

鱸鰻鰻苗細菌性口服疫苗開發研究

邱俊豪^{1*} · 李國誥² · 劉秉忠²

¹農業部水產試驗所東部漁業生物研究中心

²國立臺灣海洋大學水產養殖學系

摘要

本研究旨在開發嗜水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 與愛德華氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 口服疫苗以改善鱸鰻 (*Anguilla marmorata*) 鰻苗在蓄養期間常見的細菌性疾病問題，提升其存活率。疫苗之製備係以福馬林不活化抗原後以 3% 褐藻酸鈉溶液或 6% 鄰苯二甲酸乙酸纖維素溶液作為敷材包覆，及福馬林不活化抗原以超音波細胞均質機處理 1.5 hr，再以 5% 褐藻酸鈉溶液或 9% 鄰苯二甲酸乙酸纖維素溶液包覆。鰻苗經口服接種疫苗後血清抗體力價有顯著性上升，分別以 *A. hydrophila* 與 *E. tarda* 進行腹腔攻毒注射，單次接種組以褐藻酸鈉組優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素組，其效果於第 8 週達最佳。二次接種組可顯著提升鰻苗之血清抗體力價並延長疫苗效果至第 12 週，抗原經均質處理後則能提高抗原包覆量而達到更好的疫苗效果。本研究顯示施用口服疫苗可協助抗原通過胃酸到達腸道並因而激活免疫反應，有效提升鱸鰻對此二病原之抵抗能力。

關鍵詞：鱸鰻、嗜水性產氣單胞菌、愛德華氏菌、口服疫苗、免疫系統

前言

鰻鱺科是由 16 種鰻鱺所組成，多分布在太平洋東部以及大西洋南部之熱帶與溫帶海域 (Silfvergrip, 2009)。鰻鱺為降河產卵魚類，最終會返回海洋進行產卵，世代長度取決於物種及地理位置等因素 (Jacoby and Gollock, 2014; Jacoby *et al.*, 2014)。日本一直被認為是鰻魚的經濟主導市場，然而從 1960 年後，日本鰻玻璃鰻因每年捕撈以及非法買賣，導致日本開始尋求進口之替代物種。根據聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 報告顯出，日本對於鰻魚消費量雖有下降，但是中國鰻魚的進口量卻沒有下降，推測是有新的物種作為替代 (Shiraishi and Crook, 2015)。臺灣於 1989 年因過度捕撈、洄游路徑受阻、鰻苗不當丟棄等原因將鱸鰻列入保育動物名錄。爾後有鑑於各縣市致力鱸鰻保育工作之成效，經科學評估，

臺灣本土鱸鰻資源量已有恢復之情況，且在眾多科學證據支持下，農委會 (現為農業部) 於 2009 年解除鱸鰻禁捕令，自此鱸鰻可在臺灣合法進行養殖及販售，連帶異種鰻 (歐洲鰻、美洲鰻、澳洲寬鰭鰻、鱸鰻、太平洋雙色鰻、印尼短鰭鰻、莫三比克鰻等) 養殖風潮也逐漸興起。因臺灣地區日本鰻苗捕獲量銳減，依據 2021 年漁業統計年報顯示，鰻魚苗產量約 800 萬尾，產值高達 5.5 億元，未來除找出日本鰻替代物種外，維持鰻魚養殖穩定性亦為重要。

臺灣異種鰻養殖地區多分布於中、南及東部地區，其中又以屏東為最主要之養殖地區；在眾多異種鰻品項中，又以鱸鰻和黑鰻 (太平洋雙色鰻及印尼短鰭鰻) 為臺灣主要放養的異種鰻品種。

過去鰻魚養殖時期所遇到的疾病和問題，依然出現在現今的鱸鰻養殖上，如病毒方面有柱狀壞死病毒 (eel birnavirus) 的報告 (Lee *et al.*, 1999) 以及疱疹病毒 (*Herpesvirus anguillae*) 的研究 (Davidse *et al.*, 1999; Hangalapura *et al.*, 2007)。細菌方面有 *Aeromonas hydrophila* (Guo *et al.*, 2014; 徐, 2015)、*Edwardsiella tarda* (Alcaide *et al.*, 2006; 徐, 2015)、偽單胞菌 (*Pseudomonas anguilliseptica*) 以及

* 通訊作者/臺東縣成功鎮五權路 22 號, TEL: (089)850090#304; FAX: (089) 850092; E-mail: jhchiou@mail.tfrin.gov.tw

Enterobacteriaceae 等腸道菌 (Alcaide *et al.*, 2006)。寄生蟲方面有擬指環蟲 (Denmark, 1987)、微孢子蟲 (*Plistophora anguillarum*) (Joh *et al.*, 2007)、鰻線蟲 (*Anguillicola crassus*) (Knopf *et al.*, 2000; Sures and Knopf, 2004)、車輪蟲 (*Trichodina spp.*; *Trichodinella spp.*) (Dung *et al.*, 2014)、指環蟲 (*Dactylogyrus sp.*) (Abdelmonem *et al.*, 2009) 等的感染。

自 1940 年來首篇作為魚類預防疾病的疫苗開發是由 Snieszko and Friddle (1949) 發表，爾後也相繼開發許多疫苗，每年也有數以萬計之魚類接種疫苗，例如挪威自使用疫苗後，減少抗生素的使用 (Rodger, 2016) 且疫苗接種已成為控制魚類感染性疾病最具成本效益及可持續性的方法之一 (Horzinek *et al.*, 1997; Radhakrishnan *et al.*, 2022)。

為提升鱸鰻苗育成率，促進鱸鰻養殖產業發展，本研究擬針對鱸鰻養殖過程常見的細菌病原 *A. hydrophila* 與 *E. tarda* 製備雙價口服疫苗進行投餵接種，並比較藻膠酸鈉殼材以及鄰苯二甲酸乙酸纖維素對口服疫苗的效力的提升效果，同時再利用不活化抗原均質處理，探討其對鱸鰻苗的免疫力的效益。

材料與方法

一、實驗菌株

(一) 菌株來源

本研究所使用的菌株為 *A. hydrophila* 及 *E. tarda*，為 2015 年由宜蘭鰻苗中間養成場瀕死病體肝臟及腎臟所分離純化之菌株。聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 檢測 *A. hydrophila* 所使用之引子參考 Chu and Lu *et al.* (2005) 之方法，預計增幅產物約 685 base pair (bp)；*E. tarda* 所使用之引子參考 Savan *et al.* (2004) 之方法，預計增幅產物約 290 bp。

(二) 菌株強化

將實驗菌株培養培養於 0.5% NaCl 胰蛋白酶大豆瓊脂 (tryptone soy agar, TSA) 上，於 30°C 下培養 24 hr，使用無菌之 PBS (phosphate buffer saline, pH = 7.2)，兩菌株最初以 10^8 CFU/g fish body weight 之最終接受劑量對鰻苗 (1000 尾/kg) 行腹腔注

射，期間停止投餵 3 日、每日換水並觀察 1 週，待魚體瀕臨死亡時，從肝、脾及後腎進行分離並鑑定，之後根據魚隻之死亡情形，逐次降低注射菌液之濃度並求得其半致死劑量 (lethal dose 50%, LD₅₀)。

二、多價疫苗製備

(一) 抗原製備

將菌株 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 各別活化於含 0.5% NaCl TSA 之瓊脂平板上 (面積約 50 cm²)，於 30°C 培養 24 hr，利用 PBS 沖洗菌落製成菌懸液，再將菌懸液塗佈於已覆蓋 cellophane 之含 0.5% NaCl TSA 之滅菌鐵盤上 (面積約 875 cm²) 以大量生產抗原，於 30°C 培養 24 hr，利用少量 PBS 沖洗、濕潤 cellophane 上之細菌，再以滅菌 L 棒收集菌體於 50 ml 離心瓶。以 19,500 × g 離心 90 min，倒去上清液，重複三次，最後以適量 PBS 懸浮，加入總體積 1% (v/v) 之 37% 福馬林進行不活化，置於室溫下搖晃三天後抽取 100 μl 塗佈於 0.5% NaCl TSA 上，後將此 TSA 以 30°C 培養 24 hr，確認不活化完成。最後以 19,500 × g 離心 90 min，倒去上清液，再以 PBS 沖散沉澱菌塊，重複上述動作 3 次，置於 4°C 下備用。

(二) 褐藻酸鈉包覆製備

取濃度 10^{11} CFU/ml 福馬林不活化菌體與 3% 褐藻酸鈉 (Sigma-Aldrich) 水溶液以 1:1 比例混合，成為 1.5% 褐藻酸鈉 - 不活化菌體混合液。將混合液以 1:9 的比例加入含 0.05% span 80 之大豆油中，以轉速 500 rpm 攪拌至乳化。爾後再加入等體積之 1.5% CaCl₂ (含 3% 乙酸，45% 乙醇) 水溶液攪拌 10 min，再加入等體積相同濃度之 CaCl₂ 水溶液，靜置等待微顆粒沉澱後，低速離心使溶液與顆粒分離，倒去上部液體，取下微顆粒，再使用冷凍乾燥機去除水分備用。*A. hydrophila* 及 *E. tarda* 之 1:1 混合菌載量約為 5.77×10^{11} CFU/g (後同)。

(三) 鄰苯二甲酸乙酸纖維素包覆製備

將鄰苯二甲酸乙酸纖維素顆粒 (cellulose acetate phthalate, CAP) (Sigma-Aldrich) 溶於 100% 丙酮，製成 6% CAP 溶液，再與濃度 10^{11} CFU/ml

的福馬林不活化菌體以 9:1 比例混合，均勻混合後利用抽風裝置去除丙酮，最後將成品製成粉末備用，菌載量約為 4.02×10^{11} CFU/g。

(四) 抗原均質後包覆製備

福馬林不活化之菌液以超音波細胞均質機 (Sonic Vibra cell, VCX 500/750) 以 pulse on: 10 sec; pulse off: 2 sec, 進行細胞均質處理 1.5 hr, 期間每 0.5 hr 將菌液均勻搖晃 10 sec, 完畢後置於 4°C 下備用。

包覆製備步驟同上，惟褐藻酸鈉水溶液濃度更改為 5%，CaCl₂ 濃度改為 2.5%，菌載量約為 9.13×10^{11} CFU/g。CAP 製備成 9% 溶液，菌載量約為 5.94×10^{11} CFU/g。

三、免疫試驗

(一) 實驗設計

將鰻苗分成 9 組，每組 200 尾，蓄養於 64 L 之玻璃缸內，玻璃缸蓄淡水 48 L，水溫為 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 且有打氣，每日換水且所用之水取於蓄水桶中，蓄水桶之水以 5 ppm ClO₂ 消毒後打氣至少 8 hr 後才使用。疫苗組分別為褐藻酸鈉組 (Alginate)、褐藻酸鈉均質組 (Alginatesonicated, AS)、褐藻酸鈉二次接種組 (Alginateboost, AB)、褐藻酸鈉均質二次接種組 (ASB)、CAP 組、CAP 均質組 (CS)、CAP 二次接種組 (CB)、CAP 均質二次接種組 (CSB) 以及對照組 (control)。以每日兩餐的方式進行投餵，每餐重量為總重的 5%，其中實驗組投餵之飼料係以 10% 疫苗 (第一次接種，Alginate 組每隻的每日接受抗原量為 1.74×10^{10} ; CAP 組為 1.17×10^{10} ; AS 組為 2.74×10^{10} ; CS 組為 1.79×10^{10} 。二次接種，AB 組為 2.18×10^{10} ; ASB 組為 3.43×10^{10} ; CB 組為 1.46×10^{10} ; CSB 組為 2.24×10^{10} CFU/g fish body weight)、10% 赤蟲及 80% 鰻粉混合，持續投餵 1 週，之後以全鰻粉投餵；對照組只投餵鰻粉，二次接種則於第 5 週進行第二次投餵。於第 4、8、12、16 週進行腹腔注射攻毒試驗，每組取 10 尾；第 2、4、6、8、10、12、14、16 週進行採血，每組取 5 尾，3 重複，分析其血清抗體力價。

(二) 攻毒試驗

先將欲攻毒之實驗菌株培養於 0.5% NaCl 的 TSA 上，於 30°C 培養 24 hr，利用滅過菌之 PBS 製成菌懸液，調整濃度為 20 倍 LD₅₀ (*A. hydrophila*: 2.0×10^7 CFU/g fish body weight; *E. tarda*: 1.8×10^6 CFU/g fish body weight)，以腹腔注射進行攻毒。實驗期間停止餵食 3 日、每日換水 (30 - 40%) 並觀察 2 週，統計死亡率後計算出相對活存率 (relative percent survival, RPS)。瀕臨死亡、死亡魚隻皆由肝、脾以及後腎進行採樣，分離及純化強勢菌種後進行 PCR 鑑定。

$$RPS = 100 \times \left(1 - \frac{\text{疫苗組死亡率 (\%)}}{\text{對照組死亡率 (\%)}}\right)$$

(三) 血清抗體力價分析

本研究使用酵素連結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 進行分析。將實驗菌株製成菌懸液，並調整濃度至 108 CFU/ml 後加入 100 μl 菌懸液於 96 孔盤中，置於 4°C overnight，隔日將菌懸液倒掉後，加入 100 μl 含 0.5% 脫脂奶粉之 PBS，於 37°C 培養 2 hr 後倒去液體，以 1× wash solution 清洗 3 次，加入已將蛋白量定量為 10 μg/ml 之待測樣本血清，於 37°C 培養 2 hr 後倒去液體，以 1× wash solution 清洗 3 次，加入 100 μl Rabbit anti - *Anguilla marmorata* IgM (以 PBS 稀釋 2500 倍)，於 37°C 培養 2 hr 後倒去液體，以 1× wash solution 清洗 3 次，再加入 100 μl Goat anti - Rabbit IgG, HRP conjugate (以 PBS 稀釋 2500 倍) 於 37°C 培養 2 hr 再倒去液體，以 1× wash solution 清洗 3 次，最後加入呈色劑反應 30 min，用 ELISA reader 以波長 405 nm 下測定吸光值。

四、統計分析

將實驗所得之血清抗體力價及血液非特異性免疫力價數據利用 SAS/PC (SAS/PC version, SAS Institute, Cary, CA, USA) 套裝軟體進行單變異數分析 (Analysis of variance, ANOVA, one-way) 測試各實驗組是否有差異，再以 Duncan's New-multiple Range Test 比較各處理組間差異之顯著性，顯著水準定為 $p < 0.05$ 。

結果

一、菌株鑑定

將實驗菌株以專一性引子進行聚合酶連鎖反應，經洋菜膠膠體電泳後，菌株 *A. hydrophila* 之 DNA 萃取物於 685 bp 出現專一性的 PCR 產物 (Fig. 1)；菌株 *E. tarda* 則於 290 bp 出現專一性的 PCR 產物 (Fig. 2)，此兩實驗菌株確實為 *A. hydrophila* 及 *E. tarda*。 *A. hydrophila* 之 LD₅₀ 為 1.00×10^6 CFU/g fish body weight，*E. tarda* 之 LD₅₀ 為 9.05×10^4 CFU/g fish body weight。

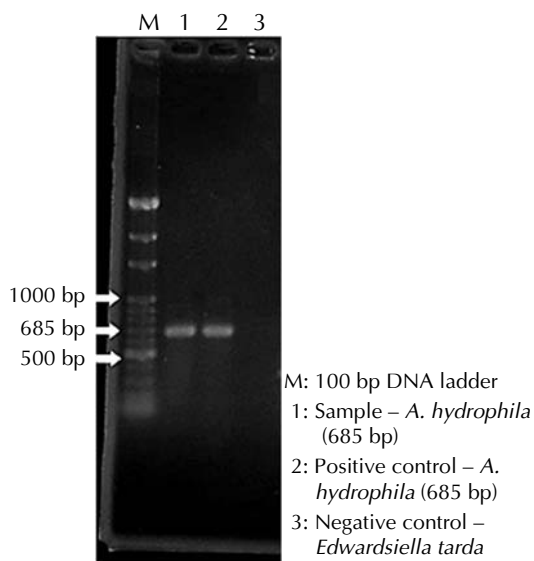


Fig. 1 Gel electrophoresis of *Aeromonas hydrophila* collected from dying or dead eels.

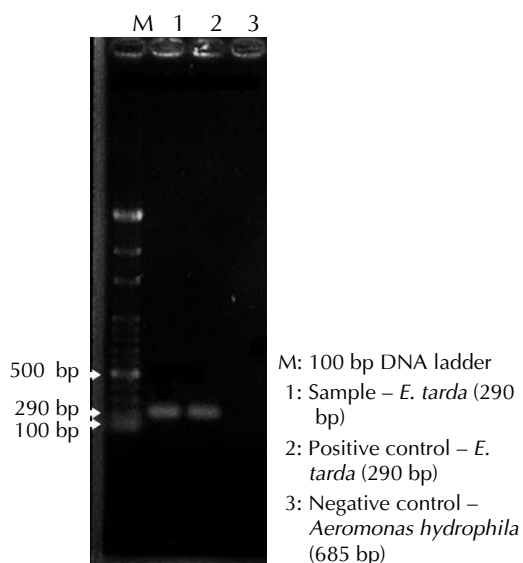


Fig. 2 Gel electrophoresis of *Edwardsiella tarda* collected from dying or dead eels.

二、接種二價口服疫苗後之攻毒試驗

將實驗魚以 *A. hydrophila* 攻毒後之結果呈現於 Table 1，第 4 週以褐藻酸鈉組之 RPS 優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素組；各組 RPS 自第 8 週起，二次接種組別較無接種組高，以有抗原均質處理組高於無均質處理組，褐藻酸鈉組優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素組，實驗魚隻以 *E. tarda* 攻毒後之結果呈現於 Table 2，其結果與 *A. hydrophila* 之結果相似。本實驗攻毒後之瀕臨死亡或死亡鰻隻所分離及純化之強勢菌種皆為攻毒菌種。

三、二價疫苗之有效性與時間性之抗體力價分析

以 *A. hydrophila* 為抗原進行抗體力價分析，其結果如 Table 3。第 2 週各處理組抗體力價皆有提升，處理組與對照組已有顯著差異，AS 及 ASB 組顯著高於其他組；第 4 週處理組有小幅度提升，處理組與對照組有顯著差異，AS 及 ASB 組顯著高於其他組；第 6 週各處理組抗體力價有上升之現象，二次接種組有更大幅度之提升，以 Alginate-SB 組顯著高於其他組；第 8 週各處理組有微量之上升，處理組與對照組有顯著差異，以 AB 及 ASB 組顯著高於其他組；第 10 週除 AB 組、AS 組、ASB 組、CAP 組、CB 組及 CSB 組之抗體力價有上升外，其餘皆下降，各處理組與對照組有顯著差異，AB 及 ASB 組顯著高於其他組；第 12 週，除 AB 組、ASB 組、CB 組及 CSB 組之抗體力價有持平與些微上升，其餘皆小幅度下降，各處理組與對照組有顯著差異，以 AB 及 ASB 組顯著高於其他組；第 14 週除 ASB 組之抗體力價持平以及 CAP 組有些微上升外，其他各處理組皆下降，各處理組與對照組有顯著差異，以 ASB 組最為顯著；第 16 週每組處理組之抗體力價皆呈現下降，處理組與對照組有顯著差異，AB 及 ASB 組顯著高於其他組別。

以 *E. tarda* 為抗原進行抗體力價分析，其結果如 Table 4。第 2 週各處理組抗體力價有提升但差異性不大，與對照組間已有顯著差異；第 4 週發現處理組 Alginate 包埋組與 CAP 包埋組開始出現差異性；第 6 週單次與二次接種組發生顯著性差異，二次接種組別之抗體力價提升幅度大，尤

其 CS 與 CSB 組間差異最大;第 8 週各處理組上升之現象,以 ASB 組之值最明顯;第 10 週 Alginate 組、CAP 組及 CS 組之值下降,其餘處理組皆持續上升,ASB 組效果最顯著;第 12 週除 AB 組及 CSB 組有小幅度上升外,其餘皆下降;第 14 週僅

ASB 組有上升之現象,其餘處理組皆下降;第 16 週除 ASB 及 CS 組有小幅度上升,其餘皆下降,其中 ASB 組自第 10 週起,血清抗體力價顯著高於其他各組。

Table 1 Survival rate and relative percent survival (RPS) of *Anguilla marmorata* after receiving oral bacterial vaccines, followed by intraperitoneal injection challenge with *Aeromonas hydrophila* (2.0×10^7 CFU/g fish body weight) at different timepoints (in weeks)

Time (Weeks)	Group	Mortality	Survival rate (%)	RPS (%)
4	Control	9/10	10	-
	Alginate	2/10	80	78
	AS	2/10	80	78
	AB	3/10	70	67
	ASB	2/10	80	78
	CAP	4/10	60	56
	CS	4/10	60	56
	CB	4/10	60	56
	CSB	3/10	70	67
8	Control	10/10	0	-
	Alginate	2/10	80	80
	AS	1/10	90	90
	AB	0/10	100	100
	ASB	0/10	100	100
	CAP	3/10	70	70
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	1/10	90	90
12	Control	10/10	0	-
	Alginate	3/10	70	70
	AS	2/10	80	80
	AB	1/10	90	90
	ASB	0/10	100	100
	CAP	4/10	60	60
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	2/10	80	80
16	Control	9/10	10	-
	Alginate	3/10	70	67
	AS	2/10	80	78
	AB	2/10	80	78
	ASB	1/10	90	89
	CAP	3/10	70	67
	CS	2/10	80	78
	CB	2/10	80	78
	CSB	2/10	80	78

Table 2 Survival rate and relative percent survival (RPS) of *Anguilla marmorata* after vaccination with oral bacterial vaccines followed by intraperitoneal injection challenge with *Edwardsiella tarda* (1.8×10^6 CFU/g fish body weight) at different timepoints (in weeks)

Time (Weeks)	Group	Mortality	Survival rate (%)	RPS (%)
4	Control	10/10	0	-
	Alginate	5/10	50	50
	AS	3/10	70	70
	AB	4/10	60	60
	ASB	3/10	70	70
	CAP	7/10	30	30
	CS	6/10	40	40
	CB	6/10	40	40
	CSB	6/10	40	40
8	Control	10/10	0	-
	Alginate	3/10	70	70
	AS	2/10	80	80
	AB	0/10	100	100
	ASB	0/10	100	100
	CAP	3/10	70	70
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	2/10	80	80
12	Control	10/10	0	-
	Alginate	3/10	70	70
	AS	2/10	80	80
	AB	1/10	90	90
	ASB	0/10	100	100
	CAP	4/10	60	60
	CS	3/10	70	70
	CB	2/10	80	80
	CSB	2/10	80	80
16	Control	10/10	0	-
	Alginate	5/10	50	50
	AS	3/10	70	70
	AB	2/10	80	80
	ASB	0/10	100	100
	CAP	5/10	50	50
	CS	4/10	60	60
	CB	3/10	70	70
	CSB	3/10	70	70

Table 3 Serum antibody titer against *Aeromonas hydrophila* from *Anguilla marmorata* after oral vaccination

	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Control	0.89±0.20 ^{A,b}	0.91±0.07 ^{E,b}	0.95±0.05 ^{E,a}	0.87±0.02 ^{H,b}	0.92±0.03 ^{F,ab}	0.95±0.05 ^{F,a}	0.90±0.01 ^{F,ab}	0.91±0.10 ^{F,ab}	0.89±0.12 ^{D,b}
Alginate	0.89±0.20 ^{A,B}	1.31±0.05 ^{F,C,de}	1.35±0.20 ^{C,cd}	1.43±0.03 ^{F,b}	1.49±0.04 ^{D,a}	1.41±0.08 ^{D,b}	1.36±0.17 ^{D,c}	1.29±0.14 ^{D,e}	1.21±0.20 ^{C,f}
AS	0.89±0.20 ^{A,d}	1.42±0.13 ^{A,c}	1.50±0.07 ^{A,b}	1.53±0.06 ^{D,b}	1.60±0.31 ^{BC,a}	1.62±0.12 ^{B,a}	1.59±0.13 ^{B,a}	1.51±0.09 ^{C,b}	1.43±0.23 ^{B,c}
AB	0.89±0.20 ^{A,e}	1.35±0.09 ^{B,d}	1.36±0.05 ^{C,d}	1.62±0.05 ^{B,c}	1.69±0.04 ^{A,b}	1.73±0.09 ^{A,a}	1.74±0.07 ^{A,a}	1.70±0.13 ^{B,ab}	1.68±0.14 ^{A,b}
ASB	0.89±0.20 ^{A,g}	1.40±0.03 ^{A,f}	1.49±0.03 ^{A,e}	1.67±0.04 ^{A,d}	1.69±0.04 ^{A,cd}	1.73±0.14 ^{A,bc}	1.79±0.16 ^{A,a}	1.79±0.15 ^{A,a}	1.76±0.25 ^{A,ab}
CAP	0.89±0.20 ^{A,f}	1.27±0.04 ^{D,cd,e}	1.31±0.10 ^{D,bcd}	1.40±0.04 ^{G,ab}	1.42±0.06 ^{E,a}	1.33±0.16 ^{E,abc}	1.23±0.44 ^{E,de}	1.25±0.29 ^{D,cd,e}	1.16±0.56 ^{C,e}
CS	0.89±0.20 ^{A,e}	1.31±0.04 ^{C,c}	1.42±0.03 ^{B,b}	1.46±0.05 ^{F,ab}	1.51±0.06 ^{D,a}	1.48±0.35 ^{C,ab}	1.47±0.26 ^{C,ab}	1.30±0.33 ^{D,c}	1.22±0.12 ^{C,d}
CB	0.89±0.20 ^{A,f}	1.35±0.07 ^{B,e}	1.35±0.02 ^{C,e}	1.55±0.04 ^{C,ab}	1.59±0.07 ^{C,ab}	1.61±0.09 ^{B,a}	1.62±0.18 ^{B,a}	1.51±0.22 ^{C,c}	1.46±0.19 ^{B,d}
CSB	0.89±0.20 ^{A,f}	1.31±0.11 ^{C,e}	1.41±0.08 ^{B,d}	1.54±0.02 ^{D,b}	1.63±0.06 ^{B,a}	1.63±0.17 ^{B,a}	1.64±0.04 ^{B,a}	1.53±0.25 ^{C,bc}	1.48±0.16 ^{B,c}

Different letters (A, B, C, D, E, F, G, and H) in the same column indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

Different letters (a, b, c, d, e, f, g) in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

Table 4 Serum antibody titer against *Edwardsiella tarda* from *Anguilla marmorata* after oral vaccination

	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Control	1.12±0.10 ^{A,a}	1.15±0.02 ^{C,a}	1.08±0.07 ^{D,a}	1.00±0.07 ^{G,a}	0.95±0.30 ^{F,ab}	0.97±0.07 ^{E,ab}	1.00±0.01 ^{F,a}	0.89±0.12 ^{F,b}	0.97±0.07 ^{H,ab}
Alginate	1.12±0.10 ^{A,g}	1.43±0.28 ^{A,e}	1.56±0.32 ^{A,bc}	1.63±0.13 ^{CD,ab}	1.71±0.25 ^{C,a}	1.64±0.42 ^{C,ab}	1.54±0.17 ^{DE,cd}	1.47±0.14 ^{DE,de}	1.30±0.05 ^{G,f}
AS	1.12±0.10 ^{A,f}	1.33±0.42 ^{AB,e}	1.55±0.47 ^{A,d}	1.59±0.04 ^{DE,cd}	1.72±0.29 ^{B,ab}	1.78±0.05 ^{C,a}	1.75±0.13 ^{C,a}	1.73±0.19 ^{C,ab}	1.65±0.17 ^{D,ab}
AB	1.12±0.10 ^{A,e}	1.36±0.43 ^{AB,d}	1.48±0.35 ^{ABC,c}	1.73±0.43 ^{AB,b}	1.83±0.41 ^{B,ab}	1.85±0.10 ^{B,a}	1.87±0.07 ^{B,a}	1.80±0.06 ^{B,ab}	1.73±0.10 ^{BC,b}
ASB	1.12±0.10 ^{A,f}	1.41±0.16 ^{A,e}	1.53±0.37 ^{AB,d}	1.78±0.08 ^{A,c}	1.96±0.27 ^{A,b}	2.12±0.40 ^{A,a}	2.10±0.41 ^{A,a}	2.19±0.31 ^{A,a}	2.20±0.06 ^{A,a}
CAP	1.12±0.10 ^{A,f}	1.28±0.22 ^{B,e}	1.44±0.09 ^{BC,bcd}	1.53±0.22 ^{EF,b}	1.64±0.11 ^{D,a}	1.52±0.39 ^{D,b}	1.47±0.51 ^{E,bc}	1.41±0.25 ^{E,cd}	1.36±0.11 ^{F,de}
CS	1.12±0.10 ^{A,e}	1.40±0.37 ^{A,d}	1.40±0.08 ^{C,d}	1.50±0.36 ^{F,c}	1.69±0.12 ^{C,a}	1.68±0.17 ^{C,a}	1.60±0.12 ^{D,b}	1.51±0.04 ^{D,c}	1.52±0.06 ^{E,c}
CB	1.12±0.10 ^{A,f}	1.32±0.20 ^{AB,e}	1.44±0.21 ^{BC,d}	1.68±0.17 ^{BC,c}	1.76±0.10 ^{B,ab}	1.80±0.10 ^{B,a}	1.77±0.06 ^{C,ab}	1.75±0.15 ^{BC,b}	1.69±0.10 ^{CD,c}
CSB	1.12±0.10 ^{A,f}	1.40±0.18 ^{A,e}	1.49±0.23 ^{ABC,d}	1.72±0.15 ^{AB,c}	1.83±0.15 ^{B,b}	1.87±0.04 ^{B,ab}	1.89±0.01 ^{B,a}	1.76±0.18 ^{BC,c}	1.74±0.22 ^{B,c}

Different letters (A, B, C, D, E, F, G, and H) in the same column indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

Different letters (a, b, c, d, e, f, g) in the same row indicate a significant difference ($p<0.05$) was observed.

討 論

至 2019 年全球已有 26 種市售魚類疫苗，但多位於歐美國家且用於冷水魚種如鮭、鱒魚類 (Ma *et al.*, 2019)。鰻魚為臺灣重要之養殖水產品且以輸出日本為大宗，但因藥物殘留之事件層出不窮，致日本對於從本國輸出的活鰻進行更為嚴格的藥物殘留檢驗方式，因此研發疫苗之防疫手段成為目前水產養殖發展的主要目標之一 (蕭, 2009; Gudding and Van Muiswinkel, 2013)。口服方式給予疫苗是最便捷之方法，對生物造成的緊迫也最小 (Mutoloki *et al.*, 2015)，但需克服腸胃道酸性環境的破壞，因此找尋最合適的包覆方式，可幫

助疫苗效力的改善 (Johnson and Amend, 1983; Adams *et al.*, 2006)。二次接種疫苗後，其保護力優於單次接種 (Joosten *et al.*, 1997; Tobar *et al.*, 2014)。褐藻酸係一多醣且在水產養殖上常作為一種免疫刺激物，促進巨噬細胞之活性以提高魚類非特異性免疫功能 (Yang and Jones, 2009)，於小鼠研究中亦證實其可增強免疫能力 (Huang *et al.*, 2021) 近年來仍不斷有研究以不同或改良殼材將免疫性物質包覆，以提升口服免疫的效力 (Pumchan *et al.*, 2022)，根據葉 (2012)、楊 (2014) 及徐 (2015) 等人之疫苗研究，本研究選用效果較好之鄰苯二甲酸乙酸纖維素及褐藻酸鈉作為抗原包覆殼材；參照林 (2016) 以不活化抗原，再均質

處理後進行試驗，探討除包覆材料及佐劑添加外，抗原的再加工是否對疫苗效果有影響。

本研究結果發現，單次接種褐藻酸鈉組以 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 攻毒結果，其最佳 RPS 於第 8 週有 80%、70%；鄰苯二甲酸乙酸纖維素組亦於第 8 週有 70%、70%。相較過去之發表結果，葉 (2012) 以褐藻酸鈉包覆 *V. alginolyticus* 及 *V. carchariae* 後以口服方式接種石斑魚後進行 10 倍 LD₅₀ 攻毒試驗，最佳 RPS 分別發現於第 8 週 75% 及第 4 週 88.89%。徐 (2015) 以褐藻酸鈉及鄰苯二甲酸乙酸纖維素包覆 *A. hydrophila* 及 *E. tarda* 後以口服方式接種鱸鰻苗後進行 10 倍 LD₅₀ 攻毒試驗，褐藻酸鈉組最佳 RPS 於第 12 週達 80%、90%；鄰苯二甲酸乙酸纖維素組於第 8 週達 90% 及 80%。本研究 RPS 成效不如葉及徐之研究，推測其原因為本研究使用 20 倍之 LD₅₀ 進行注射攻毒所致，但疫苗效果的趨勢皆主要出現於第 8 週。於二次接種實驗中，疫苗效力較單次好，且延長至第 12 週後才趨降，截至實驗結束之第 16 週仍與對照組有顯著性差異。於 Choi *et al.* (2011) 以單次接種及第 2 週二次口服接種 10⁸ 與 10⁹ CFU/fish 之 *E. tarda* 於牙鯧 (*Paralichthys olivaceus*) 之結果發現，於第 3 週進行攻毒試驗後，單次接種 10⁹ CFU/fish 及先接種 10⁹ CFU/fish 再接種 10⁸ CFU/fish *E. tarda* 皆為 100% RPS，表示疫苗於牙鯧中可保持至少 3 週之效力。在抗原有無均質處理組的比較中，發現有經過均質疫苗處理組之保護力優於無處理組，此結果與林 (2016) 相符，認為係包覆之抗原量不同所致，此結果與 Anuradha *et al.* (2010) 分別以 *A. hydrophila* 10⁶ 及 10⁸ CFU/g of feed 口服接種吳郭魚，高濃度下有較好的保護率效果相符。褐藻酸鈉效果優於鄰苯二甲酸乙酸纖維素推測係因非特异性免疫刺激所得之結果。

依據鰻苗抗體力價結果顯示，單次口服接種疫苗之保護最佳效果於第 8 週，未來可嘗試於不同時間點進行第二次接種，尋找疫苗之最大效益。一般養殖池菌體大量繁殖係因水中營養過高且於高溫下細菌繁殖速度增快所致，而本實驗所用菌株皆為環境常在菌且鰻魚無論幼鰻或成鰻皆易受其感染，故此疫苗之接種建議可於進入高溫期前使用，以度過易感染週期並減少抗生素之投入，降低對環境之衝擊。

參考文獻

- 漁業署 (2021) 中華民國110年台閩地區漁業統計年報. 行政院農業委員會漁業署, 臺北, 臺灣.
- 林超群 (2016) 以生物殼材包覆福馬林不活化及超音波震碎腸炎及創傷弧菌作為口服疫苗對養殖石斑之保護效果. 國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 85 pp.
- 徐程鈞 (2015) 鱸鰻苗鹽度馴化及細菌性疾病防治研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 51 pp.
- 楊政勳 (2014) 不同殼材包覆溶藻弧菌與鮫弧菌口服疫苗對養殖石斑魚之有效性研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 56 pp.
- 葉偉生 (2012) 弧菌二價疫苗及微球體包覆口服疫苗應用於石斑魚上之研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 119 pp.
- 蕭宇辰 (2009) 愛德華氏菌及嗜水性產氣單胞菌混合疫苗對日本鰻保護之效果研究. 國立臺灣海洋大學水產養殖學系碩士論文, 89 pp.
- Abdelmonem, A. A., M. M. Mohamed and S. H. Metwally (2009) Pathological studies on some parasitic diseases of eel (*Anguilla anguilla*). Egypt. J. Comp. Pathol. Clin. Pathol., 22 (3): 96-113.
- Adams, A. and K. D. Thompson (2006) Biotechnology offers revolution to fish health management. Trends Biotechnol., 24(5): 201-205.
- Alcaide, E., S. Herraiz and C. Esteve (2006) Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain. Dis. Aquat. Org., 73: 77-81.
- Anuradha, K., H. L. Foo, N. S. Mariana, T. C. Loh, K. Yusoff, M. D. Hassan, H. Sasan and A. R. Raha (2010) Live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing aerolysin genes D1 and D4 for protection against *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Appl. Microbiol., 109(5): 1632-1642.
- Choi, S. H., M. S. Kim, and K. H. Kim (2011) Protection of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Edwardsiella tarda* infection by oral administration of auxotrophic mutant *E. tarda* (Δ alr Δ asd *E. tarda*). Aquaculture, 317(1-4): 48-52.
- Chu, W. H. and C. P. Lu (2005) Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. J. Fish. Dis., 28: 437-441.
- Davidse, A., O. L. M. Haenen, S. G. Dijkstra, A. P. van Nieuwstadt, T. J. K. van der Vorst, F. Wagenaar and G. J. Wellenberg (1999) First isolation of

- herpesvirus of eel (*Herpesvirus anguillae*) in diseased European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Europe. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 19(4): 137.
- Denmark, F. C. (1987) Pseudodactylogyrus infections in eel: a review. Dis. Aquat. Org., 3: 51-57.
- Dung, T. V., V. C. Cong, T. V. Dung and A. B. Glenn (2014) Parasites of wild glass eels and cultured elvers of the giant mottled eel (*Anguilla marmorata* Quoy and Gaimard, 1824) in Vietnam. J. Aquacul. Sci., 5 (2): 145-153.
- Gudding, R. and W. B. Van Muiswinkel (2013) A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. Fish Shellfish Immunol., 35(6): 1683-1688.
- Guo, S. L., J. J. Feng, Q. H. Yang, R. Z. Guan, Y. Wang and P. P. Lu (2014) Immune effects of bathing European eels in live pathogenic bacteria, *Aeromonas hydrophila*. Aquacul. Res., 45: 913-921.
- Hangalapura, B. N., R. Zwart, M. Y. Engelsma and O. L. Haenen (2007) Pathogenesis of Herpesvirus anguillae (HVA) in juvenile European eel *Anguilla anguilla* after infection by bath immersion. Dis. Aquacul. Org., 78 (1): 13-22.
- Horzinek, M. C., V. E. C. J. Schijna, M. Denis, P. Desmettre and L. A. Babiuk (1997) General description of vaccines. In Veterinary Vaccinology (P. P. Pastoret, J. Blancou and C. Vannier eds.), Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands, 132-152.
- Huang, J., J. Huang, Y. Li, Y. Wang, F. Wang, X. Qiu, X. Liu and H. Li (2021) Sodium alginate modulates immunity, intestinal mucosal barrier function, and gut microbiota in cyclophosphamide-induced immunosuppressed BALB/c mice. J. Agricul. Food Chem., 69(25): 7064-7073.
- Jacoby, D. and M. Gollock (2014) *Anguilla bicolor*, *Anguilla celebesensis*, *Anguilla japonica*, *Anguilla luzonensis* and *Anguilla marmorata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014/10 (www.iucnredlist.org).
- Jacoby, D., J. Casselman, M. DeLucia, G. A. Hammerson and M. Gollock (2014) *Anguilla rostrata*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014/10 (www.iucnredlist.org).
- Joh, S. J., Y. K. Kwon, M. C. Kim, M. J. Kim, H. M. Kwon, J. W. Park, J. H. Kwon and J. H. Kim (2007) *Heterosporis anguillarum* infections in farm cultured eels (*Anguilla japonica*) in Korea. J. Vet. Sci., 8 (2): 147-149.
- Johnson, K. A. and D. F. Amend (1983) Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids. J. Fish Dis., 6(5): 473-476.
- Joosten, P. H. M., E. Tiemersma, A. Threels, C. Caumartin-Dhieux and J. H. W. M. Ronibout (1997) Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. Fish Shellfish Immunol., 7: 471-485.
- Knopf, K., K. Naser, M. H. van der Heijden and H. Taraschewski (2000) Humoral immune response of European eel *Anguilla anguilla* experimentally infected with *Anguillicola crassus*. Dis. Aquacul. Org., 42 (1): 61-69.
- Lee, N. S., Y. Nomura and T. Miyazaki (1999) Gill lamellar pillar cell necrosis, a new birnavirus disease in Japanese eels. Dis. Aquacul. Org., 37(1): 13-21.
- Ma, J., T. J. Bruce, E. M. Jones and K. D. Cain (2019) A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms, 7(11): 569.
- Mutoloki, S., H. M. Munang'andu and Ø. Evensen (2015) Oral vaccination of fish—antigen preparations, uptake, and immune induction. Front. Immunol., 6: 519.
- Pumchan, A., U. Sae-Ueng, C. Prasittichai, S. Sirisuay, N. Areechon and S. Unajak (2022) A novel efficient piscine oral nano-vaccine delivery system: Modified halloysite nanotubes (HNTs) preventing streptococcosis disease in tilapia (*Oreochromis sp.*). Vaccines, 10(8): 1180.
- Radhakrishnan, A., B. Vaseeharan, P. Ramasamy and S. Jeyachandran (2022) Oral vaccination for sustainable disease prevention in aquaculture: an encapsulation approach. Aquacul. Int., 1-25.
- Rodger, H. D. (2016). Fish Disease Causing Economic Impact in Global Aquaculture. In Fish Vaccines, Birkhäuser Advances in Infectious Diseases (A. Adams eds), Springer, Basel, pp.1-34 https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0980-1_1.
- Savan, R., A. Igarashi, S. Matsuoka and M. Sakai (2004) Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop: mediated isothermal amplification method. Appl. Environ. Microbiol., 70: 621-624.
- Shiraishi, H., and V. Crook (2015). Eel market dynamics: An analysis of *Anguilla* production. TRAFFIC, Tokyo, Japan.
- Silfvergrip, A. M. C. (2009) CITES identification Guide to the Freshwater Eels (Anguillidae) with Focus on the

- European Eel *Anguilla anguilla*. Report 5943, Version 1.1, The Rep. Swed. Environ. Prot. Agency, Stockholm.
- Snieszko, S. F. and S. B. Friddle (1949) Prophylaxis of furunculosis in brook trout (*Salvelinus Fontinalis*) by oral immunization and sulfamerazine. *Prog. Fish. Cult.*, 11: 161-168.
- Sures, B. and K. Knopf (2004) Individual and combined effects of cadmium and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the humoral immune response in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally infected with larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Parasitology*, 128 (4): 445-454.
- Tobar, I., S. Arancibia, C. Torres, V. Vera, P. Soto, C. Carrasco, M. Alvarado, E. Neira, S. Arcos and J. A. Tobar (2015) Successive oral immunizations against *Piscirickettsia salmonis* and infectious salmon anemia virus are required to maintain a long-term protection in farmed salmonids. *Front. Immunol.*, 6: 244.
- Yang, D. and K. S. Jones (2009) Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. *J. Biomed. Mater. Res.*, 90A: 411-418.

The Development of Oral Bacterial Vaccines for Juvenile Marbled Eels (*Anguilla marmorata*)

Jung-Hau Chiou^{1*}, Kuo-Kau Lee² and Ping-Chung Liu²

¹Eastern Fishery Research Center, Fisheries Research Institute

²Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University

ABSTRACT

The present study aimed to address bacterial disease and improve the survival rate of juvenile marbled eels (*Anguilla marmorata*) with the development of oral bacterial vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. The vaccines were developed using bacterial cells treated with formalin and encapsulated with 3% sodium alginate or 6% cellulose acetate phthalate (CAP) and formalin-treated bacterial cells which were sonicated for 1.5 hours and encapsulated with 5% of sodium alginate or 9% CAP. The eels' serum antibody titer significantly increased after oral vaccination, and results from eels intraperitoneally (i.p.) challenged with *A. hydrophila* and *E. tarda*, respectively, showed that the highest relative percent survival was obtained at week 8 in the one-time orally vaccinated groups. Eels administered with boosters of the same oral vaccine exhibited a higher antibody titer that was maintained to the 12th week. Due to the higher quantity of antigen in the encapsulated vaccine, the sonicated-antigen vaccine groups demonstrated increased vaccine efficacy compared to the untreated groups. The results show that oral administration with encapsulated vaccine may protect bacterial antigens from stomach acid, thereby enabling antigen-induced immune responses in the eels' intestine.

Key words: *Anguilla marmorata*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, oral vaccine, immune system

*Correspondence: No. 22, Wu-Chuan Rd., Chengkung, Taitung, Taiwan. TEL: (089) 850-090 ext. 304; Fax: (089) 850-092; E-mail: jhchiou@mail.tfrin.gov.tw