

牛流行熱預防的研究

邱仕炎 呂榮修

台灣省家畜衛生試驗所

1984年3月在台灣南部再度發生牛流行熱時，筆者等曾經分離牛流行熱病毒4株。由於當時該病病毒毒力甚強，一般對症療法比較消極且損失較大，乃應緊急預防的需要，試製活毒及不活化疫苗二種，分發田間作乳牛緊急預防接種之用。

以分離的牛流行熱畜試株經小白鼠3代繼代後再以BHK21細胞繼代15代純化的減毒變異株作為活毒疫苗使用。該項試製活毒疫苗的中和抗體價產生能力良好，接種後1週就上升為1.4倍，4週時達10倍。

不活化疫苗則以分離病毒畜試株經小白鼠3代繼代及以BHK21細胞繼代9代並純化後以福馬林不活化並再以磷酸鋁膠吸附作為不活化疫苗使用，其中和抗體價產生能力亦甚好，即接種後1週中和抗體價上升至1.6倍，4週時達4倍。

實際在田間緊急預防時利用不活化疫苗的補強效果作用，採用活毒—不活化疫苗前後二次免疫接種方法，即LK法，在第一次活毒疫苗接種後4週再以不活化疫苗接種免疫加強效果，其結果8週時中和抗體價上升至最高峰的219倍，5個月後仍維持64倍。

活毒疫苗二次免疫法(LL法)亦能提高中和抗體價，在5週時上升至64倍，8週時達178倍的高峰。以不活化疫苗二次免疫(KK法)，在5週時即上升至100倍而6週時達到最高峰215倍，至5個月後仍有128倍之力價。

為應緊急預防牛流行熱的需要，自1984年8月起先試製分發活毒疫苗50,195劑量至全省18縣市對乳牛實施預防接種，至9月試製分發不活化疫苗50,514劑量作為加強預防接種之用。

20世紀初以來，牛流行熱在非洲、中東、兩亞、澳洲及日本均有發生的報告，^(1,2,6,7,8,9,10,11)而澳洲及日本有人開發疫苗使用。^(4,5,12,14)

早在1951年椿等⁽¹³⁾將病牛在發熱時採血脫纖維後加入結晶紫及Ethylene glycol後作為預防免疫用疫苗。至1971年稻葉等⁽⁴⁾將病毒

的HmLu-1細胞培養液以福馬林不活化並以磷酸鋁膠吸附後作為疫苗使用結果證明抗體產生及防禦能力均良好。

1973年Theodoridis等試驗繼代少及繼代多的病毒以硫酸鋁膠吸附後作為疫苗效力比較結果發現繼代多的病毒以硫酸鋁膠吸附後作為

疫苗效力比較結果發現繼代少的疫苗的疫苗抗原性較佳，此外他並報告使用 Freund's Incomplete adjuvant 的油質疫苗的有效性。

最近 Vanselow 等⁽¹⁴⁾報告使用 Quil A (Saponin 石鹼素之一種) 或 Quil A 加硫酸 saponin 作為不活化疫苗的佐劑時疫苗的抗原性良好。

在台灣過去對牛流行熱並無使用疫苗經驗，牛流行熱發生時以對症療法控制。此次發生牛流行熱因病情較為劇烈，各方亟求疫苗的使用以遏止蔓延並減少病情與損失，乃應緊急防治的需要試製疫苗。

作者依照稻葉等^(3,5)的方法，將分離的病毒株製成變異株而用以製造活毒疫苗。其次再依稻葉等⁽⁴⁾的方法，將培養於細胞的病毒以福馬林不活化並以磷酸鋁膠吸附作為不活化疫苗。

試製的二種疫苗先經檢討對牛的安全性與有效性後分發全者作為緊急預防接種使用。第 1 次接種使用活毒疫苗，第 2 次接種使用不活化疫苗，在第 1 次接種後牛流行熱的發生即顯著減少已予有效控制，第 2 次接種後就完全遏止牛流行熱的發生而證明試製疫苗在野外使用的有效性。

材料與方法

1. 活毒疫苗製造法：

將分離的牛流行熱柳營株作為活毒疫苗製造用病毒。本病毒株係於 1984 年分離，經哺乳小白鼠繼代 3 代後以 BHK21 細胞繼代 8 代、10 代、12 代時分別以界限稀釋法純化(Clone)病毒，再經 BHK21 細胞繼代 2 代成為 14 代病毒作為活毒疫苗製造用種毒予以冷凍保存。製造時將此病毒接種於 BHK21 細胞 1 代以 34°C 培養 48 小時，其培養液以 3,500rpm 遠心沈澱後上清液作為疫苗而保存於 -80°C。

本疫苗原液的病毒含有量為 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml。對原液添加等量的保護液(含 10% 乳糖，0.3% Poly-vinyl Pyrrolidone K90 水溶液 115°C 滅菌 20 分鐘)後分裝 2 ml 於容量 20ml 真空瓶加以冷凍乾燥保存。本項緊急預防

用活毒疫苗共計製造 10 批 50,000 劑量。

2. 不活化疫苗製造法：

將分離的柳營株病毒以小白鼠繼代 3 代後再以小田鼠腎(BHK21)細胞繼代 3 代並以界限稀釋法純化的病毒，再以 BHK21 細胞繼代 3 代並以界限稀釋法純化的病毒，再以 BHK21 細胞繼代 6 代的病毒為製造不活化疫苗的材料。對本項材料添加 0.2% 的試藥特級福馬林，在恒溫槽 37°C 中攪拌使其作用 2 小時予以不活化。

佐劑則使用稻葉等⁽⁴⁾報告的磷酸鋁膠，即取上述不活化病毒培養液 90 份加入 10% 磷酸鈉 ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 溶液及 10% 鹽化鋁 ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 溶液各 5 份，充分攪拌後在 4°C 中靜置一夜，然後加入 1/100 量的 1% Ethyl mercury thiosalicylate 生理鹽水，分裝於 100ml 瓶中成為不活化疫苗。

3. 活毒疫苗安全性及有效性的檢定法：

為測定疫苗的安全性及有效性，將試製的 3 批活毒疫苗分別對 10 頭乳牛(但其中嘉義大林組為 9 頭)各接種 1 ml，接種後 14 日間觀察臨床症狀，並調查中和抗體產生情形，另有 10 頭乳牛未接種疫苗，但亦定期調查中和抗體作為對照。

4. 試製疫苗對感染的防禦效力試驗：

為調查試製疫苗的有效性，對乳牛 10 頭先接種活毒疫苗 4 週後分為二組各 5 頭分別接種活毒或不活化疫苗，在第二次接種 14 日後以強毒畜試株(小白鼠 3 代，BHK21 細胞 1 代培養，力價 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml) 5ml 靜脈內接種攻擊。此外未接種疫苗乳牛 2 頭亦以相同方法攻擊作為對照，攻擊後觀察 14 日，記錄臨床症狀及調查中和抗體的消長。

5. 活毒疫苗及不活化疫苗

的野外應用試驗：

1984 年 8 月起至 1985 年 5 月試製活毒疫苗 50,195 劑量及不活化疫苗 50,154 劑量，分發全省各地區對牛隻實施野外緊急預防接種。

結 果

1. 疫苗的安全性及有效性：

(1) 安全性：

在台南分離的牛流行熱畜試株病毒經小白鼠3代及BHK21細胞繼代15代的減毒株，接種於BHK21細胞後製成3批活毒疫苗。各批活毒疫苗各對10頭乳牛皮下接種1 ml並觀察臨床症狀。如表1所示，接

種牛未觀察到任何異狀，未接種對照牛亦無任何症狀。

(2) 有效性：

如表1所示疫苗接種後週即已產生免疫反應。其免疫效果於第1週時各批疫苗免疫反應分別為70%，20%及67%，2週後分別為100%，40%及78%，至4週後均提高至90%以上。其平均中和抗體價在接種後1週時為1.43倍，2週時為2倍，3週時為4倍而4週時達10倍（圖1）。

表1 試製活毒疫苗野外交種試驗免疫反應與效果

試驗地	批號 No.	試驗 頭數	接種 量 (ml)	反應或 發病頭 數	免 疫 反 應				免疫效果(%)			
					接種前	1週後	2週後	4週後	接 種前	1 週後	2 週後	4 週後
嘉義 梅山A	1	10	1.0	0	0/10	7/10	10/10	10/10	0	70	100	100
嘉義 梅山B	2	10	1.0	0	0/10	2/10	4/10	9/10	0	20	40	90
嘉義 大林C	3	9	1.0	0	0/9	6/9	7/9	8/9	0	67	78	89
合 計		29		0	0/29	15/29	21/29	27/29		52	72	93
對 照		10	0	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0	0	0	0

*：分母為試驗頭數、分子為抗體轉變為陽性頭數。

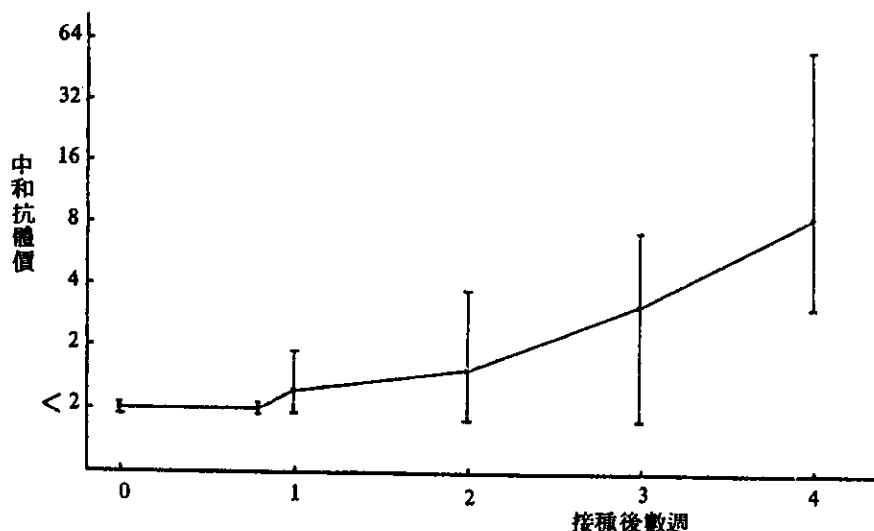


圖1 試製活毒疫苗接種牛血清中和抗體價的消長。I表示中和抗體價的幾何平均，上限與下限。

2. 活毒疫苗二次接種法 (LL法), 活毒——不活化疫苗接種法 (LK法), 不活化疫苗二次接種法 (KK法) 的抗體反應:

(1) LL法的抗體反應:

對10頭乳牛接種活毒疫苗結果, 未發現發熱等臨床症狀。如圖二所示乳牛在第一次接種後抗體產生良好, 接種後1週時平均中和抗體價為1.6倍, 2週時2.8倍, 3週時為5.3倍, 4週時上升到12倍。4週後再接種活毒疫苗時中和抗體價急劇上升, 5週時平均中和抗體價為54倍, 8週時達到最高峰的178倍, 嗣後抗體價慢慢下降, 至5個月後調查結果仍保有32倍的抗體價。

(2) LK法的抗體反應:

如圖2所示第1次以活毒(L)疫苗接種後中和抗體價稍低, 但4週後以不活化(K)疫苗接種後得到很高的力價, 即5週時力價上升至145倍, 8週時達到最高峰的219倍。至20週時仍比LL法的中和抗體稍高而保持64倍的力價。

(3) KK法的抗體反應:

第1次接種不活化(K)疫苗後1週的

中和抗體價為1.6倍, 2週時3.2倍, 4週時上升至4倍(圖2)。4週後再接種K疫苗時與LL法或LK法相同產生加強(Booster)作用, 5週時即上升到1000倍, 6週達到215倍的最高峰而維持到17週, 20週時仍有128倍之高價, 比LL法或LK法稍高。

3. 試製疫苗的感染防禦試驗:

以試製疫苗免疫後檢其防禦感染的效力。對以LL法及LK法免疫的乳牛各5頭, 在第2次接種後14天分別接種牛流行熱畜試株強毒(10^5 TCID₅₀/ml)攻擊。其結果如表2所示, 接種免疫牛均無任何症狀, 但對照牛(未免疫)則產生發熱, 呼吸器症狀, 流涎, 白血球減少, 中性桿狀球增加等症狀。

試製疫苗的野外應用試驗:

如表3, 活毒疫苗試製50,195劑量自1984年8月起分發18縣市供為乳牛緊急預防接種用。接種牛未發現不良反應或流產, 結果牛流行熱的發生迅速減少。1個月後分發試製的不活化疫苗50,514劑量作為第2次緊急預防接種用, 結果牛流行熱獲得完全控制。

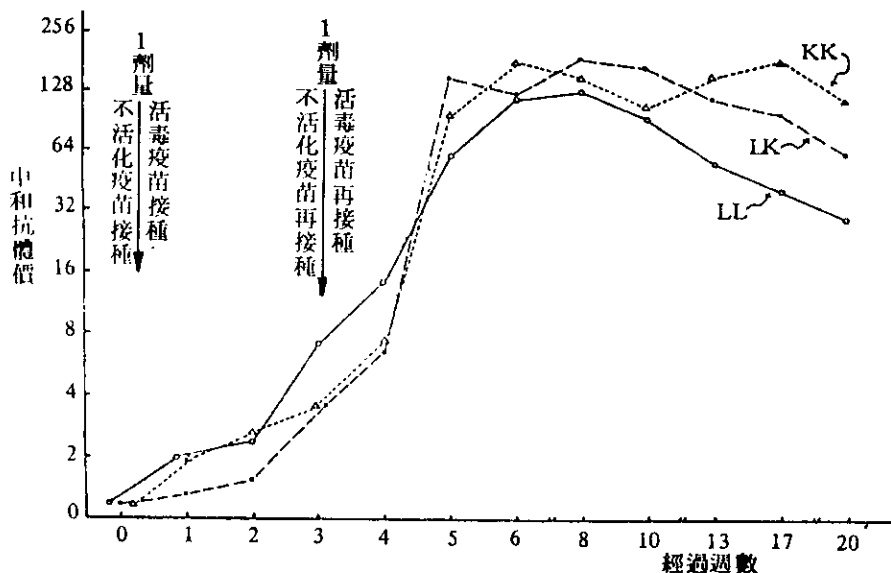


圖2 試製疫苗以LL法, LK法, KK法接種牛的中和抗體價的消長。

表2 LL法及LK法疫苗接種後對牛流行熱感染防禦試驗

疫苗	批號	接種法*	疫苗接種後攻擊日數	攻擊頭數	發病頭數	中和抗體價(平均值)
	3	LL	14	5	0	137
	3	LK	14	5	0	145
未接種對照				2	2	< 2

*：接種間隔；4週
接種量與方法；LL法2次均皮下1.0 ml，LK法第1次皮下1.0 ml，第2次皮下3.0 ml。

表3 牛流行熱緊急預防試驗使用活毒疫苗及不活化疫苗量。

縣市別	活毒疫苗	不活性疫苗
1. 宜蘭縣	20*	30*
2. 台北縣	3,390	1,130
3. 桃園縣	4,980	3,600
4. 新竹縣	340	486
5. 苗栗縣	2,740	1,750
6. 台中縣	2,828	5,050
7. 彰化縣	6,659	4,000
8. 南投縣	781	1,750
9. 雲林縣	4,258	3,900
10. 嘉義縣市	4,000	7,850
11. 台南縣	8,100	12,323
12. 高雄縣	5,214	5,610
13. 屏東縣	5,181	0
14. 台東縣	0	400
15. 花蓮縣	20	486
16. 新竹市	400	400
17. 台中市	259	346
18. 台南市	551	633
19. 高雄市	0	500
20. 台北市	0	270
21. 澎湖縣	4	0
合計	50,195	50,514

(1984.8~1985.5)

*：表示劑量(活毒疫苗為1.0 ml 不活化疫苗為3.0 ml)。

討論

早期日本的椿等⁽³⁾以結晶紫滅毒豬瘟病毒的方法，以牛繼代的牛流行熱病毒加以不活化後作為疫苗使用。嗣後稻葉等⁽⁴⁾，Inaba等⁽⁵⁾查明牛流行熱YH株繼代至4代，YHM株繼代至3代，YHK株繼代至7~8代仍對牛有病原性，同時使牛血清中和抗體陽轉並能耐過強毒的攻擊而不顯示任何症狀。增加繼代後，即YH株6代及BHK株(B系)9代繼代材料對牛已無病原性，試驗接種免疫牛未顯示任何症狀並能耐過任何攻擊。

筆者等以台灣分離的畜試株經小白鼠3代BHK21細胞14代繼代病毒疫苗，調查其病原性及抗體產生能力結果，對牛已無病原性而抗體產生情形良好。該項疫苗接種後1週中和抗體即有20~70%的牛轉變為陽性，4週後90~100%的牛中和抗體轉變為陽性，顯示免疫反應良好。

Inaba等⁽⁶⁾以HmLu-1細胞培養的病毒以福馬林不活化後以磷酸鋁膠吸附的不活化疫苗應用結果，抗體產生能力良好並證明能耐過強毒的攻擊。

在疫苗應用方面，Inaba等⁽⁶⁾又報告以活毒-不活化疫苗免疫的所謂LK方式比活毒疫苗2次免疫的LL方式或不活化疫苗2次免疫的KK方式，能得到更高的中和抗體價並能維持較長的時間。

Theodoridis等⁽¹²⁾亦報告添加有Freund's adjuvant的不活化疫苗1次接種可維持免疫能力1年並能耐過強毒的攻擊。最近Vanselow等⁽¹⁴⁾報告將病毒的細胞培養液不活化後添加Quil A或Quil A及硫酸Saponin的疫苗比既有疫苗有效。

筆者等依照Inaba⁽⁶⁾的方法將病毒的細胞培養液以福馬林不活化後試製磷酸鋁膠吸附的疫苗應用結果免疫反應良好即接種免疫後一週的平均中和抗體價上升至1.6倍，2週後3.2倍，4週時達到8倍。在不活化疫苗接種4週後，第2次再以不活化疫苗接種(KK法)時免疫獲得加強作用，中和抗體價達到98.7倍，證明

LK法及KK法均比LL法為優。

由於牛流行熱仍有再發生的可能，雖然已開發的活毒及不活化疫苗的效力均尚稱良好，但今後仍有繼續改進疫苗效力的必要。

試製的活毒疫苗50,195劑量自1984年8月起開始在農村供乳牛緊急免疫之用後牛流行熱的發生顯著減少，嗣在9月間將試製完成的不活化疫苗50,514劑量供為第2次緊急免疫用採取LK法預防結果牛流行熱獲得完全控制。

參考文獻

1. Burgess, G. W. 1971. Bovine ephemeral fever: a review. *Veterinary Bulletin*, 41:887-895.
2. Doherty, R. L., H. A. Standfast and I. A. Clark. 1969. Adaptation to mice of the causative virus of ephemeral fever of cattle from an epizootic in Queensland, 1968. *Australian Journal of Science*, 31:365-366.
3. 稻葉右二(1970)牛の流行熱,家畜衛試年報X142-147.
4. Inaba, Y., H. Kurogi, K. Sato, Y. Goto, T. Omori and M. Matumoto. 1973. Formalin inactivated aluminum phosphate gel-adsorbed vaccine of bovine ephemeral fever virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 42:42-53.
5. Inaba, Y. H. Kurogi, A. Takahashi, K. Sato and M. Matumoto. 1974. Vaccination of cattle against bovine ephemeral fever with live attenuated virus followed by killed virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 44:121-132.
6. 稻葉右二(1980)牛流行熱,牛病學(大森常良,安藤敬太郎,石谷類造,稻葉右二,清水悠紀臣,林光昭,山内亮編)242-254,近代出版,東京.
7. Mackerras, I. M., M. J. Mackerras and F. M. Burnet. 1940. Experimental studies of ephemeral fever in Australian cattle. *Council for Scientific and Industrial Research Melbourne Bulletin No. 136.*
8. Meadow, D. 1919. Notes on ephemeral fever of Indian cattle resembling South African "three days sickness". *Veterinary Journal*, 75:138-140.
9. Morgan, I. and M. D. Murray. 1969. The occurrence of ephemeral fever of cattle in Victoria in 1968. *Australian Veterinary Journal*, 45:271-274.
10. Snowdon, W. A. 1970. Bovine ephemeral fever: the reaction of cattle to different strains of ephemeral fever virus and the antigenic comparison of two strains of virus. *Australian Veterinary Journal*, 46:258-266.
11. Spradbrow, P. B. and J. Francis. 1969. Observations on Bovine ephemeral fever and isolation of virus. *Australian Veterinary Journal*, 45:525-527.
12. Theodoridis, A., S. E. T. Boshoff and M. J. Botha. 1973. Studies on the development of a vaccine against bovine ephemeral fever. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 40:77-82.
13. 椿 精一,齊藤保二,島田文茂,升茂(1951),所謂牛の流行性感冒の研究II-4,免疫實驗,日本獸醫學雜誌13,296[學會記事]
14. Vanselow, B. A., I. Abetz and K. Trenfield. 1985. A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quil A: A comparative study using adjuvants Quil A, aluminium hydroxide gel and dextran sulphate. *Veterinary Record*, 117:37-43.

THE PROPHYLAXIS OF BOVINE EPHEMERAL FEVER IN TAIWAN

S. Y. Chiu and Y. S. Lu

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

At the outbreak of Bovine Ephemeral Fever (BEF) in the dairy cattle in Taiwan in 1984, the isolation of the causative virus was successfully attempted. As the situations of epizootic required for an effective way to control further prevalence, both live and inactivated vaccines were developed and used in the emergency control program.

Using limiting dilution techniques, the isolated virus was cloned at 12th passage in BHK 21 cells and used as seed virus for live vaccine development after 2 more passages. The saftiness and the efficacy of the vaccine have been tested with 39 dairy cattle in the dairy farms. After the inoculation of the live vaccine, antibody titer was first detectable in 2nd week and it reached 12 at 4th week. Immune response was good (100%). Either vaccination, first with live vaccine followed by 2nd live vaccine (LL) or followed by inactivated vaccine (LK) has induced satisfactory neutralizing antibody, 64 and 145 respectively. Five months after the vaccinations, the titer still remained

32 for LL and 64 for LK method.

Five cows each in LL and LK groups were challenged with virulent virus 14 days after the second vaccination and elapsed without any clinical signs. A total of 50,195 doses of this live vaccine has been used for the initial emergency control of BEF in 1984.

Using formalin inactivation and aluminium phosphate absorption method, an inactivated vaccine was also developed. The vaccine was safe and produced in a geometric mean antibody titer of 1.6 in the 1st week, 3.2 in the 2nd and reached 8 in the 4th week.

The 2nd vaccination at the 4th week (KK) has strongly boosted the production of titer which maintained at 128 for 5 months. This titer was somewhat higher than that of LL or LK method. From Autumn 1984 to early 1985, 50,514 doses of this inactivated vaccine were delivered to farms for the follow up vaccination program.