

牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗之研發

許愛萍*、林育如、李燕霖、曾俊憲、黃天祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 牛流行熱是由牛流行熱病毒所引起，經由庫蠓等吸血節肢動物媒介。台灣首發病例於 1967 年，之後約每三至六年爆發，造成酪農業嚴重經濟損失。目前台灣牛流行熱疫苗免疫以接種組織細胞培養後不活化之病毒抗原為對策，製程耗費大量資金、人力，然獲得的病毒力價卻不高，僅 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL 左右。因牛流行熱病毒 G 蛋白具良好免疫原性，且可誘發中和抗體產生，本計畫主要目標是以 2007 年台灣牛流行熱病毒分離株核酸作為模板增幅 G 蛋白之核酸片段，將此核酸片段構築至桿狀病毒之染色體核酸，經轉染於昆蟲細胞並篩選重組桿狀病毒後，於昆蟲細胞中製造重組 G 蛋白，並以此蛋白嘗試開發次單位疫苗。目前本研究已完成重組桿狀病毒篩選、佐劑挑選、牛隻效力試驗，牛隻經此試製疫苗免疫及補強後可誘發 32 倍及 128 倍之中和抗體力價，高於牛流行熱不活化疫苗國家檢定效力試驗標準。

關鍵詞：牛流行熱，G 蛋白，桿狀病毒，次單位疫苗。

緒言

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)，外形呈桿狀或子彈狀，病毒表面具封套，基因體為單股負股的 RNA，全長約 15 kb，轉錄五種結構蛋白 (L、G、M、P、N) 與一種非結構蛋白 (G_{NS}) [3,9,12]。本病之傳播非透過空氣、食入等直接性傳播，而是需經由庫蠓 (*Culicoides* spp.) 等吸血節肢動物媒介，主要發生在非洲、亞洲、澳洲之熱帶和亞熱帶國家 [3,12]。

牛流行熱首次被正式發表是 1906 年在南非，接著 1936 年澳洲便發生，而日本首次發生則是在 1949 至 1950 年期間 [1,12]。台灣首發病例於 1967 年，之後約每三至六年爆發，造成酪農業嚴重經濟損失。目前台灣的疫情呈週期性發生，主要發生在夏季、高溫雨量多之月份。在台灣可媒介本病的病媒蚊包括庫蠓 (*Culicoides* spp.)、家蚊 (*Culex* spp.)

及瘧蚊 (*Anopheles* spp.) [2]。

臨床上成年牛、肥胖牛、高產乳牛感染本病都較嚴重，經過 3-8 天的潛伏期呈現短暫性發熱 (體溫突然升高至 41-42°C，稽留 1-2 天，最長 3-4 天後就會下降)、跛腳站立不能、食慾不振、鼻鏡乾燥、口鼻眼分泌物、流淚、泌乳量下降或突然停止 (恢復後亦較之前產量為低) [3]。

目前台灣牛流行熱免疫是以接種組織細胞培養後不活化之病毒抗原為對策，台灣市場上包括本所之產品共計有三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，因此開發一更經濟而有效的疫苗是需要的 [3,6]。

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 之四級結構，並依靠其蛋白羧基端的區域附著在封套上

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

[5,9]。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，有效抵抗人工強毒攻毒試驗[11]。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) 成功地表現了具抗原性的重組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[7]。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。

材料與方法

重組桿狀病毒之構築

以商品化套組抽取2007年台灣牛流行熱病毒分離株核酸（由本所疫學組提供），並以此病毒核酸作為模板進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應，增幅G蛋白之核酸片段，透過商品化套組之topoisomerase和重組作用，將G蛋白核酸片段構築至桿狀病毒之基因體。使用ganciclovir以及極限稀釋法（end point dilution assay）篩選重組桿狀病毒核酸轉染（transfection）後於昆蟲細胞（Sf9）生產之第一代及第二代重組桿狀病毒，並使用間接螢光染色技術及免疫墨點法（dot blotting）做初步之篩選確認，以獲得可於Sf9細胞表現G蛋白之重組桿狀病毒。

重組 G 蛋白表現確認及初階抗原性評估

將重組桿狀病毒感染Sf9細胞，以表現製造G蛋白。透過蛋白質膠體電泳，並以抗V5標之單株抗體（Thermo[®]，catalog number MA1-81042，屬於IgG2a，辨識位為線性GKPIP NPLLGLDST序列）進行西方墨點法，透過分子量的評估確認重組G蛋白之表現。以抗2007年株牛流行熱病毒的多價抗血清，及自本所疫學研究組分讓的其他病牛高免血清，進行間接免疫螢光染色，並於螢光顯微鏡下觀察螢光來評估重組G蛋白抗原性。本試驗所使用之血清抗體分別為，血清編號1為抗V5之單株抗體，高免血清編號2、3、4是來自感染牛流行熱發病之病牛，血清編號5是抗G蛋白線性抗原決定位之單株抗體，高免血清編號6是來自YHL株不活化病毒免疫紐西蘭大白兔而獲得，編號7、8、9來自將純化的野外分離株不活化後免疫

紐西蘭大白兔而獲得。

重組桿狀病毒力價測定

先於96孔組織培養盤中種植Sf9細胞（每孔 2.5×10^4 個細胞）將病毒連續十倍序列稀釋，以每孔添加100 μ L的稀釋病毒，於27 $^{\circ}$ C培養7天。培養後移除上清液，以抗V5標之單株抗體進行間接免疫螢光染色，並於螢光顯微鏡下觀察螢光，計算病毒TCID₅₀力價。

製備並純化重組蛋白

將重組桿狀病毒感染Sf9細胞，表現製造G蛋白後，將細胞懸浮並以3,500 rpm離心20分鐘，移除上清液後，細胞以商品化萃取溶劑處理，將所收得的蛋白粗萃液利用金屬離子親和性色層分析（Metal Affinity Chromatography）純化重組蛋白；分別是以20 mM Imidazole的緩衝液洗去雜蛋白數次後，最後以200 mM Imidazole的緩衝液回收純化的蛋白。

於小鼠模式挑選合適的佐劑試驗

將商品化萃取溶劑處理後獲得之G蛋白，與純化標準品G蛋白比較以測試其濃度，將每劑之蛋白量為10 μ g的G蛋白與九種不同的佐劑（Q、A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1、D2）適當混合、乳化，每組五隻6-8週齡的BALB/c小鼠肌肉接種兩次（間隔兩週），於補強後的兩週採集血液分離血清，並進行血清中和試驗。每月一次的血清樣本採集，共評估為期八個月，以挑選一個抗體力價爬升高且為持久的佐劑蛋白組合。

牛隻重組 G 蛋白次單位疫苗效力試驗

挑選牛流行熱血清抗體陰性約四至六月齡荷蘭牛兩頭進行G蛋白次單位疫苗效力試驗。以肌肉注射方式給予0.5 μ g或1 μ g之重組G蛋白（混合Quil-A），經初次免疫三週後再予以補強，之後每兩週採血測定血清中和抗體力價。

結果

重組桿狀病毒之構築

參考文獻及比對相關牛流行熱病毒G蛋白序列後，設計G蛋白專一性引子，2007年台灣牛流行熱病毒

分離株進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應後，獲得G蛋白核酸片段（圖1）。透過商品化套組之topoisomerase和重組作用，將G蛋白核酸片段構築至桿狀病毒之基因體，達成10個重組桿狀病毒表現基因體之構築，並定序G蛋白核酸序列確認無誤，轉染於昆蟲細胞產生第一代子代病毒（圖2）。

重組 G 蛋白表現確認及初階抗原性評估

本研究初始便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，因而共獲得10個特性不同的重組G蛋白完成純化具牛流行熱病毒G蛋白基因之重組，並確認此10株病毒感染昆蟲細胞後表現了10個分子量大小正確的重組G蛋白（圖3）。進一步地利用多個抗血清來辨認以區別此10個重組G蛋白是否具有不同的抗原性（圖4），經由間接免疫螢光染色結果可見，蛋白編號1、2、8、9、10皆具有良好的抗原性，尤當與高免血清編號2、3、4、7反應時。

製備並純化一批重組蛋白

將大量被重組桿狀病毒感染的昆蟲細胞經萃取細胞內蛋白後利用Ni-NTA樹脂純化帶有六個組胺酸序列的重組G蛋白，並進行蛋白質膠體電泳以確認純度及產量（圖5）。可見純化之單一蛋白質條帶，可達到的純化濃度為50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，將做為後續蛋白試驗之濃度標準品蛋白。

於小鼠模式試驗挑選合適的佐劑

將重組G蛋白分別與九種佐劑混合，在小鼠以肌肉注射方式免疫及補強後，採血分離血清進行中和試驗，可見所有組別之免疫小鼠皆有被誘發中和抗體產生，在補強後兩週所有免疫組別之小鼠皆可獲得32至128倍不等的中和抗體揚升現象。在為期八個月的觀察期中，以A2佐劑來製作試製的G蛋白次單位疫苗可提供維持較久且較高力價的中和抗體，在補強後七個月仍可維持平均約128倍左右的中和抗體（圖6）。

牛隻重組 G 蛋白次單位疫苗效力試驗

當使用初步小量試製兩種蛋白劑量之疫苗產品（0.5 $\mu\text{g}/\text{劑}$ 以及1 $\mu\text{g}/\text{劑}$ ），各施打於一隻牛流行熱抗體陰性之牛隻，於初次免疫後三週予以補強，補

強兩週後採血偵測血清中和抗體力價，分別可達128倍以及32倍，高於牛流行熱不活化疫苗國家檢定效力試驗標準（圖7）。

討論

感染牛流行熱之牛隻常因發熱導致泌乳量下降，甚至停止泌乳，尤在狀況佳之高產乳牛，泌乳量的下降可至12%。據農委會民國101年畜牧統計，台灣乳牛飼養戶536戶，產乳牛在養頭數約五萬九千餘頭，乳量產出約34.8餘萬公噸，產值約91億新台幣，佔該年畜牧總產值6.2%，可窺見牛流行熱防治之必須。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週予以一次補強，而後每半年補強一次；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疫苗一直存在有一定之市場。台灣目前施打之疫苗為不活化疫苗，乃將組織培養之牛流行熱病毒物活化，因其病毒複製特性所能到達之病毒力價僅約 $10^{6.5}$ TCID₅₀/mL。根據過往文獻[11]，牛流行熱G蛋白的免疫僅0.5 μg 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。

本次研究是利用桿狀病毒表現系統來開發牛流行熱G蛋白次單位疫苗。桿狀病毒是個大型的DNA病毒，主要在昆蟲細胞的核內複製，自1983年桿狀病毒被開發成真核細胞表現載體並成功地製造出具活性的人類 β -干擾素（ β -interferon），即被廣泛研究與應用[10]。第一個利用桿狀病毒表現系統研發的疫苗（Intervet的豬瘟E2次單位疫苗，分泌性的E2蛋白）已被核准及上市以及FDA亦核准了另一個利用桿狀病毒表現系統研發的前列腺癌疫苗[4,8]。顯見桿狀病毒表現系統用以利用開發疫苗的安全性佳。目前在牛流行熱G蛋白的次單位疫苗產品上，市面上尚無相關產品，然而前人研究的確證實桿狀病毒表現系統可成功表現了具抗原性的重組G蛋白。本次研究便試圖去將桿狀病毒表現系統所表現的G蛋白導入疫苗的開發。

目前本所所生產製造的牛流行熱死毒疫苗之種毒株為民國73年由台南畜試所之發病牛脫纖血分離而來，雖經本組疫學研究組證實該毒株與近年的爆發或

流行毒株仍具有高度的交叉保護性，在開發牛流行熱 G 蛋白的次單位疫苗的核酸模板，我們以較近期的毒株做為選擇，遂而將本所疫學研究組提供之 2007 年台灣牛流行熱病毒分離株做為 G 蛋白的次單位疫苗開發的核酸模板。本研究初期所架構的不同特性的重組 G 蛋白（包括分泌型及不同功能區的長短）皆於間接免疫螢光染色結果證實具有良好的抗原性（尤其蛋白編號 1、2、8、9、10）。在評估蛋白表現量後，於此十株不同特性的重組桿狀病毒中選擇其中一株進行下游的疫苗開發試驗。

為了決定後續於牛隻的安全效力試驗中牛流行熱 G 蛋白的次單位疫苗的劑型，遂先試驗挑選最適合的佐劑。目前台灣及日本在牛流行熱死毒疫苗的檢定上仍是使用小鼠做為疫苗安全效力評估的動物標的，為了擴大佐劑挑選時的樣本數，以及增加可挑選的佐劑種類，在佐劑挑選之疫苗效力試驗上，乃採用小鼠做為模式動物來進行。本次試驗供挑選了九種不同的佐劑，當以每劑之蛋白量為 10 μ g 的 G 蛋白與佐劑適當混合、乳化後，經過兩次的施打，所有小鼠皆可在補強後的兩週到達 32 至 128 倍不等的中和抗體爬升，皆高於目前台灣的檢定標準。然而在為期約八個月的

觀察期中，A2 佐劑和 G 蛋白的搭配組合可維持長久的高抗體力價，因此初步決定 G 蛋白混合 A2 佐劑做為未來牛流行熱 G 蛋白的次單位疫苗之主要劑型。

進一步地我們將含有每劑含有 0.5 μ g 以及 1 μ g 的 G 蛋白次單位疫苗免疫牛隻，再經過初次免疫及三週後予以補強，補強後兩週血清中和抗體分別可達 128 倍以及 32 倍，符合國家檢定標準。此結果顯示確實如前所述 0.5 μ g 的 G 蛋白免疫僅即可提供保護力，即便是由昆蟲細胞所表現之重組 G 蛋白。目前此血清中和抗體力價仍持續評估中，而未來也會擴大牛隻樣本數來進行效力試驗的評估。

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 G 蛋白次單位疫苗的免疫去促使更高之中和抗體產生，以延長群體中的抗體保護效期，達到有效防範牛流行熱之疫病。

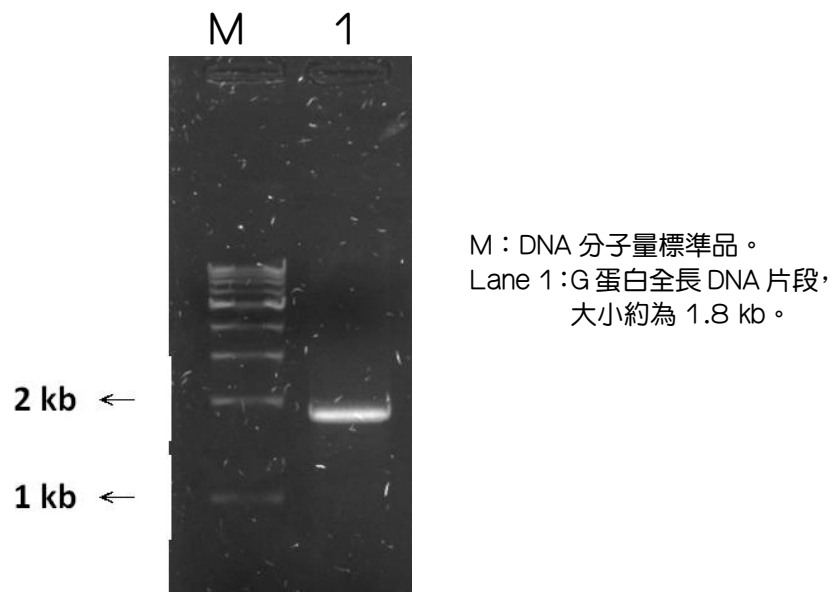


圖 1、經反轉錄聚合酶鏈鎖反應增幅牛流行熱病毒 G 蛋白全長核酸片段之結果。

牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗之研發

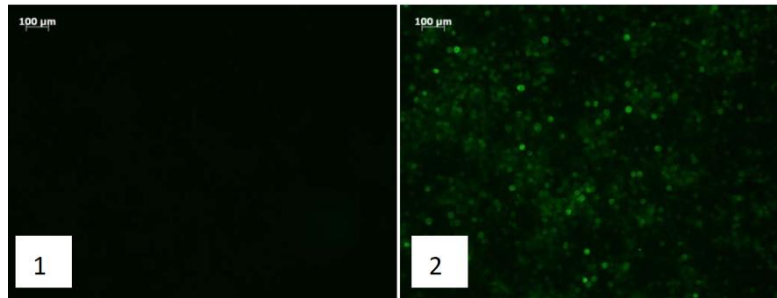


圖 2、重組桿狀病毒染色體轉染於昆蟲細胞後第一代子代病毒之螢光偵測反應，本試驗使用小鼠抗 V5 之單株抗體做為一級抗體。

1. 未轉染重組桿狀病毒染色體之昆蟲細胞 (Mock-infected)。
2. 轉染重組桿狀病毒染色體之昆蟲細胞。

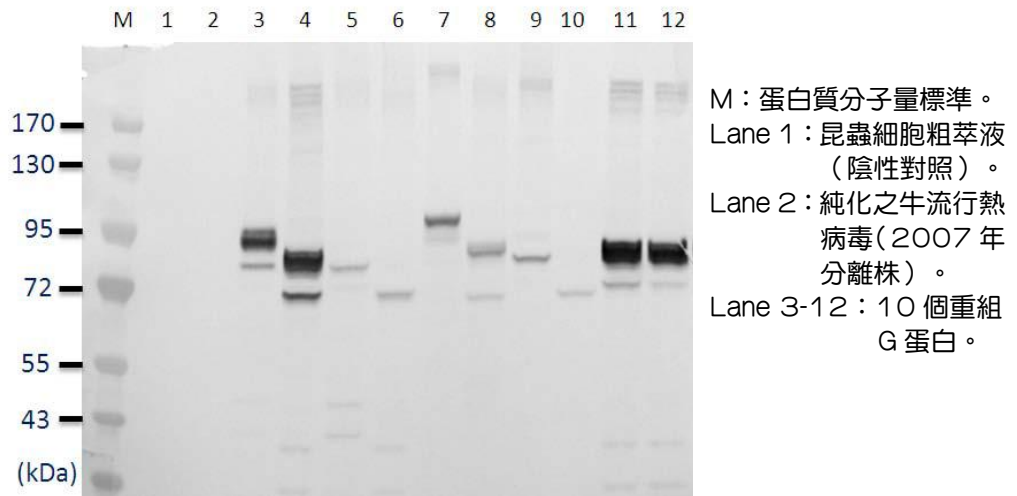


圖 3、將篩選出的 11 株重組桿狀病毒感染昆蟲細胞所獲得的 11 個重組 G 蛋白，本試驗使用小鼠抗 V5 之單株抗體做為一級抗體。

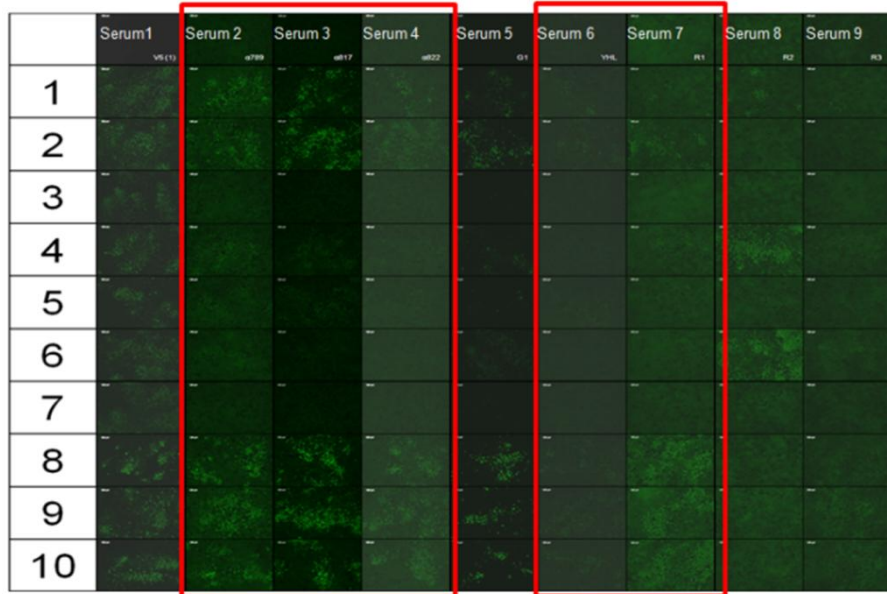


圖 4、利用多個抗血清來辨認以區別此 10 個重組 G 蛋白是否具有不同的抗原性。血清編號 1 為抗 V5 之單株抗體，高免血清編號 2、3、4 是來自感染牛流行熱發病之病牛，血清編號 5 是抗 G 蛋白線性抗原決定位之單株抗體，高免血清編號 6 是來自 YHL 株不活化病毒免疫紐西蘭大白兔而獲得，編號 7、8、9 來自將純化的野外分離株不活化後免疫紐西蘭大白兔而獲得。

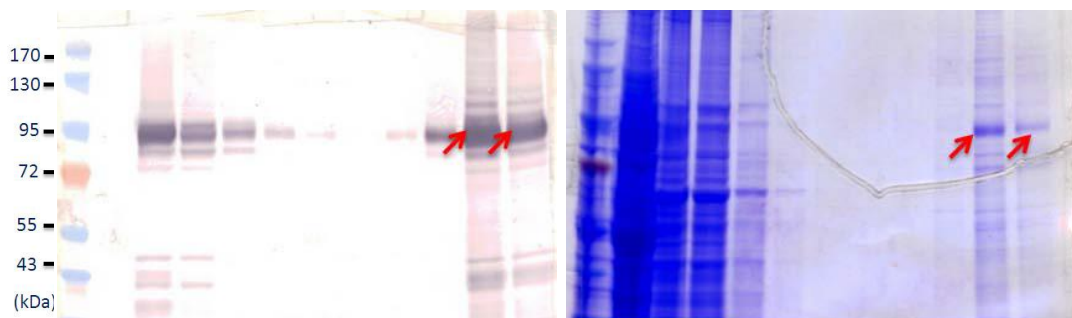


圖 5、已成功純化重組 G 蛋白（如紅色箭頭所示），該純化之重組 G 蛋白濃度可達 50 μ g/mL。

牛流行熱 G 蛋白次單位疫苗之研發

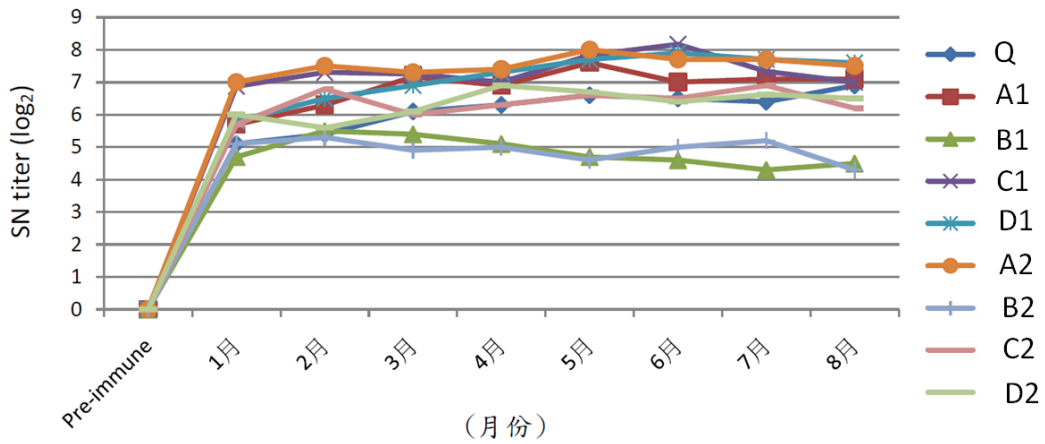


圖 6、重組 G 蛋白分別與 9 種佐劑混合，以肌肉注射方式免疫及補強後採血分離血清進行中和試驗，可見小鼠皆有被誘發中和抗體產生，根據此結果選擇 A2 佐劑來製作試製疫苗。

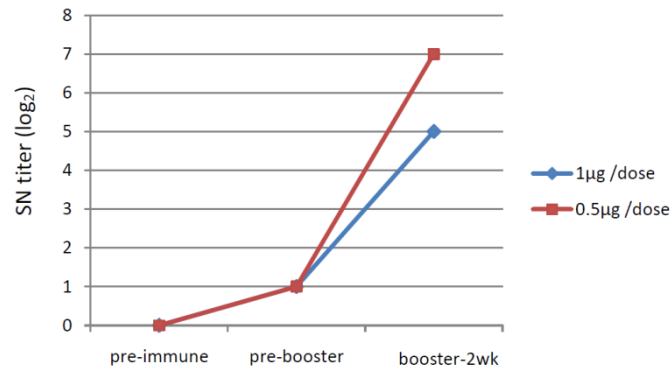


圖 7、使用小量試製兩種蛋白劑量之疫苗產品（0.5 µg/劑以及 1 µg/劑）對牛隻進行肌肉注射免疫及三週後補強，可誘發符合國家檢定標準之中和抗體，分別可達 128 倍以及 32 倍。

誌謝

特別感謝本所疫學研究組丁履初副研究員提供牛流行熱2007年田間分離株，以及G蛋白單株抗體使本研究得以順利進行。

參考文獻

1. 丁履初、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. 杜武俊。庫蠓（糠蚊）發生與防治-養牛場庫蠓防治手冊。動植物防疫檢疫局。2005。
3. 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。
4. Bouma, A., A. J. de Smit, E. P. de Kluijver, C. Terpstra, and R. J. Moormann. 1999. Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 66:101-14.
5. Cybinski DH, Walker PJ, Byrne KA, Zakrzewski H. Mapping of Antigenic Sites on the Bovine Ephemeral Fever Virus Glycoprotein Using Monoclonal Antibodies. *JGV*, 71:2065-2072, 1990.
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*, 44:121-132, 1974.
7. Johal J, Gresty K, Kongsuwan K, Walker PJ. Antigenic Characterization of Bovine Ephemeral Fever Rhabdovirus GNS Glycoproteins Expressed from Recombinant Baculoviruses. *Arch Virol*, 153:1657-1665, 2008.
8. Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich, and P. F. Schellhammer. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363:411-22.
9. Kongsuwan K, Cybinski DH, Cooper J, Walker PJ. Location of Neutralizing Epitopes on the G Protein of Bovine Ephemeral Fever Rhabdovirus. *JGV*, 79:2573-2581, 1998.
10. Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraser. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 3:2156-65.
11. 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*, 12:845-850, 1994.
12. Wang F, Hsu AM, Huang KJ. Bovine Ephemeral Fever in Taiwan. *JVDI*, 13:462-467, 2001.

Development of Bovine Ephemeral Fever G Protein Subunit Vaccines

AP Hsu^{*}, YJ Lin, YL Lee, LJ Ting, CH Tseng, TS Huang

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Bovine ephemeral fever (BEF) caused by bovine ephemeral fever virus (BEFV), is an arthropod-borne disease. In Taiwan, the first outbreak recorded was in 1967; since then, these have occurred every three to six years. This febrile disease induces serious economic loss in the dairy industry through reduction of milk production and raising cull rates. Currently available killed vaccine produced by cell culture has a high production cost as it is labor extensive, as well as a lower-titer virus production. Since the G protein of BEFV can induce high neutralizing antibody titers, the G protein was cloned and expressed in a baculovirus expression system. A nucleic acid fragment of G protein, generated by RT-PCR using a Taiwan isolate (from 2007) as template, was fused to baculovirus genomic DNA and transfected recombinant DNA to insect cells Sf9. The recombinant progeny baculovirus was screened to select the clones expressing G protein. Currently, a vaccine trial using the recombinant protein derived from the baculovirus system with adjuvant showed strong neutralization antibody titers ($32\times$ and $128\times$) in cows, thus achieving higher titers than the required national standard.

Keyword: *bovine ephemeral fever, G protein, baculovirus, subunit vaccine.*

