

## 水包油包水 (w/o/w) 油質佐劑對牛流行熱疫苗抗體 消長之影響

\*<sup>1</sup> 朱純燕 <sup>2</sup> 陳貞妘 <sup>3</sup> 陳銘政

<sup>1</sup> 國立屏東科技大學動物疫苗科技研究所 屏東縣內埔鄉

<sup>2</sup> 高生製藥股份有限公司研究開發處 高雄縣湖內鄉

<sup>3</sup> 建盈股份有限公司 雲林縣斗六市

(收稿日期：96 年 10 月 12 日。接受日期：96 年 11 月 13 日)

## Effect of water-in-oil-in-water (w/o/w) Oil Adjuvant on Long-term Antibody Response of Bovine Ephemeral Fever Vaccine

\*<sup>1</sup> Chun-Yen CHU, <sup>2</sup> Jan-Jin CHEN, <sup>3</sup> Hunter CHEN

<sup>1</sup> Graduate Institute of Animal Vaccine Technology, National Pingtung University of Science and  
Technology, Neipu, Pingtung, Taiwan 912, ROC

<sup>2</sup> Department of R&D, Kaohsiung Biological Product Co., Ltd., Hunei, Kaohsiung, Taiwan 829, ROC

<sup>3</sup> Chien Ying Co., Ltd. Douliou, Yunlin, Taiwan 640, ROC

(Received: October 12, 2007. Accepted: November 13, 2007.)

抽印自台灣獸醫學雜誌第 33 卷第 3、4 期

中華民國 96 年 12 月

Reprinted from Taiwan Veterinary Journal

Taipei, Taiwan, ROC

Vol. 33 No. 3、4, December

## 水包油包水 (w/o/w) 油質佐劑對牛流行熱疫苗抗體消長之影響

\*<sup>1</sup> 朱純燕 <sup>2</sup> 陳貞姁 <sup>3</sup> 陳銘政

<sup>1</sup> 國立屏東科技大學動物疫苗科技研究所 屏東縣內埔鄉

<sup>2</sup> 高生製藥股份有限公司研究開發處 高雄縣湖內鄉

<sup>3</sup> 建盈股份有限公司 雲林縣斗六市

(收稿日期：96年10月12日。接受日期：96年11月13日)

**摘要** 牛流行熱 (bovine ephemeral fever; BEF) 是由桿狀病毒經庫蠓媒介傳染的牛病毒性疾病，本病在台灣及亞洲國家中呈週期性流行。本研究同時選用 Tn73 (1984) 及 Tn88128 (1999) 之台灣分離株為種毒株，將病毒力價提高為  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL，以 BEI (binary ethylenimine) 為不活化劑，加上水包油包水 (w/o/w) 之雙相油質佐劑研製新疫苗。於田間選用 4-6 月齡仔牛進行試驗，經基礎免疫後再間隔 2-4 週補強注射；結果於免疫後 4-8 週中和抗體力價最高可揚升至 512 倍，高峰期 6-9 個月，有效保護力價維持一年，顯著優於最高 32 倍，高峰期只持續 3 個月之氫氧化鋁膠疫苗。雙相油質佐劑粘稠度低容易注射，同時具有水質及油質疫苗之優點，可刺激長效型抗體之產生，使抗體高峰期持續至 6 個月以上，同時能刺激淋巴細胞增殖激發細胞性免疫反應，提供免疫牛群有效保護力。[\*朱純燕、陳貞姁、陳銘政。水包油包水 (w/o/w) 油質佐劑對牛流行熱疫苗抗體消長之影響。台灣獸醫誌 33 (3&4): 211-216, 2007。\*聯絡人 TEL: 08-7740520, FAX: 08-7700447, E-mail: cychu@mail.npust.edu.tw]

**關鍵詞：**牛流行熱，疫苗，佐劑

### 緒 言

牛流行熱 (bovine ephemeral fever; BEF) 是由桿狀病毒，經由庫蠓等昆蟲媒介傳染，所引起的牛病毒性疾病，流行期時牛隻感染率高，死亡率也高，罹病牧場除了牛隻損失外，在醫藥及產乳量的損失也很可觀 [6]。本病除了台灣地區 [11] 外，鄰近國家如紐西蘭、澳洲、日本及中國大陸，也有類似疫情。由於環境中昆蟲媒介無法加以完全消滅，因此本病的預防方法，各國仍以採用接種疫苗控制最為有效 [14]。台灣雖然已有商業化疫苗問世多年，但因所使用之種毒株為 73 年分離株，採用氫氧化鋁膠為佐劑，在現場上使用已長達 20 年，每年均須補強注射 2-3 次，仍無法提供足夠的保護力，使得整個防疫效果出現漏洞 [15]。

BEFV 為核糖核酸病毒，具外套膜 (envelope)，含有五個結構蛋白基因，呈子彈或錐形，大小為  $80 \times 140$  nm，為負性單股的 RNA (11-12 kb, 42 S) 基因體 [10]。其中外套膜糖蛋白 (envelope glycoprotein) 分子量為 81 kDa，以 G 表示，位在封套中是貫膜性糖蛋白，是病毒的抗原決定位，可引發牛隻的保護性免疫反應 [4,13]。筆者等 [7] 將 1984-2004 之台灣分離株經定序分析後發現，Tn88128 (1999) 之分離株與目前使用的疫苗株 Tn73 (1984) 在 G 糖蛋白有 12 個胺基酸序列出現差異，且與 2001 年以後的分離株在親源樹分析圖上屬於同一群，因此選定 Tn88128 (1999) 之分離株為開發新疫苗之種毒株。本研究除了針對種毒株之更新、將病毒力價提高為  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL、以 BEI (binary ethylenimine) 為病毒不活化劑，將

疫苗佐劑 (adjuvant) 改用水包油包水 (water-in-oil-in-water; w/o/w) 之雙相油質佐劑等製程重新研究改善之外, 並重新評估疫苗免疫於田間不同年齡層之牛隻, 包括仔牛、女牛及懷孕母牛之免疫適期與抗體消長追蹤試驗。並以小鼠為模式, 測定接種疫苗後淋巴細胞之增殖情形, 以刺激指數之上升證實 w/o/w 疫苗同時可激發細胞性免疫反應。

## 材料與方法

**病毒的增殖** 選取 Tn73 (1984) (GenBank accession No. AY935239) 及 Tn88128 (1999) (No. AF208840) 之牛流行熱病毒分離株 (由台南縣家畜疾病防治所分讓), 以倉鼠幼兒腎臟細胞 (baby hamster cell; BHK-21) 做為增殖病毒之用, 病毒力價為  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL。

**疫苗調配** Tn73 及 Tn88128 病毒液分別經 BEI (Sigma, U.S.A) 最終濃度為 0.001M [2] 不活化後, 等量混合做為抗原。雙相油質疫苗之調配方法依內層之抗原: 油層: 外層之抗原為 1:1:2 之比例, 乳化而成水包油包水 (w/o/w) 疫苗 [7]。另將 70% 的抗原與 30% 氫氧化鋁膠 (aluminum hydroxide gel; Al-gel) 混合調配為 Al-gel 疫苗。

**中和抗體試驗法** 血清樣品先經 56°C 水浴加熱 30 分鐘非働化處理, 於 96 孔的微量培養盤每孔加入 50  $\mu$ L 細胞培養液, 取 50  $\mu$ L 血清進行 2 倍序列連續稀釋至 1024 倍, 加入 50  $\mu$ L 中和用 Tn88128 病毒液 (100 TCID<sub>50</sub>/mL), 振盪混合均勻後置入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中進行感作 1 小時。感作後每孔加入 50  $\mu$ L 之 BHK-21 細胞懸浮液濃度為  $5 \times 10^5$ /mL, 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱繼續培養 5 天, 以不產生細胞病變效應 (cytopathic effect; CPE) 之最高倍數, 判定為其血清中和抗體力價。

**不同佐劑之比較試驗** 選擇 4-6 月齡健康仔牛 15 頭, 分為 3 組每組 5 頭: A 組於頸部肌肉接種 w/o/w 疫苗一劑量 (3 mL); B 組接種 Al-gel 疫苗一劑量 (5 mL); A、B 兩組均於間隔 2 週後再補強接種疫苗一劑量; C 組為不免疫對照組。所有供試驗之仔牛於接種前及第一次接種後 2、4、8、10 週, 3、4、6 個月進行採血, 測定中和抗體力價。

**w/o/w 疫苗免疫仔牛適期及抗體消長追蹤試驗** 選擇 4-6 月齡健康仔牛 30 頭, 每組 10 頭隨機分為

三組: A、B 兩組均於頸部肌肉接種 w/o/w 疫苗一劑量 (3 mL) 後, A 組間隔 2 週後再補強接種疫苗一劑量; B 組間隔 4 週後再補強接種疫苗一劑量; C 組為不免疫對照組。所有供試驗之仔牛於接種前及第一次接種後 2、4、8、12 週, 6、9、12 個月進行採血, 測定中和抗體力價。

**w/o/w 疫苗免疫懷孕母牛安全及效力試驗** 選擇荷士登懷孕母牛 15 頭, 隨機選取 5 頭為不接種疫苗之對照組, 另外 10 頭間隔 4 週後肌肉接種疫苗 w/o/w 一劑量 (3 mL), 接種後疫苗組觀察至分娩為止, 並定期採血檢測中和抗體力價。

**w/o/w 疫苗免疫女牛抗體消長追蹤試驗** 選擇荷士登女牛 15 頭, 隨機選取 5 頭為不接種疫苗之對照組, 另外 10 頭間隔 4 週肌肉接種疫苗 w/o/w 一劑量, 所有供試驗之女牛於接種前及第一次接種後 2、4 週, 2、4、6、9、12 個月進行採血, 測定中和抗體力價。

**細胞性免疫反應試驗** 購自成大動物中心之 7 週齡 BALB/CJ 小鼠共 15 隻分為三組, 每組 5 隻, 分別以 w/o/w 疫苗、Al-gel 疫苗及 PBS, 每隻小鼠肌肉注射 0.25 mL, 二週後補強一劑, 並於第四週時犧牲小鼠取脾臟細胞進行 T 細胞增殖試驗, 測定經試製疫苗免疫後的小鼠之細胞性免疫反應效力。於 96 孔細胞培養盤中, 先加入 50  $\mu$ L 經 UV 照射之 10 倍稀釋 BEFV Tn88128 不活化病毒抗原、ConA (1  $\mu$ g/mL, Sigma) 或 RPMI-1640 培養液 (GIBCO), 再加入 50  $\mu$ L 調整濃度  $8 \times 10^6$ /mL 之脾臟細胞懸浮液, 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 5 天後取出, 以自動微量吸管每孔加入 CellTiter96® 試劑 (Promega) 20  $\mu$ L, 混合均勻後置回 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中反應 4 小時後, 取出培養盤於 anthos 2010 ELISA reader 上測定 492 nm 波長之吸光值。刺激指數 (stimulation index) = (試驗組之平均 OD 值 - 背景值)  $\div$  (無抗原刺激對照組之平均 OD 值 - 背景值)。

**統計分析** 以 Office 2000 的 Excell (Microsoft, Bellevue, Washington, USA) 作資料處理, 計算平均力價、標準偏差、及雙尾 t 檢定計算 P 值等, 分析探討佐劑對抗體消長之影響是否有顯著性差異。

## 結 果

**不同佐劑之比較試驗** 免疫 w/o/w 疫苗之試驗牛抗體力價，4 週後上升為 64 倍以上，8 週後則均高於 256 倍，高峰期持續至 4 個月，顯著高於 Al-gel 水質疫苗組 (\*\*P<0.01)，後者之最高抗體力價為 32 倍，高峰期僅持續 3 個月 (Fig. 1)。不免疫對照組仔牛之移行抗體持續下降，於 8 週後降至 32 倍以下。

**w/o/w 疫苗免疫仔牛適期及抗體消長追蹤試驗** A 組間隔 2 週補強接種 w/o/w 疫苗一劑量，4 週後試驗仔牛抗體力價上升至 256 倍以上，高峰期持續至 9 個月。B 組間隔 4 週補強接種 w/o/w 疫苗一劑量，12 週後試驗仔牛抗體力價上升至 256 倍以上，高峰期持續至 6-9 個月。不論間隔 2 週或 4 週完成 w/o/w 疫苗二次免疫，均可以提供牛隻長達一年之有效保護力價 (Fig. 2)。不免疫對照組仔牛之移行抗體持續下降，於 8 週後降至 32 倍以下，為避免造成牛場防疫漏洞，於 12 週後緊急施打疫苗，不列入後續之抗體消長追蹤試驗。

**w/o/w 疫苗免疫懷孕母牛安全及效力試驗** 不同胎次懷孕母牛在分娩前完成二劑 w/o/w 疫苗基礎及補強免疫，經觀察至分娩日，均無任何不良反應而正常分娩，安全性佳。免疫後之中和抗體力價可以維持一年在 32 倍以上 (Fig. 3)。不免疫對照組懷孕母牛僅供觀察分娩情形，分娩後即補強注射疫

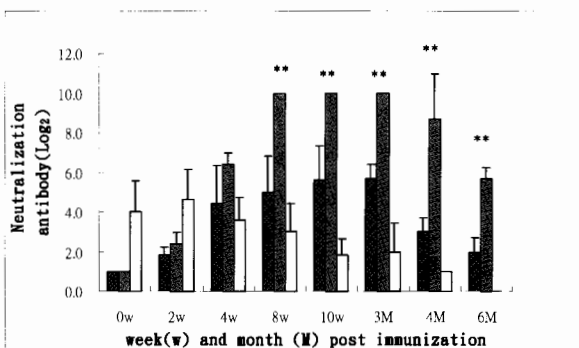


Fig. 1 The effect of adjuvant on production of anti-BEFV neutralization antibodies in calves after immunization with BEF vaccines. Fifteen 4-6-month-old calves were divided into three groups with five in each group. Group A (■) was vaccinated 3 mL of w/o/w vaccine, group B (▨) was vaccinated 5 mL of Al-gel vaccine, group C (□) was used as the non-vaccinated control. Difference between group A and group B was analyzed with two-tailed Student's t-test. \*\*P<0.01.

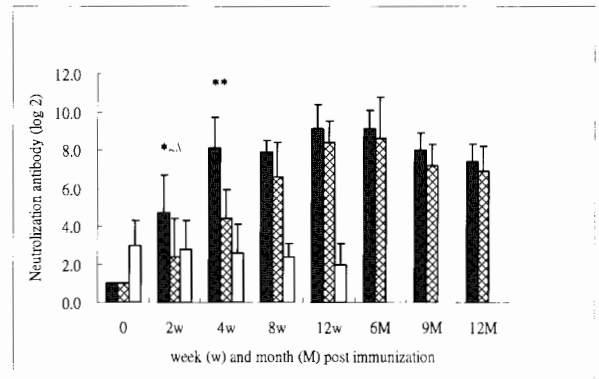


Fig. 2 Production of anti-BEFV neutralization antibodies in calves after different boost immunization with BEF w/o/w vaccine. Thirty 4-6-month-old calves were divided into three groups with ten in each group. Group A and B received a prime vaccination of 3 mL BEF w/o/w vaccine. Group A (■) boosted two weeks later, group B (▨) boosted four weeks later, group C (□) was used as the non-vaccinated control. Difference between group A and group B was analyzed with two-tailed Student's t-test. \*P<0.05; \*\*P<0.01.

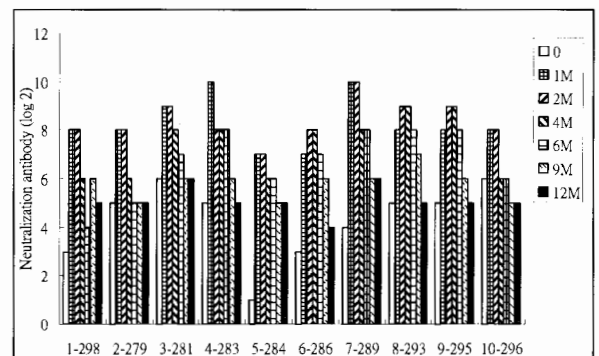


Fig. 3 Anti-BEFV neutralization antibodies duration in pregnant cows after immunization with BEF w/o/w vaccines. Ten Holstein pregnant cows ( 1-298, 2-279, 3-281, 4-283, 5-284, 6-286, 7-289, 8-293, 9-295, 10-296 ) were given a prime and one boost via the i.m. route with 3 mL of w/o/w vaccine and bled every 1-3 month ( 1 M, 2M, 4M, 6M, 9M ), till the 12<sup>th</sup> month ( 12 M ).

苗，不列入長期之抗體消長追蹤試驗。

**w/o/w 疫苗免疫女牛抗體消長追蹤試驗** 女牛在配種前完成二劑 w/o/w 疫苗基礎及補強免疫，免疫後之中和抗體力價可以維持一年在 32 倍以上 (Fig. 4)。不免疫對照組女牛之抗體降至 32 倍以下，即緊急施打疫苗，不列入後續之抗體消長追蹤試驗。

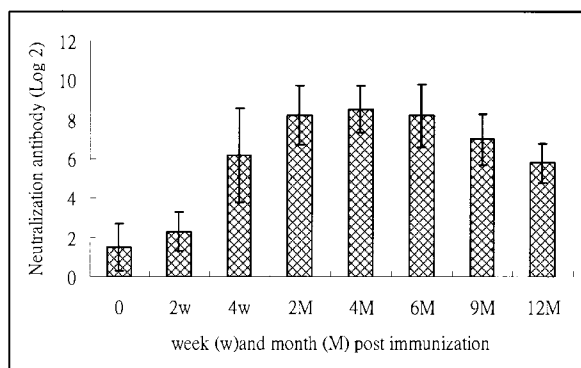


Fig. 4 Anti-BEFV neutralization antibodies duration in heifers after immunization with BEF w/o/w vaccines. Ten Holstein heifers were given a prime and one boost via the i.m. route with 3 mL of w/o/w vaccine and bled every 2-3 month till the 12<sup>th</sup> month.

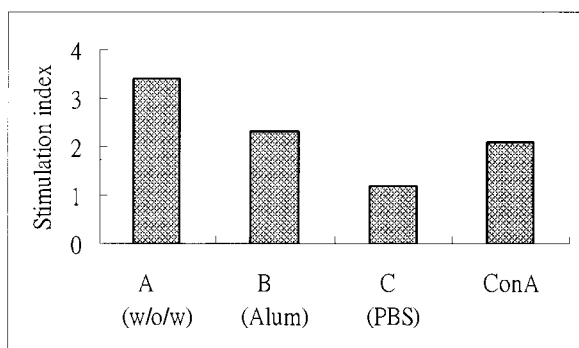


Fig. 5 Lymphocyte proliferative responses in mice immunized with BEF vaccines. Fifteen 7-week-old BALB/CJ mice were divided into three groups with five in each group. Group A was vaccinated 0.25 mL of w/o/w vaccine, group B was vaccinated 0.25 mL of Alum (Al-gel) vaccine, group C was vaccinated 0.25 mL of PBS used as the control. After two weeks, each group was boosted once and sacrificed at 2 weeks later. The splenocyte were cultured with UV-inactivated BEFV ( $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL) and concanavalin A ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Each splenocyte sample was plated in triplicate. The proliferative response was measured by CellTiter96®. The stimulation index is defined as the mean of experimental data divided by the mean of the unstimulated control.

**細胞性免疫反應試驗** 經 BEF 疫苗免疫後的小鼠，取其脾臟淋巴細胞加入經 UV 照射之 10 倍稀釋不活化 BEF 病毒抗原、ConA ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 RPMI，於培養 5 天後取出，加入 CellTiter96 試劑反應 4 小時後，測定其 492 nm 波長之吸光值。結果免疫 w/o/w 疫苗組之淋巴細胞之刺激指數均高於 ConA 陽性對照組及 Al-gel 疫苗組，顯示 w/o/w 疫苗能刺激淋巴細胞增殖 (Fig. 5)，激發細胞性免疫反應 (cell mediated immunity, CMI)，除了幫助抗體持續性地產生，並有效地防禦及阻斷野外病毒

株之入侵。

## 討 論

蛋白質抗原需要佐劑輔助其產生高質量之抗體及提升記憶性免疫反應，實驗動物誘發抗體反應，通常需要 mg-g 的蛋白質抗原量，太多或太少的抗原可能超過抗原的活性反應，引起耐受性。抗原加上佐劑注射比起單獨注射抗原，只需較少的抗原含量即可得到較高的抗體力價 [3]。鋁膠化合物被做為疫苗佐劑已超過六十年的歷史，目前以氫氧化鋁膠 (aluminium hydroxide) 和磷酸化鋁膠 (aluminium phosphate) 最普遍，已廣泛的使用在獸醫及人醫疫苗，與油質佐劑同屬於微粒型 (particulate adjuvant) 佐劑。鋁膠佐劑與抗原原有兩種作用方式：利用鋁鹽沉澱 (alum-precipitated) 及利用鋁鹽吸附抗原 (alum-adsorbed) 的疫苗 [12]。研究者指出市售的氫氧化鋁膠每 mg 可吸收約 50-200 g 的蛋白質，但鋁鹽的吸附效果決定於抗原的 pI (isoelectric pH) 等電點及培養基的 pH 值，低等電點的蛋白質會帶負電，可吸引帶正電的氫氧化鋁膠結合，反之，高等電點的蛋白質會與鋁膠形成不穩定的結合。鋁膠是一個微弱的佐劑，正因它所引起的炎症反應微弱，具安全性高且能刺激產生記憶性的效用，故為第一個被核准使用在人類的佐劑。但是，當在實驗動物大量使用時，會在注射的部位引起約幾個星期的發炎反應，偶爾可能會形成慢性肉芽腫。鋁鹽的作用原理主要是靠著緩慢地釋放原來延長抗原在體內推積的時間約為 2-3 週，即非專一性的活化巨噬細胞 (macrophage) 和活化補體系統。而在其它研究中發現可以藉由加入  $\gamma$ -胰島素，界面活性劑 (detergents) 或百日咳桿菌 (Bordetella pertussis) 來增加佐劑的效力，但炎症反應同時也會增加，由於鋁鹽的短期堆積效果 (short-term depot effect) [3]，比起油包水劑型 (water-in-oil emulsion; w/o) 需要補強施打多次才能引起好的免疫反應。此點與本研究中 Al-gel 水質疫苗組 (Fig. 1)，免疫後之最高抗體力價為 32 倍，高峰期僅持續 3 個月之結果相似。

油質佐劑是由油和界面活性劑所組成，由不同的油相/水相的比例，可製造成油包水 (w/o)、水包油 (o/w) 和水包油包水 (w/o/w) 的不同連續相油質 [3]。這些佐劑在抗體產生效益上和佛氏不完全佐劑 (Incomplete Freund's Adjuvant; IFA) 差不多；但是炎症反應表現相對地減少許多。被油滴包覆的抗原形成水包油乳劑可以很快地被巨噬細胞

吞下，運送到淋巴結或脾，幫助抗原被組織中的樹狀突細胞表面所捕捉，迅速地經由淋巴管運送到淋巴結，而保留在脾或淋巴結濾泡中的抗原，則是刺激產生抗體和維持記憶性所必須的。最終分化的漿細胞可以存活幾天到幾週，必須由再活化的記憶細胞取代之，只有濾泡中的抗原可以活化記憶細胞。由仔牛、女牛及懷孕母牛之抗體消長追蹤試驗結果中 (Fig. 2-4)，證實 w/o/w 疫苗可經由此途徑刺激長效型抗體之產生。

包覆型抗原可維持抗原的緩慢釋放，如脂質體 (liposome-entrapped Ag) [9]、生物可降解型與非降解型 (degradable polymer; nondegradable polymer-entrapped Ag) 等聚合物被用來當作包覆型佐劑，可以建構和形成不同大小的微球體，使用單一劑量就可達成類似基礎免疫和補強注射的效果 [5]。然而，此類佐劑的製備是相當複雜的，適用於一些較特殊抗原應用於單一個體的注射，尤其是在抗原量相當有限的情況下。包覆型佐劑的缺點是製造過程太複雜，但因可引起顯著的免疫反應，故仍有其發展的價值。其他的非微粒型 (non-particulate) 佐劑如細胞激素 (cytokines)、細菌毒素及 CpG-ODN (cytosine-phosphodiester-guanine oligodeoxynucleotides) 等等新一代佐劑仍在研究階段，有些新佐劑的成本太高，雖效力很好，但因成本上的限制仍無法在家畜疫苗上使用。

理想的佐劑應能有效的輸送抗原、呈獻抗原、並協助抗原對準免疫細胞，以達到提高免疫抗體力價、提高細胞媒介性免疫效力，甚至能提高中和抗體力價，以及誘導 B 淋巴球抗體生產細胞釋放具保護效力的抗體 [3]。此外，理想的佐劑亦應具有良好的穩定性、高安全性、容易使用、容易製造，且價格合理 [1]。現階段應用於經濟動物之佐劑以雙相油質佐劑 (w/o/w) 最能符合須求。但是，使用的油和界面活性劑種類應該持續改良，並須經由嚴格的品質管制，防止因為其他物質污染而造成過度的炎症反應，並考慮與其他化學性免疫調整劑的併用 [8]，將成為新一代佐劑中的主角。

本研究同時選用 Tn73 及 Tn88128 不同年代之 BEF 分離株為種毒株，以 BEI 為不活化劑，破壞病毒之核酸結構，使病毒失去複製及增殖能力，但完整保留了病毒之表面抗原，因此免疫後可以有效刺激高中和抗體力價之產生 [2]。加上佐劑選用水包油包水 (w/o/w) 之雙相油質，粘稠度低容易注射，注射部位不會產生肉芽腫，同時具有水質及油

質疫苗之優點，外層之抗原可以快速刺激短效型抗體之產生，而包於油層內之抗原則是緩慢釋放，刺激長效型抗體之產生，使抗體高峰期持續至 6-9 個月以上，提供牛隻長達一年之有效保護力。由小鼠之模式顯示接種 w/o/w 疫苗能刺激淋巴細胞增殖，同時能激發細胞性免疫反應，將於後續牛隻試驗中深入探討。

## 參考文獻

1. Alving CR. Design and selection of vaccine adjuvants: animal models and human trials. *Vaccine* 20: S56-S64, 2002.
2. Brown F. Inactivation of viruses by aziridines. *Vaccine* 12: 322-327, 2001.
3. Cox JC, Coulter AR. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15: 248-256, 1997.
4. Cybinski DH, Davis SS, Zakrzewski H. Antigenic variation of the bovine ephemeral fever virus glycoprotein. *Arch Virol* 124: 211-224, 1992.
5. Eldridge JH, Gilley RM. Biodegradable micropheres as a vaccine delivery system. *Mol Immun* 28: 287-294, 1991.
6. Hsieh YC, Cheng SH, Wang FI. Bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan (2001-2002). *J Vet Med Sci* 67: 411-416, 2005.
7. Hsieh YC, Wang SY, Chu CY. DNA sequence analysis of glycoprotein G gene of Bovine Ephemeral Fever virus and development of a double oil emulsion vaccine against Bovine Ephemeral Fever. *J Vet Med Sci* 68: 543-548, 2006.
8. Jin H, Li Y, Wang B. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine* 22: 2925-2935, 2004.
9. Kersten GFA, Crommelin DJA. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine* 21: 915-920, 2003.
10. Kongsuwan K, Cybinski DH, Cooper J, Walker PJ. Location of neutralizing epitopes on the G protein of bovine ephemeral fever rhabdovirus. *J Gen Virol* 9: 2573-2581, 1998.
11. Liao YK, Inaba Y, Liou PP. Epidemiology of bovine ephemeral fever virus infection in Taiwan. *Microbiol Res* 153: 289-95, 1998.
12. Lindblad EB. Aluminium adjuvants-in retrospect and prospect. *Vaccine* 22: 3658-3668, 2004.
13. Uren MF, Walker PJ, Byrne KA. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. *Vaccine* 12: 845-850, 1994.
14. Vanselow BA, Wathall JC, Abetz I. Field trials of ephemeral fever vaccines. *Vet Microbiol* 46: 117-130, 1995.
15. Wang FI., Hsu AM, Huang KJ. Bovine ephemeral fever in Taiwan. *J Vet Diagn Invest* 13: 462-467, 2001.

## Effect of water-in-oil-in-water (w/o/w) Oil Adjuvant on Long-term Antibody Response of Bovine Ephemeral Fever Vaccine

\*<sup>1</sup> Chun-Yen CHU, <sup>2</sup> Jan-Jin CHEN, <sup>3</sup> Hunter CHEN

<sup>1</sup> *Graduate Institute of Animal Vaccine Technology, National Pingtung University of Science and Technology, Neipu, Pingtung, Taiwan 912, ROC*

<sup>2</sup> *Department of R&D, Kaohsiung Biological Product Co., Ltd., Hunei, Kaohsiung, Taiwan 829, ROC*

<sup>3</sup> *Chien Ying Co., Ltd. Douliou, Yunlin, Taiwan 640, ROC*

(Received: October 12, 2007. Accepted: November 13, 2007.)

**ABSTRACT** Bovine Ephemeral Fever (BEF) is a bovine viral disease that is transmitted by culicoides, its outbreak in Taiwan and Southeast Asian countries is periodical. To develop a new oil vaccine, we used both the Tn73 (1984) and Tn88128 (1999) strain as the master seed, elevated the titer of the vaccine to  $10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub> /mL, and utilized BEI (binary ethylenimine) for the inactivation and included a special formulated water-in-oil-in-water (w/o/w) adjuvant. In the field trial, this vaccine was tested on 4-6-month-old calves, the animals were given the initial vaccination, followed by a booster dose 2-4 weeks later. The highest titer of the neutralization antibody was observed 4-8 weeks after inoculation, reaching 512x and with the peak lasting for 6-9 months, protecting the animals over a period of 1 year. This new w/o/w vaccine is far more superior to the conventional aluminum hydroxide (Al-gel) vaccine; the latter only gives a titer of 32x and the peak lasting only 3 months. The w/o/w vaccine is highly syringeable and retains the advantages of both the Al-gel and oil based vaccine, which means, it stimulates not only the long-lasting antibody response but the activity of cell-mediated immunity, providing the effective protection for the herd of cattle. [\*Chun-Yen CHU, Jan-Jin CHEN, Hunter CHEN. Effect of water-in-oil-in-water (w/o/w) Oil Adjuvant on Long-term Antibody Response of Bovine Ephemeral Fever Vaccine. Taiwan Vet J 33 (3&4):211-216, 2007. \*Corresponding author TEL: 08-7740520, FAX: 08-7700447, E-mail: cychu@mail.npust.edu.tw]

*Key words: bovine ephemeral fever, vaccine, adjuvant*