

牛流行熱 G 蛋白次單位 疫苗之開發



許愛萍 本所製劑研究組

病毒簡介

牛流行熱 (bovine ephemeral fever, BEF) 是由牛流行熱病毒 (bovine ephemeral fever virus, BEFV) 所引起，該病毒屬桿狀病毒科 (Rhabdoviridae)，外形即呈桿狀、子彈狀 (見圖 1)，病毒表面具封套，基因體為單股負股的 RNA。本病之傳播非透過空氣、食入等直接性傳播，而是需經由庫蠅 (*Culicoides spp.*) 等吸血節肢動物媒介。臺灣首發病例於 1967 年，之後約每 3 至 6 年爆發，造成酪農業嚴重經濟損失。

牛流行熱之防疫與 G 蛋白次單位疫苗開發

目前臺灣牛流行熱免疫是以接種組織細胞培養後不活化之病毒為對策，臺灣市場上包括本所之產品共計有 3 家動物用藥品製造廠生產本疫苗，有效

的不活化疫苗免疫反應仰賴高的不活化抗原量，然組織培養所獲得的病毒力價卻不高，僅 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL 左右，因此開發更經濟而有效的疫苗是需要的。G 蛋白是牛流行熱病毒表面的醣蛋白 (glycoprotein)，其立體構型是形成 homotrimer 之 4 級結構，並依靠其蛋白羧基端的區域附著在封套上。

前人研究發現將純化後的牛流行熱病毒 G 蛋白免疫牛隻可誘發保護性中和抗體產生，有效抵抗實驗室中的強毒

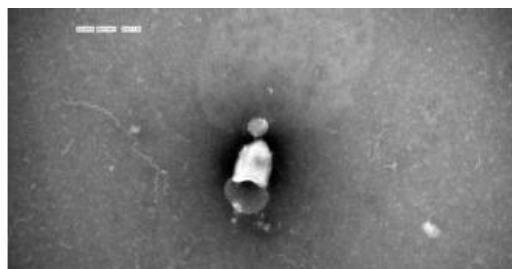


圖 1、牛流行熱病毒於電子顯微鏡下呈現桿狀、子彈狀之外貌。



攻毒。又近年來，利用牛痘病毒表現系統 (vaccinia virus expression system)，以及桿狀病毒表現系統 (baculovirus expression system)，成功地表現具抗原性的重組 G 蛋白，在在顯示牛流行熱病毒表面的 G 蛋白具強抗原性、免疫原性，且可引發中和抗體產生，故目前本實驗室試圖利用桿狀病毒表現系統開發牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗。

牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗開發過程

牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗開發主要流程是將 G 蛋白核酸片段構築到桿狀病毒染色體，而後將重組桿狀病毒感染昆蟲細胞，利用昆蟲細胞做為蛋白生產平臺，將所生產的重組 G 蛋白免疫牛隻，以開發次單位疫苗 (圖 2)。

工作初始，先自牛流行熱病毒野外分離株進行病毒核酸萃取，並以牛流行熱 G 蛋白之專一性引子對進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)，反應後獲得專一性增幅之核酸條帶，大小約 1.8kb (圖 3)。而後將此 G 蛋白之專一性核酸片段構築至桿狀病毒染色體。本研究已構築各種不同長度及融合不同片段之 G 蛋白重組桿狀病毒，共獲得 10 個特性不同的重組 G 蛋白 (圖 4)，進一步

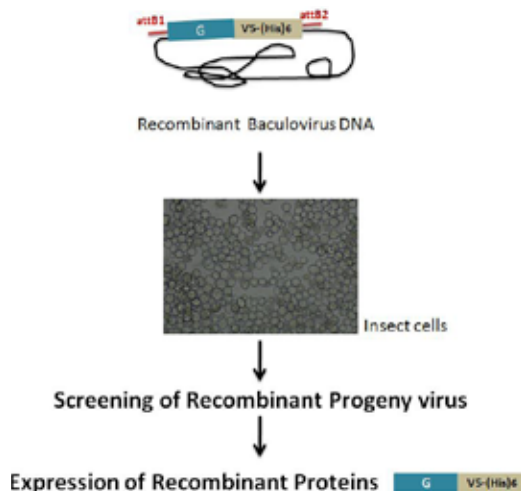


圖 2、牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗開發主要流程。首先使用反轉錄聚合酶連鎖反應來增幅 G 蛋白的基因，將增幅後的核酸片段以重組反應送入桿狀病毒之染色體並轉染於昆蟲細胞，並篩選純化具 G 蛋白基因片段的重組桿狀病毒，最後將此桿狀病毒感染昆蟲細胞來製造重組 G 蛋白。

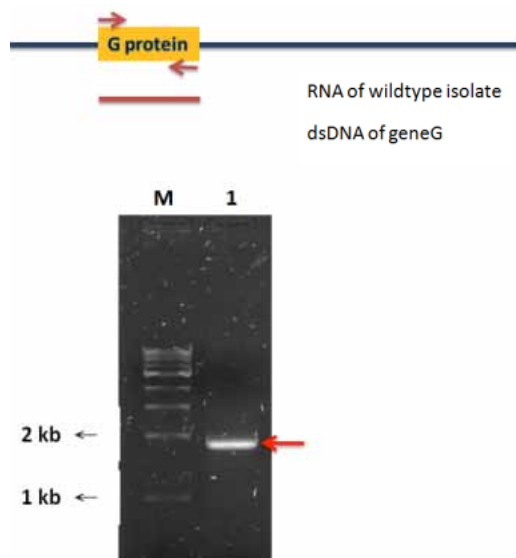


圖 3、以牛流行熱 G 蛋白之專一性引子對來進行反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)，反應後獲得專一性增幅之核酸條帶。

地利用多個抗血清來辨認以區別此 10 個重組 G 蛋白是否具不同的抗原性（圖 5），經由間接免疫螢光染色結果可見，蛋白編號 1、2、8、9、10 皆具相當不錯的抗原性，尤當與高免血清編號 2、3、4、7 反應時（高免血清編號 2、3、4 來自感染牛流行熱發病之病牛；編號 7 來自將純化的野外分離株免疫紐西蘭大白兔而獲得）。

後續進一步地將重組 G 蛋白施打在牛隻評估其免疫原性（圖 6），先選擇 2 號及 10 號重組 G 蛋白，在混合適當佐劑後給予肌肉注射，並經 3 週後予以補強注射，可見接受 2 號重組 G 蛋白注射的 1 號及 2 號牛，在初次免疫後 3 週即被誘發產生 4 倍之中和抗體，而再經

補強後，中和抗體迅速上升至 64-128 倍。反觀接受 10 號重組 G 蛋白注射的 4 號及 5 號牛，即使經過 1 次補強，皆沒有保護性中和抗體被誘發。伴隨免疫後之時間拉長，1 號及 2 號牛隻血清中和抗體力價有逐漸消退之傾向，然在半年後予以第 2 次補強後，1 號及 2 號牛隻之牛流行熱血清中和抗體力價又上升至 64-256 倍。此免疫原性評估結果顯示 2 號重組 G 蛋白具有做為次單位疫苗開發之潛力。

牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗之展望

牛流行熱所造成之經濟損失主要為致使泌乳牛乳量下降，為防範其疫情爆發及其後續損失，政府防疫政策為 4-6 月齡小牛經過初次免疫後 3 週予以 1 次

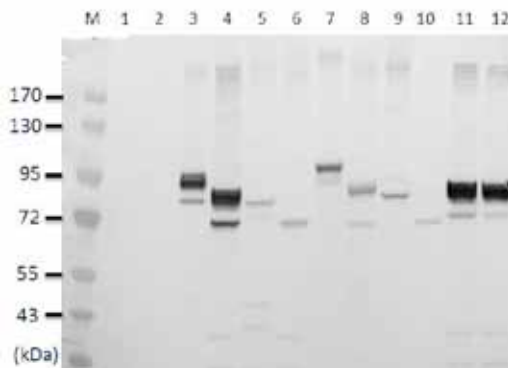


圖 4、Lane3-Lane12 為 10 個特性不同的重組 G 蛋白。

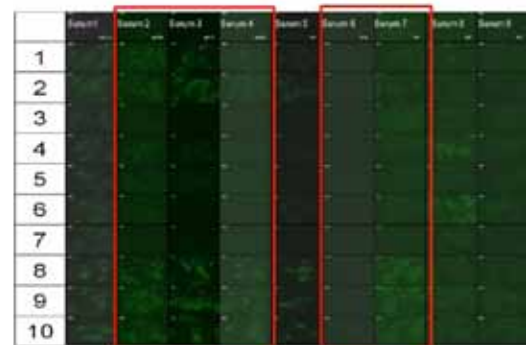


圖 5、利用多個抗血清來辨認以區別此 10 個重組 G 蛋白是否具不同的抗原性。



補強，而後每半年補強 1 次；酪農戶為避免損失也皆積極使用疫苗，因此在國內牛流行熱不活化疫苗一直存在有一定之市場。根據文獻，牛流行熱 G 蛋白的免疫僅需 $0.5 \mu\text{g}$ 即可提供保護力，顯示其每劑所需生產成本將會比現今之組織培養不活化疫苗來的低。

本所目前除積極開發牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗，也佐以開發牛流行熱 YHL 活毒疫苗，期待將來兩疫苗產品成功發展出來後，可讓活毒免疫誘發完善的免疫機制，而以 G 蛋白次單位疫苗的免疫促使更高之中和抗體產生，以延長群體中的抗體保護效期，俾有效防範牛流行熱。

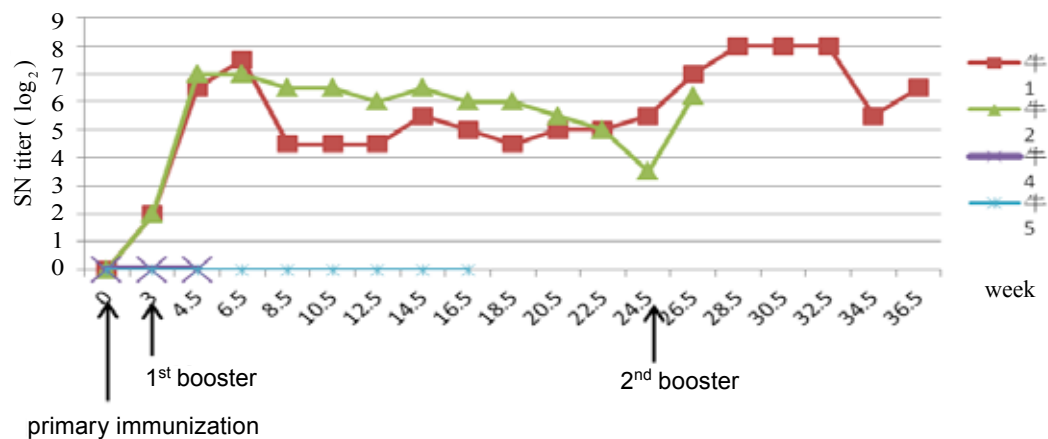


圖 6、將重組 G 蛋白施打於牛隻評估其免疫原性。牛 1 及牛 2 為接受 2 號重組 G 蛋白注射之試驗組，牛 4 及牛 5 則為接受 10 號重組 G 蛋白注射之另一試驗組。其免疫方式皆為以肌肉注射方式給予 $10 \mu\text{g}$ 之重組 G 蛋白（混合適當佐劑），經初次免疫 3 週後再予以補強，之後每 2 週採血測定血清中和抗體力價以評估保護性。



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. 邱仕炎、呂榮修。牛流行熱預防的研究。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告 23:73-79, 1987。
3. Cybinski, D. H., P. J. Walker, K. A. Byrne, and H. Zakrzewski. 1990. Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 71:2065-2072.
4. Dietzschold, B., T. J. Wiktor, W. H. Wunner, and A. Varrichio. 1983. Chemical immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology.* 124:330-337.
5. Inaba, Y., H. Kurogi, A. Takahashi, K. Sato, T. Omori. 1974. Vaccination of cattle against bovine ephemeral fever with live attenuated virus followed by killed virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 44:121-132.
6. Johal, J., K. Gresty, K. Kongsuwan, and P. J. Walker. 2008. Antigenic characterization of bovine ephemeral fever rhabdovirus G and GNS glycoproteins expressed from recombinant baculoviruses. *Arch. Virol.* 153:1657-1665.
7. Kongsuwan, K., D. H. Cybinski, J. Cooper, and P. J. Walker. 1998. Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J. Gen. Virol.* 79:2573-2581.
8. Uren, M. F., P. J. Walker, H. Zakrzewski, T. D. St George, and K. A. Byrne. 1994. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine* 12:845-850.
9. Wang, F., A. M. Hsu, and K. J. Huang. 2001. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:462-467.
10. Yilma, T., R. G. Breeze, S. Ristow, J. R. Gorham, and S. R. Leib. 1985. Immune responses of cattle and mice to the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 150:101-115.