

牛流行熱活毒疫苗之研發

李燕霖*、黃天祥、黃金城

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 牛流行熱在台灣平均每 3 至 6 年爆發流行一次，為加強本病之預防，本研究利用日本分讓之牛流行熱活毒疫苗病毒株 YHL 株製作活毒疫苗。病毒增殖用細胞 HmLu-1 先進行細胞生長試驗以瞭解細胞生長速度，之後再建立病毒增殖曲線。發現在 175 平方公分 (175T) 之細胞角瓶與 850 平方公分旋轉培養瓶分別種入 5×10^6 與 5×10^7 個細胞 2 天後可以形成單層細胞，形成單層細胞後即可接種病毒，病毒力價不論是細胞角瓶或旋轉培養瓶皆於接種 2 天後可達到最高，為 10^7 TCID₅₀/mL。安全試驗中，一頭荷蘭牛與一頭娟姍牛在注射 $10^{7.13}$ TCID₅₀ YHL 株病毒後，在 14 天內並未出現發熱或其他不良反應，確定安全無虞即開始進行效力試驗。牛隻於 YHL 株注射後第 4 週再注射本所生產之牛流行熱不活化疫苗，結果發現血清中和抗體力價快速開始上升，於實驗第 6-7 週上升至高峰，抗體中和力價可達 128 倍與 256 倍，之後就逐漸下降。試驗結果顯示 YHL 活毒除安全外，與不活化疫苗搭配使用誘發抗體產生的能力亦具有不錯的效果。

關鍵詞：牛流行熱，活毒疫苗，中和抗體

緒言

牛流行熱是由桿狀病毒 (Rhabdovirus) 所引起之急性發熱性疾病，在牛之間並不會經由直接接觸、體液或空氣傳染，須透過庫蠓等吸血性節肢動物做為媒介來傳播疾病，目前僅有一種血清型[11,13]。牛流行熱病毒屬單股 RNA 病毒，結構包括封套與五個結構性蛋白 (L、G、N、M1 與 M2) [13]，其中又以 G 蛋白最重要，因為此蛋白可呈現病毒的專一性及中性抗原部位，引發牛隻的免疫反應並保護牛隻不受感染[2, 5, 9]。在臨床上，病牛會出現高熱、開口呼吸、流涎、四肢僵硬、跛足、關節疼痛等症狀，其中泌乳量遽減常造成重大損失[3]。

1967 年台灣首次出現疫情後，分別在 1983、1989、1996、1999、2001、2004、2007 年又有疫情發生，可見本病平均每幾年流行一次，呈現周期性爆發性疫情，而間隔似乎有縮短的趨勢[1, 7]，加上全球正面臨氣候變遷，全球暖化使得原本在

熱帶的昆蟲數目倍增之外，亦開始往溫帶遷徙，並且產生延遲避冬的現象[4]，這代表疾病可能傳播的區域變廣了，時間性的分布也延長了，原本在冬天數目應該減少的蚊子由於暖冬仍然在活動，特別是台灣天氣高溫多濕，環境中極易滋生蚊蟲，隨著暖化效應的影響，不論是南部或北部，都將面臨病媒蚊增多的威脅，且因為季節間的差異愈來愈不明顯，庫蠓好發的時間或許將不再侷限於夏天，這將使得畜牧場在預防控制上更為困難，防治之道除加強防治病媒蚊外，更需藉助疫苗免疫牛隻以產生抗體對抗病毒，根據研究，血清中和抗體力價尚需大於或等於 32 倍才能保護牛隻不被野外病毒感染[10]。

台灣目前施打之疫苗為不活化疫苗，僅能刺激體液免疫產生，初生小牛接種第一劑疫苗數週後必須補強第二劑，之後每年亦需補強注射，才能達到理想免疫效果。日本方面有研究指出以 YHL 株活毒疫苗搭配不活化毒疫苗的方法免疫牛隻，安全性高，毒力減弱的病毒雖然本身誘發中和抗體的能力降低，但其具有

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

的致敏作用 (priming effect) 卻可使牛隻對於之後施打的不活化疫苗迅速產生反應，製造出大量的中和抗體，甚至 10^6 TCID₅₀ 的病毒量即具有致敏作用[6]。為防範牛流行熱疫情造成養牛戶經濟上嚴重損失，除現有之不活化疫苗外，擬利用分讓自日本之牛流行熱活毒疫苗病毒 YHL 株研發活毒疫苗以加強基礎免疫，於民國 98 至 100 年，逐步完成活毒疫苗之各項試驗，冀能生產具良好免疫性之活毒疫苗以有效預防疾病。

材料與方法

細胞株與病毒株

HmLu-1 (hamster lung) 細胞為倉鼠肺臟株化細胞，與牛流行熱病毒 YHL 株皆由日本農業技術研究機構動物衛生研究所提供；BHK-21 (baby hamster kidney) 細胞為倉鼠腎臟株化細胞，牛流行熱病毒株 Vac-1984 則是 1984 年自台南縣柳營鄉病牛所分離，兩者分別為本所牛流行熱不活化疫苗使用之細胞株與病毒株。

細胞生長試驗

HmLu-1 細胞以不同細胞數分別接種至細胞角瓶 (175T) 及旋轉培養瓶 (850 cm²) 中，培養於 37°C，每日觀察細胞生長狀況，並計算細胞數，以便判斷單層細胞形成所需時間。

病毒增殖曲線試驗

細胞角瓶及旋轉培養瓶分別種入 5×10^6 與 5×10^7 的細胞，於 37°C 培養 2 天後分別計算細胞數目，接種 0.038 MOI 之 YHL 病毒，於 37°C 感受 1 小時後移除病毒液，細胞角瓶加入 50 毫升而旋轉培養瓶加入 250 毫升細胞維持液於 34°C 培養，之後連續 5 天每天採取病毒液離心取上清液保存，統一進行病毒力價測定。

病毒接種量試驗

YHL 病毒液經不含血清之 MEM 培養液稀釋後，以不同 MOI 接種至已長成單層細胞之細胞角瓶，於 37°C 感受 1 小時後移除病毒液，改以細胞維持液在

34°C 培養，分別於 24、32、48 和 56 小時收集病毒液，離心後取上清液進行病毒力價測定。

YHL 株安全性試驗

選定牛流行熱抗體陰性之 6 月齡娟珊牛及荷蘭乳牛各 1 頭，於試驗前 7 天開始每日 2 次量測肛溫以記錄體溫變化，牛隻於皮下注射 YHL 病毒共 2 mL ($10^{6.83}$ TCID₅₀/mL) 後再持續量測體溫 14 天，同時觀察牛隻是否出現任何異狀或不良反應。

YHL 株效力試驗

完成安全性試驗之牛隻繼續進行效力試驗，於 YHL 病毒 (L) 注射 3 週後以本所生產之牛流行熱不活化疫苗 (K) 經肌肉注射 1 劑量完成基礎免疫 (LK 組)，接著每週採血並分離血清保存，使用前經 56°C 非動化處理 30 分鐘，再進行血清中和抗體力價分析。對照組 (KK 組) 為娟珊牛與荷蘭乳牛各 1 頭，以本所生產之牛流行熱不活化疫苗間隔 3 週二次肌肉注射完成基礎免疫，之後同樣每週採血並分離血清保存，比較二組之血清中和抗體力價變化。

血清中和抗體力價測定

將非動化處理過的待測血清在 96 孔微量培養盤中進行 2 倍連續稀釋，每孔再加入含 100 TCID₅₀ 的牛流行熱 Vac-1984 病毒液，置於 37°C 感作 1 小時後，每孔種入 3×10^4 個 BHK-21 細胞，於 34°C 培養 3-5 天，再進行力價判定。

高免血清製備與抗體力價測定

第 1 批以肌肉注射 YHL 病毒方式連續免疫 9 頭紐西蘭家兔共 4 次，每次間隔分別為 1、2、2 週，最後經心臟採血製備高免血清；第 2 批則是 BALB/c 哺乳小鼠腦內接種 YHL 病毒，觀察 2-3 天，出現神經症狀的小鼠共 28 隻採取腦組織磨成第一代乳劑，再以其腦內接種哺乳小鼠，同樣將有神經症狀的小鼠共 44 隻採腦製成第二代乳劑，以其靜脈注射免疫 2 頭紐西蘭家兔，4 週後以肌肉注射補強免疫 1 次，1 週後心臟採血製成高免血清。血清中和抗體力價測定方式與上述相同，兩批高免血清分別進行牛流行熱 Vac-1984 病毒株與 YHL 病毒株之中和試驗。

結果

細胞生長試驗

在 175T 細胞角瓶中，種入 5×10^6 HmLu-1 個細胞 2 天可以形成單層細胞，細胞數為 2.5×10^7 ，種入的細胞數越少，長滿的時間也越久；而旋轉培養瓶種入 5×10^7 個細胞，2 天後長成單層細胞時的細胞數為 1.3×10^8 。

病毒增殖曲線試驗

HmLu-1 細胞接種 YHL 病毒一天後即開始出現細胞病變，第二天細胞病變就達到 90% 以上，接下來細胞隨著時間增加逐步破碎死亡的比例也增加（圖 1）。病毒力價試驗結果也發現無論是細胞角瓶還是旋轉培養瓶，病毒接種後第 1 天力價可達 $10^{6.8}$ TCID₅₀/mL，而在第二天所收集的病毒液力價最高，可達 10^7 TCID₅₀/mL，與細胞病變的觀察結果一致，之後隨著時間力價逐漸下降，顯示收集病毒液的最佳時間是在接種第 2 天前後（圖 2）。

病毒接種量試驗

所測得的力價結果可以發現不同的病毒接種量之間於 24 小時時的差異最大，以接種 0.1 MOI 的病毒力價最高，0.01 MOI 次之，0.001 MOI 的力價最低，在 32 和 48 小時時三組差異縮小，在 56 小時時，則與 24 小時的剛好相反，接種 0.001 MOI 的力價反而最高，顯示病毒增殖的高峰點會隨著接種病毒量不同（圖 3）。

YHL 株安全性試驗

牛流行熱發病的牛隻通常會出現持續 2-3 日的高熱（40-42°C），在試驗前 7 天到試驗期這段時間，除了在施打 YHL 病毒後第 5 天乳牛體溫曾經出現過一次 40°C 之外，其餘體溫都未出現異常（圖 4），外觀上也無任何異常或出現不良反應。

YHL 株效力試驗

YHL 病毒搭配不活化疫苗的 LK 組，在注射 YHL 後的三週內抗體力價並未明顯上升，但在第 4 週也就是補強不活化疫苗一週後，血清中和抗體立刻開始爬升，在第 6-7 週時到達最高峰，分別是 128 倍跟 256 倍，之後隨著時間增加，抗體力價緩慢降低，

在第 25 週分別只剩下 16 倍與 4 倍。兩次均免疫不活化疫苗的 KK 組，在第 1 劑注射後的第 3 週抗體就開始爬升到 8 倍與 4 倍，再補強一劑後上升得更快，在第 5-6 週分別到達 128 倍跟 512 倍，之後一樣隨著時間而下降，在第 25 週時抗體分別為 32 倍與 64 倍（表 1）。

高免血清中和抗體力價測定

兩批 YHL 高免血清中的抗體不論是對 Vac-1984 或 YHL 病毒均具有中和能力，其中又以第 1 批的 1 號免抗體力價最高，可達 512 倍；第 2 批的 B 免力價也有 256 倍（表 2）。

討論

為瞭解增殖 YHL 病毒的最佳條件，在培養細胞的生長試驗中可發現 175T 的細胞角瓶與 850 cm² 的旋轉培養瓶相比，兩者面積大約差 5 倍，在相同條件下如希望能在 2 天後長成單層細胞，旋轉培養瓶種的細胞量需為細胞角瓶的 10 倍，細胞在旋轉培養瓶生長的速度會慢一些。

病毒增殖曲線的建立是希望能夠藉以得知病毒數量在甚麼時候出現高峰，在此時間點收集下來，將有助於提高疫苗的品質。在此試驗中，若比較細胞角瓶與旋轉培養瓶可發現兩者之間的病毒力價差異不大，這或許不符合一般認知旋轉培養瓶可生長的細胞數量較多，因此病毒力價應該較高，因為在本試驗中，兩者培養面積與培養出的細胞數量成正比，接毒時也以相同比例將細胞角瓶的接毒量放大至旋轉培養瓶，並以等比例的細胞維持液培養，所以病毒的力價也相似。

由於已知接毒 0.038 MOI 後第 2 天左右力價最高，為進一步了解在何時間點收毒及接種不同病毒量是否會影響病毒力價所進行的試驗中，可發現病毒增殖的高峰點會隨著接種病毒量而不同，以 0.1 MOI 來說，四個時間點以 32 小時的力價最高，0.01 MOI 則是 48 小時，接種量最少的 0.001 MOI 雖然在增殖 24 小時後力價最低，但隨著時間增加力價亦逐漸增加，在 56 小時反而最高，惟與 BHK-21 增殖牛流行熱病毒相同的是以組織培養方式增殖出的病毒力價大約都落在 10^7 TCID₅₀/mL 左右，很難提高，就算使

用較少的細胞維持液培養，對於力價的濃縮效果也不大，如同 Sato 等人曾報告過，在旋轉角瓶接毒後分別加入 100、500 與 800 mL 的細胞維持液，所得到的病毒力價並無差別[8]。經由上述結果可知，接種 YHL 病毒的合適時間為 HmLu-1 單層細胞形成後，而病毒力價的高低影響關鍵則是收集病毒液的時間與病毒接種量。

YHL 株的效力評估方面，LK 實驗組的抗體力價於注射前後揚升超過四倍，已合乎國家檢驗標準，但與 KK 組相較，效果似乎比不上兩次均注射不活化疫苗，而以牛種來看，娟孀牛的抗體力價在 LK 組與 KK 組中都比乳牛高。若以 32 倍的抗體力價做為分界點來判斷牛隻是否具有保護力，LK 組不到 4 個月即降到 32 倍以下，KK 組則可持續到 5 個月，日本的研究指出 LK 組抗體維持的時間比 KK 組久[6]，在本試驗中卻出現相反的結果。除牛隻對於疫苗的免疫反應彼此之間可能有差異之外，由於本次試驗每組均只有一頭牛，樣本數不足，因此無法推論是否具有代表性。此外 LK 試驗中的兩頭牛打完 YHL 病毒後，血清中和抗體並未顯著上升，與日本的研究一致，但因為 3 週後緊接著注射不活化疫苗，未能監控單純施打 YHL 病毒的後續中和抗體變化，因此尚未能確定 YHL 病毒本身誘發中和抗體的能力，且本次試驗亦缺少兩次均施打 YHL 病毒的組別，無法得知若以 YHL 病毒進行基

礎免疫的效果如何，這將有待後續試驗闡明。

至於使用日本的病毒株製造活毒疫苗在台灣使用是否恰當，曾有文獻針對牛流行熱病毒可誘發中和抗體產生的 G 蛋白進行基因序列分析，結果發現亞洲株與澳洲株為不同的基因群，而亞洲株又可區分成台灣株與日本株兩個基因群，若以本所製造不活化疫苗所使用的 Vac-1984 與 YHL 做比較，兩者 G 蛋白核酸相似度高達 97% [12]。在高免血清製備完成後所進行的血清中和試驗結果中，也發現雖然是以 YHL 病毒進行連續免疫，產生的抗體卻能有效中和 Vac-1984 病毒，與中和 YHL 的能力不相上下，顯示抗體具有交叉保護的效果，因此以 YHL 研發活毒疫苗應無效力上的疑慮。

如前所述，開發活毒疫苗的目的是希望能同時誘發細胞與體液免疫以彌補不活化疫苗的不足，活毒本身刺激抗體產生的效果或許不佳，但若能引起細胞免疫，產生免疫記憶細胞，甚至直接激化細胞毒殺細胞，即使中和抗體力價不高或維持時間不盡理想，仍有其他途徑可對抗病毒。在本報告中，使用 YHL 株做為活毒疫苗對於牛隻的安全性高且搭配不活化疫苗誘發抗體產生的能力不錯，未來將繼續活毒疫苗的研發工作，希望能盡速完成以供使用。

牛流行熱活毒疫苗之研發

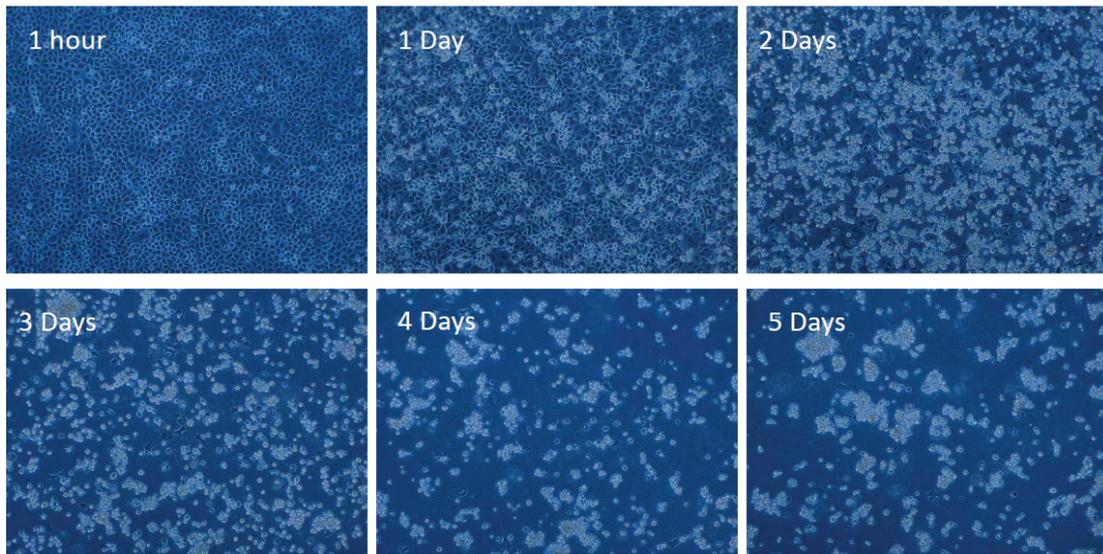


圖 1、接種 YHL 病毒後不同時間之 HmLu-1 細胞變化。

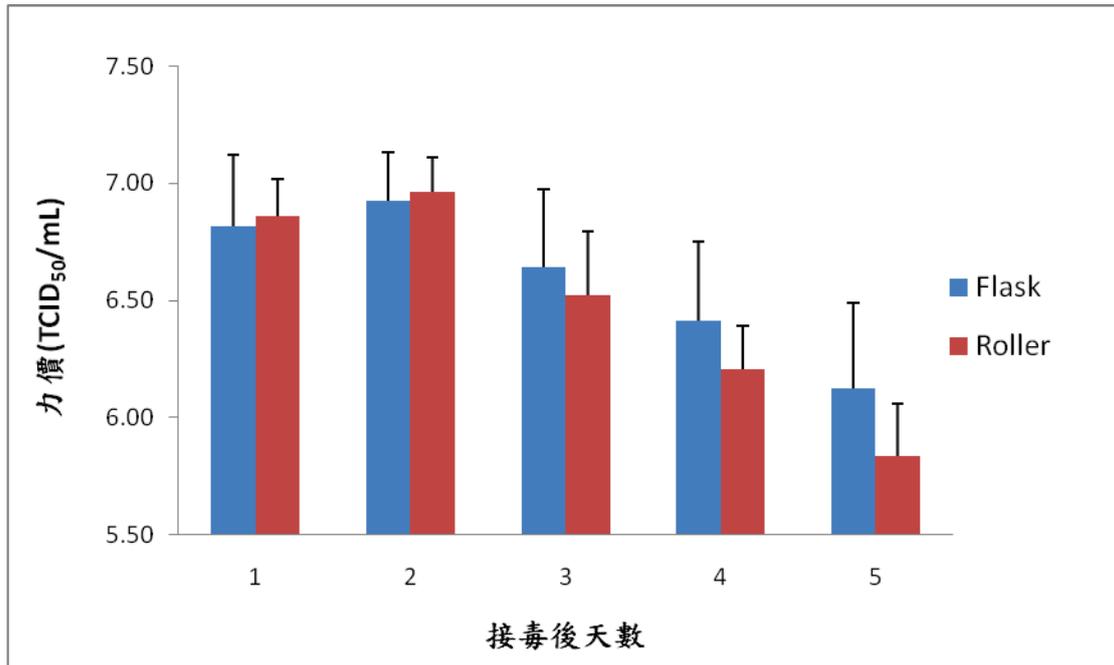


圖 2、HmLu-1 細胞分別生長於細胞培養瓶(175T Flask)及旋轉培養瓶(850 cm² Roller)2 天後，接種 YHL 病毒 0.038 MOI，增殖不同天數之病毒力價結果。

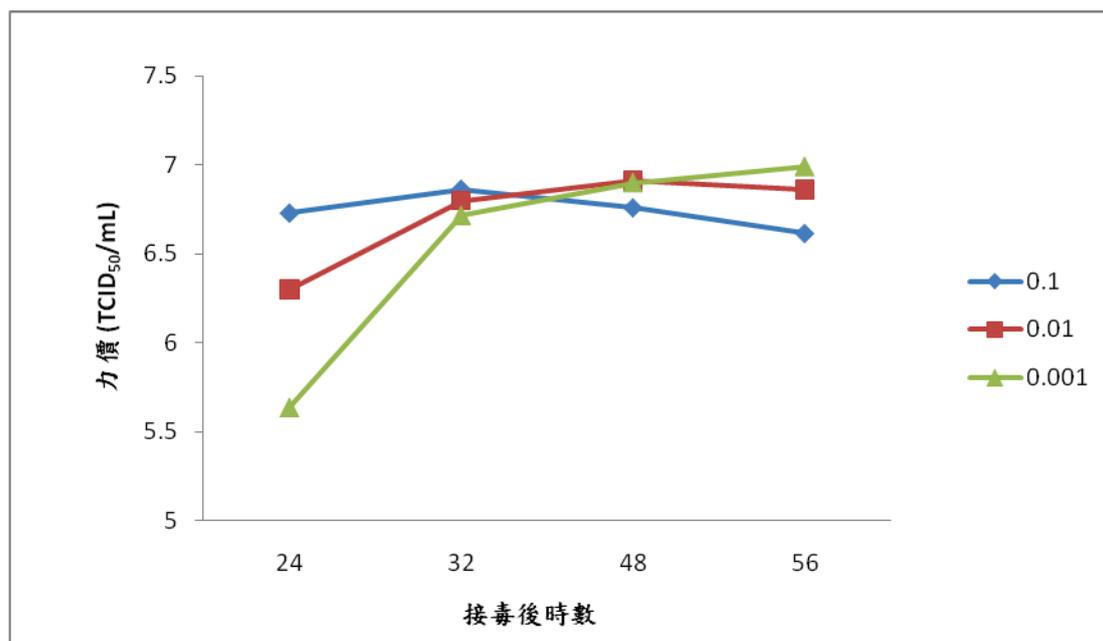


圖 3、病毒接種量與增殖曲線。細胞培養角瓶種入細胞培養 2 天後分別接種 YHL 病毒 0.1、0.01 或 0.001 MOI，於 24、32、48 及 56 小時收集病毒液進行病毒力價測定。

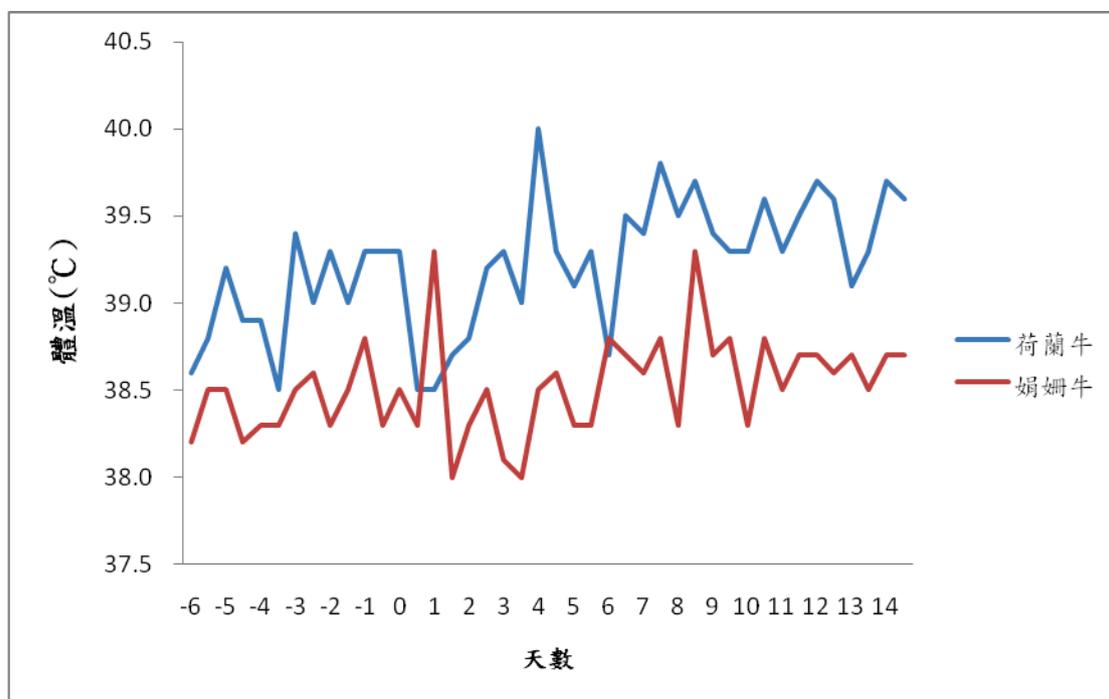


圖 4、牛隻於第 0 天施打 YHL 病毒後之體溫變化。

牛流行熱活毒疫苗之研發

表 1、以牛流行熱疫苗 LK 和 KK 免疫注射荷蘭牛和娟珊牛後之血清中和抗體力價變化

組別	免疫後週數																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
荷蘭牛 LK	<2	<2	<2	32	64	128	32	32	32	16	32	32	32	16	32	32	16	32	16	32	16	8	16	16	16
娟珊牛 LK	<2	<2	2	32	128	128	256	64	64	32	64	32	32	32	16	8	16	8	16	8	8	4	4	4	4
荷蘭牛 KK	<2	4	8	64	64	128	64	128	64	64	64	32	32	16	32	32	16	8	16	16	16	16	32	32	32
娟珊牛 KK	<2	<2	<2	64	512	256	512	512	512	512	256	256	256	256	256	128	256	256	128	128	128	64	128	128	64

註：L 代表 YHL 活病毒，K 則為牛流行熱不活化疫苗，第一次免疫定為第 0 週，第二次免疫則在第 3 週完成採集血液樣本後。

表 2、以 YHL 高免血清對牛流行熱 Vac-1984 病毒株及 YHL 病毒株進行中和試驗之抗體力價

編號	病毒	
	Vac-1984	YHL
1	512	512
5	256	128
A	32	64
B	256	256

註：1 號及 5 號兔為第 1 批高免血清，A、B 兔則為第 2 批高免血清

致謝

本研究承蒙日本農業食品產業技術綜合研究機構後藤義之博士 (Dr. Yoshiyuki Goto) 書信指導並提供珍貴研究資料，本所前製劑研究系主任陳清博士不吝撥冗聯繫後藤義之博士並回所協助翻譯日信件資料，多項試驗得以順利進行，謹此致謝。

參考文獻

1. 丁履紉、李敏旭、郭舒亭、鄭明珠、蕭終融。牛流行熱疫情監控及免疫適期之探討。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告 38:1-8，2002。
2. Cybinski DH, Walker PJ, Byrne KA, Zakrzewski H. Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. *J Gen Virol*, 71 (9): 2065-2072, 1990.
3. Davis SS, Gibson DS, Clark R. The effect of bovine ephemeral fever on milk production. *Aust Vet J*, 61(4): 128, 1984.
4. Greer A, Ng V, Fisman D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. *CMAJ*, 178(6): 715-722, 2008.
5. Hertig C, Pye AD, Hyatt AD, Davis SS, McWilliam SM, Heine HG, Walker PJ, Boyle DB. Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not G(NS) glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. *J Gen Virol*, 77(Pt4):631-640, 1996.
6. Inaba Y, Kurogi H, Takahashi A, Sato K, Omori T. Vaccination of cattle against bovine ephemeral fever with live attenuated virus followed by killed virus. *Arch Gesamte Virusforsch*, 44(2): 121-132, 1974.
7. Liao YK, Inaba Y, Li NJ, Chain CY, Lee SL, Liou PP. Epidemiology of bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan. *Microbiol Res*, 153(3): 289-295, 1998.
8. Sato K, Inaba Y, Kurogi H, Omori T, Yamashino T. Rolling round bottle culture of HmLu-1 cells and the production of bovine ephemeral fever virus. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, 15(3): 109-115, 1975.
9. Uren MF, Walker PJ, Zakrzewski H, St George TD, Byrne KA. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine*, 12(9): 845-850, 1994.
10. Vanselow BA, Walthall JC, Abetz I. Field trials of ephemeral fever vaccines. *Vet Microbiology*, 46: 117-130, 1995.
11. Walker PJ, Byrne KA, Cybinski DH, Doolan DL, Wang YH. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *J Gen Virol*, 72(Pt 1): 67-74, 1991.
12. Wang FI, Hsu AM, Huang KJ. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J Vet Diagn Invest*, 13(6): 462-467, 2001.
13. Wunner WH, Calisher CH, Dietzgen RG, Jackson AO, Kitajima E W, Lafon M F, Leong JC, Nichol ST, Peters D, Smith JS. & Walker PJ. Rhabdoviridae. In *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 288-293, 1995.

Development of Bovine Ephemeral Fever Live Vaccine Based on YHL Strain

YL Lee*, TS Huang, CC Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Bovine ephemeral fever (BEF) outbreaks occur every 3-6 years in Taiwan. To improve the BEF vaccination program, we tried to develop a live vaccine using a YHL virus strain from Japan. For determining the growth rate and culture conditions of HmLu-1 cells, cell proliferation test was carried out, and the propagation curve of YHL virus was then established. As a result, the optimum monolayer of cells was found 2 days after seeding 5×10^6 cells in 175T flask and 5×10^7 cells in 850 cm² rolling bottle. After the establishment of a monolayer, culture fluid was removed and virus suspension was inoculated. Virus titer reached a peak, 10^7 TCID₅₀/ml in 2 days post inoculation. In the safety test, a $10^{7.13}$ TCID₅₀ YHL viral inoculation didn't cause any fever or other side reactions in inoculated cattle during the 14 day trial. After the safety of the live YHL vaccine was confirmed, immune efficiency test of cattle was performed. The calves boosted with a dose of AHRI BEF inactivated vaccine at 3 weeks post YHL virus vaccination produced a rapid neutralizing antibody response against BEFV. The antibody titers against BEFV reached a peak of 1:128 and 1:256 within 3 to 4 weeks post boosting vaccination with inactivated vaccine and then declined gradually. These findings indicated that cattle vaccinated with a live YHL vaccine and then, boosted with a AHRI BEF inactivated vaccine showed a strong antibody response and no side effects were observed.

Keywords: *Bovine ephemeral fever, Live vaccine, Neutralizing antibodies*