，因此也會出現不同的亞型症狀(Floegel-Niesmann et al., 2003)。通常豬隻於亞急性期所表現的症狀會比急性期和緩，當亞急性期的豬隻存活超過 30 天以上時，這些豬可能會復原或進入慢性感染期。在慢性期，豬隻會出現輕微食慾不振、嗜睡、結膜炎、皮膚炎下痢和換肉率低等症狀；感染弱毒株的豬瘟病毒時，可能不表現病狀或出現少許症狀，通常最後都會康復(Weesendorp et al., 2009)。

感染豬瘟病毒在急性期和亞急性期最重要的病理變化為嚴重的全身性出血，在皮膚、淋巴結、喉結、膀胱、腎臟和迴腸結腸交會處皆曾經被描述出現出血性斑點，在脾臟周邊也會出現多灶性梗塞和硬化(Le Potier et al., 2006; Belak et al., 2008)。而慢性感染期，大腸或迴腸會有鈕扣狀潰瘍和胸腺萎縮等病理變化，出血性損傷較不常見(Le Potier et al., 2006; Choi et al., 2003)。

在組織病理學上，急性期和亞急性期的典型特徵為出血性和凝固性壞死(Le Potier et al., 2006; Belak et al., 2008)。扁桃腺的病理變化為細胞碎片、嗜中性球和角質堆積造成的囊腫大和線窩栓塞。淋巴結較常看見急性出血、溫和的淋巴流失和濾泡壞死。脾臟為淋巴流失、濾泡壞死和淋巴球出現動脈周圍的淋巴鞘(Periarteriolar lymphoid sheaths, PALS)。腎臟常發生間質性腎炎和絲球體腎炎。肺臟支氣管炎幾乎在所有受到感染的豬都可觀察到。在大腦和小腦，主要的病灶為小神經膠質細胞增生、單核球的發炎反應和內皮細胞的腫脹壞死所造成的血管炎(Le Potier et al., 2006; Belak et al., 2008)。慢性感染較不常見壞死性損傷，比較明顯的病理變化為中樞神經發炎和濾泡增生、淋巴結壞死(Le Potier et al., 2006; Choi et

al., 2003)。



1-5 致病機轉

口鼻傳染是豬瘟病毒最常見的傳播途徑；當豬瘟病毒進入豬隻體內後，首先會在扁桃腺大量複製，再藉硫酸肝素(heparin sulfate)和硫酸軟骨素乙糖胺聚醣之受體(chondroitin sulfate B glycosaminoglycan receptors)進入腺窩上皮細胞、巨噬細胞、淋巴球和內皮細胞(Belak et al., 2008; Ophuis et al., 2006; Hulst et al., 2000)。六天之內，豬瘟病毒會從淋巴結藉周邊血液完全散佈到骨髓、胰腺、腦部、迴腸、腸繫膜淋巴結(Belak et al., 2008; Ophuis et al., 2006)。

在急性期，豬瘟病毒會誘導內皮細胞、淋巴球和骨髓造血細胞凋亡和壞死、血小板減少症以及擾亂纖維蛋白原之合成所導致的出血(Summerfield et al., 2001; Bensaude et al., 2004)。豬瘟病毒所誘導的凋亡和壞死，主要發生在 B 淋巴細胞、 $CD3^+CD4^+CD8^+$ 記憶型幫手 T 細胞、 $CD3^+CD4^+CD8^-$ 尚未接觸過抗原之幫手 T 細胞、 $CD3^+CD4^-CD8^+$ 毒殺型 T 細胞、 $\alpha\beta^-TCR^+T$ 細胞及 $CD3^+CD4^-CD8^{-/low}\gamma\delta T$ 細胞(Summerfield et al., 1998, 2000, 2001)。淋巴細胞流失在受到感染的豬隻將導致免疫抑制的情形發生。

1-6 豬瘟病毒的標的細胞與免疫調控

豬瘟病毒主要標的細胞包括內皮細胞、淋巴球、單核球/巨噬細胞系列細胞、樹突細胞和骨髓造血細胞，並使這些細胞的免疫功能和相關細胞激素功能低下。病毒在內皮細胞所誘導表現的細胞激素有 IL-1、IL-6、IL-8、血管內皮細胞生長激素、E-selectin 和 integrin- $\beta 3$ ，誘導減少分泌的有內皮細胞連接蛋白 43 (endothelial connexin 43)、內皮細胞一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase)，而當豬瘟病毒感染內皮細胞時，也會藉由核轉錄因子 κB (NF- κB) 控制細胞發炎激素和細胞黏附分子(Bensaude et al., 2004; Hsiao et al., 2010; Tang et al., 2010; Wang et al., 2011)。內皮細胞連接蛋白 43 分泌減少，主要是因連接蛋白 43 啟動子活性減低，影響 AP2 的結合(Hsiao et al., 2010)；另外一氧化氮的生物活性降低是由於一氧化氮合成酶之啟動子、轉錄因子 AP1-SP1 和 GATA1/2 受到調控下降的關係(Wang et

al., 2011)。在病毒感染急性期，細胞發炎激素和細胞貼附分子的活性受到影響時，止血系統將被擾亂導致凝血和血栓，不僅如此，豬瘟病毒也會抑制內皮細胞分泌 IFN- α 和凋亡，並阻止細胞進入細胞週期的 S-phase (Bauhofer et al., 2007; Bensaude et al., 2004; Tang et al., 2010)。

研究顯示，抑制 IFN- α 的分泌和豬瘟病毒的 N^{pro} 和 E^{ns} 蛋白有關。IFN- α 的製造通常是由 dsRNA 所誘導的干擾素調控因子 3 和 7 (interferon regulatory factor 3 and 7, IRF-3 and IRF-7) 調控，而 N^{pro} 蛋白會阻斷 IRF-3 的路徑，進而達到抑制 IFN- α 的作用。E^{ns} 蛋白是一種 RNase，主要的功能是裂解 dsRNA，抑制 dsRNA 刺激細胞產生 IFN- α (Bauhofer et al., 2007)。當豬瘟病毒感染細胞時，細胞週期也會受到影響，豬瘟病毒的 NS2 蛋白經由抑制 Endoplasmic reticulum stress (ER stress) 阻斷細胞凋亡，也透過增加 NF- κ B 和 cyclin A 的分泌防止細胞進入 S-phase (Tang et al., 2010 and 2011)。上述豬瘟病毒誘導的免疫抑制和阻斷細胞凋亡，都是使病毒本身在宿主體內的存活和複製更加順利。

豬瘟病毒引起的淋巴球減少症，被證明是豬瘟病毒藉由抑制 E^{ns} 和粒線體跨膜電位，間接或直接地誘導淋巴細胞凋亡 (Summerfield et al., 1998; Brusckhe et al., 1997)，另外，也有研究指出豬瘟病毒感染巨噬細胞時所誘導的 TNF- α 是導致 B 淋巴細胞凋亡的原因 (Choi et al., 2004)；當豬瘟病毒感染 T 淋巴細胞時會增加 CD49d、MHC II 和 Fas 的表現，使得 Fas-Fas 媒介所誘導的凋亡更具感受性 (Summerfield et al., 1998)。單核球/巨噬細胞系列的細胞為豬瘟病毒主要的標的細胞，當豬瘟病毒順利感染單核球/巨噬細胞系列之細胞時，對病毒會較有利的釋放更多促進疾病發展的媒介分子和激素，比較不同的是，豬瘟病毒並不會造成此類型細胞的凋亡和病變 (Knoetig et al., 1999)，使單核球和巨噬細胞發炎激素 IL-1、IL-6、TNF- α 及 PEG2 的表現量增加，並抑制巨噬細胞一氧化氮的製造 (Zaffuto et al., 2007; Sánchez-Cordón et al., 2002)。感染豬瘟造成的出血症和淋巴球流失等臨床症狀和致病機轉，以及豬瘟病毒與淋巴球/巨噬細胞之間的交互作用扮演著很重要的角色。

然而，樹突細胞功能的瓦解在豬瘟病毒造成的致病機轉是很重要的階段。豬瘟病毒會在樹突細胞中複製，但不會調控 MHC 和 CD80/86 的功能以及 IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 等細胞激素的表現(Carrsco et al., 2004)，有趣的是，豬瘟病毒也會藉 N^{pro} 蛋白抑制樹突細胞分泌 IFN- α (Bauhofer et al., 2005)，但有研究指出，這種抑制的情形只發生在普通的樹突細胞(Conventional dendritic cells, cDC)，在類漿細胞樹突細胞(Plasmacytoid DC, pDC)，又稱自然製造干擾素的樹突細胞(natural interferon-producing cells, NIPC)不會被 N^{pro} 蛋白的抑制作用影響(McCullough et al., 2009)，此種抑制 IFN- α 分泌的機制，使得豬瘟病毒存活率提高並能隨著樹突細胞移動到全身感染更多組織和器官。

1-7 兔化豬瘟疫苗與次單位疫苗

傳統的活毒減毒疫苗包括 Chinese C strain (C strain)、Japanese guinea-pig exaltation-negative strain (CPE⁻ strain)及 Thiverval strain (T strain)，在畜牧場中是最常被拿來使用的疫苗。其中 C strain 已從兔子繼代數百餘代，製作成臺灣目前最常用的兔化豬瘟疫苗(Lapinized Philippines Coronel, LPC)，另外 hog cholera Lapinized virus 和 Riems strains 也在不同的國家被使用(van Oirschot, 2003)。在 C strain 的 cDNA 全長序列中，有大約 12 個核苷酸長度的 T-rich 插入子在病毒基因中的 3'NTR 端(Pan et al., 2008)，CPE⁻疫苗是從強毒性的 ALD strain 連續經由不同的細胞培養製成，和親代的差異有 225 個核苷酸。T strain 則是由 Alfort strains 經過 170 次的繼代製作而成(van Oirschot, 2003)。而 Chinese C strain 是一種安全無毒性的疫苗株，此活毒疫苗會在淋巴器官複製，接種後主要在扁桃腺存在 6 到 42 天(Koenig et al., 2007)，有研究指出，當 C strain 疫苗接種在懷孕的母豬身上，可啟動相關的體液性免疫和細胞性免疫，從接種後第 5 天開始至少可提供 6-18 個月完整的保護(van Oirschot, 2003)，而抗豬瘟病毒的中和抗體約在接種後第 12 天可被檢測到，抗體力價在 4-12 週達到最高峰，在早期中和抗體尚未出現的階段，主要是仰賴細胞性免疫的保護(van Oirschot, 2003; Ganges et al., 2008)。豬瘟病毒特異性分泌 IFN- γ 的細胞主要來自於 CD4⁺CD8⁺淋巴球，在接種疫苗後的第 6-140 天可被檢測到；PBMC 來源的豬瘟病毒特異性細胞增殖反應主要為 CD4⁺CD8⁻和 CD4⁺CD8⁺T 淋巴球，特異性毒殺細胞主要為 CD4⁺CD8⁺T 淋巴球(van Oirschot, 2003; Suradhat et

al., 2007; Pauly et al., 1995; Armengol et al., 2002; Pirios et al., 2003)。

目前市面有兩種商業化的次單位疫苗分別為 BAYOVAC[®] CSF Marker 和 Porcilis Pesti 較常見，這兩種不同的次單位疫苗皆利用昆蟲桿狀病毒分別表現 32 μ g 和 86-100 ELISA units/dose 的 E2 蛋白製作而成(Dong et al., 2007)，接種後只誘導體液性免疫，缺乏細胞性免疫，但在臨床研究顯示在接種 E2 次單位疫苗後的第 14 天開始即可保護豬隻不被強毒株的豬瘟病毒感染，免疫效果至少可持續 13 個月，雖然施打疫苗的豬隻不會出現臨床症狀，但在施打後的第 14 天還是檢測到病毒血症及分泌物有病毒的釋出，目前還沒辦法完全避免垂直及水平的病毒傳播(Dong et al., 2007; van Oirschot, 2003)。

新型豬瘟疫苗的發展，係源自於為了讓 E2 次單位疫苗能成功誘導抗豬瘟病毒的特異性中和抗體。大部分的多肽疫苗是使用 E2 的 A 或 BC domain，但評估發現免疫效不理想(Dong et al., 2007; Beer et al., 2007)。新型的 DNA 疫苗是用質體結構，將 E2 基因和細胞激素基因(如 IL-2、IL-3、IL-12、IL-18)結合，或是調整細胞表現分子的基因(例如 CD154 和 CD40)以及結合刺激免疫反應的 CpG 和 BCG 等，這些新型的疫苗都在發展當中(Ganges et al., 2008; Dong et al., 2007; Beer et al., 2007)。多數 DNA 重組疫苗都能誘發出體液性及細胞性免疫，但在接種疫苗後到給予豬隻保護的時間比減毒疫苗及 E2 次單位疫苗都要來的長，這段免疫空窗期是 DNA 疫苗需要改善的缺點(Ganges et al., 2008; Dong et al., 2007; Beer et al., 2007)。以病毒為載體的疫苗包括 Poxvirus、Pseudorabies virus (PRV)、porcine adenovirus 和 BVDV 較常被應用(Dong et al., 2007; Beer et al., 2007)。多數 E2 嵌合重組活毒疫苗免疫於豬隻都能夠提供完整的保護，但重組疫苗株有可能會和 wild-type 病毒株產生基因重組，這是其潛在風險，另外雖然施打重組疫苗對豬隻不會致死，但對其他感受性高的宿主仍具有毒性，且會干擾病毒載體所誘導的中和抗體效價(Dong et al., 2007; Beer et al., 2007)。

第二節 豬第二型環狀病毒

2-1 病毒學分類

豬環狀病毒(Porcine circovirus, PCV)為一小型，大小約 14-19nm、正二十面體之不具套模的單股環狀 DNA 病毒，基因序列長 1.76kb，屬於環狀病毒科(Circoviridae)，環狀病毒屬(Circovirus) (Finsterbusch et al., 2009; Mankertz et al., 2004)。其中環狀病毒屬還包括第一型、第二型豬環狀病毒(Porcine circovirus type 1、type2, PCV1, PCV2)、鵝環狀病毒(Goose circovirus, GoCV)、鸚鵡喙羽症病毒(Psittacine beak and feather disease, PBFDV)、鴿環狀病毒(Pigeon circovirus, PiCV)等病毒(Bassami et al., 1998; Todd, 2004)。

豬環狀病毒最早於污染的豬腎細胞株(PK15)被發原，此病毒對酸性環境 pH=3、氯仿和高溫皆具抵抗性。豬環狀病毒因基因序列和病源性的差異將之分為兩型，其中最早由 PK15 分離無病原性的病毒為第一型豬環狀病毒(PCV1)，另外由豬離乳後多系統消耗性症候群(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)所分離，具有病原性的病毒為第二型豬環狀病毒(PCV2) (Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998)。PCV1 的基因大小約 1758-1760 個核苷酸，不同的 PCV1 病毒株基因序列相似度約 98-99%。而 PCV2 的基因大小約 1767-1768 個核苷酸，在不同國家所分離到的 PCV2 病毒株基因序列相似度為 93-99% (Muhling et al., 2006)，其中包括 PCV2a、PCV2b 和 PCV2c 三種基因型(Segalés J et al., 2008; Cortey et al., 2011)；研究指出，PCV2 有 11 個開放式閱讀框架(Open reading frames, ORF)，其中 ORF1、ORF2 和 ORF3 已被證明是複製相關蛋白、衣殼蛋白及凋亡相關蛋白 (Finsterbusch et al., 2009; Mankertz et al., 2004)。PCV2 的核酸序列在 ORF1 的相似度為 97-100%，ORF1 所編碼的複製相關蛋白為 Rep 和 Rep' (Larochele et al., 2002; Mankertz et al., 2004)；PCV2 的核酸序列在 ORF2 的相似度為 91-100%，ORF2 主要負責轉譯病毒的衣殼蛋白(capsid protein)；ORF3 編碼凋亡相關的蛋白質(Liu et al., 2005)。

2-2 歷史背景與流行病學

1996 年，一種新興疾病-豬離乳後多系統消耗性症候群(Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)在加拿大首次被發現，之後在美洲、歐洲

和亞洲也陸續出現病例。由於從 PMWS 發病的豬隻所分離出的環狀病毒和從被污染的 PK15 分離出的環狀病毒，不管在基因序列、抗原性和病原性都有差異，因此將此病毒命名為豬第二型環狀病毒(PCV2) (Meehan et al., 1998)，目前 PMWS 在許多國家廣泛存在且造成許多經濟上的損失(Allan and Ellis, 2000)。而台灣首次發現 PCV2 的時間為 2001 年，之後的調查發現 PCV2 血清抗體陽性率為 83.5%，此結果顯示 PCV2 在台灣已普遍存在(Wang et al., 2004)。由世界各地分離出的 PCV2 雖然同屬於一樣的病毒株，但基因序列仍有差異，目前也無證據顯示 PCV2 的基因序列和地域性以及疾病的嚴重性有關連(Cheung et al., 2007; de Boisseson et al., 2004)。

2-3 豬環狀病毒傳播方式

豬第二型環狀病毒(PCV2)的垂直及水平傳播方式已被證明為環境傳播 (Grau-Roma et al., 2011)；在水平傳播中，眼睛、咽喉、扁桃腺和支氣管分泌物、唾液、糞便、尿液、母乳及精液都是重要的傳播因子(Chung et al., 2005; Shibate et al., 2006; Grau-Roma et al., 2011)，PCV2 的傳染經常是由間接或直接接觸到受到 PCV2 感染豬隻的分泌物所造成；在垂直傳染中，PCV2 可透過懷孕母豬的胎盤傳染給胎兒(Pensaert et al., 2004, Grau-Roma et al., 2011)。

2-4 臨床症狀與離乳後多系統性消耗症候群

豬離乳後多系統消耗性症候群(PMWS)常發生於出生後 25-120 天的豬隻，PMWS 的豬隻臨床上常出現皮膚蒼白、嗜睡、體重減輕、黃疸、呼吸急促、下痢和發燒等非特異症狀；PCV2 的感染亦可為不顯性感染。有研究指出，出現 PMWS 症狀的豬隻只有 15%是單獨感染 PCV2，大多數的 PMWS 都是和其他病原共同感染，因此病情的發展和症狀較複雜和難預料，PMWS 的臨床症狀大都非特異性。要確診為 PMWS 需同時具備以下條件：(1)耗弱、呼吸困難和鼠蹊淋巴結腫大(2)組織病理學的損傷為淋巴組織出現中等到嚴重的淋巴細胞流失和組織球中有葡萄球狀雙染性的嗜鹼性包涵體(3)受到損傷的淋巴組織內可檢測到高 PCV2 病毒量 (Segalés J et al., 2004; Chae, 2004)。

具有 PMWS 症狀的豬隻常見到鼠蹊部、腸繫膜和縱膈腔的淋巴結腫大，在某些病例可見到淋巴結有多發性至融合性的壞死、胸腺萎縮、肺葉塌陷和肝腫大等病理變化，部分病例亦可見到黃疸、腸道蒼白、潰瘍等現象(Rosell et al., 1999; Segalés J et al., 2004)。在組織病理學的診斷當中，PMWS 主要的病變發生於淋巴組織，包括淋巴結、扁桃腺、peyer's patches 和脾臟等，典型特色為肉芽腫性的炎症反應、組織球內有嗜鹼性包涵體、多發性凝固性壞死、不同程度的淋巴細胞流失伴隨著組織球和多核巨細胞浸潤。其他組織的病變有間質性肺炎、肝細胞發炎、腎炎等(Allan and Ellis, 2000; Darwich et al., 2004; Segalés J et al., 2004)。

有研究指出，豬第二型環狀病毒(PCV2)是藉由已受到感染豬隻的口鼻或呼吸道分泌物直接接觸未受感染的豬隻散播。當病毒進入宿主体內會先在頭部的扁桃腺和淋巴結，之後進入單核球、巨噬細胞及濾泡的樹突細胞，但不會進行複製。PCV2 在樹突細胞是不易被察覺的，細胞對病毒沒有毒殺作用，但病毒有可能會改變細胞表面抗原 MHC I 和 MHC II 的表現(Vincent et al., 2003)。另外，也有學者認為 PCV2 感染單核球的目的是為了藉單核球散佈到全身，並感染淋巴器官(Darwich et al., 2004; Gillespie et al., 2009)。但是當淋巴球未受到抗原刺激時，病毒的感染率和病毒量都會較低，而且並不會出現 PMWS 的症狀。然而，PCV2 次臨床感染(subclinically infected)豬隻若受到具傳染性或不具傳染性的輔助因子(cofactors)刺激免疫系統，就有可能使病毒複製效率提高並發展成 PMWS 豬隻(Darwich et al., 2004)。使用 Concanavalin A(con A)作為免疫刺激原活化淋巴球，對 PCV2 也有類似於酵素催化的功能，使淋巴球增值和 PCV2 的複製效率提高；也有研究特別注意到，PCV2 需在細胞週期中的 S phase 並依賴宿主細胞核內的聚合酶才能順利進行複製(Lin et al., 2008; Tischer et al., 1987)。

2-5 豬第二型環狀病毒標的細胞與免疫調控

在有 PMWS 症狀的豬隻可以明顯在淋巴組織看到細胞激素的變化，例如在胸腺、淋巴結、脾臟和血液可以檢測到高表現量的 IL-10 (Doster et al., 2010; Crisci et al., 2010; Sipos et al., 2004; Darwich et al., 2003 and 2004)。有趣的是，會表現大量 IL-10 的細胞通常是 CD163⁺單核細胞/巨噬細胞等非主要標的細胞(bystander)和少



數 CD4⁺和 CD8⁺細胞，IL-10 並非由真正受到 PCV2 感染的細胞所表現(Doster et al.,2010; Crisci et al., 2010)。另外有研究在各淋巴組織的 Th1 和 Th2 觀察到 IL-2、IL-4、IL-10、IL-12p40 及 IFN- γ 的 mRNA 表現量減少(Darwich et al.,2003)。而 PCV2 感染肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage, AM)時會明顯的分泌 TNF- α ，以及表現 IL-8 和 MCP-1 的 mRNA (Chang et al., 2006)，在單核球分化而成的巨噬細胞也可檢測到 MCP-1 和 MIP-1 明顯的表現(Tsai et al., 2010)。從以上的結果可以推測，當 PCV2 感染巨噬細胞來源細胞時，會增加發炎相關細胞激素的分泌。

目前已經有研究證明 PCV2 可感染樹突細胞和巨噬細胞(Chang et al., 2006; Vincent et al., 2003)。單核球來源之樹突細胞(Monocyte-derived dendritic cells, MoDCs)和骨髓來源之樹突細胞(Bone marrow-derived DC, BMDCs)可藉由胞吞的方式使 PCV2 存在於細胞中，感染率約 80-90%，PCV2 不會造成 DC 死亡也不會在 DC 內複製。在 DC 發展過程中的細胞表面抗原 MHC I、MHC II、CD14、CD16、CD25 和 CD80/86 皆不受 PCV2 影響(Vincent et al., 2003)。另外，PCV2 對肺泡巨噬細胞(AM)的感染率超過 90%，PCV2 可存在於細胞質和細胞核中，當 PCV2 感染 AM 時不會造成細胞凋亡率上升，但細胞吞噬和微生物毒殺能力會明顯的降低，而 IL-8、TNF- α 、AMCF-II、G-CSF 和 MCP-1 等細胞發炎激素皆明顯的增加(Chang et al., 2006)。上述相關研究顯示 PCV2 的抗原和 DNA 會堆積於單核球/巨噬細胞之系列細胞當中，但 PCV2 對細胞不會造成損傷也不會在此類細胞複製，因此推測這些免疫相關的細胞只是扮演傳播病毒的媒介角色。

第三節 豬隻相關病毒共同感染之免疫干擾

3-1 豬第二型環狀病毒與相關病毒共同感染

Kekarainen 等學者(2008)認為免疫反應在 PCV2 感染造成的損傷中佔最重要的因素。PMWS 的豬隻會發現嚴重的淋巴組織損傷，包括淋巴細胞流失和肉芽腫性炎症反應及改變淋巴器官和 PBMCs 之細胞激素的表現。例如誘導 IL-4 的表現量下降以及 IL-2、IL-10 和 IFN- γ 的分泌，其中，試管內的實驗顯示 PCV2 似乎能誘導 IL-10 的表現量上升(Darwich et al., 2003)。體外研究也觀察到感染 PCV2 豬隻在

胸腺的 IL-10 mRNA 表現量有上升的趨勢(Sipos et al., 2004)。目前普遍認為受到 PCV2 感染的仔豬之血液中的 IL-10 和 PMWS 的發展有重要的關聯(Stevenson et al., 2006)。

如先前所述，PCV2 不會在 DC 內複製，也不會改變 DC 抗原的攝取及表現 (Vincent et al., 2005)，然而，PCV2 的感染會抑制骨髓系和類漿細胞之樹突細胞分泌 IFN- α 和 TNF- α (Vincent et al., 2005 and 2007)。為了研究 PCV2 是否藉由分泌 IL-10 影響假性狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)之記憶性抗原(recall antigen)反應，Tuija 在 10-13 週齡的實驗豬隻先接種商業化減毒 PRV 疫苗，之後分別給予 PCV2 和 PRV 的刺激，檢測 IFN- γ 、IFN- α 、IL-10、IL-2 和 IL-12 在蛋白質層次表現的情形，藉此探討影響 PRV 記憶性抗原的因子，結果顯示，在 PBMCs 和 BMDCs 研究模式之下，PCV2 可抑制 IFN- α 的表現量，當 PCV2 和 PRV 共同刺激時，IL-10 的分泌量會明顯的增加(Kekarainen et al., 2008)。先前的研究指出(Darwich et al., 2003a, b; Hasslung et al., 2005; Stevenson et al., 2006) PCV2 的感染可能會影響細胞激素表現的趨勢，並推測 IL-10 可能是影響細胞激素分泌的機制之一，但沒有研究能夠明確指出相關的資料。因此 Kekarainen 等學者的研究發現 PCV2 所誘導的 IL-10 會使記憶性抗原的反應降低，並連帶抑制 IFN- γ 、IFN- α 、IL-2 和 IL-12 的表現量，其中令人驚訝的發現是，PCV2 會抑制 IFN- α 進而影響記憶性抗原的反應，但在 naïve 細胞 PCV2 則會誘導 IFN- α 的產生，此作用機制尚未清楚，但推測可能是 PCV2 會鎖住細胞的記憶功能，干擾記憶型 T 細胞和抗原呈現細胞之間的交互作用。以 IL-10 為媒介抑制 T 細胞活性在某些人類及動物病毒已經被證明，而 IL-10 所誘導的免疫抑制也被認為是導致病毒能持續感染的原因之一(Brooks et al., 2006)。在人類的文獻指出 IL-10 抑制 IL-12 和 IL-2，進而影響到 Th1 的增值反應(Taga et al., 1993)。這些研究幫助我們了解 PCV2 具有強烈抑制特異性抗原記憶反應(recall antigen)的趨勢，這對於某些需要使用疫苗來防治的疾病會造成衝擊性的影響 (Kekarainen et al., 2008)。

Chang 等學者(2005)認為 PCV2 和豬呼吸道與生殖綜合症病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)在豬身上都是屬於常見的病

毒，因此使用豬肺泡巨噬細胞對這兩種病毒進行共同感染(co-infection)，並觀察細胞的形態及相關的免疫影響。研究結果顯示當 PCV2 單獨感染時不會造成細胞死亡也有較高的抗原包涵率(antigen-containing)。當 PRRSV 單獨感染時細胞有較高的死亡率和凋亡率，而共同感染時，PRRSV 的傳播率和細胞死亡率、凋亡率都較低，特別的是，在有 PCV2 感染的組別都有高表現量的 IFN- α 。在 mock 和 PRRSV 單獨感染的組別皆未觀察到有 IFN- α 的分泌，另外 PRRSV 感染豬肺泡巨噬細胞所引起的細胞病變效應(cytopathic effect, CPE)也會因為 PCV2 的存在而相對減少，但加入 IFN- α 的中和抗體，此情形就不會發生，因此 Chang 等人推論 PCV2 的感染會誘導 IFN- α 的產生，因此降低 PRRSV 的 CPE 和感染率(Chang et al., 2005)。

Cecere 等人在 2012 年發表了關於 PCV2 和 PRRSV 共同感染 DC 所誘導 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T_{regs} 的相關研究。以病毒為媒介調節 T 細胞(regulatory T cells, T_{regs})對宿主的免疫反應是一種特異性的致病機制，且有利於病毒的生存(Belkaid, 2007)。T_{regs} 大致分成胸腺來源的自然 T_{regs} 和後天誘導的 T_{regs}，以及胸腺來源以外的 naïve CD4⁺T 細胞(Askenasy et al., 2008)，目前 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T_{regs} 細胞在豬的研究模式中已被確認具有不同機制的抑制活性(Kaser et al., 2008; Kaser et al., 2011)。病毒感染藉由 T_{regs} 改變宿主的免疫反應已經在許多病毒中發現，包括疱疹病毒(herpes simplex virus)、C 型肝炎病毒(hepatitis C virus)、B 型肝炎病毒(hepatitis B virus)、人類免疫不全病毒(human immunodeficiency virus)、巨細胞病毒(cytomegalovirus)和人類疱疹病毒第四型(Epstein-Barr virus) (Belkaid, 2007; Li et al., 2008; Rouse et al., 2006)；近幾年的研究顯示當 PCV2 和 PRRSV 共同感染 PBMC 時會減少 IFN- γ 的表現量和增加 IL-10 的分泌(Shi KC, 2010)，而 PRRSV 不管是在試管內或體內實驗都有誘導 T_{regs} 的情形發生。PCV2 雖然能夠大量堆積在 DC 的細胞質中，但沒有結果顯示 PCV2 會在 DC 內複製，病毒的傳播也不會活化同源性的 T 細胞和造成細胞的死亡(Steiner et al., 2008; Vincent et al., 2005; Vincent et al., 2003)。而當宿主啟動抗 PCV2 之免疫反應時，PCV2 誘導的 T_{regs} 可能會減少 IFN- γ 的反應、抑制 IL-2 以及阻斷效應型 T 細胞(effector T cells)的趨化作用和增值(Askenasy et al., 2008)。在 PCV2 和 PRRSV 共同感染所誘導的 T_{regs} 研究結果顯示會增加 PCV2 的複製和臨床徵狀，除了增加 IL-10 的表現量，抑觀察到 IL-2、IL-4、

IL-6、IL-12p40 和 IFN- γ 有被抑制的情形(Shi KC, 2010)。

Cecere 等人(2012)的研究結果為 PCV2 和 PRRSV 共同感染 DC 時，可在共同感染組觀察到 TGF- β 的表現量大於單獨感染 PCV2 或 PRRSV 的組別，但 IL-10 在所有實驗組卻沒有顯著差異，這樣的結果相似於 2009 年 Silva-Campa 等人所發表的文獻(Silva-Campa et al., 2009)。在細胞培養上清液檢測到的 TGF- β 可能是 DC 或 T 淋巴球所製造，和 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T_{regs} 似乎沒有直接的關聯性，因此 TGF- β 的分泌可能還有其他因子所誘導。另外在 Cecere 等人的研究中並沒有使用 LPS 或其他病毒刺激 DC 成熟，所以沒辦法明確指出病毒特異性的增加 T_{regs} 反應和發炎激素的產生，是否符合體內真實的情況。

3-2 豬第二型環狀病毒影響兔化豬瘟疫苗之效力

目前已經有研究證明 PCV2 的感染的會減少豬呼吸道與生殖綜合症病毒 (PRRSV) 疫苗的保護效力(Opriessnig et al., 2006)，也有文獻指出 PCV2 的病毒構造或 PCV2 所誘導的可溶性分子 IL-10 會影響假性狂犬病病毒(PRV)的記憶性抗原 (recall antigen)反應(Kekarainen et al., 2008)，Huang 等人(2011)觀察到 PCV2 感染會降低兔化豬瘟減毒疫苗(Lapinized Philippines Coronel Vaccine, LPCV)效力的情形，在實驗當中，如果沒有先感染 PCV2，在野生型(wild-type)豬瘟病毒功毒時，LPCV 可以給予豬隻完全的保護，不會出現發燒、病毒血症和病毒釋出於唾液或糞便等臨床症狀。但如果事先已經有 PCV2 的存在時，幾乎多數的豬隻即使有接種 LPCV，還是會出現發燒等臨床症狀；此結果證明 LPCV 的效力會因為 PCV2 而減低。

在淋巴球活化和增值的分析中，先感染 PCV2 的實驗組 IgM⁺、CD4⁺、CD8⁺ 和 CD4⁺CD8⁺ 淋巴球群皆明顯地低於沒有 PCV2 感染的實驗組。此 PCV2 所主導之干擾淋巴球的活化和降低宿主體液性免疫和細胞性免疫，推測和抗豬瘟病毒的中和抗體短暫延遲出現，以及抑制對豬瘟病毒具有特異性 PBMC 的增殖有關連。根據以往的研究顯示 PCV2 可能會藉由 IL-10 和 CpG motif 影響 PRV 的記憶性抗原，但在 Huang 等人的研究中顯示 PCV2 的 CpG motif 和所誘導的 IL-10 對豬瘟病毒特異性的 PBMC 增殖反應在每個組別沒有明顯的差異，因此推論 PCV2 減少 LPCV

疫苗的效價和 PCV2 影響 PRV 記憶性抗原的致病機制可能不同。所有的活毒滅毒豬瘟疫苗都仰賴著疫苗所誘導的體液性免疫和細胞性免疫才能發揮完整的免疫保護效力，在剛施打疫苗的早期階段，抗豬瘟病毒的中和抗體還未出現時，細胞性免疫就顯得格外重要。對豬瘟病毒具有特異性的細胞性免疫包括 IFN- γ 分泌細胞、細胞增殖的活性以及毒殺型淋巴細胞，皆和對抗豬瘟病毒的感染有關聯。而當 PCV2 存在時，LPCV 所誘導的體液性免疫和細胞性免疫都明顯地減少活性，雖然中和抗體的力價沒有差異，但在抗體出現的時間卻有延遲的反應。當 LPC 疫苗沒有辦法誘導完整的免疫反應時，遇到 wild-type 的豬瘟病毒便會引起短暫的發燒以及病毒血症等臨床症狀。另外預先感染 PCV2 所引起的 CD4⁺、CD8⁺和 CD4⁺CD8⁺ 淋巴球群的減少也意味著幫手型(helper)T 細胞和毒殺型(cytotoxic)T 細胞被相對抑制；然而，當給予去活性(UV-inactivated)的 PCV2 時也同樣能夠抑制豬瘟病毒特異性 PBMC 的增殖，有文獻指出 PCV2 病毒顆粒的殼衣蛋白(capsid protein)在感染期間會與細胞表面的硫酸肝素(heparin Sulfate)和硫酸軟骨素乙醯胺聚醣受體(chondroitin sulfate B glycosaminoglycan receptors)結合，因此懷疑 PCV2 所誘導的免疫缺陷可能和病毒本身的殼衣蛋白有關(Misinzo et al., 2006)。在沒有給予 LPC 疫苗的情況下，如先感染 PCV2 再感染 wild-type 的豬瘟病毒時，豬隻存活的時間會比沒有感染 PCV2 的豬隻還短，且臨床症狀會更加嚴重，此結果推論 PCV2 會調整宿主的免疫反應，使 LPC 疫苗的效力減低，使豬瘟病毒更容易感染並導致更嚴重的臨床症狀(Huang et al., 2011)。

PCVAD 在全球的養豬產業中常常會造成嚴重的經濟損，PMWS 通常好發於出生後 20-120 天的豬隻，尤其是出生後 60-80 天的豬隻罹患 PMWS 的機率最高(Allan and Ellis, 2000; Darwich et al., 2004)，這段時間剛好和兔化豬瘟疫苗(LPC)的免疫適應期重疊，這對 LPC 疫苗的防治效果有不利的影響(Huang et al., 2011)；從 PMWS 豬隻所分離出的 PBMC，給予分裂原刺激也不會正常生產 IFN- γ 或 IL-2(Darwich et al., 2003, 2004)，如單獨將 PCV2 感染 CD172a⁺單核球系列細胞時可誘導大量 IL-10，PCV2 也有抑制自然干擾素製造細胞(Natural interferon producing cells, NIPC)製造 IFN- α 的情形被描述(Vincent et al., 2005, 2006)，以上結果顯示 PCV2 的基因和蛋白質結構有可能具有強烈的免疫抑制活性。Huang 等人(2014)提到 LPCV 可以在

肺泡巨噬細胞中複製，肺泡巨噬細胞能將 LPCV 帶到淋巴組織中並表現抗原予以刺激免疫細胞，而 PCV2 對巨噬細胞的感受性和 LPCV 相似。在 Huang 等人(2014)使用此模式進行兩種病毒交互作用的研究發現，PCV2 主導的干擾反應係呈現劑量效應，而 PCV2 的 DNA 結構和所誘發的 IFN- γ 或許可以解釋干擾 LPC 疫苗效價的一種機制；研究結果顯示 LPCV 在 AM 的複製會因為 PCV2 的存在而減少。且不論是預先感染 PCV2、同時感染或感染 LPCV 後再感染 PCV2 的結果，肺泡巨噬細胞中的 LPCV 抗原偵測皆明顯地減少，推測 PCV2 可能會抑制 LPCV 進入 AM 或干擾 LPCV 的複製。PCV2 抑制 LPCV 的感染和 PCV2 感染的劑量也有關聯，預先感染 PCV2(pre-infection)會比後感染 PCV2(post-infection)具有更強力的抑制作用。這在 2006 年 Chang 等人所發表 PCV2 會使 PRRSV 感染率降低也有提到，此結果顯示 PCV2 的感染順序和干擾強度具有正相關性。而 LPC 疫苗效力減少的程度在不同畜場也不盡相同，另外也發現 PCV2 對 LPCV 的干擾具有劑量效應，目前已知 PCV2 的病毒量和 PMWS 的相關性，這反映了 LPCV 防治計畫失敗通常都發生在 PMWS 的疫區。

在過去的研究中曾提到去活性的 PCV2 和具有活性的 PCV2 同樣能夠抑制豬瘟病毒特異性 PBMC 的增殖(Kekarainen et al., 2008)，但在 AM 的研究模式中發現，去活性的 PCV2 不會影響 LPCV 的複製。因此 Huang 等人(2014)推測干擾 LPCV 複製的因子可能是 PCV2 的基因或是 PCV2 複製時的中間產物或兩者皆是，但 PCV2 的衣殼蛋白就研究結果顯示可能不是干擾 LPCV 在 AM 複製的因子。無論是 PCV2 的全長基因或片段序列，特別是 CpG-ODN C9 序列皆能抑制 LPCV 在 AM 的複製；PCV2 的 CpG-ODN 片段能夠減少假性狂犬病(PRV)在 PBMC 所誘導的 IFN- γ 和 IL-2，及減少 PRV 在骨髓來源樹突細胞(bone marrow-derived dendritic cells, BMDCs)所分泌之 IL-12(Kekarainen et al., 2008b)，以上結果推測 PCV2 的 CpG-ODN 片段可能會抑制其他病原體所誘導的免疫刺激，減少疫苗的保護效力。然而，影響病毒感染和複製的因子還有某些細胞激素，在過去的文獻有提到 IFN- α 、IFN- γ 和 TGF- β 1 皆有可能抑制或增強病毒的感染和複製(Bensaude et al., 2004; Chang et al., 2005; Graham et al., 2012; Presser et al., 2013; Reed, 1999)。

Huang 等人(2014)的研究顯示，以 PK15 作為研究模式時 LPCV 的抗原結合率與 IFN- γ 的產生具有負相關性，IFN- γ 干擾 LPCV 複製的情形在單核球也同樣被觀察到(Grahan et al., 2012)，又 IFN- γ 的表現量和宿主對抗豬瘟病毒的感染具有正相關性(Suradhat et al., 2007; Grahan et al., 2012)；而 PCV2 在 PBMC 可能會誘導或抑制 IFN- α 的分泌和 LPCV 的感染率減少也有文獻提及過(Bensaude et al., 2004; Chen, 2007; Hasslung et al., 2003)，但在 Huang 等人(2014)的研究中於每個組別皆未檢測到 IFN- α ，這和 Chang 在 2005 所發表的文獻中所提到的 PCV2 可藉由 IFN- α 的分泌減少 PRRSV 在 AM 的感染結果不符合(Chang et al., 2005)。推測可能的原因，除病毒基因序列、病毒劑量和感染的時間點皆不相同外，不同病毒之間的交互作用不同，才導致研究的結果相異(Chen, 2007; Hasslung et al., 2003)，因此 Huang 等人於 2014 發表的研究結果發現在 AM 的研究模式中，PCV2 本身的全長基因、CpG-ODN C9(Sequence 5'-3' GGGGCCAGTTCGTCACCCTTCC)片段序列以及 PCV2 所誘導的 IFN- γ 可能為干擾 LPC 疫苗效價的部分原因。

第四節 豬單核球來源之樹突細胞研究模式

4-1 豬單核球來源樹突細胞簡介

樹突細胞(Dendritic cells)在免疫系統擔任高效率的防護角色，特別是一般傳統型的樹突細胞(conventional DC, cDC)、類漿細胞樹突細胞(plasmacytoid DC, pDC)以及單核球系列細胞之間相輔相成的交互作用，才形成一個成熟的免疫防護系統，然而當不同的病原體感染不同亞型的 DC 時，致病機制會趨向複雜化。然而疫苗常常會搭配佐劑確保效用，疫苗本身提供抗原可啟動特異性的適應性免疫，而佐劑可刺激最初的先天性免疫，先天性免疫會連帶影響到適應性免疫的價值，進而決定整個免疫系統的防護效率，在這之中 DC 扮演著重要的關鍵角色。然而，免疫系統也並非無所不能，在我們生活的自然環境中總是不斷有新的病原體在挑戰免疫系統，宿主的目的始終是保護自己不受病原侵害，相對的對病毒和各種病原體最重要的是如何逃避宿主的攻擊繼續存活下去。

cDC 主要分佈在全身的各組織和器官，這意味著 cDC 會在受到感染的部位或



疫苗施打的地方(例如:皮膚和黏膜)和抗原接觸，並將抗原攜帶至淋巴濾泡，而 cDC 最重要的作用是攝取及呈現抗原片段給 T 淋巴球進行辨識和毒殺(Carrasco et al., 2001; Summerfield et al., 2003; Piersma et al., 2006; Basta et al., 2000)，同時也促進 B 淋巴球的活化反應(Bergamin et al., 2007)。雖然 cDC 扮演著免疫防禦發展的關鍵角色，但為了避免在第一線的 cDC 過度活化，因此需要經過成熟的步驟確保免疫系統的反應適當(Gogola'k et al., 2003)。未成熟的 DC (immature DC, imDC)具有高效率的細胞吞噬能力，以及抗原攝取和處理的能力。成熟的 DC (mature DC, mDC)吞噬能力較低，但有較高的 MHC 和協同刺激分子的表現能力，可增強抗原特異性淋巴球的反應(McColl, 2002; Uhlig et al., 2004)。imDC 在轉變為 mDC 的過程中，需要一個特殊的”危險(danger)”訊號，如果適當的辨認危險訊息和正確處理抗原，就能有效促進先天性免疫和適應性免疫的發展，相反如果缺少有效的危險訊息，cDC 的功能即缺乏效率甚至不活化。在 2006 年，Blander and Medzhitov 證明了老鼠的 cDC 能吞噬雞蛋溶酶體(hen egg lysozyme, HEL)，但是若沒有脂多醣(Lipopolysaccharides, LPS)提供”危險”訊號，cDC 就不會處理和表現攝入的抗原(Blander and Medzhitov, 2006)。cDC 的細胞表面具有各種不同執行免疫反應的受體，例 Toll-like receptors (TLRs)、Scavenger receptors (SRs)和 C-type lectin receptors (CLR)，這些都是相當重要的模式識別受體(pattern recognition receptors, PRRs)，能夠辨認病原體上的相關分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)。當抗原和 PRRs 結合時，PRRs 能迅速活化細胞，包括發炎激素的釋放以及促進協同刺激分子和免疫細胞的反應(Pulendran et al., 2004)。不同的 TLRs 能夠辨認不同的細菌和病毒(Oda and Kitano, 2006)，例如 TLR2 和 TLR4 在細胞表面能夠辨認細菌和病毒的表面分子，而 TLR3、TLR7/8 和 TLR9 在細胞內能各自辨認不同的核酸(Kawai and Akira, 2006; Kenneth C et al., 2009)。

在 *in vitro* 條件下產生的 DC，依照來源分為單核球來源之樹突細胞(MoDCs)與骨髓來源之樹突細胞(BMDCs)。由於 MoDCs 的取得方便，因此是免疫相關研究的良好模式，一般使用 IL-4 和 GM-CSF 的條件下培養 4-7 天，使單核球分化為具有樹突構造的樹突細胞供後續研究使用(Carrasco et al., 2001; Paillot et al., 2001)。MoDCs 的細胞表面分子表現型為 CD1⁺、CD14⁺、CD16⁺、CD80/86⁺、CD172a⁺和



MHCII⁺ (Raymond et al., 2005; Carrasco et al., 2001; Chamorro et al., 2004; Foss et al., 2003; Paillot et al., 2001), 而 CD14 通常被認為是單核球系列之細胞表面抗原，並非樹突細胞特有 (Banchereau et al., 2000)。但在貓、狗和牛的 DCs 都帶有 CD14 (Miranda et al., 2006)，在近年關於豬的 DCs 的研究中也顯示無論是否給予刺激，豬的 DCs 均會表現 CD14。CD172a (SWC3) 屬於骨髓單核細胞來源所表現之抗原 (Alvarez et al., 2000)，在早期分化的階段 CD172a 會表現於單核球或顆粒球 (Summerfield et al., 1997)。而樹突細胞的功能在豬隻的重要性除了呈現抗原擔任細胞性免疫的媒介角色外，作為第一線接觸疫苗抗原給淋巴球的樹突細胞在豬隻的免疫系統中顯得格外重要；因此在本研究選用實驗室誘導產生的 MoDCs 作為觀察 PCV2 影響 LPC 疫苗效價的細胞模式。

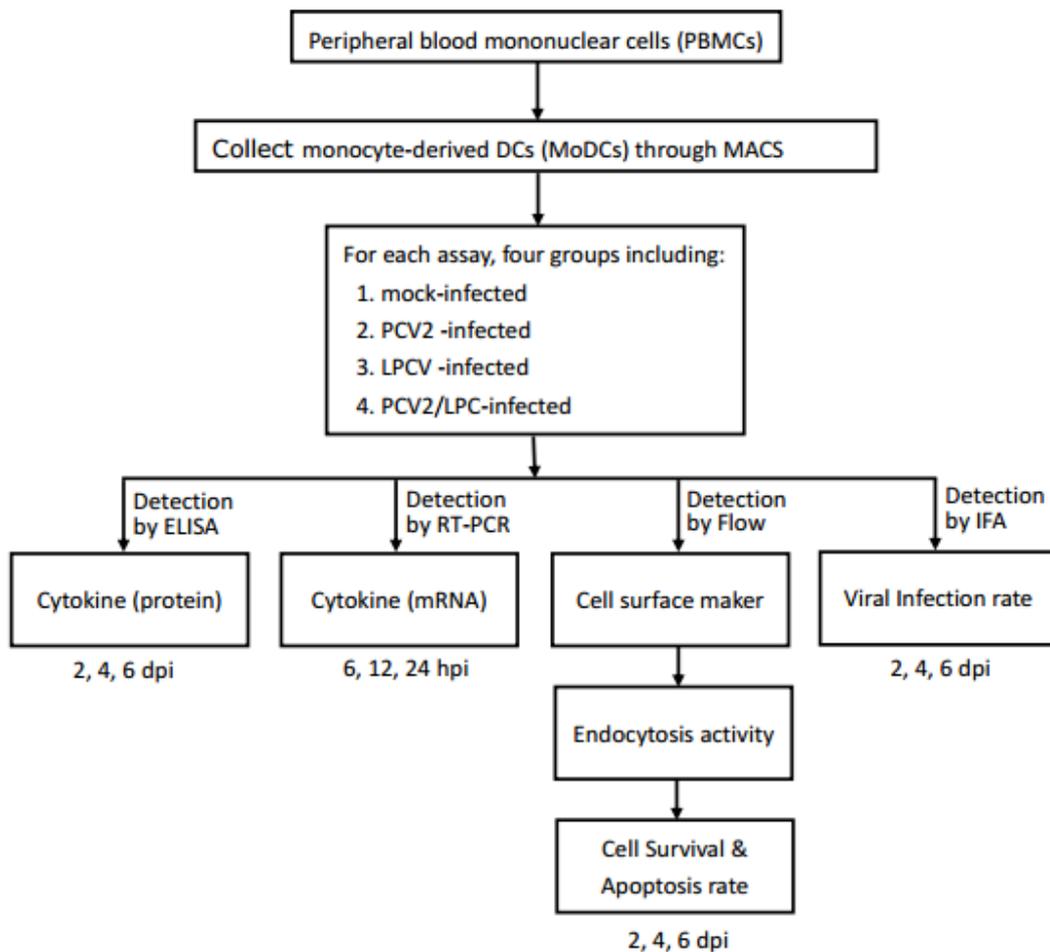
第三章 材料與方法



第一節 實驗設計

本實驗目的為探討豬第二型環狀病毒感染血液單核球來源之樹突細胞，是否干擾兔化豬瘟疫苗效力的可能機制。從無特定病原(SPF)豬隻採血後，分離周邊血液單核細胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)，並使用 MACS MicroBeads 磁珠分選系統篩選出 CD172a⁺細胞，繼續培養成未成熟樹突細胞(imature MoDCs, imDCs)。實驗組分為四組，分別為陰性控制組、第二型豬環狀病毒單獨感染組、兔化豬瘟疫苗病毒株單獨感染組以及共同感染組，觀察各實驗組之樹突細胞在感染病毒後不同時間點的細胞型態、病毒感染率、細胞存活率、細胞凋亡率、細胞壞死率、細胞攝取抗原之能力、細胞表面抗原的改變和細胞激素 mRNA 及蛋白質的表現量，藉此釐清其可能干擾機制。

1-1 實驗設計與流程圖





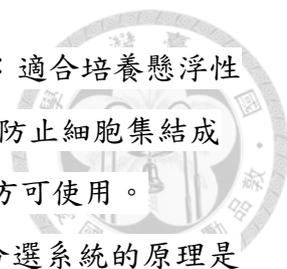
第二節 實驗材料

2-1 實驗動物

自臺灣動物科技研究所購買四隻六週齡無特定病原(Specific pathogen free, SPF)健康豬隻，無特定病原定義包括豬第二型環狀病毒、豬瘟病毒、豬生殖與呼吸道綜合症病毒、假性狂犬病病毒、豬細小病毒、豬流行性感冒病毒及豬肺炎黴漿菌等病原的感染，在酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)檢測結果為陰性。為了減少干擾因素，使用聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)再次檢測是否污染豬第一及第二型環狀病毒、豬瘟病毒、豬生殖與呼吸道綜合症病毒等四種病毒，檢測結果皆為陰性；豬隻飼養於行政院農委會家畜衛生試驗所動物房，每週採血進行實驗。

2-2 血球分離相關藥品

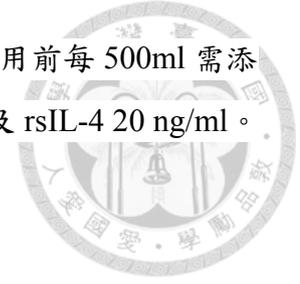
1. K²-EDTA 真空無菌紫頭採血管(Vacutainer™)：採血管內壁噴霧 K²-EDTA，藉由螯合血液中促進血液凝固的鈣離子，進而達到抑制血液凝固的作用。
2. Antibiotic-antimycotic 抗生素(Gibco™)：內含 Amphotericin B、Streptomycin 和 Penicillin，用途為抑制細菌及黴菌污染。
3. Dulbecco's Phosphate-buffered saline (D-PBS)：在本實驗中配製藥品及試劑是使用不含鈣和鎂的 D-PBS (Gibco™)，使用 1 公升二次水溶解後，調整 pH 值至 7.4-7.5，經高壓滅菌釜滅菌後使用。
4. 2% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)：0.01M Na₂EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) 20g 溶解於 1 公升 D-PBS，校正 pH 值至 7.4-7.5，經高壓滅菌後使用。
5. Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich®)：血液中之血球有不同的沉降係數，利用此原理將同密度細胞分布在同一介面，並使用離心在密度梯度中分離細胞。
Ficoll-paque 溶液密度為 1.007 g/ml，分離過程中細胞和溶液會形成四個介面，由下而上順序為紅血球、Ficoll-paque、buffy coat、RPMI medium。
6. Ammonium chloride potassium chloride (ACK) lysing buffer：在分離血球過程中，溶解紅血球。每 1 公升二次水含 0.15M NH₄Cl 8.29 g、1M KHCO₃ 1 g、0.01M EDTA 37.2mg，調整 pH 值至 7.2-7.4，以 0.22μm 過濾杯(Corning Costar Corp)過濾後使用。

- 
7. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 培養液(Gibco™)：適合培養懸浮性細胞，在本實驗分離豬周邊血液單核球時用來清洗細胞，可防止細胞集結成塊，使用前每 1 公升加入抗生素 10ml 和 2% EDTA 10 ml 後方可使用。
 8. QuadroMACS™ Starting Kits (MACS Miltenyi Biotec)：磁珠分選系統的原理是利用具特殊抗原鍵結磁珠(MicroBeads)捕捉欲篩選之細胞，當細胞通過管柱時，目標細胞因抗體鍵結會被強力磁性吸附在管壁中，藉此去除其他細胞，提高實驗特異性。此系統包含具有磁性的分離器(Separator)、磁座(MultiStand)及離心管架。
 9. LS Columns (MACS Miltenyi Biotec)：適用於正向篩選(positive selection)，每次分選細胞總數最大值為 2×10^9 ，磁珠標記細胞最大值為 10^8 。
 10. Mouse Anti-Pig CD172a conjugate FITC (AbD Serotec)：0.1mg，isotype IgG1，CD172a 表現於骨髓單核球系列之細胞，例如單核球、樹突細胞、巨噬細胞等，在本實驗當中為一級抗體所使用。
 11. Anti-FITC MicroBeads (MACS Miltenyi Biotec)：2ml，可用於 200 次以上分選(每次分選細胞 2×10^9 內)。
 12. MACS Running Buffer (MACS Miltenyi Biotec)：磁珠分選系統中用來清洗細胞之緩衝液。1 公升 D-PBS 含有 0.5% Bovine serum albumin (BSA)及 2mM EDTA，需調整 pH 值至 7.2，0.22 μm 過濾杯(Corning Costar Corp)過濾後使用。

2-3 細胞培養液和相關試劑

1. Fetal bovine serum (Biological Industries)：胎牛血清經非働化後使用。
2. Recombinant swine granulocyte macrophage-colony stimulating factor (rsGM-CSF)顆粒球巨噬細胞生長刺激因子(Invitrogen™, Karlsruhe, Germany)：在本實驗 GM-CSF 係用來刺激單核球分化為樹突細胞，100 $\mu\text{g}/\text{vial}$ 粉末使用 1ml D-PBS 溶解成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分裝儲存。
3. Recombinant swine interleukin-4 (rsIL-4) (Invitrogen™, Karlsruhe, Germany)：IL-4 可刺激單核球分泌 GM-CSF，使單核球分化為樹突細胞，10 $\mu\text{g}/\text{vial}$ 粉末使用 100 μl D-PBS 溶解成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分裝儲存。
4. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)培養基(Gibco™)：豬單核球來源樹突

細胞(MoDCs)培養液，刺激分選出單核球分化成 MoDCs。使用前每 500ml 需添加上節所述之抗生素 5ml、FBS 50ml、rsGM-CSF 20 ng/ml 及 rsIL-4 20 ng/ml。



2-4 豬第二型環狀病毒與兔化豬瘟疫苗病毒株

1. 兔化豬瘟疫苗 Lapinized Philippines Coronel (LPC) vaccine：由行政院家畜衛生試驗所豬瘟組分讓。
2. 豬第二型環狀病毒 porcine circovirus type 2 (PCV2)：基因型為 PCV2b，由宜蘭大學郭村勇老師實驗室分讓。

2-5 核酸萃取及聚合酶鍊鎖反應之藥品

1. 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich[®])：在收取細胞過程中減緩 RNA 降解。
2. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)：用於抽取細胞 RNA。此套組內含 RNeasy mini spin columns、Collection tubes、Buffer RLT、Buffer RW1、Buffer RPE 及 RNase-free water。Buffer RPE 55ml 使用前須加入 220ml 絕對酒精 (Sigma-Aldrich[®])。Buffer RLT 每 10ml 加入 100 μ l 2-mercaptoethanol。
3. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific)：在本研究中所使用的 cDNA 轉換試劑。內含 Thermo Scientific RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase、Thermo Scientific RiboLock Ribonuclease Inhibitor、5x Reaction Buffer、10mM dNTP Mix、Oligo(dT)₁₈ Primer、Random Hexamer Primer、DEPC-treated Water。
4. KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (Kapa Biosystems)：在即時聚合酶鍊鎖反應時使用之試劑。
5. 本實驗所使用的 probe 及 primer 列於 Table. 1。

2-6 流式細胞儀相關藥品

1. Annexin V 能夠與正在凋亡細胞的磷脂質絲氨酸(Phosphatidylserine, PS)結合，Propidium Iodide (PI)可插入壞死細胞的 DNA 鹼基對中，藉由雙染便能得知細胞凋亡與壞死的情形。此套組內含 Annexin V-FITC、Propidium Iodide 及 Annexin V Binding Buffer。

- 
2. DQ™ovalbumin (Molecular Probes®, Eugene, OR, USA) : 1mg , 用於偵測細胞攝取可溶性抗原之能力。
 3. *Staphylococcus. aureus* conjugates FITC (Molecular Probes® Eugene, OR, USA) : 10 mg , 用於偵測細胞攝取及處理顆粒性抗原之能力。
 4. Mouse Anti-Pig CD14 conjugate FITC (AbD Serotec) : 0.1 mg , 。
 5. Anti-Mouse CD80 conjugate FITC (B7-1) (eBioscience) : 0.5 mg 。
 6. Rabbit Anti-pig CD86 conjugate PE (B7-2) (Bioss, USA) : 0.1 mg 。
 7. Mouse Anti-Pig SLA Class I-FITC (AbD Serotec) : 0.1 mg 。
 8. Mouse Anti-Pig SLA Class II-FITC (AbD Serotec) : 0.1 mg 。
 9. BD FACSDiagnostic Sheath Fluid (BD FACSDiagnostic™) : 流式細胞儀所使用鞘液。

2-7 酵素連結免疫分析法

1. IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、TNF- α 、IFN- γ 測定，使用商業化套組 Quantikine® ELISA (R&D systems) : 內含 Microplate、Standard、Control、Conjugate、Assay Diluent、Calibrator Diluent、Wash Buffer、Color reagent A、Color reagent B、Stop Solution 。
2. Protein Detector HRP Microwell Kit (KPL) : 測定 IFN- α ，內含 Coating Solution Concentrate、BSA Diluent/Blocking Solution、Wash Solution、50% glycerol solution、HRP-labeled Anti-Mouse IgG (H+L)、ABTS Peroxidase Substrate、ABTS Stop Solution 。
3. Recombinant Porcine Interferon Alpha (PBL Assay Science) : 0.1 ml , 1x10⁵ units , activity 1.66x10⁶ Units/ml 。
4. Mouse Anti-pig Interferon Alpha (PBL Assay Science) : 500 μ g , clone K9 。
5. Mouse Anti-pig Interferon Alpha (PBL Assay Science) : 500 μ g , clone F17 。
6. Avidin-Horseradish peroxidase (eBioscience) : 用於 ELISA 檢測，1 : 500 稀釋 。

2-8 免疫螢光染色相關試劑

1. WH303 Mouse Anti-Pestiviruses (Classical Swine Fever Specific) (AHVLA Scientific) : 1mg , 在免疫螢光染色中之一級抗體 。

2. Mouse Anti-porcine circovirus type 2 (分讓自行政院農委會家畜衛生試驗所 豬瘟組)：在螢光染色中之一級抗體。
3. Goat Anti-mouse IgG conjugate FITC (BD pharmingem™, NJ, USA)：在免疫螢光染色中之二級抗體。
4. Propidium Iodide (Sigma-Aldrich®)：在免疫螢光染色時染細胞核所使用。



2-9 儀器

1. Real-time PCR：LightCycler®480 system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
2. 流氏細胞儀：FACS Calibur flow cytometer (Becton and Dickinson, Sunnyvale, CA, USA)
3. PCR：yT&A® vector (Yestern Biotech)
4. 細胞抹片離心機：Shandon cytospin centrifuge (Shandon Southern Instrument, Sewelicky, PA, USA)

第三節 實驗方法

3-1 細胞分離與培養

3-1-1 豬周邊血液單核細胞(PBMCs)的分離與純化

1. 四隻 SPF 豬隻固定各採血 20 ml，平均分配於真空無菌紫頭管，新鮮血液與管內 EDTA 充分混勻。
2. 離心 1800 xg，30 分鐘，4°C。
3. 抽取血漿與血球之間的 Buffy coat，與 3ml RPMI-1640 (內含 0.02 % EDTA)混合均勻，緩慢滴入事先準備好的 7ml Ficoll-Paque，使細胞懸浮液在 Ficoll-Paque 上層，勿衝破液面。離心 1800 xg，30 分鐘，4°C。
4. 抽取位於第二層的 PBMCs，與 3ml RPMI-1640 混合均勻後補滿 RPMI-1640。
5. 離心 200 xg，10 分鐘，4°C。
6. 去除上清液，加入 5 ml ACK 緩衝溶液與底部細胞混合均勻，5 分鐘，4°C。
7. 加入 10 ml RPMI-1640 中止 ACK 緩衝溶液反應，離心 180 xg，10 分鐘，4°C。

8. 去除上清液，底部細胞與 15ml RPMI-1640 充分混合均勻。
9. 離心 120 xg，10 分鐘，4°C。
10. 使用 trypan blue (Sigma-Aldrich®) 細胞計數之。



3-1-2 MACS 磁珠系統分選 CD172a⁺ (SWC3) 細胞與培養

1. 將分離完成 PBMCs 細胞數調整為每管 5×10^7 ，與 5ml MACS Running buffer 混和均勻。
2. 離心 200 xg，10 分鐘，4°C。此步驟目的為去除血小板。
3. 去除上清液，底部細胞與 500 μ l MACS Running buffer 混合均勻，每管加入 10 μ l Mouse Anti-Pig CD172a (SWC3) conjugate FITC。
4. 4°C 作用 15 分鐘。
5. 加入 5ml MACS Running buffer，離心 300 xg，10 分鐘，4°C。
6. 去除上清液，底部細胞與 5 ml MACS Running buffer 混合均勻。
7. 離心 300 xg，10 分鐘，4°C。
8. 去除上清液，底部細胞與 490 μ l MACS Running buffer 混合均勻，每管加入 10 μ l Anti-FITC MicroBeads。
9. 4°C 作用 15 分鐘。
10. 加入 5ml MACS Running buffer，離心 300 xg，10 分鐘，4°C。
11. 去除上清液，相同豬隻的細胞合併成一管，將細胞懸浮於 5 ml MACS Running buffer 中。
12. 將 QuadroMACS™ Starting Kits 所附之磁座、磁性分離器、試管架及收集廢液離心管架設完成。
13. LS Columns 放入分離器卡榫當中，使用 3 ml MACS Running buffer 潤洗之。
14. 待 LS Columns 中的液體全部流入廢液管後，加入欲分選的細胞懸浮液。
15. 待 LS Columns 中的細胞懸浮液全部流入廢液管後，加入 3 ml MACS Running buffer 清洗之。此步驟需重複三次。
16. 完成清洗後，將 LS Columns 從磁性分離器取出並置於離心管上方，加入 5 ml MACS Running buffer，並使用 LS Columns 所附之擠壓器將管柱內的細胞用力擠壓至離心管中。



17. 分選完成細胞使用 trypan blue 計數之。
18. 離心 300 xg，10 分鐘，4°C。
19. 去除上清液，使用回溫至 36.5°C 的 DMEM 培養基(內含 rsGM-CSF 20 ng/ml 及 rsIL-4 20 ng/ml)將 CD172a (SWC3)細胞數調整為 5×10^5 /ml。
20. 依照不同實驗組和不同時間點將細胞鋪於 24 孔盤(Costar, Cambridge, USA)，每孔細胞數為 5×10^5 /ml。
21. 培養於含 5% CO₂ 37°C 恆溫培養箱五天，培養期間須觀察細胞分化情形。
22. 第六天加入豬第二型環狀病毒(PCV2) 0.5 m.o.i。
23. 待 18 小時後，加入兔化豬瘟疫疫苗病毒株(LPCV) 0.5 m.o.i。
24. 在本研究中，收取細胞進行分析的時間點分別為感染病毒後第 48、96、144 小時。(在分析細胞激素 mRNA 表現量時，細胞收取時間為感染病毒後第 6、12、24 小時)。

3-2 豬第二型環狀病毒對兔化豬瘟疫疫苗在樹突細胞的影響

3-2.1 以免疫螢光染色法檢測病毒對樹突細胞的感染率

1. 本研究的實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)，在欲收取細胞的時間點先將細胞培養上清液收集並儲存於-80°C，並在每孔加入 1 ml 冰 PBS，使貼於底部的細胞懸浮。
2. 放置五分鐘後，使用微量吸管清洗每孔，使還貼於底部的細胞完全懸浮於 PBS，收取完成後，使用 trypan blue 計數之。
3. 取 100 μ l 細胞懸浮液(細胞數量約 5×10^3)，利用細胞抹片離心機將細胞打到玻片上。離心 120 xg，10 分鐘。
4. 使用玻璃染缸將玻片浸泡 100%丙酮中固定，4°C，10 分鐘。
5. 取出玻片風乾，並用防水筆在細胞外圍畫一圈，避免染色時抗體溶液乾涸。
6. 以 PBS 清洗玻片，風乾後分別於對應的組別加 50 μ l 一級抗體。
7. 置於室溫作用 1 小時。
8. 以 PBS 清洗玻片，加 50 μ l 二級抗體。
9. 置於室溫作用 1 小時，需避光。

- 
10. 以 PBS 清洗玻片，加 50 μ l PI 染細胞核，停留一秒即可馬上清洗。
 11. 玻片風乾後使用封片膠封片，螢光顯微鏡觀察。
 12. 在 200 倍視野下選擇細胞密度適當的位置，計算每一百顆細胞總數量及陽性細胞數量，求得病毒對單核球來源樹突細胞感染率，之後使用照相系統拍照儲存相片，玻片可避光儲存於 4°C 數個月。

抗體稀釋倍數:

- I. 1°Ab: Mouse Anti-Pestiviruses(WH303) 100x dilute
Mouse Anti-porcine circovirus type 2 (114C8) 300x dilute
- II. 2°Ab: Goat Anti-mouse IgG conjugate FITC 500x dilute
- III. Propidium Iodide (PI) 1000x dilute

3-2.2 以流式細胞儀檢測細胞表面抗原 CD14、CD80/86、MHC I、MHC II 之變化

1. 本實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)，在欲收取細胞的時間點先將細胞培養上清液收集並儲存於-80°C。
2. 於每孔加入 1 ml 冰 D-PBS，使貼於底部的細胞懸浮，扣除在收取細胞及離心的過程中損失的細胞，最後的細胞數量每孔約為 4×10^5 ，並平均分配為兩管（一管 2×10^5 細胞數），分別染不同的細胞表面抗原(cell maker)。
3. 離心 180 xg，10 分鐘，4°C。
4. 去除上清液，使細胞懸浮於 D-PBS 100 μ l，混合均勻，每管分別加欲檢測細胞表面抗原的單株抗體，此步驟開始需避光。4°C 作用 30 分鐘。
5. 以冰 D-PBS 清洗細胞，離心 180 xg，10 分鐘，4°C (此步驟重複三次)。
6. 去除上清液，使細胞懸浮於 D-PBS 400 μ l，以流式細胞儀偵測螢光。
7. 使用 CellQuest™ 軟體進行數據分析，扣除陰性控制組細胞背景值定義 M1 區內陽性細胞，並換算檢測樣本位於 M1 區之細胞百分比。

每 2×10^5 細胞所配製的抗體量及 flow channel:

- I. Mouse Anti-Pig CD14 conjugate FITC: 0.1 mg/ml，10 μ l，FL1。
- II. Anti-Mouse CD80 conjugate FITC (B7-1): 0.5 mg/ml，1 μ l，FL1。
- III. Rabbit Anti-pig CD86 conjugate PE (B7-2): 0.1 mg/ml，1 μ l，FL2。

IV. Mouse Anti-Pig SLA Class I-FITC : 0.1 mg/ml , 10 μ l , FL1 。

V. Mouse Anti-Pig SLA Class II-FITC : 0.1 mg/ml , 10 μ l , FL1 。



3-2.3 以 Annexin V-FITC (AV)和 Propidium Iodide (PI)檢測細胞凋亡和壞死率

1. 在細胞凋亡的過程當中常常伴隨著一系列的特徵及型態改變，而細胞膜的改變通常較早開始發生，在凋亡細胞中，細胞膜磷脂絲氨酸(Phosphatidylserine, PS)會從內側翻轉到細胞外側；Annexin V 是一種鈣離子依賴性的磷脂結合蛋白，對 PS 有很高的親和力，可與凋亡及壞死的細胞結合，PI 是一種 DNA 染料，通常死亡的細胞細胞膜通透性會增加，當 PI 進入細胞與 DNA 結合可發出螢光，因此可區分存活與死亡的細胞。
2. 本實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)，在欲收取細胞的時間點先將細胞培養上清液收集並儲存於 -80°C 。
3. 收取四個實驗組的細胞，以 D-PBS 清洗。離心 200 $\times g$ ，10 分鐘， 4°C 。
4. 配製 AV-PI working solution，每個待檢測樣本去除上清液後，底部細胞與 104 μ l AV-PI working solution 混合均勻。(一個樣本的配方為 Annexin V Binding Buffer 100 μ l + Annexin V-FITC 2 μ l + Propidium Iodide 2 μ l)
5. 15°C - 25°C ，避光作用 15 分鐘。
6. 不須離心直接加入 Annexin V Binding Buffer 400 μ l，以流式細胞儀偵測 FL1 和 FL3 channel 雙染螢光。
7. 使用 CellQuestTM 軟體進行數據分析，以陰性控制組、單染 AV 及單染 PI 的細胞定義出三個象限(UR、LL、LR)內的陽性細胞，並換算檢測每個樣本位於四個象限內的細胞百分比。

細胞凋亡和死亡之定義：

- I. 正常細胞: Annexin V negative and PI negative
- II. 早期凋亡細胞: Annexin V positive and PI negative
- III. 死亡細胞或晚期凋亡細胞: Annexin V positive and PI positive

3-2.4 *Staphylococcus. aureus*-FITC 檢測 MoDCs 攝取及處理顆粒性抗原的能力

1. 本實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)。
2. 使 *Staphylococcus. aureus* conjugates FITC (*S. aureus* 3×10^8 /mg)和細胞的比例為 50 : 1。
3. 將背景對照組置於 4°C，檢測組置 37°C 含 5% CO₂ 恆溫培養箱作用 1 小時。
4. 加 200 μ l trypan blue 抑制胞外訊號，作用 20 分鐘。
5. 收取細胞，離心 300 xg，4°C，10 分鐘。
6. 去除上清液，使用 D-PBS 清洗細胞，離心 300 xg，4°C，10 分鐘。清洗步驟重複三次。
7. 去除上清液，加入 200 μ l 以 PBS 配製 1% Paraformaldehyde (PFA)固定細胞。
8. 流式細胞儀偵測樣本 FL1 channel 螢光值，使用 CellQuest™ 軟體進行數據分析，以背景對照組定義 M1 區內陽性細胞，並換算檢測樣本位於 M1 區之細胞百分比。

3-2.5 DQ™-ovalbumin 檢測 MoDCs 攝取及處理可溶性抗原的能力

1. 本實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)
2. DQ™-ovalbumin (DQ-OVA)螢光呈色劑為 BODIPY®FL dye，在經過細胞吞噬降解其片段後才會呈現綠色螢光。每孔加 200 μ l DQ-OVA (2mg/ml)，背景對照組置於 4°C，檢測組置 37°C 含 5% CO₂ 恆溫培養箱作用 1 小時。
3. 收取細胞，離心 300 xg，4°C，10 分鐘。
4. 去除上清液，使用 D-PBS 清洗細胞，離心 300 xg，4°C，10 分鐘。清洗步驟重複三次。
5. 去除上清液，加入 200 μ l 以 PBS 配製 1% Paraformaldehyde (PFA)固定細胞。
6. 流式細胞儀偵測樣本 FL1 channel 螢光值，使用 CellQuest™ 軟體進行數據分析，以背景對照組定義 M1 區內陽性細胞，並換算檢測樣本位於 M1 區之細胞百分比。



3-2.6 以酵素連結免疫分析法檢測細胞激素蛋白表現量

1. 酵素連結免疫分析法(Enzyme-linked immunoassay, ELISA)係利用抗原抗體專一性鏈結之特性，配合酵素與受質之反應與呈色，經由判讀顏色的變化利用吸光值(OD)進行定量分析。
2. 本實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)，在欲收取細胞的時間點先將細胞培養上清液收集並儲存於 -80°C 。
3. 測定 IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、TNF- α 、IFN- γ 使用商業化套組 Quantikine® ELISA (R&D systems)，並依照說明書進行操作。
4. 取出細胞培養上清液於室溫解凍，並按照說明書建議比例稀釋待測樣本。
5. 配製標準品和陽性控制組，將標準品做六階連續兩倍稀釋。
6. 以 IL-1 β 為例，在 96 孔微量培養盤中加 Assay Diluent 50 μl /well。
7. 標準品、陽性控制組及檢測樣本加 50 μl /well，貼上封膜膠，置於微量培養盤震盪器(Sahker)，50 xg，常溫作用 2 小時。
8. 將盤內液體吸除，加 Wash Buffer 400 μl /well 清洗 96 孔盤，洗掉沒有和抗體結合之抗原，此步驟重複五次。
9. 最後一次清洗甩乾盤內液體，加 Conjugate 50 μl /well，貼上封膜膠，置於微量培養盤震盪器，50 xg，常溫作用 2 小時。
10. 將盤內液體吸除，加 Wash Buffer 400 μl /well 清洗 96 孔盤，洗掉沒有和抗體結合之抗原，此步驟重複五次。
11. 最後一次清洗甩乾盤內液體，加 Substrate Solution 100 μl /well (Color reagent A 和 Color reagent B 等量混合，15 分鐘內使用)，常溫避光作用 30 分鐘。
12. 加 Stop Solution 100 μl /well 中止呈色反應，使用 ELISA reader (450nm) 檢測樣本吸光值。
13. 用 Office Excel 將具有線性關係之已知濃度的標準品代出公式，再將檢測樣本吸光值代入公式求得濃度。

3-2.7 以 Real-time PCR 偵測細胞激素 mRNA 表現量

1. 本實驗分為四個組別，分別為(A) mock 控制組、(B) PCV2 感染組、(C) LPCV

- 感染組、(D) PCV2-LPCV 共同感染組，細胞培養於 24 孔盤(5×10^5 /well)，在欲收取細胞的時間點(感染病毒後 6、12、24 小時)收取細胞進行後續實驗。
2. 以 RNeasy Mini Kit 萃取細胞核糖核酸(RNA)，先去除細胞培養液，配製 lysing buffer (10 ml RLT buffer 加 100 μ l 2-mercaptoethanol)加 350 μ l/well 溶解細胞。
 3. 取出細胞溶解液，加入等量(350 μ l) 70%乙醇，混合均勻，將混合液移至套組提供之 spin column，離心 8000 xg，4°C，15 秒。
 4. 更換新的收集管，加 700 μ l RW1 buffer，離心 8000 xg，4°C，15 秒。
 5. 更換新的收集管，加 500 μ l RPE buffer，離心 8000 xg，4°C，15 秒。
 6. 更換新的收集管，加 500 μ l RPE buffer，離心 8000 xg，4°C，2 分鐘。
 7. 更換新的收集管，用最高轉速(12000 xg)空轉 1 分鐘，確保 spin column 沒有殘餘液體。
 8. 將收集管更換為 RNase free 微量離心管，加 35 μ l RNase-free water，離心 8000 xg，4°C，1 分鐘。
 9. 丟棄 spin column，將抽取完成的 RNA 儲存於-80°C。
 10. 以 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 將 RNA 反轉錄為互補 DNA (Complementary DNA, cDNA)。以下為 premix 配方。

	RNA	33.5 μ l
+	<u>Oligo (dT)₁₈ Primer</u>	<u>2 μl</u>
	Total	35.5 μ l

反應條件為: 65°C，5 分鐘 → 置冰上

	10mM dNTP Mix	2 μ l
	Reverse Transcriptase	1.5 μ l
	Ribonuclease Inhibitor	1 μ l
+	<u>5x Reaction Buffer</u>	<u>10 μl</u>
	Total	14.5 μ l

反應條件為: 42°C，1 小時 → 94°C，5 分鐘 → 4°C

11. 轉錄完成 cDNA 儲存於-20°C 備用。
12. 以及時聚合酶鏈鎖反應(Real-time PCR)偵測細胞激素 mRNA 表現量。在本研究中，偵測的項目包括 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、TNF- α 、IFN- α 、IFN- γ 、TLR-3、TLR-7、TLR-8、TLR-9，House-keeping gene 使用 GAPDH、 β -actin、cyclophilin (primer 和 probe 列於 table1.)。配方如下。



qPCR Master Mix (2X)	10 μ l
forward primer	0.4 μ l
Reverse primer	0.4 μ l
Probe	0.4 μ l
cDNA template	3 μ l
+ RNase-free water	5.8 μ l
<hr/>	
	Total 20 μ l

反應條件為: 95°C, 25 秒 \rightarrow 60°C, 30 秒 \rightarrow 72°C, 20 秒

13. 以上敘述條件為 1 個循環, 共進行 40 個循環。

14. 將所有樣本的 cycle threshold (Ct)值減去 House-keeping gene 的 Ct 值可得 Δ Ct 值, 代入 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 公式可得欲評估基因之 mRNA 相對表現量。

3-3 統計分析

在本研究中的試驗結果以 mean \pm standard deviation 表示(圖表以 mean \pm standard error of the mean 表示), 並以 Prism 5 程式做圖。統計分析使用單因子變異數分析(One-Way ANOVA, Statistical Analysis System, SAS[®] 9.2 Software), 並以變方分析進行兩組之間的比較, 當其中任兩組 p 值 < 0.05 有顯著差異, 以 Duncan's test ($\alpha=0.05$)比較各組平均值之間的差異。



Table 1. 引子序列

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer	Probe primer
IL-1	GTGCTCAAACGAAGACGAACC	CATATTGCCATGCTTTTCCCAGAA	TGCTGAAGGAGCTGCCTGAGACACCC
IL-4	GTCTGCTTACTGGCATGTACCA	GCTCCATGCACGAGTTCTTTCT	CAACTTCGTCCACGGACACAAGTGCGAC
IL-6	CTGGCAGAAAACAACCTGAACC	TGATTCTCATCAAGCAGGTCTCC	TTGAACCCAGATTGGAAGCATCCGTCTTTT
IL-8	TGAGAGTGGACCCCACTGTGA	CTGTTGTTGTTGCTTCTCAGTTCTC	TGTCAATGGAAAAGAGGTCTGCCTGGA
IL-10	CGGCGCTGTCATCAATTTCTG	CCCCTCTCTGGAGCTTGCTA	AGGCACTCTTCACCTCCTCCACGGC
IL-12p40	CACAGCAGG CCCAGGAAT	TGTTGCTGACGGCCTTCA	TCAACCACTCCAAAATCTGCTGA
IFN- α	GCATGAGATGCTCCAGCAGAC	CCTCACAGCCAGGATGGAGT	CTCGGCTGCTGCCTGGAATGA
IFN- γ	CGATCCTAAAGGACTATTTTAATGCAA	TTTTGTCACTCTCCTCTTTCCAAT	ACCTCAGATGTACCTAATGGTGGACCTCTT
TNF- α	TGGTACGAACCCATCTACCTG	GGCACTGAGTCGATCATCCT	GCTGGAAG
TLR-3	GAGTTGTCATCAAATCAAATACAAGAG	GAGGCCAAATAATTTTCCAATG	TCTCCAGG
TLR-7	CACATAGCGAGCATCACTCC	TGAAATCGATCTCTACCAGGTG	CTTCCAGC
TLR-8	CTCCATCACCTCAGGGAGTT	AAGCCAGTGGGTATTTACG	GCTGGAAG
TLR-9	GACCATCGAGCCCAACAC	GGTCGTGATGCTGTTGTAGC	AGGAGCTG
GAPDH	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT	CCACCAACCCAGCAAGAGCACGC

The sequence of TaqMan probes and primers used in reverse-transcription real-time PCR from (Sipos et al., 2005)

第四章 結果



第一節 細胞純化

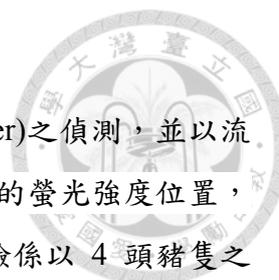
30 ml 豬隻血液使用密度梯度離心法去除血清、紅血球、顆粒球及血小板後，約可得 6×10^7 至 1.5×10^8 ，再使用 MACS 磁珠分選系統篩選出 $CD172a^+$ (SWC3) 細胞，約可得 6×10^6 至 1.5×10^7 。將細胞以 Mouse Anti-Pig CD14 conjugate FITC 進行染色分析後，得單核球來源之細胞純度平均為 97.46 %。

第二節 豬第二型環狀病毒對兔化豬瘟疫苗在 MoDCs 之影響

2-1 病毒對單核球來源之樹突細胞感染率

本試驗使用免疫螢光染色法(IFA)將細胞固定後進行染色，並以人工判讀的方式，和陰性控制組的染色結果比較病毒感染單核球來源之樹突細胞(MoDCs)之感染率(infection rate)，染色結果顯示於 Fig. 1，統計資料的呈現以百分比值(percentage)表示，本試驗係以 4 頭豬隻之 MoDCs 作為 4 重複的檢測對象。當豬的第二型環狀病毒(PCV2)單獨接種於細胞時(0.5 M.O.I)，在病毒感染後的第 2、4、6 天，PCV2 感染率平均值分別為 $85 \pm 5.85\%$ 、 $83 \pm 5.42\%$ 和 $87 \pm 3.00\%$ (Fig. 2A)；當 PCV2 和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)共同接種於細胞時在病毒感染後的第 2、4、6 天，PCV2 感染率平均值分別為 $85 \pm 4.79\%$ 、 $84 \pm 6.32\%$ 和 $88 \pm 4.32\%$ (Fig. 2A)。將 PCV2 單獨感染組和 PCV2/ LPCV 共同感染組在三個時間點進行各別比較，結果於統計學上皆無顯著差異($p > 0.05$)。

當 LPCV 單獨接種於細胞時(0.5 M.O.I)，在病毒感染後的第 2、4、6 天，LPCV 感染率平均值分別為 $88 \pm 3.0\%$ 、 $86 \pm 2.87\%$ 和 $89 \pm 3.77\%$ (Fig. 2B)；當 LPCV 和 PCV2 共同接種於細胞時在病毒感染後的第 2、4、6 天，LPCV 感染率平均值分別為 $89 \pm 3.69\%$ 、 $88 \pm 3.77\%$ 和 $89 \pm 1.26\%$ (Fig. 2B)。將 LPCV 單獨感染組和 PCV2/ LPCV 共同感染組在三個時間點進行各別比較，結果於統計學上皆無顯著差異($p > 0.05$)。本試驗結果顯示 PCV2 和 LPCV 對 MoDCs 的親和性高，從感染病毒後第 2 天開始病毒陽性率皆達 80% 以上，且 PCV2 的存在不會影響 LPCV 對 MoDCs 的感染能力，LPCV 亦不影響 PCV2 對 MoDCs 的感染能力。



2-2 單核球來源之樹突細胞相關細胞表面抗原表現結果

本試驗係以流式細胞儀進行細胞表面抗原(cell surface maker)之偵測，並以流式細胞儀分析軟體 CellQuest™ 經人工定義親細胞群(parent)所在的螢光強度位置，資料呈現方式為分析軟體所顯示之百分比值(percentage)，本試驗係以 4 頭豬隻之 MoDCs 作為 4 重複的檢測對象。針對病毒感染單核球來源之樹突細胞後所偵測的細胞表面抗原，包括 CD14、CD80、CD86、MHC class I 及 MHC class II 進行檢測，檢測結果 CD80、CD86 和 MHC class II 在所有實驗組皆為陰性；CD14 在 mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組，在病毒感染後第 48 小時的百分比平均值依序為 $97.25 \pm 1.44\%$ 、 $97.41 \pm 1.25\%$ 、 $97.51 \pm 0.80\%$ 和 $97.66 \pm 1.14\%$ (Fig. 3)，結果於統計學上皆無顯著差異($p > 0.05$)。MHC class I 在 mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組在病毒感染後第 48 小時的百分比平均值依序為 $95.00 \pm 1.14\%$ 、 $94.56 \pm 1.25\%$ 、 $94.73 \pm 1.07\%$ 和 $93.96 \pm 1.76\%$ (Fig. 3)，結果於統計學上皆無顯著差異($p > 0.05$)。本試驗結果顯示當 PCV2 和 LPCV 感染 MoDCs 時皆不會影響 CD14 和 MHC class I 的表達，而成熟型樹突細胞(mature DCs)特有的細胞表面分子 CD80、CD86 和 MHC class II 在本試驗中未檢測出，此結果顯示 PCV2 和 LPCV 在接種病毒後第 48 小時，亦沒有刺激未成熟樹突細胞(immature DCs)成熟的能力。

2-3 感染病毒後細胞存活率、死亡率與凋亡率之分析

本試驗實驗組為 mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組，分別於 MoDCs 感染病毒後的第 2、4、6、8 天收取細胞，使用 Annexin V-FITC/Propidium Iodid (AV/PI) 雙染細胞後，再以流式細胞儀之 FL1 channel 和 FL2 channel 進行細胞存活率(Survival rate)、凋亡率(Apoptosis rate)和死亡率(Necrosis rate)的分析，數據皆以流式細胞儀分析軟體 CellQuest™ 進行分析，並以單染 AV 和 PI 的控制組定義三個象限代表之正常細胞、早期凋亡細胞、晚期凋亡細胞和死亡細胞。在接種病毒後第 2 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的存活率依序為 $96.59 \pm 0.86\%$ 、 $93.01 \pm 1.58\%$ 、 $96.08 \pm 1.36\%$ 、 $93.35 \pm 0.99\%$ (Fig. 4A)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞存活率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組之間的細胞存活率在統計學上亦無顯著差異($p > 0.05$)，而 mock 組和 LPCV 感染組細胞存活率在感染病毒後第 2 天皆

高於 PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組，在統計學上存在顯著差異($p < 0.05$)。在接種病毒後第 4 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的存活率依序為 $93.61 \pm 1.246\%$ 、 $92.84 \pm 2.13\%$ 、 $95.57 \pm 0.22\%$ 、 $94.63 \pm 2.37\%$ (Fig. 4A)，每個實驗組之間皆無顯著差異($p > 0.05$)。在接種病毒後第 6 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的存活率依序為 $94.08 \pm 2.04\%$ 、 $89.65 \pm 0.09\%$ 、 $94.62 \pm 1.87\%$ 、 $87.91 \pm 1.85\%$ (Fig. 4A)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞存活率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組之間的細胞存活率在統計學上亦無顯著差異($p > 0.05$)，而 mock 組和 LPCV 感染組細胞存活率在感染病毒後第 6 天皆高於 PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組，在統計學上存在顯著差異($p < 0.05$)。在接種病毒後第 8 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的存活率依序為 $77.59 \pm 6.67\%$ 、 $55.40 \pm 8.93\%$ 、 $88.15 \pm 5.17\%$ 、 $34.16 \pm 14.72\%$ (Fig. 4A)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞存活率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，而 PCV2 感染組之細胞存活率低於 mock 組和 LPCV 感染組，高於 PCV2/LPCV 共同感染組，與其它實驗組存在顯著差異($p < 0.05$)，PCV2/LPCV 共同感染組之細胞存活率皆低於其他實驗組，在統計學上與其他實驗組皆存在顯著差異($p < 0.05$)。本試驗結果顯示 PCV2 的存在使得 MoDCs 的存活率減低，且在病毒感染後的第 8 天，PCV2/LPCV 共同感染組的存活率在所有實驗組當中最為低。

在接種病毒後第 2 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞凋亡率依序為 $1.37 \pm 0.14\%$ 、 $1.05 \pm 0.63\%$ 、 $0.48 \pm 0.30\%$ 、 $1.18 \pm 0.56\%$ (Fig. 4B)，每個實驗組之間皆無顯著差異($p > 0.05$)。在接種病毒後第 4 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞凋亡率依序為 $1.24 \pm 0.31\%$ 、 $2.01 \pm 1.11\%$ 、 $0.73 \pm 0.12\%$ 、 $1.43 \pm 0.63\%$ (Fig. 4B)，每個實驗組之間皆無顯著差異($p > 0.05$)。在接種病毒後第 6 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞凋亡率依序為 $1.45 \pm 0.27\%$ 、 $4.00 \pm 0.40\%$ 、 $0.91 \pm 0.12\%$ 、 $4.91 \pm 0.47\%$ (Fig. 4B)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞凋亡率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，而 PCV2 感染組之細胞凋亡率高於 mock 組和 LPCV 感染組，低於 PCV2/LPCV 共同感染組，與其它實驗組存在顯著差異($p < 0.05$)，PCV2/LPCV 共同感染組之細胞凋亡率皆高於其他實驗組，在統計學上

與其他實驗組皆存在顯著差異($p < 0.05$)。在接種病毒後第 8 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞凋亡率依序為 $7.28 \pm 6.63\%$ 、 $29.22 \pm 9.46\%$ 、 $1.24 \pm 0.41\%$ 、 $43.56 \pm 7.95\%$ (Fig. 4B)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞凋亡率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，而 PCV2 感染組之細胞凋亡率高於 mock 組和 LPCV 感染組，低於 PCV2/LPCV 共同感染組，與其它實驗組存在顯著差異($p < 0.05$)，PCV2/LPCV 共同感染組之細胞凋亡率皆高於其他實驗組，在統計學上與其他實驗組皆存在顯著差異($p < 0.05$)。本試驗結果顯示從感染病毒後的第 6 天開始，可觀察到 PCV2 出現誘導 MoDCs 凋亡的情形，並在和 LPCV 共同感染時引發更強烈的細胞凋亡。

在接種病毒後第 2 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2 /LPCV 共同感染組的細胞死亡率(或晚期凋亡率)依序為 $2.04 \pm 0.44\%$ 、 $1.80 \pm 1.64\%$ 、 $1.60 \pm 1.04\%$ 、 $1.94 \pm 1.49\%$ (Fig. 4C)，每個實驗組之間皆無顯著差異($p > 0.05$)。在接種病毒後第 4 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞死亡率依序為 $4.35 \pm 0.56\%$ 、 $4.43 \pm 1.04\%$ 、 $3.12 \pm 0.31\%$ 、 $2.95 \pm 0.89\%$ (Fig. 4C)，每個實驗組之間皆無顯著差異($p > 0.05$)。在接種病毒後第 6 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞死亡率依序為 $3.38 \pm 0.62\%$ 、 $5.91 \pm 0.39\%$ 、 $2.95 \pm 0.84\%$ 、 $5.68 \pm 1.21\%$ (Fig. 4C)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞死亡率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組之間的細胞死亡率在統計學上亦無顯著差異($p > 0.05$)，而 mock 組和 LPCV 感染組細胞死亡率在感染病毒後第 6 天皆低於 PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組，在統計學上存在顯著差異($p < 0.05$)。在接種病毒後第 8 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的細胞死亡率依序為 $11.85 \pm 6.89\%$ 、 $14.47 \pm 6.64\%$ 、 $10.28 \pm 4.91\%$ 、 $21.50 \pm 11.82\%$ (Fig. 4C)，其中 mock 組和 LPCV 感染組之間的細胞死亡率在統計學上無顯著差異($p > 0.05$)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組之間的細胞死亡率在統計學上亦無顯著差異($p > 0.05$)，而 mock 組和 LPCV 感染組細胞死亡率在感染病毒後第 6 天皆低於 PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組，在統計學上存在顯著差異($p < 0.05$)。本試驗結果顯示當 PCV2 單獨接種或和 LPCV 共同接種於 MoDCs 時，在病毒感染後第 6、8 天的細胞死亡率皆觀察到有升高的情形。



2-4 細胞攝取抗原之能力

本試驗實驗組為 mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組，分別於感染病毒後的第 2、4、6 天收取 MoDCs，給予 DQTMovalbumin (DQ-OVA) 偵測細胞攝取可溶性抗原之能力，亦給予 *Staphylococcus aureus*-FITC 偵測細胞攝取顆粒性抗原之能力。由於細胞在 4°C 時活性會下降而不具吞噬抗原能力，因此以其螢光數值作為背景值，將作用於 37°C 之各試驗組的螢光數值扣除背景值，並以流式細胞儀分析軟體 CellQuestTM 經人工定義親細胞群(parent)所在的螢光強度位置，資料呈現方式為分析軟體所顯示之百分比值(percentage)，本試驗係以 4 頭豬隻之 MoDCs 作為 3 重複的檢測對象。

接種病毒後第 2 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組攝取可溶性抗原 DQ-OVA 之能力依序為 95.25±1.163%、98.69±0.10%、98.96±0.82%、99.00±0.11% (Fig. 5A)，每個實驗組之間皆無顯著差異(p>0.05)。接種病毒後第 4 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組攝取可溶性抗原 DQ-OVA 之能力依序為 96.18±2.202%、98.60±0.28%、97.95±1.38%、97.81±1.03% (Fig. 5A)，每個實驗組之間皆無顯著差異(p>0.05)。接種病毒後第 6 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組攝取可溶性抗原 DQ-OVA 之能力依序為 96.63±0.470%、96.42±1.73%、98.06±0.84%、97.94±0.29% (Fig. 5A)，每個實驗組之間皆無顯著差異(p>0.05)。試驗結果顯示當 PCV2 和 LPCV 單獨感染或共同感染 MoDCs 時，皆未存在影響細胞吞噬及處理可溶性抗原之能力。

接種病毒後第 2 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組攝取顆粒性抗原 *S. aureus*-FITC 之能力依序為 96.41±0.685%、98.74±0.14%、98.95±0.85%、98.72±0.40% (Fig. 5B)，每個實驗組之間皆無顯著差異(p>0.05)。接種病毒後第 4 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組攝取顆粒性抗原 *S. aureus*-FITC 之能力依序為 79.77±7.89%、87.58±4.23%、88.76±5.37%、89.80±2.56% (Fig. 5B)，每個實驗組之間皆無顯著差異(p>0.05)。接種病毒後第 6 天，mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV

共同感染組攝取顆粒性抗原 *S. aureus*-FITC 之能力依序為 $71.90\pm 7.29\%$ 、 $75.35\pm 7.81\%$ 、 $76.29\pm 7.32\%$ 、 $82.95\pm 2.54\%$ (Fig. 5B)，每個實驗組之間皆無顯著差異($p>0.05$)。本試驗結果顯示培養的時間越長，MoDCs 吞噬顆粒性抗原的能力也會漸漸下降，而當 PCV2 和 LPCV 單獨感染或共同感染 MoDCs 時，皆未影響細胞吞噬及處理顆粒性抗原之能力。

2-5 單核球來源之樹突細胞相關細胞激素 mRNA 的表現量

本試驗參考 DCs 相關研究(Summerfield et al., 2009; Chaung et al., 2010)，挑選 IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 、TLR-3、TLR-7、TLR-8、TLR-9 做為檢測目標，以 real-time RT-PCR 方式檢測上述標的 mRNA 表現量。本研究係以 4 頭豬隻之 MoDCs 作為 4 重複的檢測對象，實驗組為 mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組，由於 mRNA 的表現相較於蛋白質最終產物，屬於較早期發生的變化，因此參考人醫對 DCs 的研究 (Stockmann-Juvala et al., 2010)選用感染病毒後第 6、12、24 小時的觀測結果進行判讀，並將所有樣本的 cycle threshold (Ct)值減去 House-keeping gene β -actin 的 Ct 值可得校正後的 Δ Ct 值，代入 $2^{-\Delta Ct}$ 公式可得欲評估基因之 mRNA 相對表現量。

在感染病毒後的第 6 小時，PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-1 mRNA 表現量依序為 2.67 ± 1.33 、 1.71 ± 0.98 、 3.48 ± 0.59 (Fig. 6)，PCV2 組和 LPCV 組、PCV2/LPCV 組的 IL-1 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2/LPCV 組的 IL-1 表現量高於 LPCV 組，在統計學上存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-6 mRNA 表現量依序為 5.84 ± 3.35 、 1.57 ± 0.72 、 7.50 ± 3.70 (Fig. 6)，PCV2 組和 LPCV 組、PCV2/LPCV 組的 IL-6 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2/LPCV 組的 IL-6 表現量高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-8 mRNA 表現量依序為 2.3598 ± 1.273 、 1.04 ± 0.63 、 2.05 ± 0.18 (Fig. 6)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 IL-8 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 IL-8 表現量高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-10 mRNA 表現量為 14.46 ± 7.18 、 2.95 ± 0.92 、 18.15 ± 15.86 (Fig. 6)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 IL-10 表現量無顯著

差異($p>0.05$)，而 PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 IL-10 表現量均高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-12p40 mRNA 表現量為 1.21 ± 0.72 、 0.98 ± 0.63 、 1.50 ± 0.63 (Fig. 6)，三個實驗組的 IL-12p40 mRNA 表現量均無顯著差異($p>0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IFN- α mRNA 表現量依序為 6.60 ± 3.85 、 0.79 ± 0.41 、 13.04 ± 9.91 (Fig. 6)，PCV2 組和 LPCV 組、PCV2/LPCV 組的 IFN- α 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2/LPCV 組的 IFN- α 表現量高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 TNF- α mRNA 表現量為 8.66 ± 2.74 、 1.08 ± 0.32 、 9.65 ± 3.28 (Fig. 6)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TNF- α 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TNF- α 表現量均高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 TLR-3 mRNA 表現量為 1.85 ± 0.33 、 0.78 ± 0.17 、 1.88 ± 0.27 (Fig. 6)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TLR-3 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TLR-3 表現量均高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 TLR-7 mRNA 表現量為 2.77 ± 0.58 、 1.17 ± 0.99 、 2.69 ± 1.33 (Fig. 6)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TLR-7 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TLR-7 表現量均高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 TLR-8 mRNA 表現量為 1.38 ± 0.46 、 0.72 ± 0.17 、 1.33 ± 0.65 (Fig. 6)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TLR-8 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 TLR-8 表現量均高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 TLR-9 mRNA 表現量為 0.47 ± 0.14 、 0.69 ± 0.13 、 0.43 ± 0.14 (Fig. 6)，PCV2 組和 LPCV 組、PCV2/LPCV 組的 TLR-9 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2/LPCV 組的 TLR-9 表現量高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。在本試驗中 IL-4 和 IFN- γ 未檢測出 mRNA 表現量，故未顯示資料。

在感染病毒後的第 12 小時，IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、IFN- α 、TNF- α 、TLR-3、TLR-7、TLR-8、TLR-9 的 mRNA 表現量在 PCV2 感染組、LPCV 感染組

和 PCV2/LPCV 共同感染組與第 6 小時的分佈在統計學上皆無特別差異(Fig. 6)。在病毒感染後的第 24 小時，所有檢測項目的 mRNA 表現量均趨近於相同水平(Fig. 6)，在統計學上各實驗組之間皆無顯著差異($p>0.05$)。綜合以上結果顯示在病毒感染後的第 6、12 小時，有 PCV2 存在的實驗組和 LPCV 感染組比較之下 mRNA 表現量較高，比較特別的是在病毒感染後的第 6 小時可以觀察到 PCV2/LPCV 共同感染組所誘導的 IL-1、IL-6、IL-10、IFN- α 、TNF- α mRNA 表現量在所有實驗組當中有最強烈的趨勢，但由於豬隻個體間的免疫反應差異較大，因此在統計學上 PCV2/LPCV 共同感染組和 PCV2 感染組沒有差異；從本試驗的結果也可觀察到 PCV2 在 mRNA 層次所誘導的某些細胞激素表現量在 24 小時之內變化很大，在病毒感染後的第 24 小時所檢測到的表現量約只有第 6 小時所檢測到的 20% 以下，而 LPCV 所誘導的 mRNA 表現量在 24 小時之內相對較平穩，因此推測 PCV2 誘發的某些細胞激素 mRNA 表現一開始雖然很強烈但卻也很快就消退。

2-6 單核球來源之樹突細胞相關細胞激素蛋白質的表現量

本試驗參考 DCs 相關研究方法(Peng et al., 2009)以及先前 mRNA 的檢測項目挑選 IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、IFN- α 、IFN- γ 、TNF- α 做為檢測目標，以 ELISA 方式檢測上述標的蛋白質表現量，本研究係以 4 頭豬隻之 MoDCs 作為 4 重複的檢測對象，實驗組為 mock 組、PCV2 感染組、LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組，在病毒感染後的第 2、4、6 天收取細胞培養上清液進行 2 重複或 3 重複檢測。

在病毒感染後第 2 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-6 濃度依序為 $3.19\pm 1.48\text{pg/ml}$ 、 $16.77\pm 4.20\text{pg/ml}$ 、 $20.14\pm 7.37\text{pg/ml}$ 、 $30.72\pm 5.45\text{pg/ml}$ (Fig. 7A)，LPCV 組和 PCV2 組、PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-6 表現量無顯著差異($p>0.05$)，而 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-6 表現量比 PCV2 組高，在統計學上存在顯著差異($p<0.05$)。在病毒感染後第 4 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-6 濃度依序為 $18.56\pm 5.66\text{pg/ml}$ 、 $21.55\pm 3.10\text{pg/ml}$ 、 $42.46\pm 9.91\text{pg/ml}$ 、 $32.38\pm 4.19\text{pg/ml}$ (Fig. 7A)，LPCV 組的 IL-6 表現量最高，與其他實驗組在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。在病毒感染後第 6 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-6 濃度依序為 $16.36\pm 9.25\text{pg/ml}$ 、 $21.54\pm 3.22\text{pg/ml}$ 、 $27.44\pm 9.48\text{pg/ml}$ 、 $35.03\pm 3.59\text{pg/ml}$ (Fig.

7A)，PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-6 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)。

在病毒感染後第 2 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 組所測得 IL-8 濃度為 $759.98\pm 171.47\text{pg/ml}$ 、 $2384.87\pm 484.88\text{pg/ml}$ 、 $767.37\pm 222.62\text{pg/ml}$ 、 $2538.54\pm 171.48\text{pg/ml}$ (Fig. 7B)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-8 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)，但高於 LPCV 感染組並存在顯著差異 ($p<0.05$)。在病毒感染後第 4 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-8 濃度依序為 $812.20\pm 247.38\text{pg/ml}$ 、 $2619.62\pm 683.30\text{pg/ml}$ 、 $1055.75\pm 579.50\text{pg/ml}$ 、 $3043.04\pm 1136.46\text{pg/ml}$ (Fig. 7B)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 組的 IL-8 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)，但高於 LPCV 感染組並存在顯著差異 ($p<0.05$)。在病毒感染後第 6 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-8 濃度依序為 $838.76\pm 293.92\text{pg/ml}$ 、 $2661.58\pm 523.25\text{pg/ml}$ 、 $1376.29\pm 721.51\text{pg/ml}$ 、 $3381.08\pm 1352.89\text{pg/ml}$ (Fig. 7B)，PCV2 組和 LPCV 組、PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-8 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)，但 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-8 表現量高於 LPCV 組，在統計學上存在顯著差異 ($p<0.05$)。

在病毒感染後第 2 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 組所測得 IL-12p40 濃度依序為 $39.63\pm 25.28\text{pg/ml}$ 、 $177.22\pm 95.60\text{pg/ml}$ 、 $31.60\pm 40.55\text{pg/ml}$ 、 $106.79\pm 31.12\text{pg/ml}$ (Fig. 7C)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-12p40 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)，但高於 LPCV 感染組並存在顯著差異 ($p<0.05$)。在病毒感染後第 4 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-12p40 濃度依序為 $63.73\pm 39.12\text{pg/ml}$ 、 $108.70\pm 59.94\text{pg/ml}$ 、 $80.44\pm 43.00\text{pg/ml}$ 、 $128.38\pm 76.56\text{pg/ml}$ (Fig. 7C)，PCV2 組和 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-12p40 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)，但高於 LPCV 感染組並存在顯著差異 ($p<0.05$)。在病毒感染後第 6 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IL-12p40 濃度依序為 $33.48\pm 18.26\text{pg/ml}$ 、 $55.91\pm 23.62\text{pg/ml}$ 、 $86.69\pm 62.53\text{pg/ml}$ 、 $109.27\pm 112.22\text{pg/ml}$ (Fig. 7C)，LPCV 組和 PCV2 組、PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-12p40 表現量無顯著差異 ($p>0.05$)，而 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-12p40 表現量高於 PCV2 組，於統計學上存在顯著差異 ($p<0.05$)。

在病毒感染後第 2 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 TNF- α 濃度依序為 8.61 \pm 9.19pg/ml、66.77 \pm 8.18pg/ml、53.49 \pm 7.56pg/ml、86.64 \pm 21.63pg/ml (Fig. 7D)，PCV2 組和 LPCV 組、PCV2/LPCV 共同感染組的 TNF- α 表現量無顯著差異($p>0.05$)，但 PCV2/LPCV 共同感染組的 TNF- α 表現量高於 LPCV 組，在統計學上亦存在顯著差異($p<0.05$)。在病毒感染後第 4 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 TNF- α 濃度在統計學上無顯著差異($p>0.05$)。在病毒感染後第 6 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 TNF- α 濃度依序為 46.11 \pm 30.10pg/ml、84.51 \pm 40.41pg/ml、114.88 \pm 50.24pg/ml、44.85 \pm 12.11pg/ml (Fig. 7D)，LPCV 組所測得的 TNF- α 濃度高於其他實驗組，並在統計學上存在顯著差異($p<0.05$)。

在病毒感染後第 2、4 天，PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IFN- γ 濃度於統計學上皆無顯著差異($p>0.05$)，但在病毒感染後的第 6 天，mock 組、PCV2 組、LPCV 組和 PCV2/LPCV 共同感染組所測得 IFN- γ 濃度依序為 6.01 \pm 5.25pg/ml、4.48 \pm 2.67pg/ml、11.11 \pm 7.75pg/ml、73.66 \pm 5.17 pg/ml (Fig. 7E)，PCV2/LPCV 共同感染組在第 6 天所測得的 IFN- γ 濃度高於其他實驗組，並在統計學上存在顯著差異($p<0.05$)。在本試驗中 IL-10 和 IFN- α 未檢測出，故資料不顯示。綜合以上研究結果顯示 PCV2/LPCV 共同感染組的 TNF- α 表現量和 LPCV 感染組比較之下，有先促進後抑制的趨勢，而 PCV2/LPCV 共同感染組的 IL-8 和 IL-12p40 表現量在病毒感染後的第 2、4、6 天皆比 LPCV 感染組高，其中值得注意的是，在接種病毒後的第 2、4、6 天，PCV2 感染組和 LPCV 感染組的 IFN- γ 表現量和 mock 控制組並無顯著差異，但在病毒感染後的第 6 天於 PCV2/LPCV 共同感染組卻檢測到高表現量的 IFN- γ 。

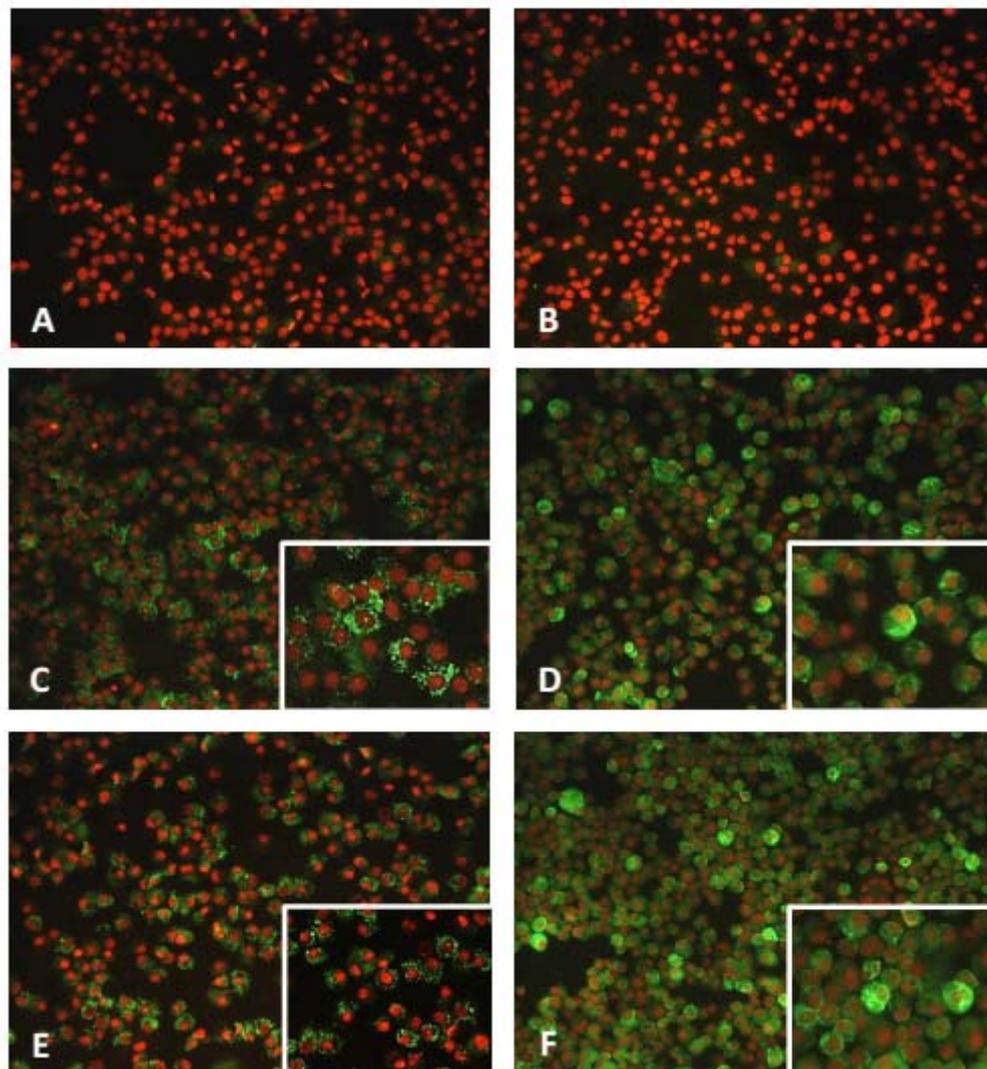


Fig. 1 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)免疫螢光染色(IFA)。將 5×10^5 的 MoDCs 接種 0.5 m.o.i 的 PCV2 和 0.5 m.o.i 的 LPCV，並在螢光顯微鏡 200x 視野下判讀每 100 顆細胞中的陽性細胞和陰性細胞，本試驗以 4 頭豬隻之 MoDCs 作為 4 重複的檢測對象，實驗方法如 3-2.1 節所敘述。(A)PCV2 陰性控制組，(B)LPCV 陰性控制組，(C)PCV2 感染組，細胞質中存在著 PCV2 病毒顆粒，(D)LPCV 感染組，LPCV 在細胞質呈現戒環狀，(E)PCV2/LPCV 共同感染組-PCV2 感染率，(F) PCV2/LPCV 共同感染組-LPCV 感染率。本試驗使用的一級抗體為 PCV2 mAb 和 WH303 (CSFV mAb)，二級抗體為 GAM-FITC(綠色螢光)，並使用 Propidium Iodide(PI)染細胞核(紅色螢光)。由於 PCV2 和 LPCV 對 MoDCs 的感染率在接種病毒後第 2、4、6 天具有一致性(統計資料見於 Fig. 2A, 2B)，故以接種病毒後第 2 天之染色照片為代表。

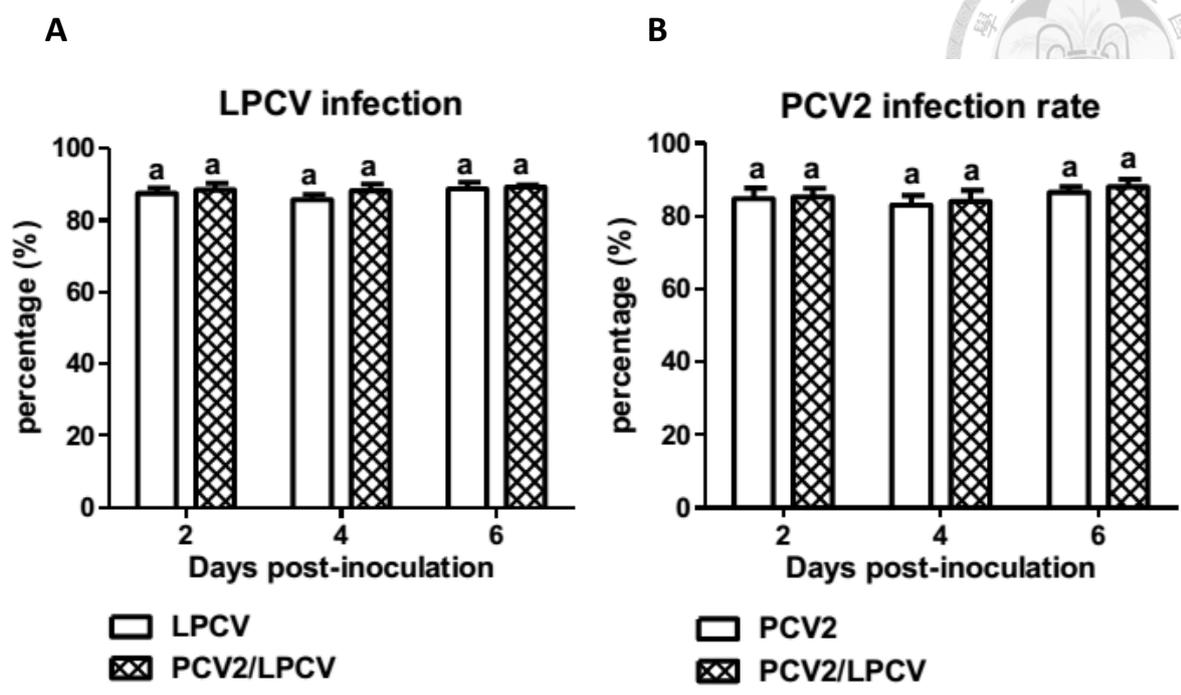


Fig. 2 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)後的感染率(Infection Rate)。本試收取細胞的時間為接種病毒後(Days post-inoculation)第2、4、6天，數據為4頭豬之 MoDCs 作為病毒感染率檢測對象，統計資料以4重複的 mean \pm SEM (standard error of the mean)表示，實驗方法如 3-2.1 節所敘述。(A)LPCV 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組之 LPCV 感染率，(B) PCV2 感染組和 PCV2/LPCV 共同感染組之 PCV2 感染率。^a表示同一時間點內不同處理組間無顯著性差異($p > 0.05$)。

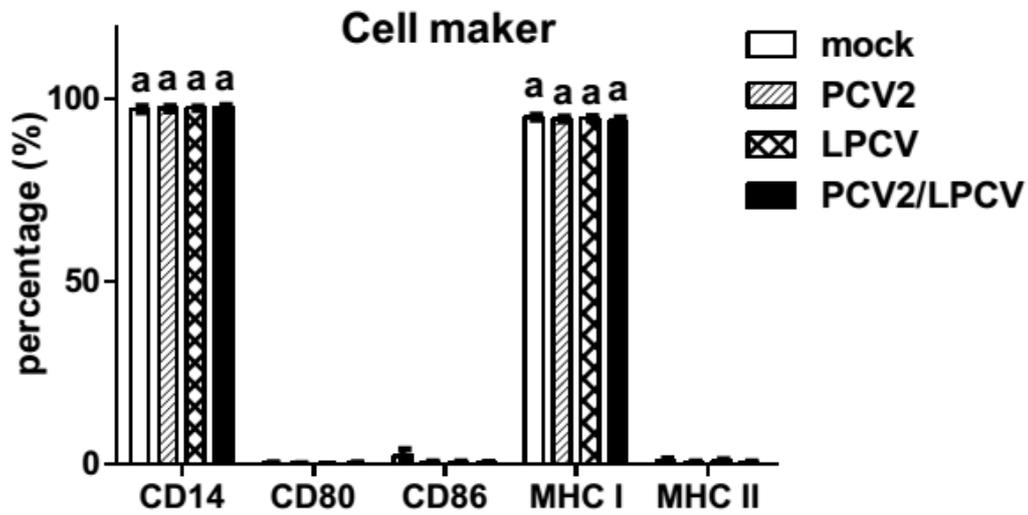


Fig. 3 單核球來源之樹突細胞(MoDCs)細胞表面抗原 CD14、CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 在接種豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)後的第 48 小時之表現情形。數據為 4 頭豬之 MoDCs 作為細胞表面抗原檢測對象，並使用流式細胞儀(FACS)做為分析工具，統計資料以 4 重複的 mean \pm SEM (standard error of the mean)表示，實驗方法如 3-2.2 節所敘述。^a 表示同一時間點內不同處理間組無顯著性差異($p>0.05$)。

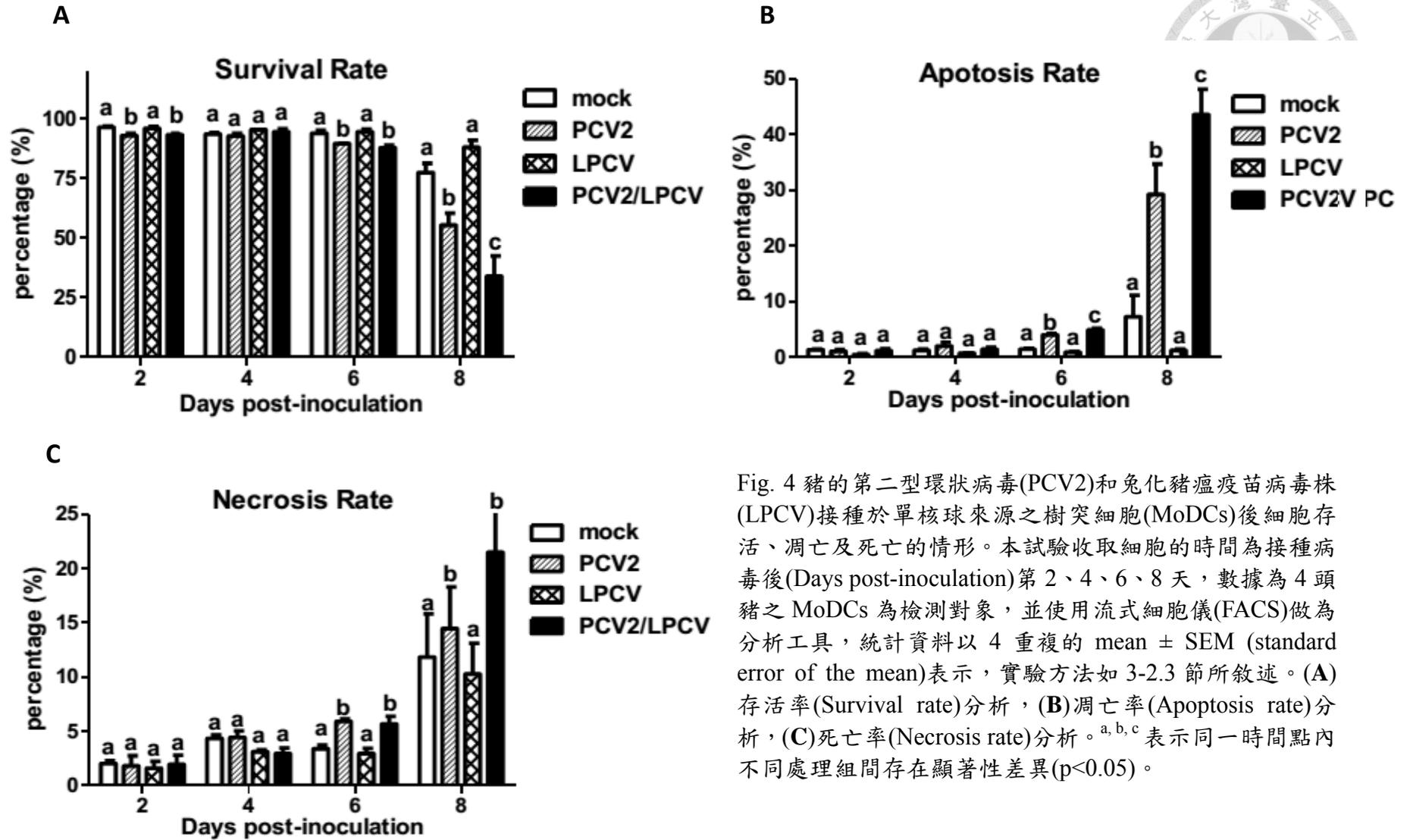


Fig. 4 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)後細胞存活、凋亡及死亡的情形。本試收取細胞的時間為接種病毒後(Days post-inoculation)第2、4、6、8天，數據為4頭豬之 MoDCs 為檢測對象，並使用流式細胞儀(FACS)做為分析工具，統計資料以4重複的 mean \pm SEM (standard error of the mean)表示，實驗方法如 3-2.3 節所敘述。(A)存活率(Survival rate)分析，(B)凋亡率(Apoptosis rate)分析，(C)死亡率(Necrosis rate)分析。^{a, b, c}表示同一時間點內不同處理組間存在顯著性差異($p < 0.05$)。

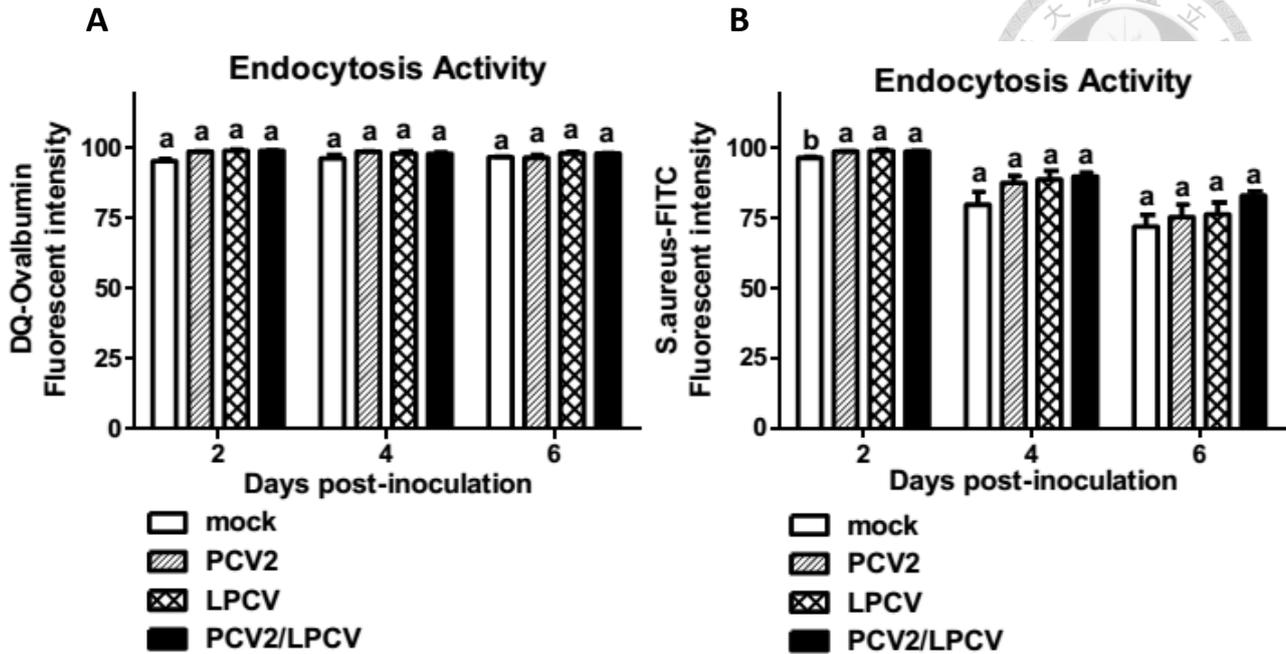


Fig. 5 豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)接種於單核球來源之樹突細胞(MoDCs)後細胞攝取抗原的能力。本試收取細胞的時間為接種病毒後(Days post-inoculation)第2、4、6天，數據為4頭豬之 MoDCs 作為細胞吞噬抗原能力的檢測對象，並使用流式細胞儀(FACS)做為分析工具，統計資料以4重複的 mean \pm SEM (standard error of the mean)表示，實驗方法如3-2.4和3-2.5節所敘述。(A)MoDCs 攝取可溶性抗原 DQTMovalbumin (DQ-OVA)之能力，(B) MoDCs 攝取顆粒性抗原 Staphylococcus aureus-FITC 之能力。^a表示同一時間點內不同處理組無顯著性差異(p>0.05)。

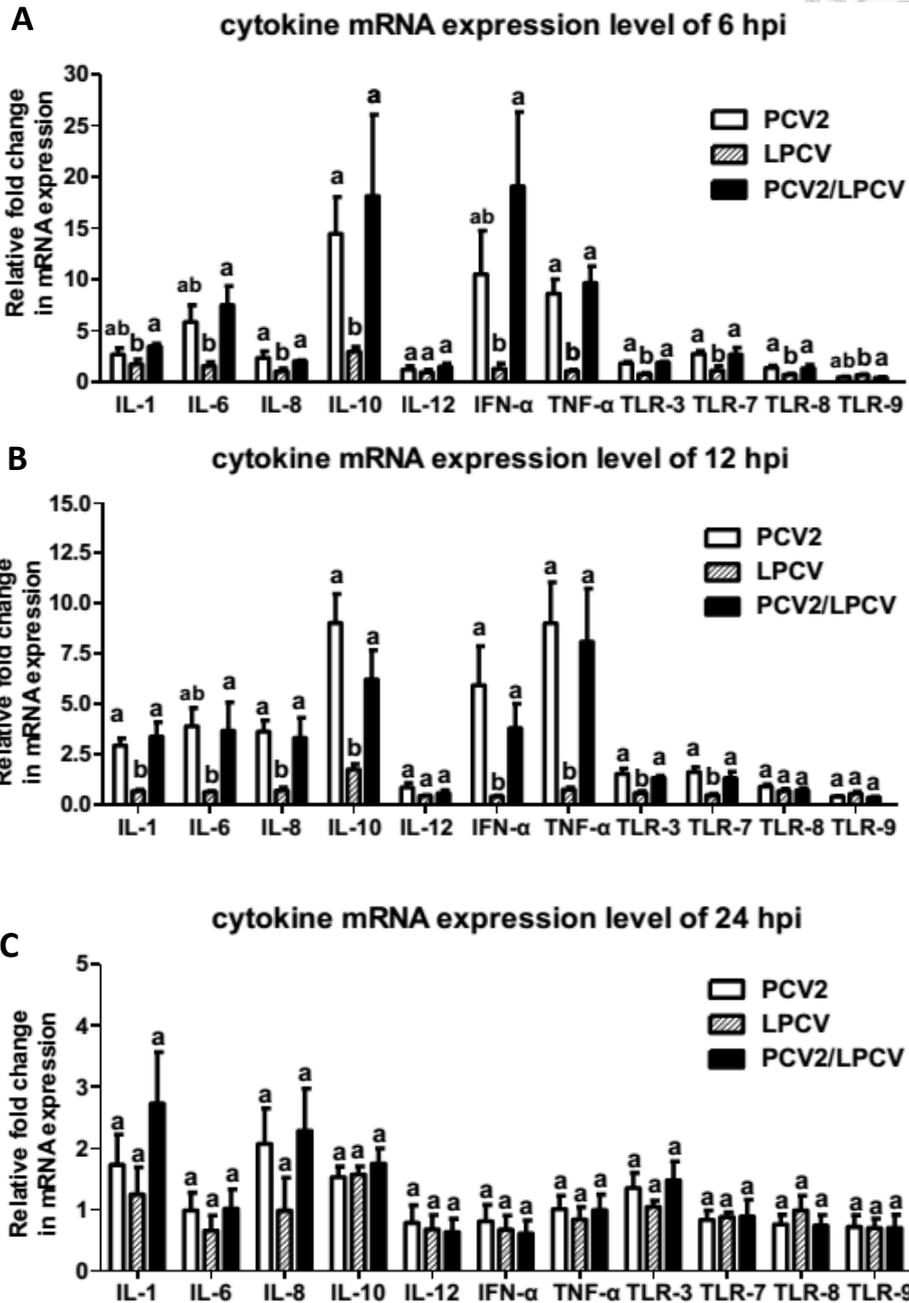


Fig. 6 單核球來源之樹突細胞(MoDCs)在豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)感染後所誘導的細胞激素(Cytokine)和Toll-like receptor(TLR)之 mRNA 相對表現量。本試收取細胞的時間為接種病毒後(Days post-inoculation)第 6、12、24 小時，使用 real-time PCR 做為檢測 mRNA 分析工具，統計資料以 4 重複的 mean \pm SEM (standard error of the mean)表示，實驗方法如 3-2.7 節所敘述。(A)接種病毒後第 6 小時 mRNA 表現量，(B)接種病毒後第 12 小時 mRNA 表現量，(C)接種病毒後第 24 小時 mRNA 表現量。^{a, b}表示同一時間點內不同處理組間存在顯著性差異($p < 0.05$)。

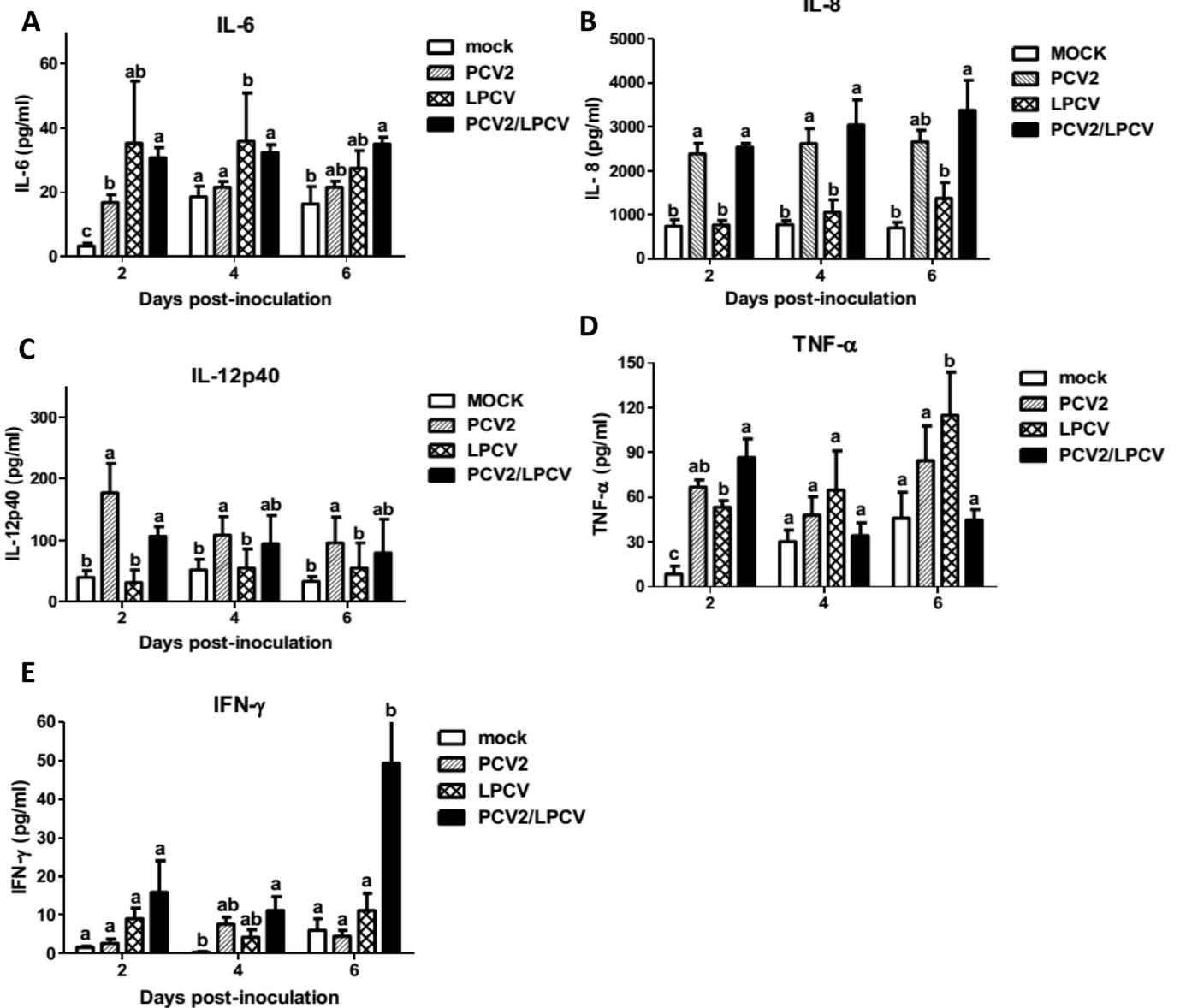


Fig. 7 單核球來源之樹突細胞(MoDCs)在豬的第二型環狀病毒(PCV2)和兔化豬瘟疫苗病毒株(LPCV)感染後所誘導的細胞激素(Cytokine)蛋白質表現量。本試收取細胞培養液的時間為接種病毒後(Days post-inoculation)第2、4、6天，數據為4頭豬之 MoDCs 為檢測對象，並使用酵素連結免疫法(ELISA)做為分析工具，統計資料以3重複的 mean \pm SEM (standard error of the mean)表示，實驗方法如3-2.6節所敘述。(A)IL-6的表現量分析，(B) IL-8的表現量分析，(C) IL-12p40的表現量分析，(D)TNF- α 的表現量分析，(E)IFN- γ 的表現量分析。^{a, b, c}表示同一時間點內不同處理組間存在顯著性差異(p<0.05)。

第五章 討論



本研究係延續 Huang 等人(2011, 2014)的觀察，豬第二型環狀病毒(PCV2)的感染會降低兔化豬瘟滅毒疫苗(LPCV)的效力，本研究進一步探討造成此現象的因素和相關機制。由於樹突細胞是連結先天性免疫和後天性免疫最重要的橋樑(Steinman and Hemmi, 2006)，在刺激記憶反應和啟動 CD4⁺幫手型 T 細胞及 CD8⁺毒殺型 T 細胞也有專一性的功能(Zhou et al., 2007)，因此本試驗選用免疫系統具關鍵作用的樹突細胞作為本試驗的研究模式。身為免疫系統裡的哨兵，樹突細胞是許多病毒欲侵犯或逃避免疫系統監測的理想目標。而病毒感染樹突細胞後，無論是否在細胞內複製，都有可能調節和改變樹突細胞原本的功能，例如人類免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus)會藉由樹突細胞將病毒傳播至淋巴球，登革熱病毒(Dengue virus)會誘導樹突細胞的成熟，在鼠類的巨細胞病毒(cytomegalovirus)也會改變樹突細胞細胞激素表現量，另外麻疹病毒(measles virus)會使樹突細胞的抗原呈現功能受損(Vincent et al., 2003)，因此若能瞭解 PCV2 和 LPCV 對樹突細胞所造成的影響，對於釐清 PCV2 影響 LPC 疫苗效價的機制將會有進一步的幫助。

在 2003 年時，Vincent 等人(2003)的研究顯示 PCV2 能感染單核球來源之樹突細胞(MoDCs)和骨髓來源之樹突細胞(BMDCs)，在共厄焦(Confocal)顯微鏡下可清楚看到樹突細胞細胞質中有 PCV2 的病毒抗原存在。相反地，在豬腎細胞(PK-15A)的細胞核與細胞質皆能夠發現 PCV2 的抗原顆粒，這種情形被懷疑和體外(in vitro)培養樹突細胞的條件有關聯；但是，後來研究顯示 PCV2 的病毒抗原在體內(in vivo)條件下，也只在細胞質被檢測出而非細胞核(Krakovka et al., 2002; Rosell et al., 1999)。目前 PCV2 在單核球/巨噬細胞系列之細胞有高陽性率(Chang et al., 2006; Gilpin et al., 2003)，而在本試驗中 PCV2 於 MoDCs 的感染率約 85%。Chen 等人(2012)顯示豬瘟病毒(CSFV)於 MoDCs 的感染率約 92%，亦符合本試驗的研究結果，而 PCV2 和 LPCV 的感染在 MoDCs 型態學上也皆無細胞病變，上述病毒與細胞親和性的觀察有助於後續相關免疫分析的可信度。為了瞭解當 PCV2 預先存在於 MoDCs 時是否會影響 LPCV 的感染率，本試驗也將 PCV2 和 LPCV 共同感染後進

行分析，結果顯示在病毒感染後的第 2~6 天，PCV2 不具影響 LPCV 感染 MoDCs 的能力，因此推測在 MoDCs 的研究模式中，PCV2 並非藉由影響 LPCV 的感染力進而減低豬瘟疫苗的效力。

當樹突細胞調控適應性免疫時需仰賴一個成熟化的過程(Saito et al., 2008)，而未成熟的樹突細胞通常位於周邊黏膜組織與真皮層，通常具有高效的抗原攝取活性，在移動到二級淋巴器官再經過刺激即轉變為成熟的樹突細胞，並能有效地呈現抗原給 T 細胞啟動免疫反應。在樹突細胞成熟的過程中，有許多樹突細胞特異性的基因(DCs-specific gene)會受到誘導，特別是共同刺激分子 CD80、CD83 和 CD86 與主要組織相容性複合物第一型(MHC-I)和主要組織相容性複合物第二型(MHC-II)皆會有表現量上升的情形(Kruse et al., 2000; Zhou et al., 2007)。因此區分樹突細胞的類型，和觀察感染 PCV2 和 LPCV 後是否會造成細胞表面分子表達的改變，為本試驗的目的。檢測結果 CD14 和 MHC I 的表現率在每個實驗組分別約 97%和 94%的陽性率，由於 CD14 在許多文獻被討論到，無論是否給予 LPS 或 TNF- α 的刺激，CD14 在 MoDCs 皆會持續表現，但也可能會因為培養環境的不同而有所差異。本實驗先前也有相關研究使用 CD14 作為單核球來源之細胞純度判斷依據，而 MHC I 通常表現於所有有核之細胞，同時也能提供細胞內部的狀況。當細胞受到病毒感染時，MHC I 能將病毒胜肽(peptide)呈現於細胞外側，提供毒殺型細胞進行偵測，屬於非特異性的免疫反應。CD80、CD86 和 MHC II 在每個實驗組的檢測結果為陰性，對照 Summerfield 等人(2009)和 Chen 等人(2012)的研究結果，PCV2 和 CSFV 感染樹突細胞時，沒有誘導其成熟之能力，因此在沒有另外給予刺激物的情況下，細胞成熟分子檢測結果為陰性似乎是可被接受的，但 Vincent 等人(2003)的研究顯示，即使未給予成熟的刺激物，MoDCs 的 CD80、CD86 和 MHC II 還是會有低至中等的表現量，與 Vincent 等人(2003)的研究不符合的可能原因為，本研究檢測細胞表面分子的時間參考 Chen 等人(2012)的研究，只選用接種病毒後的第 48 小時做為檢測時間，又另外在試驗當中所使用的抗體不同或培養環境不同也可能造成有誤差的實驗結果，因此 CD80、CD86 和 MHC II 的表現量在沒有另外給予 LPS 或 TNF- α 的情況下在未來還需要釐清。

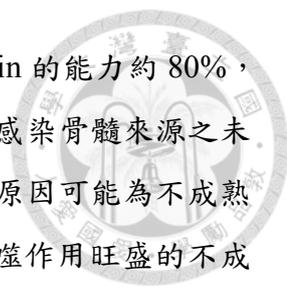
在文獻探討的 1-6 章節曾經提及當 CSFV 感染細胞時，CSFV 的 NS2 蛋白會阻

斷細胞凋亡，也透過增加 NF- κ B 和 cyclin A 的表現防止細胞進入 S-phase (Tang et al., 2010 and 2011)，而感染豬瘟引起的淋巴球減少症，也已經被證明是豬瘟病毒藉由抑制 E^{ens} 和粒線體跨模電位，間接地誘導淋巴細胞凋亡 (Summerfield et al., 1998; Bruschke et al., 1997)。目前也有文獻指出當 CSFV 感染 MoDCs 後的第 24~72 小時，MoDCs 的存活與凋亡情形和模擬控制組無差異 (Chen et al., 2012)。另外 PCV2 也常被發現存在於單核球/巨噬細胞系列之吞噬細胞和 DCs 中，PCV2 可停留在 DCs 數天，且不會造成細胞凋亡和細胞表面分子的調控，有學者認為 PCV2 可能只是利用 DCs 作為散播病毒到身體其他組織的一種機制 (Vincent et al., 2003)。本研究對細胞凋亡和死亡情形的分析結果顯示，當 PCV2 感染 MoDCs 時會造成細胞較低的存活率和較高的凋亡率及死亡率，這種情形從病毒感染後的第 6 天開始可觀察到，並在病毒感染後的第 8 天最為明顯，當陰性對照組和 LPCV 感染組的存活率有 80~90% 時，PCV2 感染組的存活率約 50%，而在 PCV2 和 LPCV 共同感染的組別存活率約只剩下 30%，細胞的凋亡率在陰性對照組約為 7%，LPCV 感染組約為 1%，PCV2 感染組約為 30%，而在 PCV2 和 LPCV 共同感染的組別凋亡率約達 45%，這是令人感到驚訝的差異。在 MoDCs 的研究模式下，PCV2 在感染後期會導致細胞的凋亡，並且在共同感染的情況下會使可能具有抑制細胞凋亡功能的 LPCV 失去抑制的能力，甚至擴大細胞凋亡與死亡的情形。回顧 Chang 等人 (2006) 對離乳後多系統性消耗症候群 (PMWS) 造成的淋巴細胞流失之機制所進行的研究顯示，當 PRRSV 單獨感染和 PCV2/PRRSV 共同感染於與脾臟巨噬細胞共同培養的脾臟淋巴球和周邊組織淋巴球時，細胞的存活率會下降，凋亡率會上升，在脾臟巨噬細胞同時也發現 Fas ligand 的表現量上升，共同培養的脾臟淋巴球和周邊組織淋巴球的 Fas 表現量上升等情形，而 Fas (CD95) 和 Fas ligand (FasL) 的活化目前也已經被證明為誘導 T 細胞和記憶型 B 細胞死亡的媒介 (Alderson et al., 1994, 1995; De Milito et al., 2001)。由於本研究是單純的 MoDCs 培養系統，並無其他細胞共同培養，因此 MoDCs 的細胞凋亡是否係經由 Fas-Fas L 的活化所致仍需進一步證實。

雖然樹突細胞在免疫學發展的早期就已經被發現，但直到 90 年代藉由體外細胞因子大量培養成功後，DCs 的研究才逐漸成為免疫學中一個不斷升溫的熱門題材，但目前相關的文獻還是有限，導致許多免疫機制和致病因子尚未明瞭。而本

試驗在細胞存活率與凋亡率的調查與 Vincent 等人(2003)發表的文獻有所牴觸的原因有三，一為 MoDCs 的純化條件不同，二為在實驗當中使用的 PCV2 病毒株亞型可能不同，三為本研究實際上觀察到顯著差異的時間點為接種病毒後的第 144 小時和 192 小時，而 Vincent 等人的研究係檢測第 24 小時至 72 小時，以上原因可能導致具有差異的觀察結果，另外由於本實驗所使用的 PCV2 病毒液力價為 10^6 TCID₅₀，PCV2 病毒液須加到 250ul 才能達到 0.5 MOI 的實驗條件，因此也不能排除病毒液佔細胞培養液的比例太高導致細胞營養成分被稀釋進而造成凋亡的可能性。凋亡在細胞自我瓦解(self-destruction)的過程中是一種正常的生理機能，並伴隨著型態和功能的改變，而外界引發凋亡的刺激與訊號的產生是來自於細胞內，以半胱胺酸蛋白酶(caspases)為媒介所誘導凋亡的路徑被活化所致。在許多病毒的生活史當中，誘導細胞凋亡是很自然的一個部分，原因是細胞凋亡對病毒而言是引起宿主細胞最小化的發炎或免疫反應，對病毒本身不會有太大的危害卻又能同時將病毒顆粒釋放與散佈出去。目前已有研究證明 PCV2 的 ORF3 蛋白在 PK15 引起的細胞凋亡是活化 caspase-8 和 caspase-3 路徑所導致(Liu et al., 2005)。而細胞趨向凋亡和壞死的因素有很多，當細胞受到不同病毒共同感染時誘導凋亡之機制可能更為複雜，雖然 PCV2 誘導 MoDCs 凋亡的機制目前尚未清楚，但從本研究當中可發現 PCV2 感染於 MoDCs 所引起的凋亡及壞死是較延遲的反應，且這種情形在 PCV2/LPCV 共同感染時更為明顯，在未來若證實 MoDCs 的凋亡確實是由 PCV2 所主導，或許可以推測豬隻受到 PCV2 感染後，再施打 LPC 疫苗所造成的效力減低與其可能有重要的關聯性。

未成熟的樹突細胞通常可透過巨胞飲作用(macropinocytosis)、以受體為媒介的胞吞作用(receptor-mediated endocytosis)和噬菌作用(phagocytosis)來達到攝取及處理抗原的目的，因此評估此功能是 DCs 相關研究中的重要項目。本研究使用的 DQTM-ovalbumin 主要係模擬大分子的可溶性抗原作為測試物質，DQTM-ovalbumin 的受體為 mannose receptors，在經過細胞吞噬降解其片段後才會呈現綠色螢光，另外 Staphylococcus. aureus-FITC 則是作為顆粒性抗原的測試物質。在本實驗中，於 MoDCs 接種 PCV2 和 LPCV 後，不論是單獨感染和共同感染在可溶性抗原及顆粒性抗原的檢測皆無顯著差異，對照 Steiner 等人(2008)將 PCV2 感染於豬腎細胞、內



皮細胞和 MoDCs 所做的研究顯示，MoDCs 吞噬 DQTM-ovalbumin 的能力約 80%，與本研究的結果相近。另外有學者指出當假性狂犬病病毒(PRV)感染骨髓來源之未成熟樹突細胞時，細胞的吞噬能力在 24 小時便會顯著地下降，原因可能為不成熟樹狀突細胞受到外來刺激原如病毒感染等刺激時，可從抗原吞噬作用旺盛的不成熟細胞轉變成吞噬作用低但抗原呈現能力強的成熟樹突細胞，另外 PRV 在細胞內快速複製病毒時會關閉(shut down)宿主本身的蛋白質合成能力，使其生理機能停滯，導致吞噬功能作用之下降(Kwong et al., 1987)。綜合以上觀察顯示 PCV2 和 LPCV 的感染，似乎對 MoDCs 的吞噬功能不會造成損傷，雖然在顆粒性抗原的檢測，隨著時間的增加吞噬能力稍減弱，但由於和模擬對照組無顯著差異，推測可能為試劑置放於冰箱造成螢光自然的降解。因此在 MoDCs 的研究模式中，PCV2 應該不是藉由影響細胞攝取及處理抗原之能力減低豬瘟疫苗的效力。

關於 PCV2 與其他病原共同感染所引起的 PMWS 和免疫抑制等情形，在文獻探討的 3-1 章節曾經被敘述，而 PCV2 在感染周邊血液單核細胞(PBMCs)和肺泡巨噬細胞(AMs)或存在於淋巴組織時常被觀察到有刺激發炎激素(Pro-inflammatory cytokine)產生的趨勢。Kekarainen 等人(2008)的研究指出 PCV2 所誘導的 IL-10 會使記憶性抗原(Recall Antigen)的反應降低，並連帶抑制 IFN- γ 、IFN- α 、IL-2 和 IL-12 的表現量，而雖然 PCV2 會抑制 IFN- α 進而影響記憶性抗原的反應，但對於 naïve 的淋巴細胞 PCV2 則會誘導 IFN- α 的產生，此作用機制目前尚未瞭解，但推測 PCV2 可能會鎖住細胞的記憶功能，干擾記憶型 T 細胞和抗原呈現細胞之間的交互作用。以 IL-10 為媒介抑制 T 淋巴球活性在某些人類及動物病毒已經被證明，而 IL-10 所誘導的免疫抑制目前也被認為是導致病毒能持續感染的原因之一(Brooks et al., 2006)。另外在人類的文獻也指出 IL-10 的分泌會抑制 IL-12 和 IL-2 的表現，進而影響到 Th1 細胞的增殖反應(Taga et al., 1993)，這些研究幫助我們了解 PCV2 具有強烈抑制特異性抗原記憶反應的趨勢，這對於某些需要使用疫苗來防治的疾病會造成衝擊性的影響。另外 Chang 等人(2005)也提出當 PCV2 和 PRRSV 共同感染 AMs 時，PCV2 所誘導的 IFN- α 會使 PRRSV 的感染率和細胞病變的特徵皆減少等論點。

在細胞激素的 mRNA 分析，本研究參考 DCs 的相關文獻(Summerfield et al., 2009; Chung et al., 2010)選擇 IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、IFN- α 、



IFN- γ 和 TNF- α 做為檢測目標。當 PCV2 和 LPCV 各自單獨感染於 MoDCs 時，皆可檢測到 IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p40、IFN- α 和 TNF- α 的 mRNA 表現量有增加的情形(Fig. 6)，而 IL-4 和 IFN- γ 則未檢測出。相較之下有 PCV2 存在的實驗組 mRNA 表現量較 LPCV 更加強烈，且在病毒感染後的第 6 小時所偵測到的 mRNA 表現量最為顯著，之後隨著時間的增加，表現量於 24 小時內會逐漸遞減，而 LPCV 所誘導的表現量則相對較平穩。而當 PCV2/LPCV 共同感染後的第 6 個小時，雖然因為豬隻個體差異的關係，在統計學上和 PCV2 單獨感染組無顯著差異，但幾乎所有的細胞激素 mRNA 表現量都比 PCV2 和 LPCV 單獨感染時還要高，似乎有加乘作用的趨勢，但這種情形在病毒感染後的第 12 小時就消失，且在病毒感染後的第 24 小時，所有實驗組之間 mRNA 表現量都近於相同水平無顯著差異。在細胞激素蛋白質分泌量的分析，PCV2 和 LPCV 感染於 MoDCs 時皆檢測到 IL-6、IL-8、IL-12p40、TNF- α 和 IFN- γ 的表現，未檢測出 IL-1、IL-10、IFN- α 。將 PCV2/LPCV 共同感染時的細胞激素分泌量與 LPCV 感染組比較後發現，在病毒感染後的第 2、4、6 天，共同感染組的 IL-8、IL-12p40 的分泌量較高，而 TNF- α 則是先促進後抑制分泌，其中值得注意的是 IFN- γ 在 PCV2 和 LPCV 單獨感染的表現量和模擬控制組於統計學上無顯著差異，也就是說 PCV2 和 LPCV 各自感染 MoDCs 時並無強烈誘導 IFN- γ 的能力，但當 PCV2/LPCV 共同感染 MoDCs 於第 8 天時卻檢測到高濃度的 IFN- γ 。

IL-6 參與了先天性及後天性的免疫反應，在先天性免疫反應中，IL-6 會刺激肝細胞合成急性期蛋白，亦促進骨髓生成嗜中性球，在後天免疫反應中會刺激 B 淋巴細胞的生長，並促其分泌抗體，而過量的 IL-6 的合成，可能會導致過度的炎症反應發生、自體免疫疾病、惡性腫瘤及病毒感染等病理變化(Assier et al., 2010; Johnson et al., 2012)，本研究在共同感染組 mRNA 的檢測也發現 IL-6 於早期有較高的產量。IL-8 是一種細胞趨化因子(Chemotactic factor)，能夠吸引嗜中性球、嗜鹼性球等細胞移行到受到感染的部位，並且能調節炎症反應，本研究發現 IL-8 的 mRNA 確實被轉錄為具有功能性的蛋白質，且在共同感染組的表現量較高。而免疫抑制的發生常與 IL-10 的分泌有關連，雖然本研究未檢測到 IL-10 蛋白質的產物，但在病毒感染後的第 6、12 小時時，有 PCV2 存在的組別在 mRNA 皆檢測到



高表現量的 IL-10，這顯示 PCV2 在基因層面確實有免疫抑制的趨勢。而當有病原感染組織的情況下，IL-12 是早期先天性免疫及細胞免疫的重要媒介，其主要的來源細胞為活化的單核吞噬細胞及樹狀突細胞，IL-12 是 Th1 免疫反應中扮演關鍵作用的細胞激素(Gee et al., 2009; Judson et al., 2012)，在本研究中，IL-12 和許多細胞激素的表現情形正好相反，IL-12 在早期 mRNA 的表現量於各個實驗組都較低且無顯著差異，但在蛋白質的檢測卻觀察到高表現量的產物，因此可以推論 IL-12 的調控較晚期才發生，而有 PCV2 存在的組別表現量也比 LPCV 組高。TNF- α 是一種多功能細胞因子，具有廣泛的生物學特性，其最顯著的活性特徵是在體內外特異性地殺傷腫瘤細胞，而對正常細胞無明顯毒性作用，目前普遍認為，TNF- α 主要通過誘導細胞凋亡、破壞腫瘤組織血管介導免疫調節作用，而本研究也於 mRNA 和蛋白質皆檢測到 TNF- α 的表現，在 mRNA 的表現情形是有 PCV2 存在的組別 TNF- α 的表現量較強烈，共同感染組在 TNF- α 蛋白質的表現情形一開始較高，但在病毒感染後的第 4、6 天就下降至和模擬控制組無顯著差異，反而是 LPCV 感染組在晚期 TNF- α 蛋白質的表現量較高。IFN- α 屬於第一型干擾素，而 IFN- α 的立即作用是干擾病毒在受到感染的細胞當中複製，並傳送訊號給周遭未受到感染的細胞使其準備病毒的侵襲，且更進一步讓免疫系統警覺到感染發生，使病毒感染的細胞更容易受到毒殺型細胞的攻擊。本研究中檢測 IFN- α 的 mRNA 有被轉錄的情形，但在蛋白質層次卻未檢測到，由於 IFN- α 常在病毒感染後第 24 小時檢測到最高活性，並會隨著時間而逐漸減少活性(Chen et al., 2007)，而本試驗係從感染病毒後的第 48 小時開始收集細胞培養上清液，推測在本實驗中 IFN- α 的活性低於偵測值故檢測結果為陰性。屬於第二型干擾素的 IFN- γ 具很強的免疫調控活性，能顯著增加 MHC I 和 MHC II 的表達，促進 T 細胞和 B 細胞分化，增強自然殺手細胞殺傷活性，充分活化單核巨噬細胞，且 IFN- γ 為激活吞噬細胞與細胞毒殺型 T 淋巴細胞等之主要細胞激素，可活化免疫細胞執行清除細胞內抗原之功能，對於預防病毒感染之疾病具有相當重要的作用(George et al., 2012)。

從 Huang 等人(2011)的研究已知活毒滅毒豬瘟疫苗須依靠疫苗所誘導的體液性免疫(Humoral immunity)和細胞性免疫(Cell-mediated immunity)才能發揮完整的免疫保護效力。在施打疫苗的早期階段，抗豬瘟病毒的中和抗體還未出現時，細

胞性免疫就顯得格外重要，研究指出對豬瘟病毒具有特異性的細胞性免疫包括 IFN- γ 分泌細胞、細胞增殖的活性以及毒殺型淋巴細胞皆和對抗豬瘟病毒的感染有關聯，而當 PCV2 存在時，LPCV 所誘導的體液性免疫和細胞性免疫都明顯地減少活性，雖然中和抗體(Neutralizing antibody)力價最後檢測的結果沒有受到影響，但在抗體最初應該出現的時間卻有延遲的反應。當 LPC 疫苗沒有辦法誘導完整的免疫反應時，遇到 wild-type 的豬瘟病毒會引起短暫的發燒以及病毒血症等臨床症狀。另外預先感染 PCV2 所引起的 CD4⁺、CD8⁺和 CD4⁺CD8⁺淋巴球群的減少也意味著幫手型(helper)T 細胞和毒殺型(cytotoxic)T 細胞被相對抑制。

PCV2 於周邊組織被具有高效吞噬能力的未成熟樹突細胞(imDCs)經由胞吞作用(endocytosis)吞噬，並且大量堆積於細胞質隨著 imDCs 散播至身體各處。而肌肉注射 LPC 疫苗後，LPCV 於真皮層主動感染事先已存在 PCV2 的 imDCs，當 PCV2 和 LPCV 同時感染於宿主時便開啟一連串未知的免疫反應。首先於 mRNA 的轉錄發現屬於發炎激素的 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF- α ，以及具有免疫抑制作用的 IL-10 和抗病毒功能的 IFN- α 在感染早期都有過度表現的趨勢，另外 IL-8、IL-12p40 和 IFN- γ 在蛋白質層次也有較高的表現量被檢測到，雖然 mRNA 並非具功能的蛋白質，但卻能反應 imDCs 在基因層面確實已經受到 PCV2 的影響而改變。而 LPCV 或許只需要些許活性的免疫反應就能成功誘導體液性免疫和細胞性免疫，但從細胞激素轉錄和分泌的趨勢來看，在先天性免疫的階段 PCV2 似乎讓免疫系統感到混亂，使得宿主在面對其他病原體入侵時做出較不恰當的回應方式，而無論細胞激素所造成的偏差是導向體液性免疫還是細胞性免疫，PCV2 都有將這個偏差加強的趨勢，儘管擾亂的機制不同，但使免疫系統的反應偏離軌道或許是 PCV2 影響不同疫苗效力的可能因素。

通常經由先天性免疫反應被刺激或被病毒感染的樹突細胞會吞入抗原，同時也對其他免疫細胞產生的細胞激素反應，最後所有的刺激讓樹突細胞往淋巴移動，並接受淋巴結所製造的趨化激素吸引進入淋巴結。在這趟旅程中，樹突細胞將會成為一個具有抗原呈現功能的成熟型樹突細胞，但在本研究發現當感染進入後期，PCV2 似乎開始誘導多數和 LPCV 共同感染的 imDCs 進入凋亡階段，這和 PCV2 所誘導的 TNF- α 是否具有關聯需更進一步確認。在本研究中，PCV2 對 LPCV



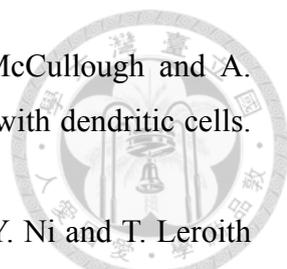
造成的干擾對免疫系統的活化以及與適應性免疫的連結有較不利的影響，對照 Huang 等人(2011, 2014)的研究，推測其可能為中和抗體延遲出現和特異性淋巴細胞減少活性的部分原因，另外在先前的研究也發現 LPCV 於 PK15 的抗原偵測率與 IFN- γ 的表現量具有負相關性，而 IFN- γ 干擾 LPCV 複製的情形在單核球也同樣被觀察到(Grahan et al., 2012)，Suradhat 等人(2007)的研究也指出 IFN- γ 的表現量和宿主對抗豬瘟病毒感染的能力具有正相關性，因此推測 LPC 疫苗效價減低的部分原因可能與本研究於共同感染組檢測到高表現量的 IFN- γ 也有重要的關聯性。雖然本研究沒有另外給予刺激，使用成熟型的樹突細胞進行更深入的探討，但在免疫系統當中適應性免疫係建立於先天性免疫所建構的基礎上，因此本論文對先天性免疫進行的相關研究或許能勾勒出一個 PCV2 影響 LPC 疫苗效力的免疫機制輪廓。

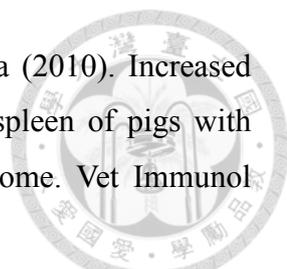
第六章 參考文獻

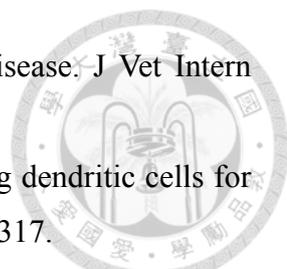


- Allan, G. M. and J. A. Ellis (2000). Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12(1): 3-14.
- Armengol, E., K. H. Wiesmuller, D. Wienhold, M. Buttner, E. Pfaff, G. Jung and A. Saalmuller (2002). Identification of T-cell epitopes in the structural and non-structural proteins of classical swine fever virus. *J Gen Virol* 83(Pt 3): 551-560.
- Askenasy, N., A. Kaminitz and S. Yarkoni (2008). Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 7(5): 370-375.
- Bassami, M. R., D. Berryman, G. E. Wilcox and S. R. Raidal (1998). Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249(2): 453-459.
- Basta, S., C. P. Carrasco, S. M. Knoetig, R. C. Rigden, H. Gerber, A. Summerfield and K. C. McCullough (2000). Porcine alveolar macrophages: poor accessory or effective suppressor cells for T-lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 77(3-4): 177-190.
- Bauhofer, O., A. Summerfield, Y. Sakoda, J. D. Tratschin, M. A. Hofmann and N. Ruggli (2007). Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol* 81(7): 3087-3096.
- Bauhofer, O., A. Summerfield, Y. Sakoda, J. D. Tratschin, M. A. Hofmann and N. Ruggli (2007). Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J Virol* 81(7): 3087-3096.
- Becher, P., M. Orlich, A. Kosmidou, M. Konig, M. Baroth and H. J. Thiel (1999). Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* 262(1): 64-71.
- Beer, M., I. Reimann, B. Hoffmann and K. Depner (2007). Novel marker vaccines against classical swine fever. *Vaccine* 25(30): 5665-5670.
- Belak, K., F. Koenen, H. Vanderhallen, C. Mittelholzer, F. Feliziani, G. M. De Mia and S. Belak (2008). Comparative studies on the pathogenicity and tissue distribution of three virulence variants of classical swine fever virus, two field isolates and one vaccine strain, with special regard to immunohistochemical investigations. *Acta*

- Vet Scand 50: 34.
- Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7(11): 875-888.
- Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7(11): 875-888.
- Bensaude, E., J. L. Turner, P. R. Wakeley, D. A. Sweetman, C. Pardieu, T. W. Drew, T. Wileman and P. P. Powell (2004). Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *J Gen Virol* 85(Pt 4): 1029-1037.
- Bergamin, F., L. Saurer, V. Neuhaus, K. C. McCullough and A. Summerfield (2007). Porcine B-cell activating factor promotes anti-FMDV antibodies in vitro but not in vivo after DNA vaccination of pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 120(3-4): 115-123.
- Biagetti, M., I. Greiser-Wilke and D. Rutili (2001). Molecular epidemiology of classical swine fever in Italy. *Vet Microbiol* 83(3): 205-215.
- Blacksell, S. D., S. Khounsy, D. B. Boyle, L. J. Gleeson, H. A. Westbury and J. S. Mackenzie (2005). Genetic typing of classical swine fever viruses from Lao PDR by analysis of the 5' non-coding region. *Virus Genes* 31(3): 349-355.
- Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440(7085): 808-812.
- Brooks, D. G., M. J. Trifilo, K. H. Edelman, L. Teyton, D. B. McGavern and M. B. Oldstone (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12(11): 1301-1309.
- Carrasco, C. P., R. C. Rigden, R. Schaffner, H. Gerber, V. Neuhaus, S. Inumaru, H. Takamatsu, G. Bertoni, K. C. McCullough and A. Summerfield (2001). Porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties. *Immunology* 104(2): 175-184.
- Carrasco, C. P., R. C. Rigden, I. E. Vincent, C. Balmelli, M. Ceppi, O. Bauhofer, V. Tache, B. Hjertner, F. McNeilly, H. G. van Gennip, K. C. McCullough and A. Summerfield (2004). Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J Gen Virol* 85(Pt 6): 1633-1641.
- Carrasco, C. P., R. C. Rigden, I. E. Vincent, C. Balmelli, M. Ceppi, O. Bauhofer, V.

- 
- Tache, B. Hjertner, F. McNeilly, H. G. van Gennip, K. C. McCullough and A. Summerfield (2004). Interaction of classical swine fever virus with dendritic cells. *J Gen Virol* 85(Pt 6): 1633-1641.
- Cecere, T. E., X. J. Meng, K. Pelzer, S. M. Todd, N. M. Beach, Y. Y. Ni and T. Leroith (2012). Co-infection of porcine dendritic cells with porcine circovirus type 2a (PCV2a) and genotype II porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) induces CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells in vitro. *Vet Microbiol* 160(1-2): 233-239.
- Chae, C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 168(1): 41-49.
- Chang, H. W., C. R. Jeng, T. L. Lin, J. J. Liu, M. T. Chiou, Y. C. Tsai, M. Y. Chia, T. R. Jan and V. F. Pang (2006). Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet Immunol Immunopathol* 110(3-4): 207-219.
- Chang, H. W., C. R. Jeng, J. J. Liu, T. L. Lin, C. C. Chang, M. Y. Chia, Y. C. Tsai and V. F. Pang (2005). Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet Microbiol* 108(3-4): 167-177.
- Cheung, A. K., K. M. Lager, O. I. Kohutyuk, A. L. Vincent, S. C. Henry, R. B. Baker, R. R. Rowland and A. G. Dunham (2007). Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 152(5): 1035-1044.
- Choi, C. and C. Chae (2003). Localization of classical swine fever virus from chronically infected pigs by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 40(1): 107-113.
- Choi, C., K. K. Hwang and C. Chae (2004). Classical swine fever virus induces tumor necrosis factor-alpha and lymphocyte apoptosis. *Arch Virol* 149(5): 875-889.
- Chung, W. B., W. H. Chan, H. C. Chung, Y. Lien, C. C. Wu and Y. L. Huang (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(1-2): 11-19.
- Cortey, M., E. Pileri, M. Sibila, J. Pujols, M. Balasch, J. Plana and J. Segales (2011). Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J* 187(3): 363-368.

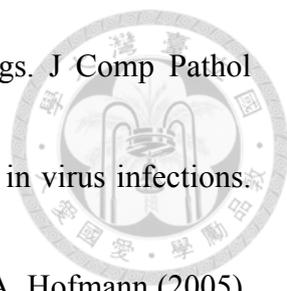
- 
- Crisci, E., M. Ballester, J. Dominguez, J. Segales and M. Montoya (2010). Increased numbers of myeloid and lymphoid IL-10 producing cells in spleen of pigs with naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Immunol Immunopathol* 136(3-4): 305-310.
- Darwich, L., J. Segales and E. Mateu (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149(5): 857-874.
- de Boisseson, C., V. Beven, L. Bigarre, R. Thiery, N. Rose, E. Eveno, F. Madec and A. Jestin (2004). Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *J Gen Virol* 85(Pt 2): 293-304.
- Desai, G. S., A. Sharma, R. S. Kataria, N. N. Barman and A. K. Tiwari (2010). 5'-UTR-based phylogenetic analysis of Classical swine fever virus isolates from India. *Acta Virol* 54(1): 79-82.
- Dewulf, J., F. Koenen, S. Ribbens, A. Haegeman, H. Laevens and A. De Kruif (2005). Evaluation of the epidemiological importance of classical swine fever infected, E2 sub-unit marker vaccinated animals with RT-nPCR positive blood samples. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(9): 367-371.
- Dong, X. N. and Y. H. Chen (2007). Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine* 25(2): 205-230.
- Doster, A. R., S. Subramaniam, J. Y. Yhee, B. J. Kwon, C. H. Yu, S. Y. Kwon, F. A. Osorio and J. H. Sur (2010). Distribution and characterization of IL-10-secreting cells in lymphoid tissues of PCV2-infected pigs. *J Vet Sci* 11(3): 177-183.
- Finsterbusch, T. and A. Mankertz (2009). Porcine circoviruses--small but powerful. *Virus Res* 143(2): 177-183.
- Floegel-Niesmann, G., C. Bunzenthall, S. Fischer and V. Moennig (2003). Virulence of recent and former classical swine fever virus isolates evaluated by their clinical and pathological signs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50(5): 214-220.
- Ganges, L., J. I. Nunez, F. Sobrino, B. Borrego, N. Fernandez-Borges, M. T. Frias-Lepoureau and F. Rodriguez (2008). Recent advances in the development of recombinant vaccines against classical swine fever virus: cellular responses also play a role in protection. *Vet J* 177(2): 169-177.
- Gillespie, J., T. Opriessnig, X. J. Meng, K. Pelzer and V. Buechner-Maxwell (2009).

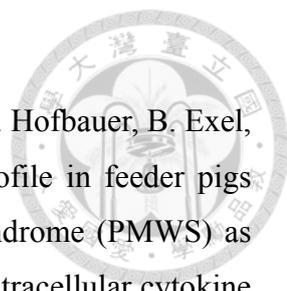
- 
- Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med* 23(6): 1151-1163.
- Gogolak, P., B. Rethi, G. Hajas and E. Rajnavolgyi (2003). Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. *J Mol Recognit* 16(5): 299-317.
- Grau-Roma, L., L. Fraile and J. Segales (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet J* 187(1): 23-32.
- Guzylack-Piriou, L., S. Piersma, K. McCullough and A. Summerfield (2006). Role of natural interferon-producing cells and T lymphocytes in porcine monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunology* 118(1): 78-87.
- Haas, B., R. Ahl, R. Bohm and D. Strauch (1995). Inactivation of viruses in liquid manure. *Rev Sci Tech* 14(2): 435-445.
- Hasslung, F., P. Wallgren, A. S. Ladekjaer-Hansen, A. Botner, J. Nielsen, E. Watrang, G. M. Allan, F. McNeilly, J. Ellis, S. Timmusk, K. Belak, T. Segall, L. Melin, M. Berg and C. Fossum (2005). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 106(1-2): 49-60.
- Hsiao, H. J., P. A. Liu, H. I. Yeh and C. Y. Wang (2010). Classical swine fever virus down-regulates endothelial connexin 43 gap junctions. *Arch Virol* 155(7): 1107-1116.
- Huang, Y. L., M. C. Deng, F. I. Wang, C. C. Huang and C. Y. Chang (2014). The challenges of classical swine fever control: modified live and E2 subunit vaccines. *Virus Res* 179: 1-11.
- Huang, Y. L., V. F. Pang, M. C. Deng, C. Y. Chang and C. R. Jeng (2014). Porcine circovirus type 2 decreases the infection and replication of attenuated classical swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *Res Vet Sci* 96(1): 187-195.
- Huang, Y. L., V. F. Pang, C. M. Lin, Y. C. Tsai, M. Y. Chia, M. C. Deng, C. Y. Chang and C. R. Jeng (2011). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Vet Res* 42: 115.
- Hulst, M. M., H. G. van Gennip, A. C. Vlot, E. Schooten, A. J. de Smit and R. J. Moormann (2001). Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and

- virulence. *J Virol* 75(20): 9585-9595.
- Kaser, T., W. Gerner, S. E. Hammer, M. Patzl and A. Saalmuller (2008). Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 122(1-2): 153-158.
- Kaser, T., W. Gerner, K. Mair, S. E. Hammer, M. Patzl and A. Saalmuller (2012). Current knowledge on porcine regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 148(1-2): 136-138.
- Kawai, T. and S. Akira (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem* 141(2): 137-145.
- Kekarainen, T., M. Montoya, E. Mateu and J. Segales (2008). Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol* 89(Pt 3): 760-765.
- Knoetig, S. M., A. Summerfield, M. Spagnuolo-Weaver and K. C. McCullough (1999). Immunopathogenesis of classical swine fever: role of monocytic cells. *Immunology* 97(2): 359-366.
- Koenig, P., E. Lange, I. Reimann and M. Beer (2007). CP7_E2alf: a safe and efficient marker vaccine strain for oral immunisation of wild boar against Classical swine fever virus (CSFV). *Vaccine* 25(17): 3391-3399.
- Larochelle, R., R. Magar and S. D'Allaire (2002). Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* 90(1-2): 101-112.
- Le Potier, M. F., M. Le Dimna, G. Kuntz-Simon, S. Bougeard and A. Mesplede (2006). Validation of a real-time RT-PCR assay for rapid and specific diagnosis of Classical Swine Fever virus. *Dev Biol (Basel)* 126: 179-186; discussion 326-177.
- Leifer, I., B. Hoffmann, D. Hoper, T. Bruun Rasmussen, S. Blome, G. Strebelow, D. Horeth-Bontgen, C. Staubach and M. Beer (2010). Molecular epidemiology of current classical swine fever virus isolates of wild boar in Germany. *J Gen Virol* 91(Pt 11): 2687-2697.
- Lin, C. M., C. R. Jeng, H. W. Chang, I. C. Guo, Y. L. Huang, Y. C. Tsai, M. Y. Chia and V. F. Pang (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(3-4): 355-366.
- Liu, J., I. Chen and J. Kwang (2005). Characterization of a previously unidentified viral

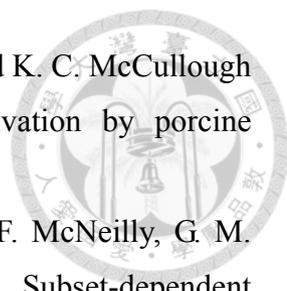
- protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 79(13): 8262-8274.
- Mankertz, A., R. Caliskan, K. Hattermann, B. Hillenbrand, P. Kurzendoerfer, B. Mueller, C. Schmitt, T. Steinfeldt and T. Finsterbusch (2004). Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 98(2): 81-88.
- McColl, S. R. (2002). Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol* 80(5): 489-496.
- McCullough, K. C., N. Ruggli and A. Summerfield (2009). Dendritic cells--at the front-line of pathogen attack. *Vet Immunol Immunopathol* 128(1-3): 7-15.
- McCullough, K. C., N. Ruggli and A. Summerfield (2009). Dendritic cells--at the front-line of pathogen attack. *Vet Immunol Immunopathol* 128(1-3): 7-15.
- Meehan, B. M., F. McNeilly, D. Todd, S. Kennedy, V. A. Jewhurst, J. A. Ellis, L. E. Hassard, E. G. Clark, D. M. Haines and G. M. Allan (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9): 2171-2179.
- Misinzio, G., P. L. Delputte, P. Meerts, D. J. Lefebvre and H. J. Nauwynck (2006). Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol* 80(7): 3487-3494.
- Moennig, V., G. Floegel-Niesmann and I. Greiser-Wilke (2003). Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J* 165(1): 11-20.
- Morozov, I., T. Sirinarumitr, S. D. Sorden, P. G. Halbur, M. K. Morgan, K. J. Yoon and P. S. Paul (1998). Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36(9): 2535-2541.
- Muhling, J., W. S. Raye, J. R. Buddle and G. E. Wilcox (2006). Genetic characterisation of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. *Aust Vet J* 84(12): 421-425; discussion 416.
- Oda, K. and H. Kitano (2006). A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Mol Syst Biol* 2: 2006.0015.
- Ophuis, R. J., C. J. Morrissy and D. B. Boyle (2006). Detection and quantitative pathogenesis study of classical swine fever virus using a real time RT-PCR assay.

- J Virol Methods 131(1): 78-85.
- Opriessnig, T., N. E. McKeown, K. L. Harmon, X. J. Meng and P. G. Halbur (2006). Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 13(8): 923-929.
- Pan, C. H., M. H. Jong, T. S. Huang, H. F. Liu, S. Y. Lin and S. S. Lai (2005). Phylogenetic analysis of classical swine fever virus in Taiwan. *Arch Virol* 150(6): 1101-1119.
- Pan, C. H., M. H. Jong, Y. L. Huang, T. S. Huang, P. H. Chao and S. S. Lai (2008). Rapid detection and differentiation of wild-type and three attenuated lapinized vaccine strains of classical swine fever virus by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 20(4): 448-456.
- Paton, D. J., A. McGoldrick, I. Greiser-Wilke, S. Parchariyanon, J. Y. Song, P. P. Liou, T. Stadejek, J. P. Lowings, H. Bjorklund and S. Belak (2000). Genetic typing of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 73(2-3): 137-157.
- Pauly, T., K. Elbers, M. Konig, T. Lengsfeld, A. Saalmuller and H. J. Thiel (1995). Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *J Gen Virol* 76 (Pt 12): 3039-3049.
- Pensaert, M. B., R. E. Sanchez, Jr., A. S. Ladekjaer-Mikkelsen, G. M. Allan and H. J. Nauwynck (2004). Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol* 98(2): 175-183.
- Pereda, A. J., I. Greiser-Wilke, B. Schmitt, M. A. Rincon, J. D. Mogollon, Z. Y. Sabogal, A. M. Lora, H. Sanguinetti and M. E. Piccone (2005). Phylogenetic analysis of classical swine fever virus (CSFV) field isolates from outbreaks in South and Central America. *Virus Res* 110(1-2): 111-118.
- Piriou, L., S. Chevallier, E. Hutet, B. Charley, M. F. Le Potier and E. Albina (2003). Humoral and cell-mediated immune responses of d/d histocompatible pigs against classical swine fever (CSF) virus. *Vet Res* 34(4): 389-404.
- Pulendran, B. (2004). Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* 29(1-3): 187-196.
- Rosell, C., J. Segales, J. Plana-Duran, M. Balasch, G. M. Rodriguez-Arrioja, S. Kennedy, G. M. Allan, F. McNeilly, K. S. Latimer and M. Domingo (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of

- 
- postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 120(1): 59-78.
- Rouse, B. T., P. P. Sarangi and S. Suvas (2006). Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 212: 272-286.
- Ruggli, N., B. H. Bird, L. Liu, O. Bauhofer, J. D. Tratschin and M. A. Hofmann (2005). N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction. *Virology* 340(2): 265-276.
- Sabogal, Z. Y., J. D. Mogollon, M. A. Rincon and A. Clavijo (2006). Phylogenetic analysis of recent isolates of classical swine fever virus from Colombia. *Virus Res* 115(1): 99-103.
- Sanchez-Cordon, P. J., S. Romanini, F. J. Salguero, A. Nunez, M. J. Bautista, A. Jover and J. C. Gomez-Villamos (2002). Apoptosis of thymocytes related to cytokine expression in experimental classical swine fever. *J Comp Pathol* 127(4): 239-248.
- Sarma, D. K., N. Mishra, S. Vilcek, K. Rajukumar, S. P. Behera, R. K. Nema, P. Dubey and S. C. Dubey (2011). Phylogenetic analysis of recent classical swine fever virus (CSFV) isolates from Assam, India. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34(1): 11-15.
- Segales, J., L. Martinez-Guino, M. Cortey, N. Navarro, E. Huerta, M. Sibila, J. Pujols and T. Kekarainen (2009). Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet Microbiol* 134(3-4): 199-207.
- Segales, J., C. Rosell and M. Domingo (2004). Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98(2): 137-149.
- Shi, K. C., X. Guo, X. N. Ge, Q. Liu and H. C. Yang (2010). Cytokine mRNA expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from piglets experimentally co-infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 140(1-2): 155-160.
- Shibata, I., Y. Okuda, K. Kitajima and T. Asai (2006). Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(6): 278-280.
- Silva-Campa, E., L. Cordoba, L. Fraile, L. Flores-Mendoza, M. Montoya and J. Hernandez (2010). European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce

- 
- Treg cells. *Virology* 396(2): 264-271.
- Sipos, W., J. C. Duvigneau, M. Willheim, F. Schilcher, R. T. Hartl, G. Hofbauer, B. Exel, P. Pietschmann and F. Schmoll (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. *Vet Immunol Immunopathol* 99(1-2): 63-71.
- Stegeman, A., A. Elbers, H. de Smit, H. Moser, J. Smak and F. Pluimers (2000). The 1997-1998 epidemic of classical swine fever in the Netherlands. *Vet Microbiol* 73(2-3): 183-196.
- Steiner, E., C. Balmelli, B. Herrmann, A. Summerfield and K. McCullough (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology* 378(2): 311-322.
- Stevenson, L. S., K. McCullough, I. Vincent, D. F. Gilpin, A. Summerfield, J. Nielsen, F. McNeilly, B. M. Adair and G. M. Allan (2006). Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol* 19(2): 189-195.
- Summerfield, A., L. Guzylack-Piriou, A. Schaub, C. P. Carrasco, V. Tache, B. Charley and K. C. McCullough (2003). Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology* 110(4): 440-449.
- Summerfield, A., M. A. Hofmann and K. C. McCullough (1998). Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 63(3): 289-301.
- Summerfield, A., S. M. Knoetig, R. Tschudin and K. C. McCullough (2000). Pathogenesis of granulocytopenia and bone marrow atrophy during classical swine fever involves apoptosis and necrosis of uninfected cells. *Virology* 272(1): 50-60.
- Summerfield, A., S. M. Knoetig and K. C. McCullough (1998). Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J Virol* 72(3): 1853-1861.
- Summerfield, A., F. McNeilly, I. Walker, G. Allan, S. M. Knoetig and K. C. McCullough (2001). Depletion of CD4(+) and CD8(high+) T-cells before the onset of viraemia during classical swine fever. *Vet Immunol Immunopathol* 78(1): 3-19.
- Summerfield, A., K. Zingle, S. Inumaru and K. C. McCullough (2001). Induction of apoptosis in bone marrow neutrophil-lineage cells by classical swine fever virus.

- J Gen Virol 82(Pt 6): 1309-1318.
- Suradhat, S., S. Damrongwatanapokin and R. Thanawongnuwech (2007). Factors critical for successful vaccination against classical swine fever in endemic areas. *Vet Microbiol* 119(1): 1-9.
- Taga, K., B. Cherney and G. Tosato (1993). IL-10 inhibits apoptotic cell death in human T cells starved of IL-2. *Int Immunol* 5(12): 1599-1608.
- Tang, Q., K. Guo, K. Kang, Y. Zhang, L. He and J. Wang (2011). Classical swine fever virus NS2 protein promotes interleukin-8 expression and inhibits MG132-induced apoptosis. *Virus Genes* 42(3): 355-362.
- Tang, Q. H., Y. M. Zhang, Y. Z. Xu, L. He, C. Dai and P. Sun (2010). Up-regulation of integrin beta3 expression in porcine vascular endothelial cells cultured in vitro by classical swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol* 133(2-4): 237-242.
- Tischer, I., D. Peters, R. Rasch and S. Pociuli (1987). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch Virol* 96(1-2): 39-57.
- Todd, D. (2004). Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet Microbiol* 98(2): 169-174.
- Tsai, Y. C., C. R. Jeng, S. H. Hsiao, H. W. Chang, J. J. Liu, C. C. Chang, C. M. Lin, M. Y. Chia and V. F. Pang (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) induces cell proliferation, fusion, and chemokine expression in swine monocytic cells in vitro. *Vet Res* 41(5): 60.
- Ugurel, S., D. Uhlig, C. Pfohler, W. Tilgen, D. Schadendorf and U. Reinhold (2004). Down-regulation of HLA class II and costimulatory CD86/B7-2 on circulating monocytes from melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 53(6): 551-559.
- van Gennip, H. G., A. T. Hesselink, R. J. Moormann and M. M. Hulst (2005). Dimerization of glycoprotein E(rns) of classical swine fever virus is not essential for viral replication and infection. *Arch Virol* 150(11): 2271-2286.
- van Oirschot, J. T. (2003). Vaccinology of classical swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 96(4): 367-384.
- van Rijn, P. A., H. G. van Gennip, C. H. Leendertse, C. J. Bruschke, D. J. Paton, R. J. Moormann and J. T. van Oirschot (1997). Subdivision of the pestivirus genus based on envelope glycoprotein E2. *Virology* 237(2): 337-348.
- Vilcek, S. and P. F. Nettleton (2006). Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol* 116(1-3): 1-12.

- 
- Vincent, I. E., C. Balmelli, B. Meehan, G. Allan, A. Summerfield and K. C. McCullough (2007). Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology* 120(1): 47-56.
- Vincent, I. E., C. P. Carrasco, L. Guzylack-Piriou, B. Herrmann, F. McNeilly, G. M. Allan, A. Summerfield and K. C. McCullough (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115(3): 388-398.
- Vincent, I. E., C. P. Carrasco, B. Herrmann, B. M. Meehan, G. M. Allan, A. Summerfield and K. C. McCullough (2003). Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* 77(24): 13288-13300.
- Wang, C., T. S. Huang, C. C. Huang, C. Tu, M. H. Jong, S. Y. Lin and S. S. Lai (2004). Characterization of porcine circovirus type 2 in Taiwan. *J Vet Med Sci* 66(5): 469-475.
- Wang, C. Y., H. I. Yeh, T. J. Chang, H. J. Hsiao, M. S. Tsai, S. M. Tsai and P. A. Liu (2011). Attenuation of nitric oxide bioavailability in porcine aortic endothelial cells by classical swine fever virus. *Arch Virol* 156(7): 1151-1160.
- Weesendorp, E., A. Stegeman and W. Loeffen (2009). Dynamics of virus excretion via different routes in pigs experimentally infected with classical swine fever virus strains of high, moderate or low virulence. *Vet Microbiol* 133(1-2): 9-22.
- Xiao, M., Y. Wang, J. Chen and B. Li (2003). Characterization of RNA-dependent RNA polymerase activity of CSFV NS5B proteins expressed in *Escherichia coli*. *Virus Genes* 27(1): 67-74.
- Zaffuto, K. M., M. E. Piccone, T. G. Burrage, C. A. Balinsky, G. R. Risatti, M. V. Borca, L. G. Holinka, D. L. Rock and C. L. Afonso (2007). Classical swine fever virus inhibits nitric oxide production in infected macrophages. *J Gen Virol* 88(Pt 11): 3007-3

