

水產魚用疫苗檢驗法規收集及田間試驗研究

林俊達、林琇蘋、陳炳義、張家嘉、許家惠、葉修如、陳瑞祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所動物用藥品檢定分所

摘要 台灣水產養殖興盛，近年來更發展出生產高經濟價值魚種如海鱺、石斑等外海箱網養殖漁業，於養殖科技方面，一直維持著高度的競爭優勢。但魚類的高密度飼養，不免伴隨魚病的問題，魚病之預防與控制是水產養殖漁業發展的重要瓶頸之一。因此，研究開發水產疫苗，期能提高水產生物之育成率，降低養殖業者之成本。本分所執行「動物用藥品管理法」之動物用藥品檢定及查驗工作，為因應我國未來魚用疫苗產品上市前必須執行之魚用疫苗新藥檢驗登記與委託試驗計畫，以及法定之逐批檢定，需建立相關水產魚用疫苗的檢定與檢驗的方法，規劃與建置必備的檢定設施與設備來進行相關動物試驗。本分所將持續研發魚用疫苗檢定技術，期能提升我國養殖漁業於國際上之競爭力。

關鍵詞：魚用疫苗、疫苗檢定、水產養殖

緒言

台灣的水產養殖產業成長快速，但由於長期高密度與不休養的飼養方式，加上缺乏疾病防治的觀念，伴隨而來的是養殖魚場的老化及傳染病的肆虐，以及無處理病體及排放水的觀念，常導致疾病一發不可收拾。石斑魚苗的年產量高峰期在1999年[2]，達2億8,247萬6,000尾，之後逐年降低，至2005年僅剩6,517萬9,000尾。最近石斑魚在兩岸經濟合作協議（EFCA）上被列入早收清單，政府也期許台灣成為石斑魚王國，並躍升為全球最大出口地，漁業署也計劃要在2016年前，將石斑魚年產值推向70億元，但石斑魚養殖業成長受限於石斑魚虹彩病毒感染症及神經壞死病毒感染症[12]，魚苗損失率高達七至八成。因此未來養殖產業要成功發展之必要條件就是必須減少因疾病所帶來之損失，並減少抗生素及其他化學藥品之使用及研發出可激發特異性或非特異性免疫之預防免疫方法，建立水產養殖業的永續經營及發展。本分所執行「動物用藥品管理法」之動物用藥品檢定及查驗工作，其重點項目包括蒐集各國水產魚用

疫苗檢驗標準，建立魚飼養設施之標準作業程序、病毒株與細胞株建立、攻毒試驗模擬以及配合國內GMP藥廠（或進口廠商）之新藥登記申請，執行經中央主管機關審核通過之委託試驗，並依據國產或輸入魚用疫苗新藥申請檢驗登記與法定之逐批檢定需要，執行魚用疫苗之檢定[1]。其目的，一方面在於可提供水產養殖戶之魚病預防與控制所需安全有效的魚用疫苗，以利於水產養殖業之發展；另一方面，則因應國內外魚用疫苗等新藥之開發與上市，支援有關的生技產業發展，幫助研發成果商品化。同時透過魚用疫苗之法定檢定與查驗，以維護水產養殖之用藥安全，增進漁產品之衛生安全，從而增進國人之健康與福祉。

材料及方法 法規收集

進行國外之水產魚用疫苗檢驗法規收集，包括歐洲藥典（European Pharmacopoeia）、日本農林水產省動物醫藥品檢查所（National Veterinary Assay Laboratory；NVAL）動物用藥品檢驗法規及美國農

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

業部獸醫生物藥品中心 (Center for Veterinary Biologics, CVB) 動物用藥品檢驗法規及中華人民共和國獸藥典等, 需持續更新各法規資料以供標準制定參考。

石斑魚攻毒試驗 病毒株與細胞株

石斑魚虹彩病毒 (Grouper iridovirus; GIV) 與增殖所使用之7-GK (Grouper kidney) 細胞株為石斑魚腎臟株化細胞皆由行政院農業委員會家畜衛生試驗所生物研究組所提供。

細胞培養及病毒力價測定

石斑魚腎細胞株, 以L-15細胞培養液加入8%胎牛血清及1%非必需胺基酸, 培養於

25°C培養箱, 不需CO₂, 以96孔細胞培養盤測定石斑魚虹彩病毒病毒株病毒力價 (圖1、2), 經Reed-Muench Method 計算其力價為 $10^{9.1}$ TCID₅₀/0.1 mL。

試驗魚隻檢疫

試驗石斑魚苗分別由行政院農業委員會水產試驗所東港生技研究中心 (以下簡稱水試所) 購入330尾及高雄市林園區田間飼養場購入點帶石斑魚苗180尾。自水試所購入魚苗平均身長11.69公分、體重23.42公克, 自林園區田間飼養場購入魚苗平均身長13.16公分、體重32.81公克。於本分所魚用疫苗檢定設施之檢疫舍內經7日檢疫, 並隨機抽樣石斑魚苗5尾進行檢體採樣, 採取石斑魚苗檢體包含鰓絲、脾臟、腎臟及腦, 以分子生物學方式[11,12]檢測石斑魚虹彩病毒 (Grouper iridovirus; GIV)、嘉納虹彩病毒 (Red sea bream iridovirus; RSIV)、傳染性脾臟腎臟壞死病毒 (Infectious spleen and kidney necrosis virus; ISKNV) 及神經壞死病毒 (Nervous necrosis virus; NNV), 引子對如表1。

試驗場所及方法

一、攻毒溫度差異

由水試所購入魚隻隨機取144尾區分為兩群, 一群飼養於低溫檢定D舍, D舍水質鹽度為30‰, 水溫25°C, 另一群飼養於檢定E舍, E舍水質鹽度為31‰, 舍內溫度則保持室溫, 其水溫為30°C。將每群試驗

魚分為4組, 每組18尾, 每試驗攻毒組分別以 10^{-1} 至 10^{-3} 之稀釋GIV攻毒液腹腔注射0.1 mL, 試驗空白對照組則腹腔注射稀釋用之PBS 0.1 mL, 觀察21日, 觀察期間每日記錄每組臨床症狀且死亡魚隻須解剖觀察病變, 並以PCR方式進行鑑定。

二、魚隻來源差異

於水產魚用疫苗檢定設施之檢定舍B、C舍大型循環系統試驗 (圖3), B舍水質鹽度為31‰, 水溫25°C, 進行水試所購入魚隻攻毒試驗, C舍水質鹽度為30‰, 水溫26°C, 進行田間飼養場購入魚隻攻毒試驗。將試驗魚分為10組, 每組18尾, 每試驗攻毒組分別以 10^{-1} 至 10^{-3} 之稀釋GIV攻毒液腹腔注射0.1 mL, 試驗空白對照組則腹腔注射稀釋用之PBS 0.1 mL, 觀察21日, 觀察期間每日記錄每組臨床症狀且死亡魚隻須解剖觀察病變, 並以PCR方式進行鑑定。

結果

法規收集

魚用疫苗檢驗標準及法規之收集, 包含歐洲藥典[4]訂定之鮭魚癰瘍病不活化疫苗 (Furunculosis (inactivated, oil-adjuvanted, injectable) for salmonids)、鮭魚弧菌不活化疫苗 (Vibriosis vaccine (inactivated) for salmonids)、鮭魚冷水性弧菌不活化疫苗 (Vibriosis (cold-water) vaccine (inactivated) for salmonids) 及鮭鱒魚腸紅嘴病不活化疫苗 (Yersiniosis vaccine (inactivated) for salmonids) 等4種魚用疫苗檢驗標準。而日本[3]目前訂定有真鯛虹彩病毒感染症不活化疫苗 (イリドウィルス感染症不活化ワクチン)、比目魚 β 溶血性鏈球菌不活化疫苗 (ひらめ β 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン)、鰺魚 α 溶血性鏈球菌不活化疫苗 (注射型) (ぶり α 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン (注射型))、鰺魚 α 溶血性鏈球菌不活化疫苗 (酵素處理) (ぶり α 溶血性レンサ球菌症 (酵素処理) 不活化ワクチン)、鮎魚弧菌症不活化疫苗 (あゆヒブリオ病不活化ワクチン)、鰺魚 α 溶血性鏈球菌類結節症混合 (添加油性佐劑) 不活化疫苗 (ぶり α 溶血性レンサ球菌症・類結節症混合 (油性アジュバント加))

不活化ワクチン)、鰺魚弧菌症 α 溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗(ぶりピブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン)、真鯛虹彩病毒鰺魚 α 溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗(イリドウイルス感染症・ぶり α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン)、真鯛虹彩鰺魚弧菌症鰺魚 α 溶血性鏈球菌症混合不活化疫苗(イリドウイルス感染症・ぶりピブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン)、鰺魚弧菌症之不活化疫苗(ぶりピブリオ病不活化ワクチン)、鮭科魚類弧菌症不活化疫苗(さけ科魚類ピブリオ病不活化ワクチン)、鰺魚 α 溶血性鏈球菌症不活化疫苗(ぶり α 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチン)、鰺魚弧菌 α 溶血性鏈球菌無乳鏈球菌症不活化疫苗(ぶりピブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症・ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症混合不活化ワクチン)、鰺魚弧菌症 α 溶血性鏈球菌類結節症混合(油性佐劑)不活化疫苗(ぶりピブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症・類結節症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン)等14項疫苗檢驗標準。中華人民共和國獸藥典則訂定有草魚出血病不活化疫苗檢驗標準。

魚隻檢疫結果

由水試所購入之石斑魚苗經檢測確認為無GIV、RSIV、ISKNV及NNV帶原。而由高雄市林園區田間飼養場購入點帶石斑魚苗經檢測則確認為無GIV、ISKNV及NNV帶原，但有RSIV帶原。

石斑魚虹彩病毒攻毒結果

一、攻毒溫度差異

於D室(水溫為25℃)攻毒結果， 10^{-1} 及 10^{-2} 之稀釋GIV攻毒液攻毒後死亡率皆為100%，

10^{-3} 之稀釋GIV攻毒液攻毒後死亡率為80%，死亡魚隻呈現體色變黑(圖4)、脾臟腫大(圖5)及腎臟腫大(圖6)等病變，而於E室(水溫為30℃)攻毒結果， 10^{-1} 至 10^{-3} 之稀釋GIV攻毒液攻毒後死亡率皆為0%，兩組之對照組魚隻於觀察期間全健存。

二、魚隻來源差異

試驗結果空白對照組於觀察期間仍健存，攻毒組發病魚隻可見有食慾不振、體色變黑及死亡現象，死

亡魚隻病變可見脾臟及腎臟腫大，由脾臟及腎臟皆可由PCR偵測出GIV病毒核酸。經計算GIV攻毒原液半致死劑量(LD₅₀)以水試所購入點帶石斑測定結果為 $10^{7.3}$ TCID₅₀/0.1 mL，但以田間飼養場購入點帶石斑，半致死劑量無法測定出，以最高濃度(10^8 TCID₅₀/0.1mL)攻毒，其死亡率僅29.17%。依試驗結果評估，使用無虹彩病毒帶原之清淨魚隻，石斑魚虹彩病毒攻毒試驗可於本系統中完成試驗，若魚隻本身為GIV或RSIV帶原魚隻，雖然此次攻毒毒株是GIV，魚隻是RSIV帶原，但仍會干擾試驗，導致攻毒試驗無法評估。

討論

歐洲藥典所制定之水產魚用疫苗檢驗標準，主要對象魚種為冷水性的鮭鱒魚類，病原種類著重於弧菌，其評估方式是將免疫組及對照組作個別識別標示後飼養於同一魚缸，且每組尾數不少於100尾，以強毒株攻毒後以計算相對存活率(Relative Percentage Survival; RPS)方式評估疫苗效力[4]，相對於歐洲藥典而言日本檢驗標準對象魚種包含真鯛、比目魚、鰺魚及鮎魚等，病原種類包含虹彩病毒、弧菌、鏈球菌及發光菌等，其效力試驗各組均以單獨水體循環水養殖魚缸來進行，效力試驗評估方式為強毒株攻毒後，其對照組死亡率須達某程度，在計算免疫組存活率是否比對照組高出其標準始判定合格[3]，如真鯛虹彩病毒感染症不活化疫苗檢驗，是先將真鯛於22~28℃水溫的循環式環境飼育7天，在停止對試驗動物餵餌達24小時以上後，各分成2組(1組90尾以上)。對1組試驗動物腹腔注射0.1mL材料以作為免疫組，另一組則作為對照組。其評估方式是將真鯛虹彩病毒(Red sea bream iridovirus)強毒株培養病毒液進行10倍稀釋，將對照組死亡率達80%前後的稀釋3階段病毒液，做為攻毒用病毒液，判定標準則是當對照組有60%以上的死亡率時，免疫組的存活率至少要有1階段是必須要比對照組的存活率高40%以上。中華人民共和國獸藥典中目前僅有一個草魚出血病不活化疫苗，效力試驗評估方式亦與歐洲藥典相同為攻毒後計算其相對存活率，而美國農業部獸醫生

物藥品中心動物用藥品檢驗法規中尚無單一魚用疫苗檢驗標準，其檢驗方法僅依照其檢驗通則及備忘錄進行檢測[5,6]，環顧各國對象魚種與台灣不盡相同，但其水產魚用疫苗檢驗方式仍可作為本國制定之參考標準。石斑為台灣養殖的高經濟魚類，是我國發展海水養殖漁業的重要魚種，漁業署更期望於105年能達到石斑魚產量倍增，但魚病之預防與控制係水產養殖漁業發展務必突破的重要課題。目前主要的細菌致病原包含有弧菌、發光桿菌[2,8,9]及鏈球菌等，病毒性疾

病則以虹彩病毒及神經壞死病毒為主要病因，我國在中央研究院、成功大學、家畜衛生試驗所、屏東科技大學動物疫苗科技研究所、國立海洋大學及國立台灣大學等各大機關、學校及實驗室皆相繼投入石斑、海鱸及烏魚等魚病疫苗之研發，日後魚用疫苗之量產及上市指日可待。而國內田間石斑魚飼養場石斑魚苗虹彩病毒及神經壞死病毒帶原情形嚴重，尋找清淨魚隻不易，將是未來執行田間試驗及疫苗檢驗之最大考驗。



圖 1、正常石斑魚腎細胞株 (GK)。

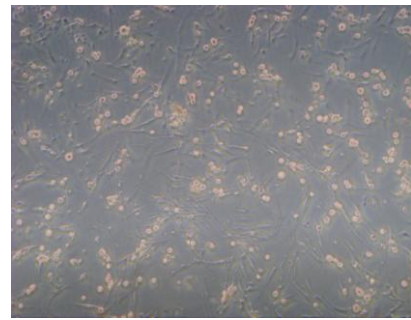


圖 2、石斑魚虹彩病毒 (GIV) 攻毒後 CPE 現象。



圖 3、共同水體循環魚缸。



圖 4、攻毒後死亡魚隻體表變黑。

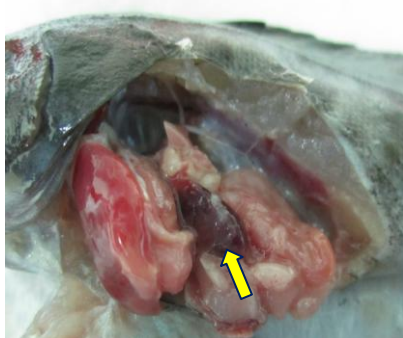


圖 5、攻毒後死亡魚隻脾臟腫大。



圖 6、攻毒後死亡魚隻腎臟腫大。

表 1、試驗魚隻檢疫使用之引子對。

檢疫疾病種類	引子對	產物大小
嘉納虹彩病毒感染症	4-F 5' -CGG GGG CAA TGA CGA CTA CA-3' 4-R 5' -CCG CCT GTG CCT TTT CTG GA-3'	568 bp
傳染性脾臟腎臟壞死症	1-F 5' -CTC AAA CAC TCT GGC TCA TC-3' 1-R 5' -GCA CCA ACA CAT CTC CTA TC-3'	570 bp
神經壞死病毒感染症	F2 5' -CGT GTC AGT CAT GTG TCG CT-3' R3 5' -CGA GTC AAC ACG GGT GAA GA-3'	427 bp

參考文獻

1. 行政院農業委員會編印。1998。動物用藥品檢驗標準。
2. 行政院農業委員會水產試驗所編印。2003。海鱺養殖科技研發與產業發展研討會
3. 會議資料輯。
4. 日本農林水產省動物醫藥品檢查所。2006。動物用生物學的製劑基準。In <http://nval.go.jp/hourei/kijyun/seiken060816.htm>
5. Department for quality of medicines within the council of Europe, Strasbourg, 2002.European pharmacopoeia, 4th Edition.
6. USDA, APHIS, Center for Veterinary Biologics, 2006. Center for Veterinary Biologics Notices . In <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/html/notices.html>
7. USDA, APHIS, Center for Veterinary Biologics, 2006. Veterinary Services Memorandu ms.In <http://www.aphis.usda.gov/vs/cvb/html/vsme mos.html>
8. Angelidis P., 2006. Immersion booster vaccination effect on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) juveniles. J. Animal Physiology and Animal Nutrition.90: 46-49.
9. Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL, Barja JL. 2000. Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. Dis Aquat Organ. Apr 20;40(3):177-83.
10. Rajan PR, Lin JH, Ho MS, Yang HL. 2003. Simple and rapid detection of
11. *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. J Appl Microbiol. 95(6):1375-80.
12. Renate Johansen, Gunvor Knudsen, Adrian J. Smith, 2005. Acts and Regulations concerning the Care and Use of Fish in Norwegian Research, 1st Edition.
13. Red sea bream iridoviral disease, chapter2.3.7, 2009. Manual of diagnostic tests for aquatic animals.
14. Toyohiko Nishizawa, Koh-ichiro Mori, Toshihiro Nakai, Iwao Furusawa, Kiyokuni Muroga. 1994.Polymerase chain reaction(PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus(SJNNV). Dis. Aqual. Ora.18:103-107.

Collection of Inspection Standards and Field Test Research of Fish Vaccine

CT Lin, HP Lin, PY Chen, CC Chang, CH Hsu, SR Yeh, RS Chen

Animal Drugs Inspection Branch, Animal Health Research Institute,
Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract Taiwan has an excellent reputation of aquaculture technology worldwide . Recently, the development of marine cage culture of high valuable species has been successfully achieved in several fish species such as cobia and groupers, and has got competition advantages in this field. High stocking density results in exposure of the fish to stress that often leads to disease, so prevention and control of fish diseases is the one important bottleneck of aquaculture development. Therefore, it hopes that the research of development aquatic vaccines will increase nurture rate of aquatic animals and reduce breeds cost of the entrepreneur. According to Animal Drugs Action, the development, execution of assay and inspection of fish vaccines is one of the responsibilities of animal drug inspection branch, animal health research institute. Thus, it is an urgent task for us to set up the facilities as well as statutory assay methods for fish vaccines. We will continuously establish vaccine examination technology to raise international competitiveness in aquaculture.

Keywords : *Fish vaccine, vaccine assay and inspection, aquaculture*