

IgY口服乳化微粒應用於防治石斑魚重要病毒病之潛力

撰文/周信佑

前言

石斑魚 (*Epinephelus spp.*) 是亞太地區重要的高經濟海水養殖魚類，臺灣石斑魚養殖年產量約 1.8 萬噸，在全球居二，產量僅次於中國大陸，但藉著人工繁殖技術的確立和種苗培育的突破性發展，臺灣石斑養殖的技術享譽國際，魚苗不僅供應國內養殖所需，也出口外銷東南亞及中國大陸，而每年高達 40 億元的產值，也高於中國產的石斑魚類，奠定了「石斑魚王國」的稱號。如此具高經濟收益的石斑魚產業，必然地吸引許多人的競相投入，雖然因此帶動了整個海水魚養殖產業的蓬勃發展，但隨之而來的卻是疾病叢生的問題。這些年來，新興傳染症無疑是限制亞洲各國石斑魚產業發展的重大瓶頸。而各種病害中，又以無法用藥物治療的兩種病毒最具威脅，即是在魚苗階段導致高致死率的神經壞死症病毒 (nervous necrosis virus, NNV)，以及不僅感染魚苗也威脅著成魚養成的石斑虹彩病毒 (grouper iridovirus)。業者們面對目前重挫石斑產業經營與發展的此兩種病毒病，憂心忡忡地提出：「如果再沒有解決對策，臺灣的石斑王國恐會變成石斑「亡」國了」。

石斑魚IgY口服疫苗之開發

針對水產動物傳染病的防治，免疫製劑的研發是有效且具潛力的對策，包括誘發主動免疫反應的疫苗、被動免疫保護的免疫球蛋白（即抗體）以及調節免疫功能的免疫增強劑。挪威鮭魚養殖業因為

疫苗的使用而得以成功復甦是最好例證，透過疫苗研發與應用，現在挪威的鮭魚在用藥上號稱比人類還健康，如此一來，消費者吃的安心，鮭魚的年產量也因此成長了好幾倍。然而石斑魚病毒性疫苗在研發策略上，有兩點考量是相異於鮭魚類。(1) 石斑魚的病毒感染疫情由卵孵化後就出現，持續到寸苗階段都會爆發極高的死亡率。而此時石斑魚苗免疫器官可能尚未發育完全，過早使用疫苗可能會引起免疫寬容 (immune tolerance) 的反效果。根據 Kato 等 (2004) 研究結果，石斑魚苗免疫器官 (胸線、腎臟、脾臟) 的發育分別在孵化後 12、1 及 6 天，而在這些免疫器官 (胸線、腎臟、脾臟) 中觀察到小淋巴球出現的時間點則是在孵化後第 21、30 及 33 天。因此最好選擇具被動保護的免疫球蛋白作為免疫製劑。(2) 石斑魚苗對外力操作極為敏感，可能因免疫注射而導致損傷、畸形或死亡，所以基於現場使用考量，口服方式是石斑魚最理想的疫苗劑型。針對以上兩點，海洋大學研究團隊開發了抗病毒卵黃免疫球蛋白 (immunoglobulin of egg yolk, IgY) 的口服乳化微粒。

IgY 技術是現今尖端生物科技中快速發展且備受重視的創新科技，有許多科學研究、診斷及治療的案例，加上應用和經濟面的考量，適用對象已由人類、畜產推廣到水產動物。使用家禽類作為生產抗體的免疫對象有許多優點，其中最首要莫屬非侵入性的抗體生產方式。因為 IgY 的來源是免疫家禽所產蛋的蛋黃，不需要採取免疫動物的血清

以獲取抗體，不僅沒有免疫動物緊迫的問題，也避免了哺乳動物血清中帶有愛滋病、狂犬病、狂牛症或口蹄疫等病原的困擾。另外比較 IgY 和 IgG 抗體的產能，每隻雞每年的 IgY 產量約為 17-35g，其中 2-10% 為抗原特異性 (Schade *et al.*, 1994)，因此每隻雞年產專一性抗體的量為 800-4,000mg。相較於兔子年產 5,200mg 的 IgG 中只有 5% 具抗原專一性抗體 (Gottstein and Hemmeler, 1985)，IgY 的年產量是兔血清 IgG 的 18 倍 (Tini *et al.*, 2002)。同時哺乳動物血清中有多種抗體，而家禽蛋黃中主要只有 IgY 一種，分離與純化技術簡便許多。綜合以上優點，IgY 可謂是優質、安全且經濟的免疫製劑，而且已經成功地應用在多種病原的防治上，如：添加抗 *Streptococcus mutans* IgY 的漱口水可以有效預防齲齒，另抗胃幽門螺旋桿菌 IgY 對該菌所引發的胃潰瘍也有良好的實用案例。同樣在水產動物方面，針對日本鰻的愛德華氏症 (Edwardsiellosis)、虹鱒的 *Yersinia ruckeri* 感染以及對蝦類的白點症病毒，IgY 抗體都有良好的保護效果。只是，如何加強 IgY 抗體在經口免疫過程中的穩定性，是 IgY 技術跨入實用領域的新挑戰。

回顧口服製劑的開發，早期只注意藥物是否會在胃腸道中崩解，並不關注藥物引起的副作用、安全性及輸送等問題，到最近隨著科技的進步，研發重點逐漸轉到如何讓藥物在適當的時機及部位釋出，以提升藥物療效，減少不良反應之發生等方向。其中乳化型給藥系統將溶質（藥物、營養物或疫苗等）包覆於油滴中，在環境改變時，溶質可經由擴散、滲透或油滴破裂方式被釋出，所以乳化產物不僅可以被有效保護，同時也可以透過調控而延長物質釋放時間，進而提高吸收效率。而所謂乳化包埋則是利用界面活性劑（即乳化劑）所具有的兩性分子特性，將兩種或以上不互溶的液體（通常是水和油），經均質攪拌後，使其中之一以比較小的液滴存在於另一液體中，一般以兩階段乳化法製作多重相乳化物 (multiple emulsion)，幾乎都是 w/o/w

（水包油包水）和 o/w/o（油包水包油）兩種型式。目前相關技術已廣用於化粧品、動物製藥與分離科學研究 (Hudayberdiyev *et al.* 1997; Silva-Cunha *et al.* 1998)。

本實驗室以多重相乳化包埋技術 IgY 製作成水產用口服免疫製劑，此技術已經獲得中華民國發明專利核准（專利號 I341177）。該成果是和農委會水產試驗所海水水繁養殖研究中心合作，製作對抗上述兩種石斑魚重要病毒的 IgY 蛋粉，並以乳化包埋製成抗石斑神經壞死症病毒以及抗石斑虹彩病毒兩種蛋粉 IgY 口服乳化微粒。製成品先經過形成率、安定性、人工胃酸耐受性等物性分析後，進一步確認可以通過消化道胃，並在腸上皮被吸收，之後進行口服投餵石斑魚苗的被動保護效果評估。根據魚苗大小投餵含抗病毒蛋粉乳化微粒的飼料或滋養餌料，連續投餵三天後，進行病毒腹腔注射的攻擊試驗，以相對存活率（相較於未免疫組在病毒攻擊後的存活率）做為保護效果的評量方式。在抗石斑神經壞死症病毒蛋粉的保護實驗中，本研究選擇以豐年蝦作為口服傳遞載體，豐年蝦先以乳化微粒滋養一小時後再投餵給石斑魚苗，結果抗病毒蛋粉滋養豐年蝦組的存活率明顯高於空白蛋粉組（取自沒有免疫雞隻的蛋黃）或未免疫組，相對存活率最高可達 59%。投餵結束後 10 天的攻擊試驗結果，餵食抗病毒蛋粉滋養豐年蝦組的相對存活率仍有 23%。進一步以 1,000 尾石斑苗為一組，在養殖現場進行抗石斑神經壞死症病毒蛋粉乳化微粒的投餵試驗，結果口服免疫結束後 5 天，免疫組魚苗體內仍可測得抗體的存在。另一方面，在進行抗石斑虹彩病毒蛋粉的保護實驗中，配製了 6 組 IgY 蛋粉濕性飼料，分別為包埋 IgY 蛋粉組、未包埋 IgY 蛋粉組、未包埋 6 倍劑量 IgY 蛋粉組及各組未含有抗體之空白蛋粉對照組。在連續投餵 3 天後，於第 1、5、10 天進行病毒腹腔注射攻擊試驗。同樣，投餵抗病毒蛋粉組的存活率明顯高於空白蛋粉組或未免疫組，且經乳化包埋 IgY 蛋粉飼料的保護效果甚至高於未

包埋 6 倍劑量的 IgY 蛋粉組。免疫後第 5 天的病毒攻擊實驗結果，包埋 IgY 蛋粉組的相對存活率高達 94.5%，而未包埋 6 倍 IgY 蛋粉組的相對存活率為 68.8%，而未包埋 IgY 蛋粉組則完全喪失保護效力。綜合以上結果，發展抗病毒 IgY 蛋粉作為石斑魚苗對抗神經壞死症病毒以及虹彩病毒感染是可行的對策，尤其透過多重相乳化包埋技術強化經口免疫的保護效果，開發 IgY 口服乳化微粒並應用於防治石斑魚重要病毒病之潛力可期。

結論

莫拉克八八風災重創臺灣南部多處石斑養殖重鎮後，政府提出石斑魚產值倍增計畫，鼓勵學界透

過技術平台的建立與輔導，協助產業復甦，同時積極推動開放活魚運搬船直航大陸地區，並將石斑魚列入兩岸簽署 ECFA 的早收清單，一連串的政策帶動著石斑魚養殖與出口業一片生機蓬勃。但是病毒仍虎視眈眈、病害問題就像是產業的未爆彈一樣，若無妥善因應對策，石斑產業的未來仍讓人感到憂心。近年來 IgY 技術與水產疫苗研發都有突破性的進展，兩者雙管齊下是對抗病毒病最有效的策略。如果能儘快落實產業並藉助透過量產降低生產成本，將有助於提升國際的競爭力，相信臺灣的石斑魚產業會有美好的遠景。

AgBIO

周信佑 國立臺灣海洋大學 水產養殖學系 教授
國立臺灣海洋大學 海洋生物科技及環境生態中心
教授

參考文獻

- 1、Hudayberdiyev, H., Öner, F. and Hincal, A.A. (1997) *Oral multiple W/O/W emulsion formulations for recombinant human insulin*. Journal of Controlled Release 48:346-347.
- 2、Gottstein, B. and Hemmeler, E. (1985) *Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis*. Zeitschrift für Parasitenkunde 71:273-276.
- 3、Kato, K., Ishimaru, K., Sawad, Y., Mutsuro, J., Miyashita, S., Murata, O. and Kumai, H. (2004) *Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory*. Fisheries science 70:1061-1069.
- 4、Schade, R., Burger, W., Schöneberg, T., Schniering, A., Schwarzkopf, C., Hlinak, A. and Kobilke, H. (1994) *Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies*. ALTEX : Alternativen zu Tierexperimenten 11:75-84.
- 5、Silva-Cunha, A., Chéron, M. J., Grossiord, M., Puisieux, F. and Seiller, M. (1998) *W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral administration to normal and diabetic rats*. International Journal of Pharmaceutics 169:33-44.
- 6、Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D. and Gassmann, M. (2002) *Generation and application of chicken egg-yolk antibodies*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 131, 569-574.