

石斑魚弧菌(*Vibrio harveyi*)之idiotypic vaccine研發

楊忠達、黃琬玲

屏東科技大學 動物疫苗科技研究所

信箱: cdyang@mail.npust.edu.tw

電話: (08) 770-3202#5334

一、源起

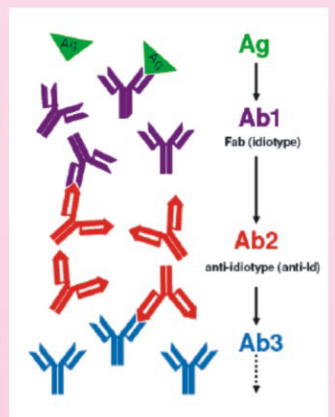
台灣水產養殖已成為重要的產業，尤其石斑魚是高經濟價值的養殖魚類，具有高收益的經濟特性，近年來已迅速發展成為國內重要的養殖魚種，且為台灣五大精緻農業中的旗艦產品之一。由於台灣的養殖區域集中於南部及單位面積放養量過高，魚隻生長環境擁擠，影響魚隻的健康，導致罹病機會大增。目前石斑魚養殖已遭受幾個重要疾病的限制[1]，其中弧菌症(Vibrosis)為造成石斑魚大規模死亡的主要細菌病原，常造成養殖戶之重大損失[2]。在2003年11月的調查報告顯示石斑魚養殖場分離出的革蘭氏陰性菌中以弧菌檢出率為最高88% (123/128)[3]；至2004年11月主要分離出的革蘭氏陰性菌中以弧菌檢出的比率佔73% (32/44)[3]，其中以*Vibrio harveyi*最常於石斑魚被檢出，可見台灣的石斑魚養殖業受到弧菌的影響不容小覷。

目前弧菌症乃以抗生素控制為主，包括四環素(tetracycline)、輕四環素(oxytetracycline)、歐索林酸(oxolinic acid)、氟滅菌(Flumequine)等。雖然抗生素對於弧菌症引起的疾病能有較好的治療效果，但是長期大量使用，將使菌株產生抗藥性，不僅正常藥量無法控制疾病，更容易增加流行病學控制上的困難[4]。因此以疫苗預防弧菌症仍為最佳方法，魚用疫苗的成分大多是全菌或細菌成分[5]，主要是使用經過福馬林處理的不活化死菌(Formalin-killed bacterium)作為抗原，接種後可使魚體具有保護性免疫能力，此種作法的缺點是無法精確的知道是何種抗原引起的免疫反應。由於*V. Harveyi*具有許多的致病因子以完成其感染，所以免疫單一弧菌抗原並無法達到完全的保護的效果，應以多種相關致病因子引入疫苗之中方可提高保護的效果。

二、設計概念

本研究欲利用由Jerne在1974年所提出的免疫網路學說(immunological network theory)來開發石斑魚弧菌的idiotypic vaccine。這個學說是由Jerne(1974)所提出，是一項關於免疫監控系統的研究，這項理論也使Jerne於1985年獲得諾貝爾獎，此學說之基礎概念如下所述。

免疫網路學說用以解釋體內免疫反應處於一穩定而具有調控能力之狀態，以抗體為例(如圖一)，當個體接受到外來抗原時，體內可針對抗原產生一群具有專一性的第一波抗體(Ab-1)，此外身體也針對這Ab-1再形成第二波抗體(Ab-2)，這些抗體之間的交互作用，直接影響了抗體與外來抗原之間的作用，而上述的Ab-1與Ab-2之間所產生的反應是透過抗體彼此之間的idiotypic(Id)所促成，因為當身體對抗原產生Ab-1時，則Ab-1的Fab(antigen-binding fragment, 亦即Id)所呈現之特殊結構會被作為抗原來產生Ab-2，此時該Ab-2的Fab則稱為anti-idiotypic(anti-Id)，透過Id與anti-Id的作用使抗體之間形成一系列的網路辨認系統，這種關係之間的作用乃是免疫網路學說的主要架構。



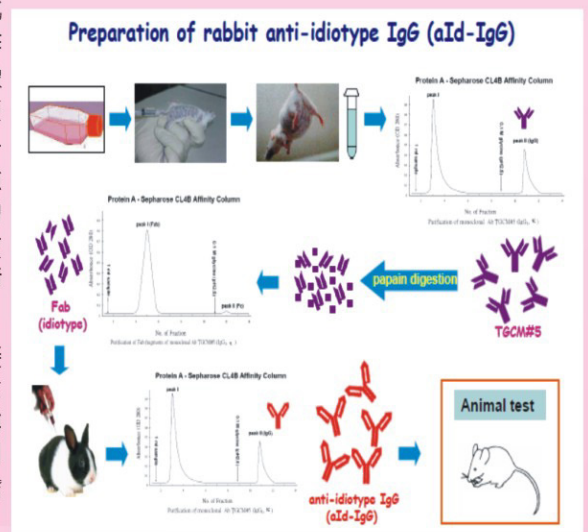
(圖一)

透過抗體的相互作用可使免疫反應強度得到精密調控，以致免疫反應的強度可以被適時的提高或降低。但另一方面，根據抗原抗體結合時所呈現的互補關係，可以推測Ab-2之anti-Id應該可以表現出很像原來抗原上的抗原決定位(epitopes)結構，換句話說，由於Ab-2的anti-Id具有很像抗原的結構存在，因此Ab-2的anti-Id可作為抗原之內像(internal image)，所以Ab-2具有作為抗原的潛力來呈現特殊的抗原決定位之結構；而且若以Ab-2之內像所引發的下一波抗體則應該更具專一性，因為Ab-2的anti-Id是由原來抗原上之某特定的抗原決定位透過Ab-1之Id所引發，所以Ab-2的anti-Id只會呈現類似引起Ab-1的抗原決定位。如此一來，在某一抗原上較強勢的抗原決定位(immunodominant epitopes)均較有機會被Ab-2的anti-Id所呈現。經過這樣的調控之後，可提高重要抗原決定位的呈現效率，使免疫系統有效辨識重要的抗原決定位並且更快形成免疫反應以清除體內之抗原。

另一項更重要的價值是經過這樣的程序所製備出來的抗原並非直接由病原體本身直接製備而來，所以在抗原的製備方面更具安全性。由於上述的這些優點，目前已有許多研究將anti-Id發展成有效的疫苗，稱為idiotypic vaccines。目前該方法很少應用在水生動物，因此本研究利用此學說生產抗弧菌之idiotypic vaccine並應用在石斑魚，也算是大膽的嘗試。

三、技術開發

由生物資源保存及研究中心購買*V. harveyi*菌株(BCRC13812)，經培養之後感染石斑魚以獲得石斑魚抗*V. harveyi*的血清，該血清中含有大量之抗體，亦即前述之第一波抗體。之後以Protein A親和性管柱純化石斑魚感染血清中的抗體，然後以此抗體免疫紐西蘭兔，則獲得第二波抗體，即為Anti-Id，也就是前述的idiotypic vaccine。同樣再利用Protein A親和性管



(圖二)

柱純化由兔子血清中的IgG，即獲得純化的idiotypic vaccine [6]。所以只要有簡單的蛋白質純化概念就可以設計及製備這樣的疫苗。動物試驗中，我們將石斑魚接種idiotypic vaccine的結果與接種不活化菌苗的結果相互分析。魚隻無論免疫idiotypic vaccine或不活化菌苗，均可以引起良好的體液性免疫反應（圖三）[6]。不過，接種idiotypic vaccine的石斑魚卻可以展現出強烈之細胞性免疫反應，高過不活化菌苗2倍，且高細胞性免疫反應可以一直維持到補強注射之後（圖四）[6]。最後以 2.5×10^6 CFU /fish *V. harveyi* (BCRC13812) 進行攻毒，發現魚隻接種idiotypic vaccine的累計死亡率為27.3%，而不活化菌苗免疫組的累計死亡率卻高達54.5%（圖五）[6]。因此可以預測當魚隻接種idiotypic vaccine後，可以同時利用體液性免疫反應及細胞性免疫反應將弧菌感染清除，而獲得較好的保護效果[6]。

四、技術競爭

- 1.本研究製備之idiotypic vaccine本身為抗體，並非病原成分，因此可以消除使用上的安全顧慮。
- 2.使用單一致病因子作為疫苗無法形成足夠的保護效果。所以必須考慮如何將多項致病因子的抗原性引入所製備的疫苗中。過去製造idiotypic vaccine都是利用單株抗體來製備，但這樣只可呈現單一抗原的抗原決定位（epitopes），為了使idiotypic vaccine可以模仿 *V. harveyi* 全菌上能引起免疫反應的蛋白抗原，因此我們以石斑魚感染血清的抗體取代單株抗體作為Ab-1，可呈現弧菌的多項致病因子的抗原決定位。
- 3.在許多感染情況中，魚類的細胞性免疫反應是佔有很重要的清除病原的角色，尤其是為了達到有效的免疫記憶，細胞性免疫反應是不可或缺，所以疫苗的設計過程中，需以增加細胞性免疫反應為重點。而本研究顯示使用idiotypic vaccine可以刺激細胞性免疫反應，即T細胞反應，正如上述這項特徵是魚用疫苗是一大優點。

五、研發成果

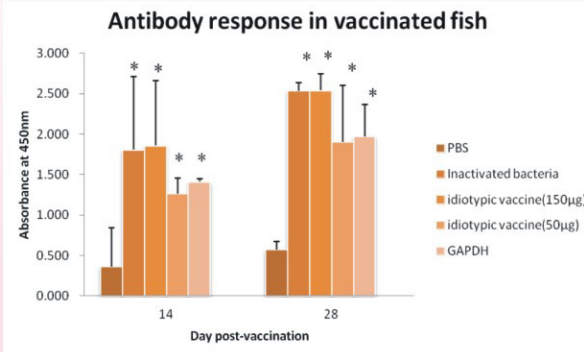
過去養殖戶錯誤觀念之下使用過量抗生素導致抗藥性菌種產生，以及使用管制的化學藥劑導致食用後對人體造成副作用，因此利用疫苗預防魚病是未來發展研究的首要方向。由於本研究的結果呈現使用idiotypic vaccine可有效防治弧菌（*V. harveyi*）的感染，若未來推廣該疫苗的使用將有助於降低過去養殖戶使用過量抗生素的現象。過去許多水生動物用疫苗都是以不活化菌苗為主，而且通常是利用福馬林不活化細菌來製備，但是福馬林的作用過程中有時會導致蛋白質抗原結構的破壞，這種情形將導致不活化疫苗使用上效果不佳的情形。在本研究的動物試驗也證實接種不活化菌苗的保護效果不佳，低於idiotypic vaccine的保護效果，所以我們推測可能在不活化的過程中已將部分蛋白抗原變性，使其保護效果不如idiotypic vaccine。所以我們所製備的idiotypic vaccine的製備流程並未使用福馬林不活化程序，而且由感染血清來製備，透過感染血清較能反映出真實與免疫系統反應的抗原，也才能使idiotypic vaccine的內像可模仿更像 *V. harveyi* 全菌抗原，使idiotypic vaccine的保護效果比不活化菌苗更好。另外，本研究中的結果顯示接種idiotypic vaccine的魚隻在補強之前就已達到很高的細胞性免疫反應，這說明idiotypic vaccine似乎在未來可以朝向single-dose vaccine來發展，不過這仍須更進一步的研究來證實，但這項可能的潛力卻令我們振奮不已。

致謝

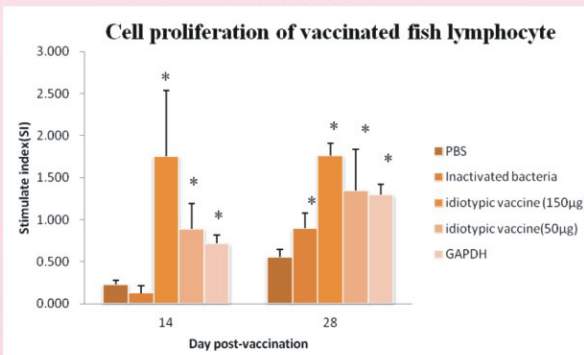
本研究感謝本校動物疫苗科技研究所、動物疫苗及佐劑技術研發中心及獸醫系提供實驗動物空間及設備之協助。

參考文獻

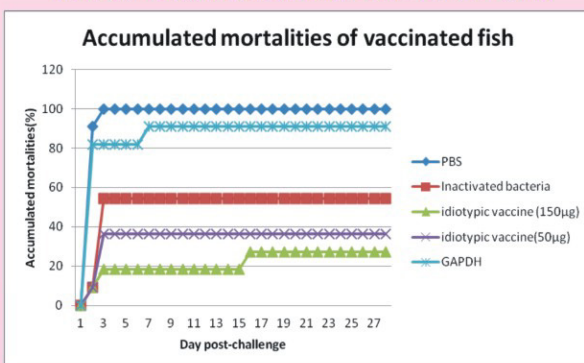
- 1.VM Son, CC Chang, MC Wu, YK Guu, CH Chiu, W Cheng: Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 2009, 26:691-8.
- 2.CW Asenjo, CH Ramirez-Ronda: Halophilic *Vibrio* infections: a review. *Bol Asoc Med P R* 1991, 83:154-6.
- 3.賴明燕: 細菌性霍病之海鱸與石斑的肝腎脾菌相研究. 碩士學位論文，國立中山大學，海洋生物科技暨資源學系 2005.
- 4.翁玉宣: 二價弧菌疫苗應用於養殖石斑魚之研究. 碩士學位論文，國立台灣海洋大學，水產養殖學系 2006.
- 5.PB Crosbie, BF Nowak: Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. *J Fish Dis* 2004, 27:623-32.
- 6.黃琬玲: 石斑魚弧菌 (*Vibrio harveyi*) 之idiotypic vaccine評估. 碩士學位論文，國立屏東科技大學，動物疫苗科技研究所 2012.



（圖三）體液性免疫反應之抗體分析



（圖四）細胞性免疫反應之淋巴球增生分析



（圖五）累計死亡率