

# 牛流行熱活毒疫苗之研發



李燕霖 本所製劑研究組

## 前言

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1種血清型，以乳牛、黃牛、水牛為主要宿主，但亦曾在鹿及羚羊體內發現有牛流行熱的抗體存在，目前沒有感染人的病例報告。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），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和性抗原部位，引發牛隻的免疫反應並保護牛隻不受感染。在臨床上，病牛會出現高熱、開口呼吸、流涎、精神沉鬱、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，病情嚴重時會因窒息而死亡。

1967年臺灣首次出現疫情後，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1次，呈現周期性爆發的現象，而間隔似乎有縮短的趨勢，過往發生的型態多是大流行，1999年後則變成散發，並多集中於夏秋兩季，甚至到10月份仍有病例傳出，與氣候變遷的暖化效應及颱風後病媒蚊數量增加是否相關，十分值得探討，因為根據研究，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，這代表疾病可能傳播的區域變廣了，時間性的分布也延長，原本在冬天數目應該減少的蚊子由

於暖冬仍然在活動。

庫蠓俗稱糠蚊，成蟲體型微小，體長約 0.3 公分，飛行能力不強但可乘風飄散至遠處，使得本病傳播與風向有關，而臺灣夏秋一向是颱風季，若這段時間絕佳的溫溼度與環境，將造成庫蠓數量遽增，加上颱風期間飛行能力不強的庫蠓剛好可乘著風勢傳播到較遠的區域，其中帶有牛流行熱病毒的庫蠓叮咬到的是體內沒有抗體或抗體不足的牛隻，疫情極有可能就因此而爆發，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。

臺灣目前施打之疫苗為不活化疫苗，乃將病毒經化學方法處理使其失去複製、繁殖能力，優點是安全性高，因為病毒不會感染細胞進行增殖，所以無毒力恢復和潛伏感染之疑慮，但也因為如此，不活化疫苗中的病毒為外源性抗原，僅能刺激體液免疫產生，抗體在經過一段時間後會自然慢慢的衰退，初生小牛接種第 1 劑疫苗數週後必須補強第 2 劑，之後每年亦需補強注射兩次，不

斷刺激抗體產生，才能達到理想免疫效果，無法施打 1 次就獲得終身免疫。

日本方面有研究指出以 YHL 株活毒疫苗作為基礎免疫的第 1 劑，之後搭配不活化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 TCID<sub>50</sub> 的病毒量即具有致敏作用。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，本所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，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本病。

### 活毒疫苗研發試驗細胞株與病毒株

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分讓。

### 冷凍乾燥活毒疫苗製作

於培養角瓶種入 HmLu-1 細胞，長成單層細胞即可接種 YHL 株病毒，病毒力價於接種 2 天左右達到最高，約 10<sup>7</sup>



TCID<sub>50</sub>/mL，所收集之病毒液經離心去除細胞碎片，與凍結乾燥安定劑（含 10% Lactose 及 0.3% PVP K90）以 1：1 比例混合並分裝於玻璃瓶內進行冷凍乾燥，凍乾完成之疫苗含濕度需低於 4%，病毒含有量經試驗約為 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>，1 瓶疫苗為 10 劑量，使用時以 20 mL 稀釋液回溶，每劑量 2 mL。

### 活毒疫苗安全試驗

以牛流行熱抗體陰性之 5-6 月齡娟孀牛 3 頭及荷蘭乳牛 6 頭進行試驗，於試驗前 7 天開始每日 2 次量測肛溫以記錄體溫變化，7 頭牛隻於皮下注射 YHL 活疫苗 1 劑量，2 頭牛接種 100 劑量，之後再持續量測體溫 14 天，同時觀察牛隻是否出現任何異狀或不良反應，結果 9 頭牛在 14 天內並未出現發熱或其他不良反應（圖 1），食慾、活動力等均正常，其中接種 1 劑量的 1 頭娟孀牛與 1 頭荷蘭乳牛於 3 週後接種第 2 次 YHL 活毒疫苗 1 劑量，之後的 14 天觀察期，體溫、食慾、活動力也正常。

### 活毒疫苗回毒試驗

於第 1 代牛隻皮下施打 YHL 活毒疫苗 4 天後採集血液，再將血液靜脈注射至第 2 代牛，同樣 4 天後採血再注射至

第 3 代牛，如此連續在牛隻繼代 3 代，每 1 代試驗觀察期 2 週，期間每天量測體溫、採集血液、糞便、鼻汁及唾液並觀察牛隻是否出現任何異狀或不良反應，結果試驗期間牛隻均無出現連續高熱或其他異常，血球分析結果亦未有白血球減少現象。病毒分離方面，採集的血液接種在增殖好的單層細胞，經感作 1 小時後移除並沖洗，換成維持液繼續培養，顯微鏡下每日觀察是否有細胞病變現象，7 天後仍無細胞病變出現，將細胞冷凍、解凍、離心，取上清液接種至新的單層細胞，如此連續繼代 3 次，第 3 次的細胞懸浮液以市售套組抽取病毒核糖核酸，並針對牛流行熱病毒之 G 糖蛋白基因設計引子用以增幅檢體中牛流行熱病毒核酸特異片段，完成反轉錄聚合酶鏈反應後的檢體經電泳分析，除陽性對照外並未出現分子量 581 bp 大小的產物（圖 2）。

### 活毒疫苗效力試驗

此試驗共分為 3 種免疫方式：單獨 1 劑 YHL 活毒疫苗皮下接種、間隔 3 週皮下施打兩劑活毒疫苗及施打活毒疫苗 3 週後肌肉注射本所生產之不活化疫苗，之後定期採血分離血清進行血清中和試

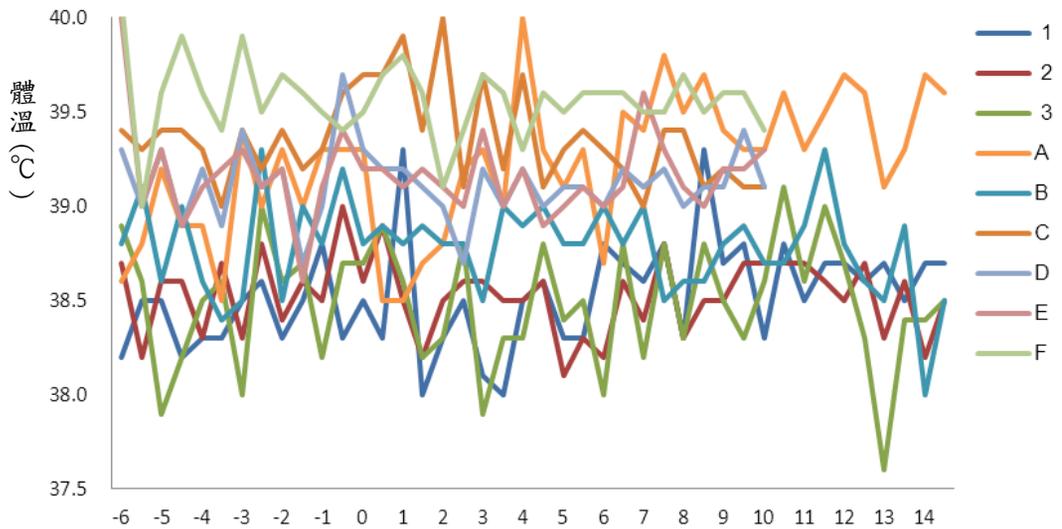


圖 1、YHL 牛隻安全性試驗牛隻體溫變化，上午下午各量測 1 次體溫，於第 0 天施打 YHL 活毒疫苗。編號 1、2、3 為娟孃牛，A、B、C、D、E、F 為荷蘭乳牛。

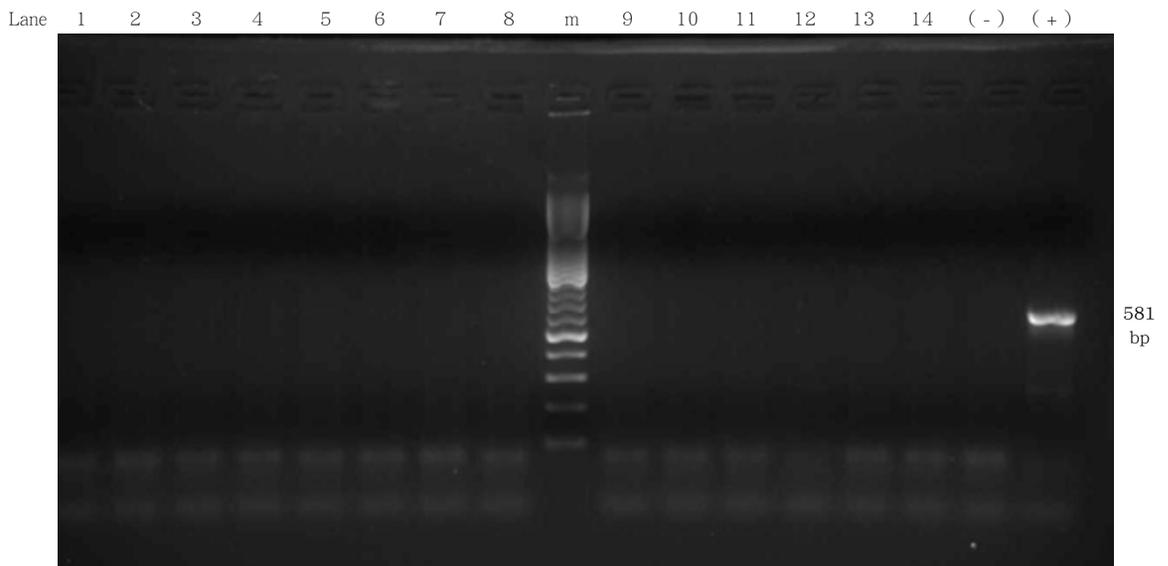


圖 2、YHL 回毒試驗病毒分離結果。Lane1-14 為血液病材經 3 代細胞繼代後之懸浮液，陰性對照 (-) 為細胞懸浮液，陽性對照 (+) 則是 YHL 株病毒。



驗，以比較疫苗施打前後牛流行熱血清中和抗體力價變化。

單純接種 1 劑活毒疫苗之牛隻，血清中和抗體於施打後 10 週內力價結果都是小於 2；接種兩劑活毒疫苗之牛隻，1 頭抗體力價免疫前後均小於 2，另 1 頭則從 2 倍揚升至 16 倍；1 劑活毒疫苗搭配 1 劑不活化疫苗的兩頭牛，血清中和抗體力價於不活化疫苗免疫後開始快速上升，於不活化疫苗施打後第 3-4 週

上升至高峰，抗體中和力價分別達 128 倍與 256 倍，之後就逐漸下降，於半年後再補強 1 次不活化疫苗，抗體又會快速上升，可達 512 倍和 256 倍（圖 3）。

### 高免血清製備

第 1 批以肌肉注射 YHL 病毒方式連續免疫 9 隻紐西蘭家兔共 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，

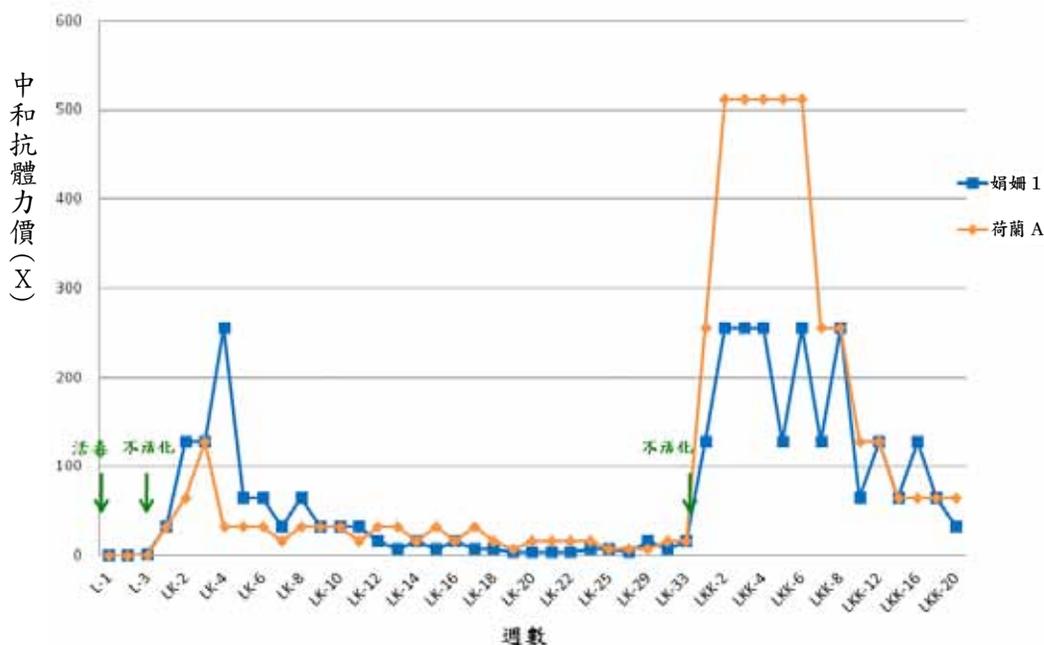


圖 3、以牛流行熱疫苗免疫注射荷蘭牛和娟婁牛後之血清中和抗體力價變化。第 1 次免疫定為第 0 週，施打 YHL 活病毒 (L)，第 2 次免疫則在第 3 週完成採集血液樣本後，施打本所生產之牛流行熱不活化疫苗 (K)，接著於半年後再次免疫本所生產之牛流行熱不活化疫苗。

出現神經症狀的小鼠共 28 隻採取腦組織磨成第 1 代乳劑，再腦內接種於哺乳小鼠，同樣將有神經症狀的小鼠共 44 隻採腦製成第 2 代乳劑，靜脈注射免疫 2 隻紐西蘭家兔，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。

兩批高免血清分別進行牛流行熱 Vac-1984 病毒株與 YHL 病毒株之血清中和試驗，結果兩批高免血清中的抗體不論是對 Vac-1984 病毒或 YHL 病毒均具有中和能力，其中又以第 1 批的 1 號兔抗體力價最高，可達 512 倍；第 2 批的 B 兔力價也有 256 倍。

### 小鼠動物模式

以 BALB/c 小鼠做為替代動物進行牛流行熱活毒疫苗之安全與效力試驗，分別以皮下或肌肉注射方式間隔 2 週接種兩次 0.5 毫升 YHL 活毒疫苗或本實驗室製作之牛流行熱不活化疫苗，於接種第 2 次疫苗後 1 週心臟採血進行牛流行熱抗體血清中和試驗。試驗期間小鼠活動力與食慾均正常，注射部位亦未出現紅腫等異狀，疫苗對小鼠之安全性應無疑慮，而免疫前與免疫後之牛流行熱抗體根據血清中和試驗結果，兩次皮下接種

YHL 活毒疫苗的組別抗體力價未上升，都是小於 2 倍；兩次肌肉注射 YHL 活毒疫苗的組別則從小於 2 倍變成 4 倍；而先皮下接種 YHL 活毒疫苗再肌肉接種不活化疫苗組則從小於 2 倍揚升至 2-4 倍。

### 討論

試驗結果可發現 YHL 活毒疫苗在牛隻及小鼠都不會造成不良反應，就算接種高劑量或是連續接種 2 次疫苗，對於牛隻仍是安全，回毒試驗的結果也是如此，連續在牛隻繼代 3 次，並未造成病毒的毒力回復而引起牛隻發病及任何臨床症狀，因此在使用上安全性應無疑慮。

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，若以血清中和抗體力價需大於或等於 32 倍才具保護力為標準，效力試驗中單獨施打 1 劑及 2 劑活毒疫苗的牛隻血液中和抗體揚升均不理想，僅 1 頭牛有到 16 倍，卻未達 32 倍，活毒本身刺激抗體產生的效果或許不佳，但若引起細胞免疫，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，如前言所提到



的致敏作用，就是活毒疫苗最重要的角色，可使施打活毒疫苗的牛隻對於之後注射的不活化疫苗迅速產生反應，效力試驗中牛隻於不活化疫苗施打後 1 週抗體即從小於 2 倍爬升至 32 倍，3-4 週後更可揚升到 128 倍以上。

使用日本的病毒株製造活毒疫苗在臺灣使用是否恰當，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臺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%。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 病毒的能力不相上下，顯示

抗體具有交叉保護的效果，亦即以 YHL 作為活毒疫苗病毒株可引起具保護力之免疫反應。

疾病的發生需要在宿主、病原與環境三者配合之下才會出現，只要能阻斷其中任兩者之間的連結，就能避免疾病的傳染。對牛流行熱來說，臺灣已成為此病的常在區，過去幾次的疫情，除了與環境中極難根除的病媒蚊有關外，不確實的免疫注射也造成牛群體內缺乏抗體保護力，因此一旦被畜舍周圍帶有病毒的庫蠓叮咬，疫情就此爆發，尤其臺灣的畜牧場多處於田間，雜草林木叢生提供了蚊蟲極佳的隱匿場所，在無法保證牛群不會被叮咬的情況之下，加強疫苗的預防接種就極為重要，若能再配合病媒蚊數量的控制，雙管齊下，才能有效達到防治目的。

