

牛流行熱油質疫苗研發之小鼠動物試驗

李燕霖*

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 牛流行熱是由桿狀病毒經蚊蟲媒介傳染的發熱性疾病，臺灣在 1967 年首次傳出疫情後，平均每 2 到 6 年爆發流行一次，為國內常在性疾病，除使牛隻產生高熱、呼吸症狀、關節疼痛等臨床症狀之外，泌乳量亦遽減，造成重大經濟損失。本所製造之牛流行熱不活化疫苗以水質磷酸鋁膠作為佐劑，具有安全性高、可迅速誘發抗體產生的特性，但高峰期持續時間不長卻是缺點，由於牛隻牛流行熱抗體表現與疫情的發生具關連性，為防範牛流行熱疫情造成養牛戶經濟上嚴重損失，著手研發牛流行熱油質佐劑疫苗。以市售合適之油質佐劑與元培科技大學研發之新型佐劑再加上對照組，共計 10 組於小鼠進行安全性及效力試驗。小鼠間隔 2 週完成 2 劑基礎免疫後，於半年後再補強接種 1 劑疫苗，大部分組別接種後均正常，僅 2 組注射部位出現嚴重之紅腫發炎反應；牛流行熱血清中和抗體揚升情形則以出現紅腫反應的 2 種水包油乳劑型佐劑 D 與 T 組、無油成分佐劑膠 C 組、市售礦物油佐劑 S 組最佳，試驗期間所有抗體力價幾何平均值依序為 505.6、474.7、355.3 及 310.8。未來將繼續進行兔子試驗與牛隻試驗，冀能篩選出安全性高、可迅速誘發抗體產生且高峰期長的佐劑，以取代現有的磷酸鋁膠來製作牛流行熱不活化疫苗，達到有效預防牛流行熱的目標。

關鍵詞：牛流行熱，油質疫苗，小鼠動物試驗

緒言

牛流行熱(bovine ephemeral fever, BEF)又稱為三日熱、牛流行性感冒、牛地方性發熱病或牛僵硬病，病原為牛流行熱病毒，分類在桿狀病毒科(*Rhabdoviridae*)的流行熱病毒屬(*Ephemerovirus*)，藉由吸血性節肢動物媒介可引起牛隻急性發熱性疾病[10]，在牛之間並不會透過直接接觸、體液或空氣傳染，目前僅有一種血清型[9]。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)與一種非結構性蛋白(G_{NS})，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[3]。在臨床上，發病牛隻會出現高熱、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。根據統計，感染牛流行

熱的乳牛平均每頭減少 175.9 公斤的泌乳量[1]。

臺灣於 1967 年首次出現疫情後，之後每 3 到 6 年爆發一次疫情，呈現週期性爆發的現象[4]，而間隔似乎有縮短的趨勢，根據全國性的血清中和抗體監測結果發現近年來幾次較大的疫情及 87% 的地方性病例與牛隻體內牛流行熱中和抗體力價高低密切相關，當免疫覆蓋率不佳時，牛隻即處在相對危險容易感染牛流行熱的狀態[6]，特別是臺灣潮濕又炎熱，環境中蚊蟲多又不易完全消滅，因此本病的預防仍須仰賴疫苗接種以刺激牛隻產生中和抗體抵抗野外病毒，而血清中和抗體力價需多高才能保護牛隻對抗野外或人工感染牛流行熱病毒，根據文獻分別為 32 倍[11]、45.2 倍[7] 和 64 倍[8]，而目前牛流行熱不活化疫苗國家檢定效力試驗標準為試驗牛抗體力價須為試驗前抗體之 4 倍以上。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

臺灣目前施打之牛流行熱疫苗均為不活化疫苗，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，初生小牛接種第一劑疫苗數週後必須補強第二劑，之後每半年亦需補強注射，不斷刺激抗體產生，才能達到理想免疫效果，無法施打一次就獲得終身免疫。

為解決牛流行熱所帶來的問題，本所曾於1984年流行期間致力分離臺灣牛流行熱病毒，分離之病毒以BHK-21細胞繼代馴化，並以此畜試株作為製造疫苗用種毒，以BHK-21細胞增殖種毒，並將病毒液不活化後，加入磷酸鋁膠佐劑製成不活化疫苗，供臺灣牛隻免疫預防用。水質磷酸鋁膠作為佐劑安全性高，可迅速誘發抗體產生，但高峰期持續時間不長卻是缺點，為防範牛流行熱疫情造成養牛戶經濟上嚴重損失，本研究目的為開發牛流行熱油質佐劑疫苗，冀能藉此有效刺激長效型抗體產生，使抗體水準在牛隻能維持較長時間以預防疾病的發生。

材料及方法

細胞株與病毒株

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年自臺南市柳營區病牛所分離，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。

不活化病毒液

BHK-21細胞種於培養角瓶中，長成單層細胞即可接種牛流行熱病毒，並於接種2天後先離心去除細胞碎片，再將病毒液加入福馬林後攪拌隔夜，完成不活化之病毒液保存於-80°C。

佐劑與病毒液混合

挑選市售合適之油質與皂素3種佐劑(I、S、Q)，加上元培科技大學研發之5種新型佐劑(T、D、C、M、N)一共8組試驗組，加入與陽性對照之磷酸鋁膠佐劑組(A)每劑相同抗原量之0.18毫升(病毒含量

約為 1.1×10^5 TCID) 不活化病毒液適當混合、乳化後置於碎冰中等待免疫小鼠，另外以注射不含病毒液之PBS(B)作為陰性對照組。

小鼠安全性試驗

選定7週齡BALB/cByJNarl母鼠隨機分組，每組5隻，並剪耳洞編成1至5號，按照組別以肌肉注射方式分別於後腿免疫相同抗原量之牛流行熱不活化疫苗，A每劑0.2毫升，其中A組含10%的佐劑；T、D、C、M、N、I與S每劑0.36毫升，含50%的佐劑；Q組每劑則為0.18毫升，含佐劑20微克；B組注射每劑0.2毫升PBS。間隔2週後以相同方式及劑量再免疫一次以完成基礎免疫，並於半年後進行第三次免疫，免疫後每日觀察注射部位是否出現紅腫或搔癢等異常，並注意小鼠活動力及食慾。

小鼠效力試驗

小鼠於疫苗免疫前先採集血液分離血清保存。安全性試驗中完成第一次免疫之小鼠，於2週後先採集血液以分離血清保存，再進行第二次免疫，並在2週後採集血液，接著每個月採血1次，並仿照現行牛流行熱疫苗牛隻免疫模式於第一次免疫半年後進行第三次免疫，免疫後第一個月2週採血一次，之後每個月採血一次直到第三次免疫後4個月結束試驗。

血清中和抗體力價測定

血清樣品使用前先經56°C非動化處理30分鐘，再進行血清中和抗體力價分析。待測血清在96孔微量培養盤中進行2倍連續稀釋，每孔加入含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再培養3-5天以進行力價判定。

結果

佐劑與病毒液混合

佐劑T與佐劑D為水包油(oil-in-water)乳劑型佐劑，加入病毒液後容易混合，且靜置不易分層；佐劑C與M為無油成分佐劑膠，取用時因呈膠狀不容易定量，但加入病毒液後會轉變為均勻水狀；佐劑N為無油成分奈米微粒佐劑，與病毒液可均勻混合不分層；

佐劑與佐劑S成分為礦物油，病毒液加入後會與佐劑明顯區隔，病毒液沉在下層，佐劑浮在上層，為所有組別中與病毒液混合均勻最費時的2種佐劑，但充分混合後並未出現分層現象，其中I組抽取定量至針筒時，質地黏稠不易推拉；佐劑Q為植物皂素，呈粉狀，使用前先以水溶解並參考小鼠建議使用劑量，每隻小鼠每劑含20 μg 佐劑Q；佐劑A為目前本所生產之牛流行熱不活化疫苗所使用的磷酸鋁膠佐劑，在疫苗中含量佔10%，與病毒液透過攪拌方式即可輕易混合均勻，但也容易分層，使用前需搖勻。

小鼠安全性試驗

間隔2週完成2劑基礎免疫之小鼠，於半年後再補強接種1劑疫苗，大部分組別接種後注射部位無任何不良反應，活動力及食慾也正常；但佐劑T與D組於第一次免疫後注射部位即出現脫毛、紅腫、發炎反應與啃咬尾巴現象（圖一），需分籠以防止相互啃咬注射部位。第二次免疫後反應更嚴重，甚至影響活動力及食慾，直到注射約一個月後才慢慢恢復，但仍使得這2組小鼠增重情況不佳，體型明顯較其他組別小。

小鼠效力試驗

血清中和試驗結果可見小鼠體內牛流行熱中和抗體於第一次免疫後即被誘發而上升（圖二），T與D組於免疫後2週抗體力價幾何平均值即分別達到24.3和32倍（表一）。第二次補強注射後，每組的抗體力價均迅速爬升，其中又以佐劑T、D、S、C及A這5組表現最佳，在第二次免疫後5個月內抗體力價幾何平均值分別為512.0、500.3、315.2、294.1及262.0倍，且在第三次免疫前此5組組內最低抗體力價的小鼠都還有256、256、512、128及128倍的中和抗體，並在三次免疫後再次衝高，若單看第三次免疫後3個月期間的抗體力價幾何平均值，這5組更可高達831.7至989.1倍，以個體來看則皆保持在抗體力價256倍的高水準以上；而若將各組試驗期間全部抗體力價取幾何平均值來比較，最高的前5組與上述5組相同但順序改變為T、D、C、S及A，分別是505.6、474.7、355.3、310.8及297.8倍。

討論

牛流行熱在臺灣已變為常在性疾病，過去多好發於濕熱的夏秋兩季，但隨著全球暖化，異常的天候改變助長可媒介牛流行熱的病媒蚊孳生，使得本病爆發的間隔似乎有縮短的趨勢，近幾年常常到了冬天仍有病例傳出，且不若以往多侷限在南部地區。根據研究[5,12]，推測原因可能是氣候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，因此仰賴蚊蟲傳播的牛流行熱自然也就能夠在冬天發生，這對於酪農戶來說必然造成困擾，因為目前政府防疫機關建議一年分別在3月及8月各施打1次牛流行熱疫苗，以本所生產的牛流行熱疫苗為例，中和抗體高峰僅能維持3個月左右，因此牛隻在3月及8月免疫後加上3個月的抗體高峰期，推算在下次疫苗施打前會在6至7月及11至隔年的2月出現空窗，合計一年中有6個月牛隻是處在抗體力價相對不足以有效抵抗牛流行熱病毒威脅的危險期，而不幸染病的牛隻除了健康及生命受到危害之外，發熱使得泌乳量大幅下降更是造成巨大的經濟損失，因此因應氣候的改變，最新的防疫政策已改為宣導牛流行熱在疾病流行年可縮短為4個月補強注射一劑，但增加疫苗施打次數也代表飼養成本增加，本研究的目的就是為了改良水質磷酸鋁膠佐劑抗體高峰期不長的缺點，希望能以油質佐劑替代以延長疫苗作用時間。

由本次小鼠試驗結果可知，相較於未施打抗原的陰性對照B組，只要有免疫牛流行熱不活化病毒，不論是搭配何種佐劑，皆可誘發中和抗體，但因為不活化的抗原免疫機制主要走體液性免疫途徑以產生專一性抗體，若單單免疫一次所產生的抗體反應可能不夠理想，但伴隨第二次補強注射時體內已存在有記憶性免疫細胞，中和抗體可迅速被抗原誘發而大量產生。以試驗中磷酸鋁膠佐劑A組為例，只免疫一次，中和抗體在半個月後僅能達到4至16倍，幾何平均值為6.1倍，相較於水包油佐劑D及T組，同樣只免疫一次，中和抗體半個月內已可上升到16至128倍與8至

64倍，幾何平均值達32倍及24.3倍，市售的礦物油佐劑S組抗體幾何平均值也有21.1倍，而無油成分佐劑膠C組雖然不是油質佐劑，但表現也不差，抗體幾何平均值有18.4倍。在第二次免疫2週後，A組與S組相同，抗體快速上升到64至256倍，C組是128至1024倍，D與T組表現又是最好，皆達到256至1024倍，且抗體維持在高的時間也長達5個多月，在第三次免疫前，此2組組內最低抗體力價的小鼠都還有256倍，S組更高為512倍，A與C組則都是128倍，以一年施打2次牛流行熱疫苗來看，在小鼠的試驗中，此5組似乎都可達到理想的抗體力價水準與維持期。頭2劑疫苗注射一般間隔2至4週內完成並視為基礎免疫，雖然已可誘發足量的中和抗體產生，但有研究認為2次免疫尚不足夠，至少需免疫3次牛流行熱不活化疫苗才能維持既穩定又長久的高抗體力價[2]，並且才能在田間具有部分保護力以抵抗牛流行熱病毒感染[1]，雖然本試驗因欠缺攻毒資料佐證，無法確定多高的抗體力價才能耐過病毒攻擊，但仍可發現與文獻相同的趨勢，第三次免疫後每一組的小鼠抗體都達到新的高點，連最低的N組在第三次免疫後3個月內的抗體力價幾何平均值都有520.9倍；以個體來看

則皆保持在256倍的高水準以上，且相較於第二次免疫後組內5隻小鼠同週數時抗體力價分布落差最大達 2^5 ，第三次免疫後更趨於一致，差異僅 2^2 ，也就是整體的抗體力價皆增加外，差異也縮小了。

參考本次試驗各項數據，最具發展潛力的佐劑依序為D、T、C與S，且可推論水質佐劑延長抗原在組織內部停留並緩慢釋放抗原產生儲存作用，進而達到長期免疫效果的能力可能不若油質佐劑好，但油質佐劑D與T組在引發強烈免疫反應的同時也對小鼠造成了嚴重的副作用，在使用上頗有疑慮，儘管在其他動物別如雞與豬的試驗中並未出現任何不良反應，因為牛流行熱疫苗檢定仍有可能以小鼠作為牛隻的替代動物，因此需要謹慎評估這兩種佐劑的安全性，特別是在標的動物牛隻身上是否安全。另外為解決疫苗檢定須尋找替代動物模式，後續也將進行兔子試驗，並繼續以磷酸鋁膠佐劑作為陽性對照。

誌謝

特別感謝元培科技大學梁弘人副教授實驗室提供研發之新型佐劑，使本研究得以順利進行。



圖 1、免疫後因過敏反應造成之皮膚病變情形：左邊為佐劑 T 組中編號 3 號小鼠，右邊則為佐劑 D 組編號 5 號小鼠，每次免疫後兩組均出現注射部位異常脫毛、紅腫、發炎及啃咬尾部現象。

參考文獻

1. Aziz-Boaron O, Gleser D, Yadin H, Gelman B, Kedmi M, Galon N, Klement E. The protective effectiveness of an inactivated bovine ephemeral fever virus vaccine. *Vet Microbiol* 173(1-2):1-8, 2014.
2. Aziz-Boaron O, Leibovitz K, Gelman B, Kedmi M, Klement E. Safety, immunogenicity and duration of immunity elicited by an inactivated bovine ephemeral fever vaccine. *PLoS One* 8(12):e82217, 2013.
3. 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.
4. Hsieh YC, Chen SH, Chou CC, Ting LJ, Itakura C, Wang FI. Bovine ephemeral fever in Taiwan (2001–2002). *J Vet Med Sci* 67: 411–416, 2005.
5. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nat Rev Microbiol* 3(2):171-181, 2005.
6. Ting LJ, Lee MS, Lee SH, Tsai HJ, Lee F. Relationships of bovine ephemeral fever epizootics to population immunity and virus variation. *Vet Microbiol* 173(3-4):241-248, 2014.
7. Vanselow BA, Abetz I, Trenfield K. A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quil A: a comparative study using adjuvants Quil A, aluminium hydroxide gel and dextran sulphate. *Vet Rec* 117(2):37-43, 1985.
8. Vanselow BA, Walthall JC, Abetz I. Field trials of ephemeral fever vaccines. *Vet Microbiol* 46: 117-130, 1995.
9. Walker PJ, Byrne KA, Cybinski DH, Doolan DL, Wang Y. Proteins of bovine ephemeral fever virus. *J Gen Virol* 72: 67–74, 1991
10. Walker PJ, Klement E. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res* 46:124, 2015.
11. Wang FI, Hsu AM, Huang KJ. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J Vet Diagn Invest* 13: 462–467, 2001
12. Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol* 140(3-4):271-280, 2010

Development of Bovine Ephemeral Fever Oil Vaccine : Animal Testing on Mice

YL Lee*

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Bovine ephemeral fever (BEF) caused by Rhabdovirus is an arthropod-borne disease. In Taiwan, the first outbreak of BEF was in 1967, and then the disease tends to occur every two to six years. This febrile disease has caused seriously economic damage to dairy and grazing industry for reducing milk production and raising cull rate. The vaccination program with inactivated vaccine has been conducted two shots as basic vaccination in calves and one booster every half year thereafter. According to serum neutralizing (SN) antibody surveillance of cattle inoculated with BEF vaccine, the highest titer was observed one month after inoculation, and then dropped gradually in a few months. Although the conventional aluminum phosphate (Al-gel) vaccine is safe and induces a quick immune response, the lasting period of high antibody titer is not long enough to provide effective protection for the herd of cattle. To reduce the financial losses caused by this disease, the aim of the study was to develop oil based inactivated vaccine. Total of fifty mice were divided into ten groups and inoculated two doses of the same amount antigen with different adjuvants at a two week interval. Six months later, the mice in each group received one booster shot. The result revealed that most mice showed no adverse reaction after vaccination except the ones in the oil-in-water oil adjuvant groups D and T. Although the skin around the injection sites appeared seriously red and swollen in these two groups, the mice developed a rapid and high level SN antibody response against BEF virus. Similar results were also observed in the non-oil gel C group and mineral oil S group. In addition, the geometric mean titers of BEF SN antibody calculated for each blood sampling during the trial in these four groups D, T, C and S, were 505.6, 474.7, 355.3 and 310.8, respectively. For future study, the safety and efficacy trials will be exerted on rabbit and cattle. The author hopes to find an adequate adjuvant with the characteristics of safety and long-term immunity to replace the original Al-gel for the BEF inactivated vaccine, and expects the new vaccine could provide better protection to the herd against the BEF virus infection.

Keywords: *Bovine ephemeral fever, oil vaccine, animal testing on mice*

