

出國報告（出國類別：研究）

## 浸泡型海豚鏈球菌不活化疫苗改進

服務機關：農業部獸醫研究所

姓名職稱：黃子鳴 助理研究員

派赴國家/地區：美國

出國期間：113 年 5 月 12 日至 113 年 5 月 26 日

報告日期：113 年 8 月 12 日

## 摘要

本計畫為精進本所魚類海豚鏈球菌不活化疫苗之研發，藉由臺美農業科技合作計畫架構，至美國農業部農業研究署之水生動物健康研究室進行為期兩週的實驗研究技術學習與交流。本次研究主要為學習美方關於海豚鏈球菌的相關研究，以及其魚類浸泡型細菌疫苗研發方法策略。美方實驗室接洽窗口為 Dr. Craig Shoemaker，規劃 2 週參訪課程除於其單位中與各實驗室研究人員學習討論之外，亦參觀奧本大學水產與漁業科學學院中的研究設施。本次研習主要項目包含海豚鏈球菌研究概況與浸泡型疫苗研發技術，另外美方實驗室也介紹其吳郭魚隻抗病品系培育、永續農業產物加入魚隻飼料的營養學研究與水產養殖藻類控制研究。總和 2 週研究心得，海豚鏈球菌於吳郭魚攻毒模式中會受到魚隻族群本身抗病基因不同所影響，不同區域吳郭魚族群的攻毒條件需要自行建立，而實驗動物來源不同時，其基因背景亦會影響對海豚鏈球菌之感受性；關於浸泡型魚用疫苗，美方針對鯰魚柱狀病（*columnaris*）的防治策略為次單位抗原合併商品化浸泡型佐劑，目前研發進度在評估攻毒方式與抗原引起之免疫反應。本計畫除了自美方水生動物健康研究室學習其疫苗研發之技術外，亦建立起我方農業部獸醫研究所與美方農業部農業研究署之農業科技合作關係，以共同因應未來面臨之水產養殖動物疾病防治。

# 目次

目的-----	4
行程概要-----	5
研究過程-----	7
心得及建議-----	10
圖次-----	11

## 目的

在臺灣養殖漁業可產生 350 億元以上的年產值，而鏈球菌感染症造成養殖漁業重大的經濟損失。鏈球菌症的防治可分為幾方面，可以抗生素治療，但是副作用為可能誘導抗藥菌株出現；可以疫苗防治，但要考慮疫苗的保護效力與投予成本；可給予益生菌提升魚隻健康與免疫力，但也要考慮益生菌生產成本。本所為防治魚鏈球菌症，嘗試開發以福馬林不活化的海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 死菌疫苗，以腹腔注射投予方式免疫。然而在水生動物疫苗使用上，除了疫苗保護有效性外，疫苗投予方式與魚隻經濟價值亦為影響疫苗使用意願的重大因素。為提升水生動物疫苗的使用意願，本所精進海豚鏈球菌疫苗研發，計畫添加佐劑將疫苗投予方式改進為浸泡免疫。本次研習重點為學習美方專家已建立或正在研發防治傳染病的技術與策略，協助本所研發浸泡型海豚鏈球菌不活化疫苗，並提升水生動物傳染病監控與研究能力。

## 行程概要

本計畫行程概要如下表。於5月12日自臺灣出發，美國時間5月12日晚上抵達美國阿拉巴馬州奧本市，5月13日起至5月24日為期2週之研究參訪行程，於5月24日回程出發，5月26日返抵達臺灣。

日期	地點	工作內容
5月12日	臺北-舊金山 舊金山-亞特蘭大 亞特蘭大-奧本	去程
5月13日	奧本 AAHRU	報到 完成生安教育訓練 完成實驗動物教育訓練
5月14日	奧本 AAHRU	介紹鯰魚動物試驗 Dr. Lange 實驗室介紹
5月15日	奧本 AAHRU	鯰魚動物試驗採樣 Dr. Aksoy 營養實驗室介紹
5月16日	奧本 AAHRU	鯰魚柱狀病浸泡攻毒 細菌定量
5月17日	奧本 AAHRU	柱狀病次單位抗原表現 抗原表現定量
5月18日	奧本	放假
5月19日	奧本	放假
5月20日	奧本 AAHRU	吳郭魚鏈球菌腹腔接種 鏈球菌定量 鯰魚卵處理
5月21日	奧本 AAHRU	柱狀病次單位抗原西方墨點法定性分析 Dr. Zheng 實驗室介紹
5月22日	奧本	海豚鏈球菌培養與定量

	AAHRU	實驗吳郭魚鏈球菌細菌分離
	奧本大學	奧本大學漁業水產學院參訪
5月23日	奧本	至南阿拉巴馬實驗室參觀魚菜共生
	南阿拉巴馬實驗室	進行鯰魚動物試驗
5月24-26日	奧本-亞特蘭大	鯰魚卵孵化與仔魚計數
	亞特蘭大-舊金山	返程
	舊金山-臺北	

---

## 研究過程

農業部獸醫研究所於2024年5月12日至5月26日派遣黃子鳴助理研究員赴美國阿拉巴馬州奧本市（Auburn, Alabama），參訪美國農業部農業研究署（the US Department of Agriculture, Agriculture Research Service, USDA-ARS）的水生動物健康研究室（Aquatic Animal Health Research Unit, AAHRU）。AAHRU的負責人為Dr. Benjamin Beck，Dr. Beck委請Dr. Craig Shoemaker負責本次參訪規劃，Dr. Shoemaker於該單位服務20餘年，為該單位目前最資深的研究人員，對溫水魚細菌性疾病有多年的研究經驗。他表示AAHRU於水產動物疾病防治上主要可分為疫苗研發、魚隻抗病品系培育與飼料營養促進抵抗力三方面。研習期間之重要項目摘要如下：

### 一、疫苗研發技術經驗分享：

美方已於10多年前研發鏈球菌疫苗研發，並且持續改進不活化疫苗的投予方式，近年則研發鯰魚柱狀病次單位浸泡型疫苗。

(1) 福馬林不活化疫苗：AAHRU於10多年前便以福馬林不活化，添加濃縮細菌培養上清液，未加入佐劑的方式，研發海豚鏈球菌疫苗，並以腹腔注射方式投予，證明能夠產生免疫保護的效果，但也同時遇到商品化技轉時疫苗投予勞力成本過高的問題。

(2) 福馬林不活化疫苗的改進：依據Dr. Shoemaker表示，由於先前試驗已知福馬林不活化海豚鏈球菌疫苗以浸泡方式投予所產生的免疫保護效力不佳，故該單位將福馬林不活化疫苗添加商品化佐劑，再與飼料混合，改進為口服投予的疫苗，成效測試評估中。

(3) 柱狀病次單位浸泡型疫苗：美國南部州為鯰魚養殖重鎮，而柱狀病（*columnaris*）危害鯰魚養殖業甚鉅，AAHRU早期也曾研發福馬林不活化疫苗，而現今因為基因定序與分子生物學的研究，發現許多柱狀菌（*Flavobacterium columnare*）的毒力因子，找尋可溶性並有能夠為抗體辨識的細菌抗原，目前測試能夠引起IgM抗體辨識的DnaK作為次單位疫苗，此抗原特性為可溶性並且能夠分泌於細胞外，故適合作為次單位疫苗使用。與商品化的浸泡型佐劑混合以促進黏膜免疫，研發次單位浸泡型疫苗，並建立柱狀病浸泡攻毒模式以評估免疫保護效果。

二、抗病品系育種：除了傳統以抗生素治療細菌感染症，改以選育抗病品系的預防細菌性疾病方式也是目前為了減少抗生素使用下的流行趨勢。AAHRU利用育種的方式自原有飼養族群中挑選抗病吳郭魚品系育種。

(1) 抗病個體的篩選與育種：先前研究發現以低劑量鏈球菌接種攻毒吳郭魚，魚隻死亡率約50-60%。而篩選存活魚隻，再進行近親配種與繁殖子代，持續接種利用以攻毒策略篩選存活魚隻，可以培育出具有抗鏈球菌症的吳郭魚抗病品系。

(2) 抗病品系的基因決定位：藉由次世代定序（next generation sequence, NGS）方式，研究抗病品系吳郭魚的單核苷酸多型性（single-nucleotide polymorphism, SNP），可以找出與抗病性有關的數量性狀基因座（quantitative trait locus, QTL）。

三、飼料營養促進抵抗力：基於永續農業的考量，許多農業副產品或廢棄物以往不被重視被當作無法利用的廢物，但因為其富含蛋白質或是含有多醣類（polysaccharides）的特性，引起大家的注意。越來越多的研究利用這些副產物或廢棄物作為動物飼料，而少數物質因為不只作為飼料，循環利用達到淨零碳排的目的，更有利用其多糖類物質具有益生元（prebiotics）特性能促進益生菌（probiotics）的生長進而增進健康與提升免疫力，達到預防或抵抗疾病的效果。

(1) 添加黑水虻糞（frass of black soldier fly）飼料：美方專家將飼料中添加使用飼養黑水虻之廢棄物，黑水虻糞。餵飼之後比較血液生化反應與對柱狀病細菌攻毒的保護效果。

(2) 添加黃豆皮、橘皮或洋蔥皮萃取物飼料：利用農產品廢棄物添加於飼料中，評估其對生長增重與疾病抵抗能力的影響。

四、其他水生動物疾病致病機制研究與永續農業：除了魚類疾病與營養的研究外，AAHRU對於其他水產物種也有致病機制相關研究。

(1) 蝦的早期致死症候群（early mortality syndrome, EMS），又稱急性肝胰腺壞死症（acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND）：本病已知與腸炎弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）有關，具有致病性的分離菌株帶有特殊的質體，此質體帶有兩個對昆蟲細胞有毒性的基因（*Photorhabdus* Insect

Related proteins A and B, PirA and PirB)。美方專家利用基因轉殖表現PirA與PirB蛋白質，再以反灌食（reverse gavage）方式接種白蝦，重現急性肝胰腺壞死症的病變，作為疾病研究的模式，未來利用此人工接種模式評估控制急性肝胰腺壞死症的方法。

- (2) 鯰魚產氣單胞菌（virulent *Aeromonas hydrophila*）的人工接種：在先前的攻毒試驗中，以TSB培養的產氣單胞菌，以浸泡方式攻毒，均無法成功感染鯰魚造成死亡，但若先以飼料顆粒混入養殖水中再加入菌液靜置數小時再浸泡魚隻，則可順利感染造成鯰魚發病死亡。抑或是可先麻醉魚隻，以剪刀剪去背鰭（不會造成流血），再浸泡於含細菌的養殖水中，也可成功感染造成鯰魚死亡，可做為注射接種之外的攻毒模式。本病於2018年後於鯰魚養殖業爆發感染，一直到目前仍為危害美國鯰魚養殖的重要病原，AAHRU目前針對此病原也在研究其毒力因子以研發疫苗。
- (3) 吳郭魚腹腔接種鏈球菌的皮膚病病變：在臺灣吳郭魚感染鏈球菌的病變，常見有眼睛腫大混濁與出血、腹水等。Dr. Shoemaker於自然感染病例與實驗腹腔注射接種均發現於感染後3-5天於皮膚可發現多發小的膿疱突起（pustule），自膿疱中與滲出液中均可分離出鏈球菌，如圖4所示。
- (4) 鯰魚卵處理與孵化：AAHRU位在阿拉巴馬州，為美國養殖鯰魚之重鎮。該單位自行育種繁殖鯰魚以培育特定魚種品系進行試驗，並能夠維持實驗魚隻免於病原汙染。每年約5-6月時，AAHRU室外養殖池公母魚混養，開始產卵。之後逐日檢查與收集受精卵，移至實驗室內消毒處理（50 ppm 碘/25 ppm福馬林）1日，於28°C有流動水源環境下孵化約1週。待孵化後收集並計算仔魚數，移至水族缸中，開始餵飼。
- (5) 魚菜共生（aquaponics）：魚菜共生結合水產養殖與水耕蔬菜生產，可使糧食生產系統多樣化，提供新的就業與經濟發展來源，並可提供可永續的高密集糧食生產方法，以解決未來糧食短缺與安全需求。於海水養殖白蝦下選擇適合之耐鹽植物，例如海蘆筍（sea asparagus）與鹹草（saltwort，鹼豬毛菜屬）；與淡水養殖吳郭魚系統配合番茄、萵苣或玉米等作物，由實驗室條件擴大至商業化大規模生產，作為農業永續發展並能增加水產養殖的收入。

## 心得及建議

- 一、 浸泡型疫苗研發：依照AAHRU的經驗，福馬林不活化海豚鏈球菌疫苗以腹腔注射之後，以腹腔接種攻毒評估疫苗保護力，所產生的保護力均優良。但是改以浸泡方式投予不活化疫苗，再以腹腔注射攻毒，免疫保護效力均不高。除了再研究以不同攻毒途徑評估外，亦可考慮局部免疫反應的評估方式，例如鰓與皮膚的黏膜免疫反應評估；或是改變免疫方式，以疫苗混合飼料方式以口服投予疫苗。而浸泡型疫苗則先利用商品化浸泡型佐劑去測試其對於黏膜免疫的反應。
- 二、 本次參訪研習時間為2週，而AAHRU的專家有許多位，每一位研究者的題目都很深入，故除了與原先預定疫苗研究主題的兩位研究人員Dr. Shoemaker與Dr. Lange有較長時間的接觸討論，其餘的研究者就只能排定短時間實驗室拜訪參觀以了解其研究內容，感到十分可惜。本次也與AAHRU研究人員約定，未來將以電子郵件或視訊會議方式進行提問與交流，並將所獲得的資訊與所內同仁分享，使本所同仁也能夠加入與AAHRU的合作下。後續將邀請美方專家來臺指導交流。更希望能藉由臺美農業科技合作計畫架構下，申請如菁英計畫之類可以資助較長期，約3-6個月的研究期間，針對特定題目或技術赴美方實驗室學習，除能深入交流外，更能以有效率的方式學習新技術以提升我方水產動物疾病防治的研究能力。
- 三、 由AAHRU的研究人員背景來看，該單位研究包含微生物、遺傳學、營養學、免疫學、生化學等多個領域，因此該單位之研究範疇涵蓋疫苗研發、抗病品系培育、益生元與益生菌飼料，飼養環境與魚菜共生研究，每位實驗室負責人除了本身專長外，更利用同事的專長合作創新，例如筆者本次的指導學者Dr. Shoemaker，其收集許多水生動物細菌病原，並建立其攻毒感染模式，而利用這些模式可以評估添加益生菌或益生元飼料對促進免疫與健康的效力。建議未來應該加強跨單位跨部會之合作，以集思廣益貢獻所長的方式共同解決農業問題。

## 圖次



圖1. 攝於美國農業部農業研究署水生動物健康研究室前，左1.張敦華博士（Dr. Dunhua Zheng），左2. Dr. Miles Lange，右2. 筆者，右1. Dr. Craig Shoemaker。

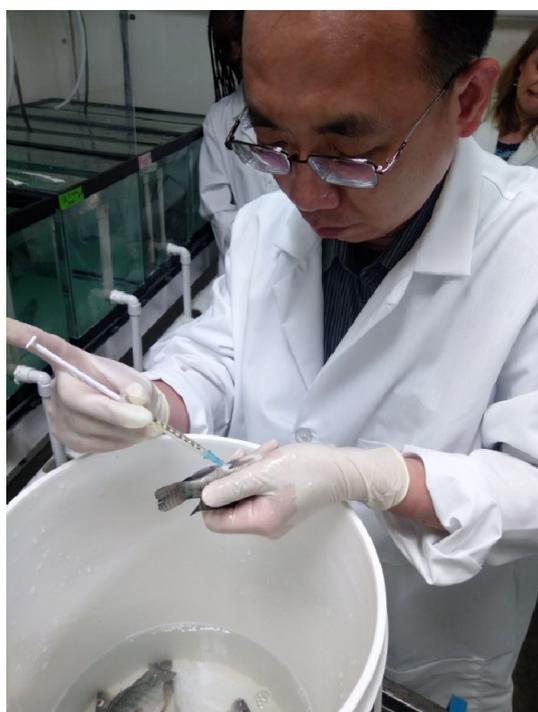
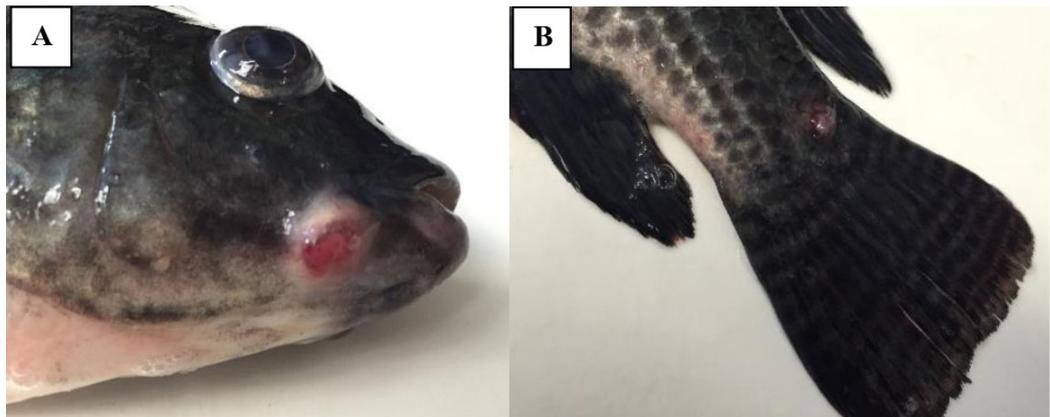


圖2. 筆者在Dr. Shoemaker指導下進行吳郭魚細菌病原腹腔注射接種。



圖3. 筆者在Dr. Shoemaker指導下進行海豚鏈球菌病原操作與計數。



Nile tilapia surviving a *Streptococcus iniae* challenge (by intraperitoneal injection) showing jaw pustules (A) and pustules on the caudal peduncle (B). Tilapia challenged by intramuscular injection with *S. agalactiae* Ib exhibit similar lesions.

圖4. Dr. Shoemaker發表有關海豚鏈球菌感染時皮膚出現膿疱突起病變。