

## 從研發到上市

# 石斑魚虹彩病毒不活化疫苗之開發歷程

撰文/黃淑敏

### 前言

全球水產養殖產量之九成以上位於亞洲，依據聯合國糧農組織 (FAO) 2012-2021 年的漁業產量預測，全世界對於水產養殖之需求，預計仍有 10-15% 之增長，水產養殖將依然是最快速增長的動物源性食品生產領域之一，尤其是亞洲地區更以中國大陸、台灣、東南亞國家、日本及南韓為主要生產國。全球養殖石斑魚產量已高達 7.5 萬噸，其中，中國年產量為 4.5 萬噸（占全世界總產量之 60%）；台灣次之，平均為 1.7 萬噸（占全世界總產量之 23%）；再次之為馬來西亞、印尼及越南等國家 (FAO 2008)。因全世界對食肉性魚類的需求增加，在捕撈漁業產量有限增長之限制下，相對帶動魚粉、魚油及飼料等價格長期上升及生產成本增加 (FAO 2012)。反觀現階段，台灣石斑魚養殖所面臨的生產成本增加，包含飼料成本上漲、魚苗育成率低、水電費增加、及為取得較佳水源而額外增加的設備成本等，因此，現今養殖場內魚群的育成率高低，將會成為是能否於國際產業競爭壓力下存活的重要關鍵。

### 目前台灣石斑魚養殖現況

#### （一）台灣優良的養殖環境與技術

台灣具有優良的天然環境及優越的氣候條件，

非常適合石斑魚之養殖，又接近於主要消費市場 - 中國的特殊地理位置，運輸成本相較低廉於東南亞國家，因此具有國際市場競爭力之優勢。由漁業署官方統計數據保守顯示，台灣石斑魚年產量為 12,000-18,000 噸，年產值為 25-50 億，而石斑魚苗之年產量平均為 4,000 萬尾，年產值近 5-6 億元，產量九成以上是以活魚外銷運輸至中國及香港，造就亮麗出口成績，而幕後主角則為一群養殖技術日益求新的石斑魚養殖戶。

#### （二）石斑魚養殖生產模式與疾病傳播之關係

台灣石斑魚養殖生產模式，主要區分為種苗期、稚魚期（白身苗）、吋苗期（兩吋 - 三吋）及成魚期。台灣石斑魚之主要生產區，分別集中於台南、高雄及屏東等地區，除成魚期之外，每階段之蓄養期很短。自種魚生產魚卵後，魚卵即開始進行商業買賣，在稚魚階段，其體內免疫系統尚未發育完全，隨著不斷進行之商業交易行為迫使魚苗遭受到運輸、重新適應水質及養殖環境等外在緊迫壓力下，疾病的爆發是不可避免的。

#### （三）石斑魚養殖環境類型與疾病發生

台灣石斑魚的養殖環境仍以直接引進海水，進行出入口流水式養殖方式為大宗，成魚池大都以室

外土塘養殖為主，吋苗場則以室內水泥硬池，白身苗場則以土塘或室內硬池等為大多數。近年來為克服病毒性疾病的水平傳播，採用全室內或封閉式循環水養殖亦有少量養殖戶使用。就養殖期長短而論，青斑育成期，正常於飼養後 10 個月至 1 年後則可達到上市體型，其養殖技術在台灣發展亦較為成熟，一般於吋苗場飼養至 3 吋或以上即可直接放入成魚池進行成魚期的養成；相同的，龍膽石斑因飼養期長達 3 年，因此所承受養殖風險較高，包含抗病性、天災因素、資金成本及養殖土地面積需求等，所以在養殖過程中則需要轉過數手來進行風險性的分攤。目前普遍成魚場的養殖環境中，並無任何有效的隔離與防疫設施，進行新進魚群的隔離與檢疫，因此，疾病的發生大都發生於魚苗交易後 1 個月內，為疾病爆發高峰期。

## 石斑魚病毒性疾病發生概況

### (一) 石斑魚病毒性疾病肆虐

目前石斑魚苗養殖業的成長受限於石斑虹彩病毒 (Grouper Iridovirus, GIV) 及神經壞死病毒 (Nervous Necrosis Virus, NNV)，損失高達八成。此兩種病毒皆會造成二十餘種之魚類感染，其中 NNV 好發於稚魚階段，而虹彩病毒則好發於吋苗期及成魚初期。目前虹彩病毒科由 5 個病毒屬所組成，分別為 *Iridovirus*、*Chloriridovirus*、*Ranavirus*、*Megalocystivirus* 及 *Lymphocystivirus*，為一正二十面體 DNA 病毒，已有報告指出可感染超過 20 種以上之魚種。*Iridovirus* 及 *Chloriridovirus* 主要感染昆蟲及無脊椎動物；*Megalocystivirus* 及 *Lymphocystivirus* 主要感染魚類；*Ranavirus* 主要造成魚類、爬蟲類及兩棲類嚴重的全身性感染，其中 *Ranavirus* 及 *Megalocystivirus* 會造成魚類高致死率並引起巨大損失，而 *Lymphocystivirus* 主要引起魚類上皮腫瘤，影響魚體外觀，致死率並不高。

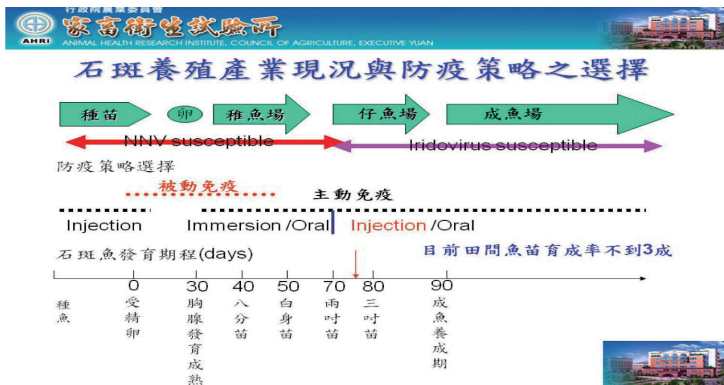
### (二) 台灣田間流行虹彩病毒種類

經 9 年持續監控田間分離的虹彩病毒分離株中，發現主要有 3 個基因型在田間流行，分別為石斑虹彩病毒 (grouper iridovirus, GIV)；嘉鱾魚虹彩病毒 (red sea bream iridovirus, RSIV) 及魚類傳染性脾臟及腎臟壞死虹彩病毒 (infectious spleen and kidney necrosis iridovirus, ISKNV)(Huang *et al.*, 2011)。在台灣重要經濟魚種中曾發現有虹彩病毒感染，共計有石斑、龍膽石斑、虎斑、紅魚、金目鱸、七星鱸、金僧、金鐘魚、四絲馬鮫(午仔)、花身雞魚、台拉燕魚(樹葉)、紅衫、筍殼魚、日本鰻、吳郭魚、海鱺與虱目魚等十七種魚種以上，對養殖魚種侵害甚鉅。

### 防疫策略之選定

石斑魚防疫策略之選擇首先須考慮石斑魚的發育過程，自魚卵孵化後，魚體需經完全變態後再逐漸發育構成魚體之組織、臟器及系統，其中呼吸、消化、循環、骨骼與肌肉及免疫系統之發育健全，與防疫策略選用成敗與否息息相關，尤其是免疫系統的發育。一般評估，硬骨魚類免疫系統是否發育成熟的次序分別為：最早期發育為胸腺、其次為腎臟、最後成熟為脾臟 (Uribe *et al.*, 2011)。許多文獻亦明確指出，在淡水魚的魚種，最早被測出具有 B-淋巴球及 IgM 免疫球蛋白之存在的魚體，長度大小為 20-30mm；而海水魚的魚種會比淡水魚更晚出現 (Chantanachookhin *et al.*, 1991; Magnadottir *et al.*, 2005)。因此，若相對於石斑魚的發育日齡而言，以任何之主動免疫策略(疫苗給予)亦適用於魚體長度約為 8 分苗或以上使用，始能發揮其免疫成效。在免疫器官發育成熟之前，以被動免疫方式(外源性抗體給予 :IgY, IgG)亦為另一種防疫策略之選擇(圖一)。

GIV 於臨床的主要好發日齡為吋苗期，成魚期 GIV 的爆發大多合併其他細菌性疾病之感染，疾病之預防應從稚魚後期至仔魚期即進行主動性免疫策



資料來源：行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

圖一 行政院農業委員會家畜衛生試驗所

略，此免疫效力能在具有疾病感受性之日齡內，長期維持住免疫保護效果，以達到魚體之群體免疫力進而控制病毒之爆發。GIV 之傳播途徑以水平傳播為主，因此，只要控制好魚體之群體免疫力，即能發揮其保護效果；GIV 目前尚未有自種魚而來之垂直性傳播途徑被證實，因此，種魚之免疫途徑尚未被評估使用。

魚體口器發育及體型大小，會限制疫苗之劑型及施予的方法。一般而言，石斑魚小於兩吋之魚隻採腹腔注射之死亡率較高，係因各魚種腹腔內徑深度不同。青斑魚種因脊髓下彎角度大，致使其安全注射區較龍膽石斑為窄，因此小於兩吋之魚隻建議以浸潤式劑型給予較為安全；兩吋以上之魚體即可建議以注射方式進行免疫。若配合台灣目前石斑魚產業分工，於吋苗期進行疾病的防疫處置，無論就石斑魚本身的免疫系統發育成熟度及飼養環境設備皆是最適宜的階段。

## 魚類疫苗研發前之考慮要素

魚類疫苗研發前須考慮的重要因素包括：第一，選擇目標魚種：以台灣目前養殖之大宗魚類種別為主要考量，前期規劃以青斑為主、後期加入龍膽石斑；第二，疫苗之製程：因疫苗製程會直接反應於

疫苗成本及施予方式，疫苗製程越繁雜其相對生產成本愈高；第三，選定疫苗生產之種毒株：篩選具有免疫原性之疫苗株，及具有廣泛宿主感受性之種毒株；第四，疫苗安全性：選定對人類及魚類皆具安全性之配方；第五，疫苗之穩定性及效力：測試疫苗之效力及穩定性，並建立一套有效評估疫苗效力之方法，最後通過田間試驗。疫苗研發的方向與疾病控制方法，將決定預期之生物製劑是否能有效應用於田間，並達到實質經濟效益；水生動物疫苗產業為近年來嶄新發展之新產業類別，如何持續穩定發展，關鍵因素在於政府政策導向、養殖業者市場需求以及消費者對食品安全的關注和重視，是推動行業快速成長的根本動力。

## 石斑虹彩病毒不活化疫苗之研發歷程

本疫苗自 94 年開始進行疫苗研發的相關試驗，從種毒株篩選、疫苗效力評估方法、疫苗安全性評估方法、疫苗配方組成、疫苗量產生產至田間試驗評估，共經歷 7 年研發期程。研發初期，實驗室內評估試驗委請農委會水試所 - 東港生技中心張正芳博士協助動物評估試驗及初步疫苗效力評估，雖確定疫苗效力，其後卻於後續試驗發現疫苗安定性不足，而重新檢討疫苗的成分與製程。歷經為期一年重新修正，成功克服疫苗乳化安定性問題，即開始找尋自願配合之疫苗田間試驗場，然經歷半年卻找不到有願意配合的養殖戶。其後台灣南部不幸遭遇 88 風災，一夕之間重創石斑魚養殖業，最後在屏東縣防治所徐榮彬所長引見，找到位於屏東的青斑田間試驗場，半年後另一位於台南場的龍膽石斑養殖業者，亦自願加入疫苗的田間試驗，遂能完成第 1 年的田間試驗。經過一年的評估與監控，獲得田間試驗場的效益肯定，進而於 98 年底提出疫苗的取證之審查，再經 99 及 100 年 2 次田間試驗的評估，終於 100 年 11 月 30 日通過審查而取得製造許可證，成為國內第 1 項通過核可的水生動物用疫苗產品（圖二）。



資料來源：行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

圖二 石斑魚虹彩病毒不活化疫苗

## 疫苗田間試驗成效評估

### (一) 注射安全性評估結果

後於台灣主要石斑魚產區評估此疫苗，並於青斑及龍膽石斑等數場進行石斑魚虹彩病毒不活化疫苗田間試驗。免疫選取約 10 克大小健康石斑魚苗，以腹腔注射第 1 劑量後，間隔 14 天再補強接種第 2 劑，而後於免疫後 3 及 6 個月，自田間試驗場購回魚隻進行效力試驗及疫苗代謝性評估。另於田間實驗期間，觀察各組之存活率、注射安全性、體重與體長之生長情形，以評估疫苗使用後對經濟效益之影響。在注射安全性評估結果顯示，田間養殖場已普遍被 NNV、GIV 及 RSIV 污染，而感染帶原中的魚隻，其疫苗注射過程中的死亡率 (1.7%-0.6%) 較高於陰性未帶原的魚隻 (0-0.03%)；另外，操作人員對於注射的熟稔度會隨經驗累積，而將死亡率從第 1 場 (1.7%) 降低至 (0.1%)，且注射速度越來越快。由此可知，本疫苗使用於 10 克以上之石斑魚養殖場，其安全性是無虞的 (圖三)。



資料來源：行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

圖三 石斑魚苗手動注射

### (二) 魚群存活率評估結果

以海水出入流水式之青斑養殖場試驗為例，於 4 年期間試驗 4 批疫苗，每批次使用相同面積魚塢作養殖，一池施打疫苗，一池做對照用，兩池的魚苗、飼養管理、投料及水質等條件一致無差異。監控使用疫苗 1 年後，最終養成育成率成效發現，第 1 批次使用疫苗育成率 7 成 5，對照組 5 成；第 2 批次使用疫苗育成率 7 成 7，對照組 6 成；第 3 批次使用疫苗育成率 7 成 7，對照組 5 成；第 4 批次養成銷售中，由歷年使用疫苗評估結果發現，本疫苗使用於青斑場能增加 2-3 成的存活率。另以海水出入流水式之龍膽石斑養殖場 3 場試驗為例，於免疫後 6 個月，3 場育成率分別為 8 成、9 成及 9 成 5，飼養過程中魚隻穩定正常攝餌，除了育成率提高 3-5 成之外，其體重增重亦明顯較以往經驗有差異，以 2 月份 8 公分龍膽石斑苗，經過疫苗注射後 6 個月養成，已有 80% 以上的龍膽石斑長至 25-35 公分。

### (三) 魚群成長速度加快

以循環水養殖龍膽石斑為例，雖發現本疫苗之實驗組與對照組之存活率皆為 100%，但其實驗組

之體重增重情形極顯著優於對照組。以免疫後 9 個月為例，免疫 GIV 組平均體重約 1,108.5 克（身長 40 公分），對照組為 625.2 克（身長 32 公分），若以龍膽交易以體長公分計算其成交價格（1 公分 20 元計），則實驗組之增長情形（8 公分），每尾增加 160 元收入，以 1 萬尾計可以幫助魚戶實際增加約新台幣 160 萬元之收入。

#### （四）疫苗提升育成率2-3成具實質效益

由田間試驗結果顯示，本疫苗於青斑及龍膽石斑皆獲得有效之保護效果，除了魚隻之存活率顯著優於對照組 2-3 成外，施打本疫苗之魚隻，其體重增重皆優於未施打者。換算疫苗使用效益，青斑之免疫成效為 75%，對照組之育成率為 50%，以飼養 1 萬尾計並換算其市價以 200 元 / 公斤計，則為魚戶增加新台幣約 50 萬元實質收入。因此，以疫苗策略來控制疾病，除了明確降低疾病死亡率外，並能實際增加魚戶之實質收益。

#### 田間養殖防疫策略觀念之建立

目前本所已取得許可證之注射型虹彩病毒不活化疫苗，主要解決吋苗期（兩吋 - 三吋）至成魚期之虹彩病毒感染問題，預期能提供增加 2-3 成之育成率。在養殖場內，以疫苗免疫最主要的好處乃是能降低疾病死亡率，並減少其它不當藥物及抗生素之使用機會。除了可降低生產成本外，亦能符合消費者對魚類產品衛生安全日趨重視之期待，並減緩海洋魚類資源過度捕撈之生態衝擊。在北美及歐洲國家，以疫苗來控制水生動物之疾病，已經變成生產過程的必要標準工作程序。以挪威的鮭魚養殖為例，1990 年未使用疫苗前，每公斤鮭魚之養成平均需要 500mg 之抗生素，但自 1992 年使用疫苗來對抗細菌性疾病後，其抗生素之用量降至接近於零，而產出量卻增加 6 倍 (Sommerset *et al.*, 2005)，加上政府積極推動產業之整合，遂能讓挪威的鮭魚養殖業產量高占全球鮭魚養殖業的 56%，成為全球最大的鮭魚養殖國。

魚類的疫苗之使用是以「預防」為前提的防疫觀念，當魚隻健康已經出現警訊，如進食量減少、異常體色、不正常泳姿、異常的驚嚇狀或在發病死亡中之魚體，皆不適宜進行魚類疫苗之免疫。石斑魚的免疫系統於孵化後 26-41 天才真正發育成熟 (Lin *et al.*, 2008)，因此，所有以主動免疫為策略之免疫方法須於免疫系統發育健全後使用，才能有效地展現其真正防疫效果。然而，魚類疫苗劑型的選用必須考慮魚隻發育過程，就石斑魚而言，體長小於 6 公分或體重小於 3 克則不建議使用注射型疫苗，可選擇使用其他口服或浸潤劑型方式給予。石斑魚的疫苗注射其困難度並不高，但需要操作熟稔度，一般養殖戶經過二次的免疫注射經驗訓練後，大都能自行進行疫苗注射操作；另亦有專業網工注射隊能為已下土塘池的石斑魚進行疫苗注射（圖四）；或以石斑魚自動疫苗注射機來進行大規模的疫苗注射工作，以節省操作時間與人力（圖五）。最後，台灣以疫苗控制魚類疾病之防疫及生產觀念皆較不及國外，如北歐及日本等國家，相關的注射配套作法及法規規定尚未定位，一般魚戶對於新的防疫政策採取觀望態度實能理解，因此，唯有不斷執行防疫觀念再教育及宣導，才能達到政府與漁戶互助及雙贏的局勢。



資料來源：行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

圖四 專業網工疫苗注射隊



資料來源：行政院農業委員會家畜衛生試驗所。

圖五 石斑魚自動疫苗注射機

## 台灣未來石斑魚產業面臨之問題與挑戰

台灣的石斑魚產業結構分布細密，在各階段養殖生產鏈之蓄養期很短的情況下，非常不利於疫病之控制。因此，需配合現階段的產業分工，選擇一種有效、安全及方便之免疫策略，直接切入目前台灣石斑魚養殖產業各時期分段，讓各階段先有穩定育成率之後，再連接由其上、下游之養殖戶形成產業鏈，由生產線再擴充其生產量形成具有穩定產量之產業，加速產業生產鏈供應整合。並以生產高品質、高產量及高安全之優良水產品為概念，搶占全球石斑魚銷售市場，永續扶植台灣石斑魚養殖之國際競爭力。

AgBIO

黃淑敏 行政院農業委員會 家畜衛生試驗所 助理研究員

## 參考文獻

1. 2012年世界漁業和水產養殖狀況 (2012) Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization (FAO)。
2. Huang S. M., Tu C., Tseng C. H., Huang C. C. Chou C. C., Kuo H. C., Chang S. K. (2011) *Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001–2009*. Arch Virol, 156:1505–1515.
3. Uribe C., Folch H., Enriquez R., Moran G. (2011) *Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review*. Veterinarni Medicina, 10: 486–503.
4. Chantanachookhin C, Seikai T, Tanaka M. (1991) *Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish*. Aquaculture, 10: 143–155.
5. Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA. (2005) *Ontogeny of humoral immune parameters in fish*. Fish and Shellfish Immunology, 19:429–439.
6. Lin H. Y., Lin H. T., Lopez C., Chen T. Y., Chen M. S. & Yang H. L. (2008) *A comparison of the expression of immunity-related rag 1 and ikaros genes with histogenesis of the thymus in Epinephelus malabaricus (Bloch & Schneider)*. Aquaculture Research, 39: 252-262.
7. Sommerset I., Krossoy B., Biering E., and Frost P. (2005) Expert Rev. Vaccine 4: 89-101.
8. 行政院農委會漁業署統計年報，From <http://www.fa.gov.tw/cht/PublicationsFishYear/index.aspx>