

第八章 魚類疫苗介紹—石斑魚病毒性疾病預防對略

涂堅

家畜衛生試驗所生物研究組

一、疫苗的歷史

疫苗是人類用來對抗病毒性疾病的唯一方法，因為直到今日人類還是無法有效治療病毒性疾病。最早人類並不懂得如何治療一些致命的疾病（例如天花），但是中國鄉下郎中卻發現一些天花痊癒病人的乾痂皮，接種到健康人類身上，可以免除這些人發生天花，雖然有時會引起接種人類的喪命，這卻是最早的疫苗應用，只是，當時的人們並不瞭解真正原因。1796 年，英國醫生金納 (Edward Jenner) 觀察到擠牛奶的女工初擠奶時，手指頭都會受感染產生膿疱，但痊癒以後再接觸到感染天花的病人，都不會被感染，進而推測可能因為女工感染牛痘，以致產生對抗天花的抗病力，經過他以牛痘的乾痂（尚含有活的牛痘病毒）接種在自己家人身上，發現可使其免除天花感染。自此找到預防天花的方法，這是人類首次發現可以經由接種一種動物來源的物質（當時並不知道是病毒），進而預防人類疾病的方法。反觀現代多數疫苗都是利用感染該種動物的病原做成，這真是一種幸運的發現，利用感染牛隻的牛痘（不會引起牛隻死亡），來接種人類（不會引起人類致命），預防會引起人類致死的人痘（天花）。以上歷史告訴我們，好的疫苗必須能避免接種人產生嚴重副作用（皮膚產生膿疱可以接受；但造成死亡，絕

不能接受），又能有效避免再次感染該種惡疾。

二、疫苗定義

金納發現第一個牛痘疫苗是利用不同動物（牛）感染的類似病原（牛痘病毒），來感染人類讓人類產生抵抗天花病毒感染；為了紀念他的緣故，現今我們稱為疫苗 (vaccine) 的這個英文字就是從牛痘病毒 (vaccinia virus) 的拉丁文轉化而成。雖然牛痘疫苗的例子是利用感染牛的活病毒來預防人的天花，並不是直接對引起人類天花的天花病毒進行處理，降低毒性再接種人類來預防天花，但還是一種利用活毒疫苗（最有效但最難開發的疫苗）來預防病毒性疾病的例子。可是在往後的對抗病原的人類歷史，我們都是採取直接對引起該種疾病的病原加以處理，降低毒性後接種動物讓動物產生抵抗力，達成預防該疾病的目的。所以疫苗就是「透過化學、物理或生物的方法不活化或降低病原（又稱抗原）的病害性（包括細菌、病毒或寄生蟲），然後將它投予生物體，使生物體產生抗體、殺手細胞及「記憶細胞」，下次遭遇相同病原時能「免除疫病」的一種生物製劑」。

魚類疫苗，例如我們所關心的石斑魚虹彩病毒及神經壞死病毒疫苗，還有一些鏈球

菌及弧菌疫苗也都是針對這些病原加以不活化而製成。

三、佐劑

所謂佐劑就是與上述抗原混合在一起製成疫苗，可加強疫苗功效的一種添加劑。科學家發現若能將上述不活化的病原（又稱為抗原）與一些物質（例如不活化的結核菌體、礦油、細菌胞壁的脂多醣體、細菌或動物的萃取物等）混合後製成的疫苗，再免疫動物，可以得到更高的保護力。原因就是抗原被包在油質內，緩慢釋放，可達成延長抗原釋放目的，刺激免疫器官產生更高的保護力。另外那些不活化的菌體、動物及細菌萃取物等則可刺激組織中的 T 細胞及吞噬細胞，加強呈現抗原，使免疫過的動物產生更高的保護力。

魚類疫苗使用的佐劑均沿用陸生動物所使用的佐劑，由於目前佐劑均已商業化，各家廠商均有各家的獨特配方，列為營業秘密，但是基本上均含有油質（植物油）及一些細菌萃取物。

四、疫苗的種類

（一）活毒疫苗

1. 以溫度、不同宿主繼代或自然基因突變篩選得到的減毒疫苗，具感染性，不具病原性，動物接種後，可以在胞內增殖，產生“內源性抗原”。
2. 單劑量就能引發毒殺型 T 細胞為主的免疫。

3. 對抗病毒性疾病有最佳的效果。
4. 目前在魚類病毒方面並無此類的疫苗。但是在鯰魚的 *Edwardsiella ictaluri* 及 *Flavobacterium columnare* 兩個細菌，則有活毒疫苗，分別為 Aquavac-EST 及 Aquavac-COL (Intervet)。在人類有天花疫苗、小兒麻痺的沙賓疫苗。在陸生動物則有豬的兔化豬瘟疫苗，羊的羊痘疫苗及雞的馬力克疫苗、雞痘疫苗及新城病疫苗。

（二）死毒疫苗

1. 將病原以化學或物理方法不活化，失去感染動物、在動物體內增殖能力的疫苗。
2. 是一種外源性的抗原，引起抗體為主的免疫。
3. 引發助手型 T 細胞 Th2 為主。
4. 目前魚類的疫苗均屬此類，例如魚類虹彩病毒疫苗、傳染性胰臟壞死病毒疫苗、神經壞死病毒疫苗、弧菌疫苗、鏈球菌疫苗、發光菌疫苗等。

（三）次單位疫苗

1. 將有抗原性的蛋白基因片段重組於載體，轉殖入細菌、酵母菌或細胞內大量生產抗原的一種疫苗。
2. 可以將數個抗原基因組合在一起表現形成多價疫苗。
3. 也可將細胞激素與抗原基因組合在一起，導引免疫反應為細胞免疫 (IL-12, IL-15, IL-18) 或導引為體液免疫 (IL-10, IL-6)。
4. 也是外源性的抗原，難誘發黏膜免疫及細胞毒殺 T 細胞解決之道為：(1) 可將 T

細胞抗原位與表現抗原組合，誘發 Tc ；
(2) 使用脂性載體 (liposome) 或胞膜傳遞蛋白將抗原送入胞質內，誘發 Tc 。

5. 目前魚類僅有 IPN 的 VP2 次單位疫苗。在人類使用的有 B 型肝炎疫苗及人類乳突病毒疫苗，利用酵母菌平台表現；在陸生動物開發成功的有豬瘟 E2 疫苗及豬胸膜肺炎桿菌疫苗。

(四) 類毒素疫苗

1. 細菌分泌的外毒素，經過化學方法不活化後產生的疫苗。
2. 魚類無此種疫苗。人類有破傷風疫苗。

(五) DNA 疫苗

1. 利用細菌表現質體，攜帶有一段抗原基因片段，當植入動物體內可在動物體內表現並誘發免疫的疫苗。
2. 可引發細胞免疫及體液免疫。
3. 2005 年 Sommerset 等發現，神經壞死病毒的 DNA 疫苗無法對比目魚產生保護。目前魚類並無任何此類疫苗商品問世，人類及陸生動物亦無此類疫苗。

五、目前世界各國商用魚類疫苗

- (一) 主要以不活化病原為主：成本低，製造容易，效果可接受。
(二) 主要採用浸泡與注射為主：前者易投予，省人力；後者保護效果佳。
(三) 次單位疫苗少見：因為試驗成效不一致，重現性差。
(四) 現行商品化病毒性疫苗：(1) 因各國疫苗使用許可不同，並不適用於每一國；(2) Norvax® Compact PD 不活化鮭魚胰臟症

(pancreas disease) 病毒疫苗 (intervet)；(3) 日本不活化虹彩病毒疫苗 (Bi-Ken)；(4) 不活化 IPN 疫苗及 IPN VP2 次單位疫苗 (intervet)；(5) 挪威不活化傳染性鮭魚貧血病毒疫苗 (pharmaq)。

(五) 現行商品化細菌性疫苗：

國 家	針 對 種 類	使 用 對 象
西 班 牙	滑走菌、弧菌、發光菌、鏈球菌	海 水 魚、 鮭 魚、 鰻 魚
智 利	滑走菌、立克次體、鏈球菌、發光菌、耶氏菌	鮭 魚
澳 洲	滑走菌、弧菌、發光菌、鏈球菌、耶氏菌	金目鱸、鮭魚
挪 威	冷水病、弧菌、癰瘡病、耶氏菌、冬季潰瘍症菌	鮭魚、海水魚
美 國	愛德華菌、癰瘡菌、耶氏菌、弧菌症	鯰魚、鮭魚
日 本	弧菌、虹彩病毒、鏈球菌	鮭魚、香魚、青甘

六、疫苗投予的方式

(一) 注射

1. 常用使用在高經濟魚類（如鮭魚、鞍帶石斑、海鱷等），可確認每尾的實際免疫劑量，可合併佐劑使用，為最有效的投與方式。
2. 可有效產生細胞與體液免疫。
3. 須注意魚類免疫系統成熟後使用才有效。
4. 魚隻太小無法使用。

5. 需要使用機器或大量人工，耗時耗力。
6. 易引起魚類緊迫。
7. 會引起局部反應（肉芽腫，腹腔器官粘黏）。

（二）浸泡

1. 可免疫大小不同魚類。
2. 透過皮膚、鰓、側線、腸道吸收。
3. 浸泡時間越久效果越佳。
4. 減少魚類緊迫，減少人力需要。
5. 需使用大量疫苗，成本昇高，但僅維持中等時間及中等保護力。
6. 先以高張鹽水浸泡，再浸泡疫苗效果較佳。
7. 先對皮膚進行穿刺再行浸泡（刺青式浸泡）效果佳。
8. 研究指出，先以 1 MHz 超音波處理 1 分鐘，再配合 10 分鐘浸泡（浸泡期間均以 3 MHz 超音波處理），效果佳。
9. 一般作為基礎免疫用。

（三）口服

1. 疫苗必須經過微膠囊或生物包被，以免被消化道消化液消化。
2. 必須與餌料或飼料一起食用，必須重複投予，因無法確定每尾魚免疫劑量。
3. 最省人力及時間的方法。
4. 最少緊迫的方法。
5. 須長期服用，需要大量疫苗，成本增高。
6. 保護時間與保護力最低。

七、魚類的免疫系統

（一）體液免疫

1. 由 B 細胞產生抗體，能中和病毒或細菌，然後由吞嗜細胞移除。
2. 與哺乳類相比，魚類的抗體親合性 (avidity) 較低。
3. 二次免疫反應也較哺乳類弱。
4. 魚類的移行抗體低。

（二）細胞免疫：有兩種 T 細胞負責

1. 細胞毒殺 T 細胞 (Tc)，加強吞噬細胞功能。
2. 助手 T 細胞 (Th)，加強抗體產生。
3. 實際上，有時抗體高低與保護力不符，需考慮此種保護應該牽涉細胞免疫。

（三）免疫適期

所謂免疫適期就是找出「何時是最適合接種疫苗的時間」。在魚類有許多疾病是稚魚階段就會感染，例如感染鯛、鱸、石斑魚兩月齡以下的稚魚，破壞魚類腦及視網膜，引起高死亡率的神經壞死病毒就是典型的例子。要預防本病就必須在稚魚階段接種疫苗，才能在病毒感染魚隻前產生保護力，但是孵化後多久才能免疫呢？因為稚魚的免疫器官若沒有成熟就接種疫苗，不僅沒辦法產生保護力，還會造成對這種病原的終身沒抵抗力，在免疫學稱為免疫耐受性 (immune tolerance)，就是一種免疫的麻痺。由於魚類種類太多，因此找出不同魚種稚魚何時免疫器官成熟，是一件很艱苦卻必須做的事情。

要了解何時最適合對石斑魚稚魚進行免疫，必須先針對石斑魚稚魚淋巴器官孵化後發育的情形進行瞭解。2004 年，Kato 等以組織學觀察孵化石斑魚的消化及免疫器官發育，發現油斑 (*Epinephelus bruneus*) 在孵化後 3 天就可觀察到肝、鰾、胰、小腸及直

腸。在 16 天可發現小腸內捲、咽齒及食道上皮黏液細胞開始分化。第 25 天胃盲囊、胃腺幽門盲腸形成。原始的胸腺、腎、脾臟分別出現在第 12、1 及 6 天。小淋巴球在前述淋巴器官出現時間則在第 21、30、33 天。以上淋巴組織出現時間與大多數海水魚類相似。2003 年，吳金英等利用組織學觀察點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 稚魚淋巴器官發育情形，水溫維持在 22 – 28°C，孵化第 10 天發現原始頭腎，11 天發現原始脾臟，第 13 天出現原始胸腺。頭腎、脾及胸腺分別於第 25 天、40 天及 18 天觀察到小淋巴球出現。

綜合以上研究數據，胸腺成熟約在 18 – 21 天，頭腎成熟約在 25 – 30 天，脾臟成熟約在 33 – 40 天。因此石斑魚的疫苗投予時間至少要在孵化後 3 週以上 (21 天)，否則無法達成保護作用。但是從孵化到 21 天有段空窗期，此段應該如何保護稚魚免受到病毒侵害則是需要利用高生物安全循環水系統，飼養稚魚避免在免疫前遭受環境病毒污染。

(四) 移行抗體 (maternal antibody)

所謂移行抗體就是「親代動物經免疫後，可將母源性免疫球蛋白垂直傳給子代動物，這些具保護性的母源免疫球蛋白就叫做移行抗體」。一般而言，具有胎盤的動物其移行抗體效果較強，鳥類次之，魚類則較弱。雖然前人研究指出在鯉魚及鰱魚免疫母魚的免疫球蛋白可垂直傳給魚卵，對仔魚進行保護。1996 年報告，針對大西洋鮭種魚持續免疫腸紅嘴病細菌疫苗 (*Yersinia ruckeri* serovar O₂) 然後對其孵化仔魚進行

測試其垂直傳給仔魚的保護作用。他們發現由免疫母魚及未免疫母魚來的卵及仔魚均可測到相同力價的凝集抗體。此外孵化後 1 週小魚即無法測到凝集抗體力價，而且無法耐過活細菌的攻毒試驗，結論是保護力可以從母魚傳給仔魚，但是力價很低不足以保護仔魚。因此想靠如哺乳類動物使用移行抗體保護幼獸的方式，在魚類並不實際。

八、石斑稚魚病毒性疾病預防對策

(一) 垂直性病毒感染的預防

1. 對種魚進行血清抗體的檢測，慎選未被感染的種魚，隔離飼養。
2. 對種魚的精液及卵進行 PCR 檢測，確保無病毒污染，始可混養。
3. 產卵前，2010 年 Kai 等發現對種魚進行重要病毒疫苗 (神經壞死病毒) 的預防注射，可降低潛在帶原母魚因重複產卵緊迫所造成的體內病毒增生，除避免病毒直接垂直感染到卵內，尚可避免排毒污染產道，保護魚卵外表不被污染。相同免疫應用在種魚的虹彩病毒免疫應有類似的效果。

(二) 水平性病毒感染的預防

1. 場區採用高生物安全循環水系統，飼養稚魚避免在免疫前遭受環境污染，並保障魚苗在 45 – 60 天前，勿接觸到環境中的病毒。
2. 孵化魚苗後應飼餵經 PCR 檢查，無病毒污染的餌料生物。
3. 在 21 – 30 天進行免疫，先以浸泡方式進行神經壞死病毒疫苗基礎免疫，等

到 2 吋半 (2 個月) 時再配合施予一劑肌肉注射的虹彩病毒疫苗。

九、參考文獻

1. 吳金英、林浩然 (2003) 斜帶石斑魚淋巴器官個體發育的組織學。動物學報, 49(6): 819-828。
2. A Mor and RR Avtalion (1990) Transfer of antibody activity from immunized mother to embryo in tilapia. Journal of Fish Biology, 37: 249-255.
3. Atle Lillehaug, Sigmund Sevatdal and Torbjørn Endal (1996) Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry against yersiniosis. Fish and shellfish immunology, 6(7): 521-535.
4. Ingunn Sommerset, Rasmus Skern, Eirik Biering, Hogne Bleie, Ingrid Uglenes Fiksdal, Søren Grove and Audun Helge Nerland (2005) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. Fish and Shellfish Immunology, 18(1): 13-29.
5. Kai, Y. H., H. M. Su, K. T. Tai and S. C. Chi (2010) Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. Vaccine, 28(4): 996-1001.
6. Keitaro Kato, Katsuya Ishimaru, Yoshifumi Sawada, Junichi Mutsuro, Shigeru Miyashita, Osamu Murata and Hidemi Kumai (2004) Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. Fisheries Sciences, 70(6): 1061-1069.
7. Yukinori Takahashi and Eijiro Kawahara (1987) Maternal immunity in newborn fry of the ovoviparous guppy. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 721-735.