

牛傳染性鼻氣管炎及牛流行熱不活化混合疫苗研製

邱資峰* 鍾明華 詹益波 丁履紉 吳詩南

台灣省家畜衛生試驗所 製劑研究系

摘要 牛傳染性鼻氣管炎 (Infectious bovine rhinotracheitis, IBR) 及牛流行熱 (Bovine ephemeral fever, BEF) 病毒分別增殖在 MDBK 及 BHK-21 株化細胞, IBR 病毒力價每毫升達 $10^{8.8}$ TCID₅₀, BEF 為 $10^{7.3}$ TCID₅₀, 培養後收集添加 0.002 M BEI 不活化劑予以不活化完全後, 將此兩種病毒混合並添加礦物油佐劑作成 W/O/W 多相乳劑, 試製成 IBR 及 BEF 不活化混合疫苗供牛隻防疫用。不活化劑選擇試驗方面, 分別以 0.2 % Formalin, 0.1 % Formalin 及 0.002 % BEI 進行比較, 經免疫及測試天竺鼠及小白鼠, IBRV 中和抗體幾何平均力價 (GMT) 分別是 21, 32 與 45, BEF 則為 23, 28 與 54, 証實 BEI 不活化劑表現較佳。而添加佐劑比較試驗方面, 有 10 % 磷酸鋁膠及礦物油 (W/O/W) 兩種, 結果 IBRV 之中和抗體分別是 37, 52 ; BEFV 則為 49, 60, 經比較顯示礦物油成績較好。在田間應用試驗方面, 選擇兩場合計 35 頭牛隻作測試, 經疫苗接種後二週, 可獲得良好免疫反應, IBR 中和抗體幾何平均值上升至 70 倍及 35 倍。BEF 則達到 176 倍及 129 倍。本試製疫苗穩定性佳, 在 4°C 可保存一年以上, 依然維持其免疫效力。

關鍵詞 : 牛傳染性鼻氣管炎, 牛流行熱, 不活化混合疫苗

緒 言

牛傳染性鼻氣管炎及牛流行熱曾在本省爆發, 造成酪農業重大損失。目前這兩種疾病之疫苗已分別在本所開發完成並技術移轉給民間生物製藥廠製造販售供牛隻防疫使用^[1, 2]。呂等^[1]於 1987 年以 IBR 大社株在 MDBK 細胞增殖, 經福馬林不活化後添加磷酸鋁膠製成 IBR 不活化疫苗, 有效控制本病之流行。另外, 邱、呂等^[2]於 1984 年依照稻葉氏^[10]之法將 BEF 柳營株增殖於 BHK-21 細胞, 以福馬林不活化後經磷酸鋁膠吸附後作為疫苗, 免疫效果良好。

本試驗目的在研製 IBR 及 BEF 不活化混合疫苗而以一次免疫能同時預防兩種疾病以節省人力費用, 增加農民收益。

材料與方法

1. 病 毒 株 :

IBR 病毒係採用 1986 年本省分離之大社株, BEF 則為 1984 年之畜試株, 以上病毒均為本所疫學系分讓。

2. 細 胞 :

IBR 與 BEF 病毒分別增殖在 MDBK 及 BHK21 細胞上, 以 Eagles MEM (GIBCO) 加入 8 % 胎牛血清 (HYCLONE), 50 µg / ml Gentamycin 及適量 NaHCO₃ 分裝在 700 cm² 血清瓶迴轉培養, 分裝後之 MDBK 細胞於 37 °C 而 BHK 於 34 °C 之暖房分別培養, 培養第三天單細胞層形成後, 作細胞繼代或病毒增殖用。

*抽印本索取作者
台灣省家畜衛生試驗所

3. 病毒增殖：

IBR 病毒以 M. O. I = 0.1 增殖在 MDBK 細胞，於 48 小時 CPE 形成達 90 % 後，搖落細胞碎片收集。BEF 病毒則增殖於 BHK21 細胞，以 M. O. I = 0.01 感染量在 34 °C 約 48 小時，CPE 達 80 % 後收集。

4. 病毒不活化：

- (1) BEI 不活化法：IBR 與 BEF 病毒增殖後，加入 Binary Ethylene Imide (BEI) 0.002 M。
- (2) Formalin 不活化法：IBR 與 BEF 病毒增殖後，加入 0.2 % Formalin，0.1 % Formalin 供病毒不活化，在 37 °C 感作 10 小時經採樣，PBS 透析後接種細胞，觀察 7 天確定無 CPE 產生顯示病毒已完全不活化，供疫苗配製使用。

5. 疫苗佐劑配製：

- (1) 磷酸鋁膠水劑：將不活化完全之 IBR 與 BEF 病毒同體積混合後，依比例 10 % (v/v) 添加 5 % 磷酸鋁膠並以均質機攪勻。
- (2) 礦物油多相乳劑 (W/O/W)^[8]：將一份不活化 IBR 與 BEF 混合病毒加入一份含 Span 80 之礦物油 (MERCK)，均質完全後，再混合二份 2 % Tween 生理鹽水，充分攪拌成多相乳劑。
- (3) MVP 乳劑製作^[5]：同體積之 IBR 與 BEF 病毒混合後再加 20 % 體積之 Emulsigen (MVP 公司) 以均質機低速攪拌而成。

6. IBR 疫苗之力價試驗：

參照日本檢定基準^[3]，取 5 頭天竺鼠，每頭肌肉注射 0.5 ml 疫苗，3 週後補強一次，再 7 日後採血，測血清中和抗體。判定標準為 80 % 以上抗體力價須呈陽性 (2 倍以上)。

7. BEF 疫苗之力價試驗：

參照日本檢定基準^[4]，取 20 頭小白鼠，每頭肌肉注射 0.5 ml 疫苗，2 週後補強一次，再 7 日後採血，鼠血 4 頭成一組，共分 5 組，測血清中和抗體。判定標準同上。

8. 疫苗之安全及效力試驗：

依行政院農委會頒定之檢驗標準^[5,6] 實施方法如下：

安全試驗：試製疫苗經小白鼠及天竺鼠作肌肉接種二週觀察無不良反應後，再選取無 IBR 及 BEF 抗體之六月齡健康牛以一劑量 3 ml 行肌肉接種，並觀察 14 天，須無呼吸及其他異樣。

效力試驗：前項安全試驗牛經觀察二週合格後，再補強一劑量，試驗牛於接種前及補強後二週各採血一次，對照牛亦同時行中和抗體測定。試驗牛 IBR 抗體價須為試驗前抗體之 2 倍以上，BEF 則為 4 倍以上，對照牛須為接種前之力價以下。

9. 田間應用試驗：

於台灣北部及南部選取二家管理完善之牧場七以經 BEI 不活化過之 W/O/W 及 MVP 兩種試製疫苗作試驗。於免疫前及補強接種後二週採血供中和抗體試驗用。

10. 疫苗保存試驗：

試製二批 W/O/W 疫苗，於 4 °C 保存 3，6，12，14 個月後，每一階段接種二頭無 IBR 及 BEF 抗體小牛，4 週再補強一次，於補強後二週採血測抗體力價。

11. 血清中和抗體測定法：

2 倍稀釋血清 50 μ l 加 200 TCID₅₀ 病毒液 50 μ l，於微量滴定盤內混和，在 37 °C，3 % CO₂ 恒溫箱感作 3 小時後，加入 50 μ l 之 5 × 10⁵ cells / ml 細胞液，再放回恒溫箱中 (BHK-21, 34 °C) 培養。第三天始觀察 CPE，判讀抗體力價。

結 果

1. 病毒增殖：

IBR 病毒 0.1 M. O. I 接種於迴轉瓶培養之 MDBK 細胞，力價可高達 10^{8.8} TCID₅₀ / ml。BEF 病毒增殖 0.01 MOI 接種於迴轉瓶之 BHK-21 細胞力價可達 10^{7.3} TCID₅₀ / ml，若依劉等^[7] 方法以微擔體 (CYTODEX3) 懸浮培養增殖病毒，則力價可升至 10^{7.6}。另試以 Hmlu-1 與 Vero 細胞增殖 BEF 病毒，力價只達 10^{6.3} TCID₅₀ / ml，且 CPE 不明顯。

2. 不活化劑選擇試驗：

將 IBR 與 BEF 之病毒液分別使用 0.2 % Formalin, 0.1 % Formalin 及 0.002 M BEI 使之不活化，經 37 °C，10 小時不活化後，兩者各添加 10 % 磷酸鋁膠配成水劑疫苗，再參照日本檢定基準模式，分別免疫天竺鼠與小白鼠，結果如表 1 所示，0.2 % Formalin, 0.1 % Formalin 及 0.002 % BEI 之比較，IBRV 中和抗體幾何平均力價 (GMT) 分別是 21, 32 與 45，BEF 則為 23, 28 與 54，可見 BEI 不活化劑表現較 Formalin 為佳。

3. 疫苗佐劑比較試驗：

將 IBR 與 BEF 病毒液經 0.002 M BEI 不活化後，兩種病毒液分別添加 10 % 磷酸鋁膠，礦物油製成水劑及油劑不活化疫苗。依日本檢定基準模式，分別免疫天竺鼠與小白鼠，由其血清中和抗體力價比較之產生，以究明 IBR 與 BEF 在水劑與油劑表現之差異，結果如表 2 所示，IBR 之中和抗體幾何平均值分別是 37, 52；BEFV 則為 49, 60，由此看礦物油成績較磷酸鋁膠好。

4. 疫苗安全及效力試驗：

疫苗接種小白鼠、天竺鼠及六月齡小牛，在二週觀察期間，並未發生發燒、呼吸等症狀，肌肉注射部位亦無肉芽腫塊等不良反應，顯示疫苗內容物安全，接種部位佐劑吸收良好，不造成藥物滯留及過敏性反應。

試驗牛經二週後再補強接種，結果對照牛呈陰性反應，試驗牛之 IBR 及 BEF 中和抗體力價達試驗前抗體價之 4 倍以上。顯示試製之

IBR 及 BEF 不活化混合疫苗皆能達到單價時之國家檢驗標準。

5. 田間應用試驗：

試製疫苗通過國家檢定標準後，選擇南北各一家牧場以二種不同油質佐劑製成之疫苗進行田間試驗。取北部 A 場 40 頭南部 B 場 30 頭 IBR 及 BEF 陰性牛進行測試，經間隔四週補強後第二週採血測抗體力價，結果如表 3 所示，在 IBR 表現方面，W/O/W 多相乳劑組在 A, B 兩場的中和抗體幾何平均值分別是 70, 35；MVP 乳化劑組則是 91, 46。在 BEF 方面，W/O/W 組的 GMT 值分別是 176, 129；MVP 組則為 157, 111。由以上成績顯示，這兩種油劑型之試製混合疫苗在 A, B 兩場的田間試驗成績皆達到國家檢定標準。

6. 疫苗保存試驗

供試二批 IBR 及 BEF 混合油質 (W/O/W) 疫苗，4 °C 冷藏保存。分別於第 3, 6, 12, 14 個月每批抽樣 3 支作試驗。此 4 種保存期間組各選二頭陰性牛作效力試驗，方法如上。結果如表 4 所示，在 IBR 成績方面，保存三個月組第一，二批疫苗之中和抗體 GMT 值分別是 64, 45；6 個月組是 54, 76；12 個月組 54, 64 及 14 個月組 38, 45。在 BEF 方面，保存三個月組第一，二批疫苗之 GMT 值分別是 152, 128；6 個月組是 128, 108；12 個月組 108, 128；及 14 個月組 108, 91。由以上成績顯示，保存成績雖有遞減趨勢，但整體均達到檢定標準，冷藏保存有效期限在一年以上。

表 1 牛 INR 與 BEF 混合疫苗不活化劑選擇比較試驗

不活化劑	免疫天竺鼠 IBR 抗體力價 GMT					免疫小白鼠 BEF 抗體力價 GMT						
0.2 % Formalin	16,	16,	16,	32,	32,	21	64,	6,	11,	91,	16	23
0.1 % Formalin	45,	32,	45,	11,	45,	32	45,	32,	16,	23,	32	28
0.002 M BEI	45,	91,	22,	45,	45,	45	32,	91,	91,	32,		54
對照組	<2,	<2,					<2,	<2				

表 2 IBR 與 BEF 不活化混合疫苗佐劑添加選擇比較試驗

不活化劑	0.002 M BEI											
	佐劑	免疫天竺鼠 IBR 抗體力價					GMT	免疫小白鼠 BEF 抗體力價				
10%磷酸鋁膠	64,	23,	91,	45,	23	37	64,	64,	45,	32,	128	49
礦物油	128,	64,	32,	45,	45	52	91,	32,	64,	128,	32	60
對照組	< 2,	< 2					< 2,	< 2				

表 3 牛傳染性鼻氣管炎及牛流行熱不活化試製混合疫苗田間應用試驗中和抗體測定結果

佐劑種類	場別	牛隻數目	IBR (GMT)		BEF (GMT)	
			免疫前	免疫後	免疫前	免疫後
W/O/W 多相乳劑	A	20	< 2	70	< 2	176
	B	15	< 2	35	< 2	129
MVP 乳化劑	A	20	< 2	91	< 2	157
	B	15	< 2	46	< 2	111

表 4 牛傳染性鼻氣管炎及牛流行熱不活化試製混合疫苗保存試驗中和抗體 GMT 測定結果

病毒別	疫苗批號	牛隻數目	疫苗保存期間			
			3 個月	6 個月	12 個月	14 個月
IBR	1	2	64	54	54	38
	2	2	45	76	64	45
BEF	1	2	152	128	108	108
	2	2	128	108	128	91

討 論

為了減少牧場勞力及免疫時造成牛隻緊迫，多價疫苗之開發自有其需要性，雖然不活化多價疫苗安全性高，但為提升疫苗效力，抗原力價也得相對升高，因此病毒增殖方法須改善，如 Lesco 等^[11] 藉微擔體培養 MDBK 細胞以提高 IBR 力價十倍，並可減少濃縮抗原步驟。Merza^[12] 曾以 ISCOM 試製 IBR 糖蛋白衣疫苗，Vanselow^[13] 也用植物油抽出物 Quil A 試製 BEF 疫苗獲致良好效果，惜價昂且技術較困難。鍾等^[8] 曾以 MVP (一種水包油乳化佐劑) 配成豬假性狂犬病疫苗注射家兔，在抗體力價、製備難易度與接種組織反應，其效果不輸 W/O/W 油劑；至於市售油質佐劑^[9] 如 Montanide ISA 25 及 ISA 206 的免疫效果極佳且無局部反應可考慮使用。

本所之前開發之 IBR 及 BEF 單價疫苗是採 Formalin 不活化和磷酸鋁膠佐劑。由不活化劑選擇試驗結果發現 BEI 之表現確實比 Formalin 較佳。至於在疫苗佐劑比較試驗，雖然油劑 (W/O/W) 之病毒抗原含量僅 25%，成績卻比 90% 病毒抗原含量之磷膠鋁膠水劑要好；缺點是製備繁瑣，易引起接種部位反應。特此，筆者剖檢已第二次免疫一週後之試驗動物，發現注射部位並無肉芽腫塊，唯仍有殘存未被吸收之白色油質。因此本試製混合疫苗改採 BEI 予以病毒不活化，佐劑則選用輕油性之 W/O/W 多相佐劑，藉以提高疫苗效力，並減低高油性油劑常造成之注射困難及接種部位藥劑滯留及過敏發炎現象。

此次田間應用試驗另使用 MVP 乳劑當佐劑藉以和目前 W/O/W 多相油劑作比較，結果發現效力成績不遜 W/O/W，雖然 MVP 原料成本較高，但疫苗製備過程簡單不似 W/O/W 繁瑣困難，可作佐劑另一種選擇，另外在 A 場的效力成績整體皆比 B 場為佳，可能是 A 場飼養管理較完善，牛隻免疫機能較健全之故。由田間試驗及保存試驗來看，兩者皆可達到國家檢驗標準，顯示 IBR 及 BEF 不活化混合疫苗具有開發潛力。

誌謝 本報告之田間試驗部份，承蒙台糖畜產試驗所獸醫系廖朝政先生及台南縣家畜疾病防治所趙典樹、李儼峰先生等鼎力協助，得以完成本試驗報告，特此僅致萬分之謝忱。

參考文獻

1. 呂榮修、李永林、邱仕炎、廖永剛、鄺懋勁、林地發、蔡向榮。牛傳染性鼻氣管炎不活化疫苗之開發與應用。中華民國獸醫學會雜誌。18(1)：41-46。1992
2. 邱仕炎、呂榮修。牛流行熱預防的研究。中華民國獸醫學會雜誌。13：189-195。1987
3. 動物用生物學的製劑協會。牛傳染性鼻氣管炎不活化ワクチン。動物用生物學的製劑基準。42-46。1993
4. 動物用生物學的製劑協會。牛流行熱不活化ワクチン。動物用生物學的製劑基準。58-61。1993
5. 劉堂輝、鍾明華、邱資峰、紀長文、詹益波。微粒子細胞培養技術之探討。台灣省畜衛試研報。24：277-284。1987
6. 鍾明華、李淑慧、邱資峰、楊喜金、詹益波。假性狂犬病不活化疫苗油質佐劑在家兔引起之免疫及組織病理反應。台灣省畜衛試研報。30：11-24。1994
7. 行政院農業委員會。牛傳染性鼻氣管炎、牛病毒性下痢及第三型牛副流行性感感冒疫苗檢驗標準。動物用藥品檢驗標準。91-93。1995
8. 行政院農業委員會。牛流行熱疫苗檢驗標準。動物用藥品檢驗標準。94-95。1995
9. Barnett, P. V., Pullen, L., Williams, L., and Doel, T. R. International bank for foot-and-mouth disease vaccine : assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine*. 1187-1198. 1996
10. Inaba, Y., Kurogi, H., Takahashi, A., Sato, K., Omori, T., Goto, Y., Hanaki, T., Yamamoto, M., Hishi, S., Kodama, K., Harada, K., and Matumoto, M. Vaccination of cattle against bovine ephemeral fever with live attenuated virus followed by killed virus. *Arch. Gesam. Virusforsch.* 44 : 121-132. 1974
11. Lesco, J., Veber, P., Hrda, M. and Feketeova, M. Large-scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on micro carriers. *Acta. Virol. Praha.* 37(1) : 73-78. 1993
12. Meraz, M., Tibor, S., Kucsera, L., Bognar, G., and Morein, b. ISCOM of BHV-1 envelope glycoproteins protected calves against both disease and infection. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 38(4) : 306-314. 1991
13. Vanselow, B. A., Abetz, I. and Trenfield, K. A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quil A : A comparative study using adjuvants Quil A, aluminum hydroxide gel and dextran sulphate. *Vet. Rec.* 117 : 37-43. 1985
1. 呂榮修、李永林、邱仕炎、廖永剛、鄺懋勁、林地發、蔡向榮。牛傳染性鼻氣管炎不活化疫苗之開發與應用。中華民國獸醫學會雜誌。

Development of infectious bovine rhinotracheitis and bovine ephemeral fever inactivated combined vaccine

T. F. Chiou,* M. H. Jong, I. P. Chan, L. J. Ting, S. N. Wu

Taiwan Animal Health Research Institute.

SUMMARY Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus and Bovine ephemeral fever (BEF) virus were propagated in MDBK and BHK21 cell lines, the highest virus titers of IBR virus was $10^{8.8}$ TCID₅₀ / ml and BEF $10^{7.3}$ TCID₅₀ / ml respectively. For the inactivative agent select test, the two kinds of harvested viral fluid were inactivated with 0.2 % Formalin, 0.1 % Formalin and Binary Ethylene Imide (BEI). After immunization of guinea pigs and mice, it was found that the neutralized antibody geometric titer (GMT) against IBRV was showed 21, 32 and 45, respectively ; against BEFV the GMT were 23, 28 and 54. According to the data of inactivation the better responses of GMT shown in treatment of BEI. With regard to adjuvant efficacy compare test, two combined inactivated viruses were incorporated with either 10 % aluminum phosphate or mineral oil (W / O / W). IBR antibody GMT showed 37, 52 and BEF were 49, 60. Comparatively, the immunity response of mineral oil was superior.

The field trial for this combined vaccine was performed at two farms, that 35 heads of cow were treated. Two weeks later second vaccination at A and B farms, the neutralized antibody geometric titer (GMT) of the IBR were 70 and 35 respectively, as for BEF the GMT were 176 and 129. The stability and immunogenicity of the bivalent inactivated vaccine were confirmed in the maintained test at 4 °C for one year.

Keywords: *Infectious bovine rhinotracheitis, Bovine ephemeral fever, Inactivated combined vaccine*

*Corresponding author

Taiwan Animal Health Research Institute. Taiwan, R. O. C.