

石斑魚浸泡式神經壞死病毒疫苗的開發與應用

撰文/蓋玉軒·齊肖琪

臺灣石斑魚養殖

臺灣水產養殖曾以草蝦及養鰻王國名聞國際，擁有相當豐富的產業基礎，並與日本、挪威同列為世界三大水產養殖技術領先國家。近年來因捕撈漁獲量下降，養殖魚逐漸成為市場主流。從民國 86 年起，行政院農業委員會推動臺灣成為亞太種苗中心後，更積極參與各大經濟貿易協定，為我國農漁產品打開出路。

石斑魚養殖是近年來臺灣最重要的海水養殖魚種，本省石斑魚養殖種類中，最普遍的是點帶石斑 (*Epinephelus coioides*)，再者就是高經濟價值的龍膽石斑 (*Epinephelus lanceolatus*)，以及新興的雜交石斑 (如龍虎斑等)。石斑魚是臺灣宴客及喜宴上不可或缺的高級魚種，同時也是重要的水產品出口項目，雖然近年價格起伏較大，但積極投入產業的公司與個體養殖戶依然相當踴躍。傳統石斑魚養殖分工精細，由種魚場、孵化場、吋苗場、至養成場，每個階段皆採高密度集約式養殖，一旦管理不當加上傳染性疾病爆發，就會造成養殖石斑魚的大量死亡。

魚類神經壞死症病毒

臺灣石斑魚苗養殖場，每年都有病毒性疾病爆發，主要病原有兩種，一種是會嚴重危害早期石斑苗的神經壞死症病毒 (nervous necrosis virus, NNV)，另一種會危害中後期石斑苗及幼魚的虹彩

病毒 (iridoviruses)。

神經壞死症病毒主要攻擊石斑魚的中樞神經系統，會造成腦及視網膜嚴重空泡化，被感染的幼苗會在兩週內引起高達 80-100% 的死亡率 (Chi *et al.*, 1997, Munday *et al.*, 2002)。除了幼苗，體重一公斤左右的龍膽石斑亦常有疫情傳出，受感染後存活下來的魚隻會變成 NNV 的帶原魚，成為傳播 NNV 的潛在危險因子。因此，控制神經壞死症病毒的傳染與擴散可降低石斑養殖的風險，進而降低養殖成本，增加養殖利潤。

石斑魚養殖成功與否，最關鍵的因素為魚苗的品質，因此，發展具有抵抗神經壞死症病毒的魚苗則為石斑繁殖課題中重要的關鍵。

神經壞死症病毒的傳染途徑包括了垂直與水平感染。垂直感染是由帶原親魚藉由帶有病毒的生殖液傳染給剛孵化的魚苗。種魚在生殖季節因多次催熟所受的緊迫，使其體內免疫力逐漸下降而導致病毒量大增，故垂直傳染機會也就伴隨著生殖次數的增加而提高。根據目前研究結果顯示，垂直感染可藉由種魚接種 NNV 疫苗，誘發中和抗體的產生，降低或清除種魚體內的病毒，達到阻斷魚卵受到垂直感染的威脅 (Kai *et al.*, 2010)。而水平感染的來源很多，主要包括帶有病毒的水源 (體)、所使用的餌料生物，以及帶原魚與健康魚的共養等。若要預防水平感染，則需要好的環境監控與消毒流程，對於養殖場有一定的難度。

神經壞死症病毒疫苗的發展現況

目前大多數商用水產疫苗皆為不活化疫苗，因為容易製備、保護效果良好、安全性高、免疫過後的魚隻不易成為帶原魚，也不會在後續養殖過程中釋放出病毒。而重組蛋白疫苗雖然容易大量生產，但基因改造食品 (genetically modified food, GM Food) 或生物製劑在新藥審查過程中通過的難度較高，所以不活化疫苗仍是目前的首選。

好的疫苗，首在病毒抗原性保存要好，且能誘發免疫魚產生高中和抗體力價。本實驗室測試了幾種細胞株及 NNV 分離株，並測試了幾種不活化病毒的藥劑與條件後，建立了最佳不活化神經壞死病毒疫苗的製備方法 (Kai *et al.*, 2008)，並制定了最適免疫策略，可分別應用於種魚、魚苗及幼魚三階段，以達到阻斷垂直感染與水平感染的目的。目前全球市面上只有日本注射型不活化 NNV 疫苗通過日本的新藥認證，我國雖然有研發單位已完成 NNV 疫苗的製備方法與免疫策略，但仍需等新藥證照的審查過程完成後，才能推廣給國內的養殖戶使用。

浸泡式疫苗簡介

浸泡式疫苗是將疫苗均勻散佈在水中，或直接噴灑在魚體上，使魚體能藉由皮膚、鰓、側線、及消化道等途徑進入魚體 (Nakanishi *et al.*, 2002)。浸泡法免疫的對象都是年齡較小的魚苗或幼魚，其優點在於能夠提早給予疫苗，並一次可免疫大量的魚隻，且浸泡造成的緊迫比注射疫苗小。施用浸泡式免疫需考慮下列幾點因素：

(一) 疫苗有效濃度及浸泡時間長短

原則上疫苗的濃度愈高，所需浸泡的時間越短，然而疫苗的稀釋倍率也有其限度，當疫苗未能達到最低有效濃度時，即使浸泡時間再長，也不會提高抗原吸收量及誘發保護效果。

(二) 疫苗顆粒大小及可溶性

一般將疫苗分作為可溶性及顆粒性，完整的病

原顆粒必需經由細胞的吞噬而進入魚體，若是可溶性的物質，可藉由細胞間的空隙進入魚體中。神經壞死症病毒的顆粒大小約為直徑約 25- 34 nm，是非常小型的抗原，有利於魚隻浸泡免疫時的吸收。

(三) 魚隻種類與大小

根據本實驗室的試驗結果，發現金目鱸苗與點帶石斑魚苗在不同時期感染 NNV 的模式不同 (Wu *et al.*, 2013)，因此在製訂免疫策略與條件時，需要考慮魚種與魚隻大小，才能發揮疫苗最大的效用。

(四) 環境因子

包括外在緊迫因子 (stress)、疫苗溶液的滲透壓、pH 值、水溫等等，都會影響到浸泡式疫苗的使用效果。

上述幾項因素中，最重要的因子是疫苗有效濃度及浸泡時間長短，在考量成本因素下，疫苗濃度越低越好，實用上，浸泡時間越短越好。為了能降低浸泡濃度及時間，除了直接浸泡法外，還有高張滲透法 (hyperosmotic immersion)、高壓噴灑法 (spray)，以及利用多孔穿刺的工具在魚體表面製造出微小傷口後，再進行浸泡免疫，以減少疫苗使用量並達到好的保護效果。

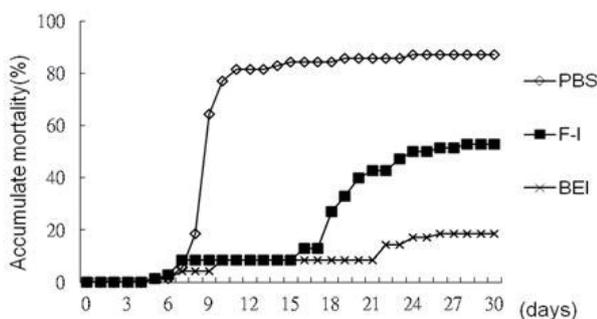
神經壞死症病毒浸泡式疫苗

不活化疫苗的效果與成本取決於細胞株複製病毒的效率，以及病毒株的病原性良好與否，要逐年追蹤與保存，以確保疫苗能抵抗流行中的病毒感染。挑選病毒株及細胞株的工作需要經年累積的成果才能達成，過程繁複，目前已有多種細胞株可用來複製 NNV。本實驗室挑選出的神經壞死病毒株 HGNNV，以 GF-1 細胞株 (Chi *et al.*, 1999) 複製，病毒力價高達 10^{11} TCID₅₀ ml⁻¹，可大幅降低疫苗的製造成本。實驗結果顯示，以二乙醯亞胺 (binary ethylenimine, BEI) 當作不活化藥劑，對於 NNV 的抗原保留性及誘發免疫魚的保護效果皆優於以福馬林 (formalin) 當作不活化藥劑 (Kai and Chi, 2008)。

浸泡免疫時，當水體中 NNV 濃度為 1×10^7 TCID₅₀/ml，浸泡一小時，一個月後將免疫組魚苗與對照組魚苗進行 NNV 浸泡攻毒，則免疫組魚苗的累積死亡率可降到 18%，對照組魚苗死亡率仍高達 87%，免疫組魚的相對存活率 (relative percentage of survival, RPS) 為 79 (圖一)， $RPS = [1 - (\text{免疫魚的死亡率} / \text{對照組魚的死亡率})] \times 100$ 。

奈米包埋的NNV不活化疫苗

奈米包埋的 NNV 不活化疫苗是利用含有硬脂酸成份的包埋劑與 NNV 疫苗充份混合後，再經由小孔徑噴嘴所製成的疫苗。經實驗結果顯示，若將白身苗或更小的魚苗經奈米包埋後的疫苗浸泡免疫後一個月，與對照組魚苗一起進行浸泡攻毒後，可發現經奈米疫苗免疫的組別，其有效使用的病毒濃度不但可降至 10^5 TCID₅₀ ml⁻¹，同時在此浸泡免疫濃度下，於一個月後利用有活性的 NNV 來進行攻毒，免疫組魚苗的累積死亡率僅有 15%，相對存活率高達 83 (圖二)；若以相同病毒含量，但沒有經過奈米包埋的 NNV 疫苗來浸泡免疫，則一個月後進行浸泡攻毒，其相對存活率低於奈米疫苗組，所以奈米包埋有提升疫苗吸收及提高保護的效果，可以降低有效免疫的疫苗使用濃度。



分別以 0.1% formalin (F-I) 及 4 mM BEI 兩種不活化藥劑製備神經壞死症病毒疫苗，然後以 1×10^7 TCID₅₀ ml⁻¹ 的 NNV 濃度浸泡免疫石斑八分苗一小時，對照組魚苗則以 PBS 緩衝溶液代替病毒疫苗。免疫 30 天之後，以具有活性之 NNV (1.6×10^6 TCID₅₀ ml⁻¹) 對三組魚苗進行浸泡攻毒 (每組 100 尾)，然後記錄 30 天的累積死亡率。

資料來源：臺灣大學生命科學系齊肖琪老師研究團隊。

圖一 浸泡式神經壞死病毒疫苗對石斑苗的保護效率

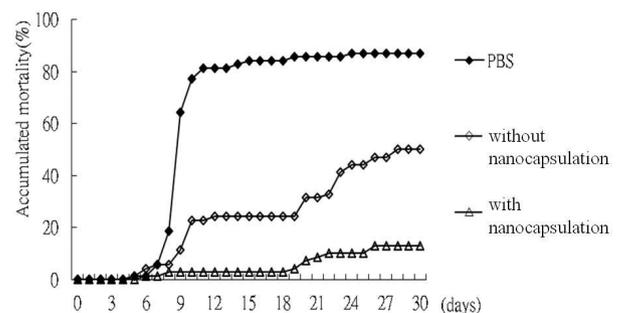
除了早期以含有硬脂酸成份的包埋劑來製備浸泡式疫苗，本實驗室這兩年也測試了以利於粘膜吸收的佐劑來製備 NNV 浸泡式疫苗，活體免疫與攻毒後的保護效果跟之前配方的浸泡式疫苗相似，優點則是混合不活化病毒與佐劑的過程簡便很多。

浸泡式NNV疫苗引起的免疫反應

浸泡式疫苗引起的保護效果，與黏膜組織的免疫力有關，由於石斑魚是海水魚，所以會喝水，因此浸泡免疫時，除了表皮及鰓部會接觸到疫苗，腸道黏膜也有機會接觸到疫苗。本實驗室曾檢測浸泡免疫後石斑苗在不同時間點不同免疫基因的表現變化，發現魚苗經過浸泡式 NNV 疫苗免疫後，不但可提高鰓部、皮膚與腸道的免疫反應，也能提升全身性的免疫反應。不但提高發炎反應及干擾素反應等先天免疫相關基因的表現，也有效誘發粘膜抗體 IgT 及系統抗體 IgM 基因的顯著表現。

神經壞死症浸泡疫苗的田間試驗

根據石斑魚免疫器官與基因發育的研究報告，魚苗最早接種疫苗的時間點約在孵化後的兩週後 (需視水溫及其他條件而定)。早期石斑苗體型很小，只適合以餵食或浸泡兩種免疫方式來接種疫



將石斑八分苗分三組，每組 100 尾，一組浸泡免疫 formalin 不活化之 NNV 疫苗 (1×10^5 TCID₅₀ ml⁻¹)，一組浸泡免疫奈米包埋後之不活化 NNV 疫苗 (1×10^5 TCID₅₀ ml⁻¹)，對照組則以 PBS 緩衝溶液代替疫苗。免疫後 30 天，以 NNV (1.6×10^6 TCID₅₀ ml⁻¹) 對三組魚苗進行浸泡攻毒 (每組 100 尾)，然後記錄 30 天的累積死亡率。

資料來源：臺灣大學生命科學系齊肖琪老師研究團隊。

圖二 奈米包埋之浸泡型神經壞死症病毒疫苗的保護效率

苗。等石斑長至八分苗時，免疫系統發育完全，免疫效果更好。七分或八分大的石斑苗（白身苗）正好是孵化場賣給吋苗場的階段，因此可於購買白身苗時，於運輸車的水箱內進行浸泡免疫，這樣不用額外再搬動魚苗，不但節省疫苗的用量，也節省人力與時間成本。

本研究團隊與南部一龍膽養殖戶合作，進行過幾次浸泡式神經壞死症病毒疫苗的田間試驗。養殖戶於購買白身苗當天，將浸泡式 NNV 疫苗加入運魚車的水箱中，浸泡時間約 30 至 60 分鐘，然後再將水箱中免疫完畢的白身苗移至吋苗場的室內大池蓄養。根據養殖戶的陳述，浸泡免疫組魚苗在後續過料階段所需時間比對照組魚苗所需時間短很多，免疫魚對環境緊迫的耐受性也比對照組魚高，將兩組魚苗裝箱自南部運往北部，開箱飼養的第一天，免疫組魚苗的活動力及存活率都比對照組魚苗明顯好。以一倍與兩倍有效濃度的 NNV 疫苗浸泡八分苗，觀察 10 天，兩組魚苗的活動率及攝餌情況無差別，說明了浸泡式疫苗的安全性，魚苗在之後的續養狀況也都十分健康，存活率高。

結語

浸泡式 NNV 疫苗已證明能達到良好的保護效果，但未來實際運用上還有一些事待做，例如測試疫苗保存期限長短，批次檢驗的標準如何訂定，對不同海水魚種的最佳使用條件，以及未來的市場評估等。臺灣石斑養殖業，目前仍以小農小戶居多，若要從魚卵階段執行 SPF 無病毒魚苗的養殖模式，需要完整的策略與周邊配套措施，所費不貲，對個體戶而言，將困難重重。本實驗室對一般石斑養殖戶有關養殖與免疫策略的建議，包括，盡量挑選無 NNV 帶原的魚苗，依魚苗大小以適當方式進行免疫，例如八分苗之前可口服免疫，七分或八分苗可浸泡免疫；因免疫後的魚苗仍需兩週時間免疫力才上升，所以在此期間要密切注意水質的穩定與飼養環境的管理，疫苗的保護效果會在免疫後一個月達到最高峰；免疫後的魚苗最好在室內池養殖，以循環水系統做中間育成；魚苗長至兩吋時，再以注射式疫苗補強免疫效果；注射免疫 2-4 週後，才將石斑魚放入室外養殖池中，這樣的流程將可大幅提升魚苗養殖期間對 NNV 的抵抗力。

AgBIO

蓋玉軒 國立臺灣大學 生命科學系 博士後研究
齊肖琪 國立臺灣大學 生命科學系 教授

參考文獻

1. Chi, S. C., Lo, C. F., Kou, G. H., Chang, P. S., Peng, S. E., Chen, S. N. (1997) *Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, Epinephelus fuscogutatus and Epinephelus akaara (Temminck & Schlegel)*. J Fish Dis 20:185-193.
2. Chi S.C., Hu W.W., Lo B. J. (1999) *Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, Epinephelus coioides (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus*. J Fish Dis 22:173-182.
3. Kai, Y. H., Chi, S. C. (2008) *Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (Epinephelus coioides) by bath immunization*. Vaccine 26:1450-1457
4. Kai Y. H., Su H. M., Tai K. T., Chi S. C. (2010) *Vaccination of grouper broodfish (Epinephelus tukula) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus*. Vaccine 28:996-1001.
5. Munday B. L., Kwang J., Moody N. (2002) *Betanodavirus infection of teleost fish: a review*. J Fish Dis 25:127-142.
6. Nakanishi T., Kiryu I., Ototake M. (2002) *Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument*. Vaccine 20(31-32):3764-3769.
7. Wu Y. C., Kai Y. H. and Chi S.C. (2013) *Persistently betanodavirus-infected barramundi (Lates calcarifer) exhibit resistance to red sea bream iridovirus infection*. Developmental and Comparative Immunology 41, 666-674.