

石斑魚健康種苗之建立 與疫苗開發策略

撰文/周信佑

前言

石斑魚是現今亞太地區重要的高經濟海水養殖魚類，由於具有高收益的經濟特性，吸引許多人競相投入養殖，進而帶動了整個海水魚產業的蓬勃發展。但是隨著市場需求的增加，活魚運輸貿易快速拓展，無形中卻加劇了跨界疫病 (trans-boundary diseases) 傳播的風險。如養殖石斑中常見的寄生蟲感染症，新貝尼登蟲 (*Neobenedenia girellae*) 病，已經確認是透過青甘鯪的活苗運輸，由海南、中國、香港引進日本 (Ogawa *et al.*, 1995)。同樣地，較早在新加坡發現的“red grouper reovirus”，也被證實是由印尼傳入 (Chew-Lim *et al.*, 1992)。這些年來，各種新興傳染症無疑是限制石斑魚養殖產業發展的重大瓶頸。而病害中，又以無法用藥物治療的病毒感染最具威脅，如病毒性神經壞死症 (viral nervous necrosis, VNN)，在石斑苗的魚花階段可導致 90% 以上的致死率；而虹彩病毒不僅感染魚苗，也威脅著成魚的養成。這些病毒重挫了亞洲多國的石斑魚養殖。因此，近年來許多科學報告或是研討會紛紛針對疾病防治的健康管理提出有效對策，包括：疫苗開發、診斷與研究、控制疾病的流行病學對策、疾病監控與通報、活魚運輸的管理、健康管理的通用對策等 (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001)。本文以下將針對健康管理與疫苗開發作較詳細的介紹。

石斑魚健康種苗之建立—由健康管理與疾病防除談起

臺灣早年的石斑苗是依賴海域捕捉的天然魚苗，但是柒零年代後期天然魚苗銳減，只好轉而求助於人工培育。經過多年的努力，現今台灣在多種石斑魚的養殖技術已達成「完全養殖」。也就是在人工操作下，從卵育苗至幼魚、成魚，並進一步讓種魚人工交配產卵，進而量化繁殖魚苗。然而在目前集約式培育種苗的生產方式下，環境、餌料、殘食以及疾病問題，讓石斑魚苗的總育苗率不到 1%。而健康魚苗是成功養殖的關鍵，因此，如何提高石斑魚苗的育成率，培育健康種苗以帶動繁殖業之景氣復甦，是當前施政與研究的重要目標。

(一) 健康管理

「預防重於治療」，良好的健康管理不僅可以避免疾病的發生，縱使爆發疫情，可以降低影響與嚴重性，防止傳播與避免復發。

1. 環境管理

良好的水質環境可減少養殖魚所承受的緊迫，故應徹底執行養殖場的衛生管理，如：養殖場環境、孵化池和水源消毒等，可以避免病原侵入養殖場的機會。另外，嚴禁在水源區進行養殖行為，因為病毒可能因此傳播至中下游的其他養殖場或造成河川生態的破壞，而良好的養殖管理將可以防止病原的

水平傳播。

2. 飼育管理

降低操作或環境緊迫因子可加強魚體本身的防禦能力，特別是種魚產卵前或是活魚運輸時，更應該注意疾病預防 (prophylactic)。運送時注意減少溫度波動、選擇適當包裝密度，以及善用麻醉技術，都可以減低運輸操作導致魚隻死亡的損失。例如：在 12 小時的包裝 (packing) 和緩解 (release) 期間，一公升水體最好不要放入超過 129 克的生物質能 (biomass)。另外，現今所謂適當的營養，除了提供動物成長所需，也必然包含了提高抵抗疾病的能力，因此水產動物營養的研究，也開始從早期侷限於改善生長效能、飼料效率和缺乏症的基礎研究，朝向於營養與生理和抗病力間複雜的交互作用。開發飼料添加物，將促進生長或用來治療及控制疾病的產品添加入飼料中來使用，也是飼育管理的重點之一。目前研發中的飼料添加物包括：營養補充劑、消化促進劑、藥物、激素類和免疫增強劑等繁多種類。

3. 預防免疫

針對特定病原施與免疫接種，疫苗是對抗傳染病最有效的方法，但仍必須在良好的健康管理下才能有成效。海水魚類在孵化後極短的時間內就開始攝餌，因此由種魚而來的抗體持續期間可能不長，所以透過種魚的免疫接種而來的親子免疫效果可能不高。另外，必須注意的是，在魚體的免疫器官尚未發育健全前就接觸異物，可能導致免疫寬容現象 (immunotolerance) 而產生反效果。以神經壞死症為例，由於大都爆發在免疫系統尚為健全的仔魚期，因此有學者建議不要太過期待疫苗的效用，反而可以考慮透過母子免疫方式，達到仔魚期的保護效果。

(二) 疾病防除

防止具感受性寄主和病原體的接觸，透過種魚選別阻斷垂直傳播，同時利用水殺菌預防水平傳播。

1. 產卵前之種魚篩選

首先必須進行病毒檢測以去除帶原之種魚。但是病毒分離和聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 檢測在現場施行有其困難度，因此希望能開發更簡便的檢測法。此外，利用偵測種魚體內病毒特異性抗體的量作為指標的方法，也是施行方向之一，雖然抗體陽性魚不代表病原的存在，但是仍不建議選作種魚，因此產卵前之種魚選別仍建議以病毒檢測結果作為依據。另外，石斑產卵種魚的健康管理，包括減少種魚的生殖次數、種魚抗體檢查和病毒檢測、避免激素注射和加溫等產卵誘發操作等皆應注意。

2. 卵的消毒

在哺乳動物中，垂直感染必須是母體將病原傳至子宮內的胎兒才稱之。但是在魚類方面，病原體存在卵內或是附著卵表面的判定困難，因此採用較廣義的解釋，也就是只要是透過卵傳播到孵化仔魚的感染都可稱為垂直傳播，所以卵消毒的效果是值得期待的防治重點。針對神經壞死症病毒的防除，日本已廣泛實施卵消毒的對策，而最近利用臭氧處理過海水來消毒大西洋比目魚卵的有效性也有報導。除了傳統用碘、氯 (50ppm、10 min) 以及臭氧 (0.1ppm、2.5 min) 進行卵消毒外，目前開發以海水殺菌裝置 (氧化劑海水、氧化劑殺菌海水 1) 來除去病毒，達到預防或抑止疫情的效果。日本奄美栽培漁業中心用以上對策 (濃度 0.3-0.5 mg/l 處理黑鮪受精卵 1 分鐘)，已成功克服了神經壞死病毒症。

3. 仔魚飼育期的對策 (防疫、化學療法、適當飼育管理)

仔魚飼育期間無病毒環境的維持是養殖上的一大重點，因此使用殺菌的飼育水為必要措施，再者各種網具最好分開收藏。同時仔稚魚必須隔離飼養，因為仔稚魚對病毒的感受性較高，應避免和寸苗及養成魚共同飼養。此外，有些病原菌 (如比目魚的細菌性腸管白濁症病原細菌或是水產兩段

註：由於海水電解後會產生引起其他物質氧化的氧化劑 (臭氧等的總稱，在此為次氯酸、HBrO)，因此有殺菌的效用 (稱為氧化劑海水)；但是氧化劑殘留，會對仔魚造成影響，因此必須先透過活性炭除去殘留氧化劑後，才可作為飼養水 (稱為氧化劑殺菌海水)。

RNA 病毒) 都有可能混入輪蟲等餌料生物, 使得要完全防止污染源的入侵變成相當困難的事情。細菌污染可以透過藥劑消毒或是使用冷凍生物餌料來改善, 但是對於病毒的污染則仍無有效解決方法。是故現急需開發由生物防治 (biocontrol) 觀念而來的微生物製劑, 取代藥物消毒來生產低污染的健康生物餌料, 或是改以無病原之人工配合飼料餵養。目前已有研究顯示, 利用益生菌 (probiotics) 不僅可以培育出健康輪蟲或橈足類幼生, 作為石斑魚仔魚的初期餌料, 更可以抑制種苗培育池中環境病原菌的數量, 達到減少疾病發生的效果。

4. 健全的檢疫制度

由疫區運送往非疫區的種苗必須嚴格要求提出檢疫證明, 藉以防止種苗運送所造成之傳播, 種苗來歷和運送等相關情報 (供給者或是發送目的地、數量、大小、死亡率等) 必須確實紀錄。此外, 成立保健安全對策, 定期召開魚類防疫對策會議、病害調查、防疫講習會、養殖場巡迴監控和建立魚病情報網路等, 皆為健全檢疫制度中重要一環。

疫苗開發策略—由生物科技談起

疫苗免疫在大規模商業養殖工業中扮演著相當重要的角色, 挪威的鮭魚經驗就是水產疫苗成功的例證。在短短三十年間, 挪威開創了鮭魚養殖王國, 疫苗的普及大幅提高了鮭魚的活存率是產業成功的重要關鍵。目前除了鮭、鱒魚類, 鮡魚 (channel catfish)、鱸魚 (European sea bass)、鯛 (seabream)、青甘鱈 (Japanese amberjack)、鰲魚 (yellowtail)、吳郭魚 (tilapia) 和大西洋鱈魚 (Atlantic cod), 皆已發展有效的商用疫苗。市售的水產疫苗主要是針對細菌性疾病, 只有極少數為病毒疫苗, 然而至今並無寄生蟲疫苗被開發出。隨著醫藥科技的進步, 2006 年的調查結果顯示, 目前核發許可證的水產疫苗已超過 100 種, 疫苗產業在全球水產養殖中的發展已顯現良好的前景。依據 Animal Pharm Report 的統計, 水產疫苗之市場由 1986 年的 100 萬美元, 至

1988 年已增加到 1200 萬美元, 1996 年大量應用於鮭鱒科魚類疾病預防, 市場成長至 3300 萬美金, 而到了 1998 年, 更提高到 4800 萬美金 (約十二億新臺幣); 水產疫苗的年成長率高達 20%, 為極具國際潛力之動物醫藥產品。

水產疫苗的研發策略跟陸上動物幾乎完全相同, 只是必須多增加養殖環境因素的考量, 因此 Grizez and Tan(2005) 針對水產動物提出理想疫苗的條件應包含: (1) 對魚、施用者和消費者都是安全; (2) 具有廣效的病原覆蓋率; (3) 可提供 100% 的保護; (4) 最好是持續整個繁殖週期的長期且持久保護; (5) 方便使用; (6) 適用於不同魚種; (7) 符合成本效益; (8) 容易取得執照或註冊核准上市。其中推廣應用的最大難關在於免疫方式, 因為常見的注射法、浸泡法和噴霧法, 雖然可以誘發良好的免疫應答效果, 但費時、費力且容易造成魚體緊迫。然而混料投餵的經口法雖然是一種理想的使用方法, 但成效比前三者都低且效果差異度大。由早期數種細菌性口服疫苗的實驗結果顯示, 有的疫苗具保護力但效果不佳, 有些甚至完全沒有效果。主要是因為在疫苗被吸收前, 腸胃道酵素會使得這些抗原還未到達目標器官即被破壞殆盡, 無法進一步誘發保護作用, 成為口服疫苗的開發困難點之一 (Hart *et al.*, 1988)。目前已有多種方法可以保護抗原不被破壞, 如: 用微脂體 (liposome) 或褐藻酸微粒 (alginate beads) 包覆、中和胃液分泌、或是利用生物膜 (biofilm) 的形成保護疫苗, 研究結果都有不錯的成效。日前成功大學楊惠郎教授團隊將表現外來抗原的大腸菌, 透過濾食累積於豐年蝦體內, 開發出水產用口服疫苗的技術平台。因為豐年蝦是石斑稚魚會攝食之浮游生物, 以包埋 NNV 基因轉殖細菌的豐年蝦作為口服疫苗, 證實可以保護石斑稚魚對抗神經壞死症病毒的感染。

此外, 考慮廣效的病原覆蓋率, 混合型疫苗, 也就是在同一劑中包含多種疫苗, 更是水產疫苗發展的新趨勢。以大日本製藥的「虹彩病毒·連鎖球

菌混合不活化疫苗「ピケン」商品為例，目前疫苗使用的普及率，在紅甘鰺約 40%、縱帶鰺約 50%。調查顯示這幾年來，抗生素的市場減少約 60%（約 18 億日圓），而疫苗的成長則高達 16 億日圓。最近，共立製藥（株）更研發出 α 溶血性連鎖球菌症、JO-3 型弧菌症、虹彩病毒感染症預防用 3 種混合不活化疫苗「ピシバック 注 3 混」，以搶攻水產動物疫苗這塊大餅。

國際上，目前有 Intervet International（荷蘭）、Novartis Animal Health（瑞士）、Schering-Plough Animal Health（美國）、Pharmaq（挪威）以及 Bayer Animal Health (Bayotek)/Microtek（德國 / 加拿大）等五家跨國動物醫療公司投入全球的水產疫苗產業。日本則大多數使用本國公司所研發的疫苗，另外中國、蘇聯、西班牙和德國也有小規模、自行開發的魚用疫苗。而台灣雖然沒有上市的商用水產疫苗，但是針對石斑魚 NNV 疫苗的研發成果豐碩。除了台灣大學齊肖琪教授研究室的不活化疫苗外，許多學者嘗試以生物技術作為疫苗的研發策略。中央研究院細生所吳金涇研究員團隊則是開發核糖核酸干擾技術（siRNA）作為抗 NNV 病毒的疫苗，而

中山大學林全信教授嘗試將 NNV 的外殼蛋白修飾後組裝為類病毒顆粒，並探討類病毒顆粒在魚體內誘發的免疫功效。還有先前提到的成大團隊利用食物鍊與基因工程技術所開發的魚用口服疫苗技術，在石斑魚稚魚孵化十四天左右就成功免疫，證實在石斑幼苗後期階段（post larvae stage）的免疫預防具有可行性。

結論

健康種苗為提高魚貨品質及產量所必須，是養殖產業發展的必然趨勢。透過良好的健康管理與疾病防疫體系，並配合疫苗來生產健康種苗，除了可以確保降低病害損失，所育成的無抗生素殘留高品質魚貨，更是未來的潮流。近年來，台灣的傳統水產養殖已在科技協助下逐漸轉型，優質種苗生產對擁有技術但地小人稠的台灣而言，將會是最適發展的水產養殖產業。

AgBIO

周信佑 國立臺灣海洋大學 水產養殖學系 教授

參考文獻

1. 周信佑 (2006) 由疾病防除面—談優質石斑種苗生產。優質種苗與水產養殖•專刊XII (行政院農業委員會漁業署補助)，頁77-82。
2. Bondad-Reantaso, M.G., Kanchanakhan, S., and Chinabut, S. (2001) *Review of grouper diseases and health management strategies for groupers and other marine finfishes*. Development of a Regional Research Programme on Grouper Virus Transmission and Vaccine Development (APEC FWG 02/2000) [Report and proceedings]. pp.121-146.
3. Grisez, L. and Tan, Z. (2005) *Vaccine development for Asian aquaculture*. In P. Walker, R. Lester and M.G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V, pp. 483-494. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
4. Hart, S., Wrathmell, A. B., Harris, J. E. and Grayson, T. H. (1988) *Gut immunology in fish: a review*. Dev. Comp. Immunol. 12:453-480.
5. Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E. and Frost, P. (2005) *Vaccines for fish in aquaculture*. Expert Rev. Vaccines 4:89-101.