

Reviewed Paper

臺灣魚蝦貝類病毒症之研究

郭光雄·陳秀男·羅竹芳

Fish and Shellfish Viral Disease Research in Taiwan

G. H. Kou¹, S. N. Chen¹ and C. F. Lo¹

In 1981, Chen and Kou established the first eel cell line in the world. Since then many warm water fish cell lines have been established in Taiwan. These investigations not only enhanced aquatic animal cell culture technology but also initiated fish and shellfish viral disease research. During the last decade viral diseases have been found in a variety of aquatic animals such as eel (*Anguilla japonica*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*), tilapia (*Sarotherodon mossambica*), loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), shrimp (*Penaeus monodon*) and hard clam (*Meretrix lusoria*). These diseases have been studied extensively in the fields of pathology, etiology, serology, biochemistry and molecular biology.

In this report, fish and shellfish viral disease research in Taiwan will be discussed under 2 main subjects: (1) establishment of fish and shellfish cell lines, (2) fish and shellfish viruses. Comparisons between research done in Taiwan and that done in other countries will also be discussed.

自 1981 年陳及郭建立世界第一個鰻魚細胞株後，有關臺灣重要魚介類細胞培養之研究報告即相繼發表 (Chen *et al.*, 1982, 1983; Chen *et al.*, 1989a, b; Chen and Kou, 1981, 1982; Chen *et al.*, 1982, 1983a, b, 1989; Chi *et al.*, 1989)。這些研究不僅奠定了國內水產動物細胞培養技術，亦開啓魚介類病毒症之研究。本文擬就比兩個主題，論述臺灣魚蝦貝類病毒症的研究，比較國內外研究結果，及未來的發展方向。

重要魚介類永久細胞株之建立

病毒是絕對細胞內寄生。在活體內 (*in vivo*) 從事病毒研究，受制於諸如個體差異免疫作用及感染條件等客觀因素，因此細胞株在病毒研究上有其必然的重要性。1962 年 Wolf 及 Quimby 由虹鱒生殖腺 (rainbow trout gonad) 建立第一個魚類永久細胞株 (Wang *et al.*, 1987)，此後世界各地又有各魚種類細胞株陸續被建立，使許多病毒因藉魚類細胞株而得以分離 (isolation)、純化 (purification)，並進行各種特性之研究。但國外建立之細胞株，大多來自冷水魚，而本省重要經濟養殖魚則屬溫水魚種，鑑於病毒都有其特定之寄主範圍 (host range)，而不同細胞又僅對部分病毒具感受性 (susceptibility)。因此近十年來國內魚類病理學者積極致力於開發各種重要魚類永久細

¹ Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 107, Republic of China.

胞株，成果豐碩，不僅強化了國內魚類病毒症之研究，更帶動了魚類細胞生物學及細胞化學之研究。

目前臺灣所建立的 13 種常用魚類永久細胞株，分別來自日本鰻 (eel, *Anguilla japonica*)、吳郭魚 (tilapia hybrid, *Sarotherodon mossambicus* × *S. nilotica*)、大肚魚 (topminnow, *Gambusia patruelis*)、錦鯉 (*Cyprinus carpio*)、鯉魚 (*C. carpio*)、臺灣鱧 (Snakehead, *Channa maculata*)、泥鰍 (loach, *Misgurnus anguillicaudatus*) 和青石斑 (banded grouper, *Epinephelus awoara*) 等 7 種溫水魚 (warm-water fish) 的腎臟、鱗、卵巢或鰓 (表 1)。這些細胞株有纖維母細胞 (fibroblastic) 和類上皮細胞 (epithelioid) 二型。在這 14 種細胞株中，除了來自泥鰍鱗組織的 LF 細胞株對病毒毫無感受性外，其它 12 種細胞株對魚類傳染性胰臟壞死病毒系列 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV)，如 EVA (eel virus America)、EVE (eel virus Europe)、EVEX (eel virus European X)、LV-1 (loach virus)、CV (clam virus) 等魚貝類病毒具感受性，但對於傳染性造血組織壞死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 和病毒出血性敗血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) 則無感受性 (Kou and Chen, 1988)。

表一 臺灣建立的 13 種溫水魚細胞株的魚種及組織來源

細胞株名稱	魚 種	來 源	組織來源	參 考 文 獻
EK-1	日本鰻 (<i>Anguilla japonica</i>)		腎 臟	Chen <i>et al.</i> , 1982
EO-2	日本鰻 (<i>A. japonica</i>)		卵 巢	Chen and Kou, 1981, 1982
TK-1	吳郭魚雜交種 (<i>Sarotherodon mossambica</i> × <i>S. nilotica</i>)		腎 臟	Chen <i>et al.</i> , 1983b
TO-2	吳郭魚雜交種 (<i>S. mossambica</i> × <i>S. nilotica</i>)		卵 巢	Chen <i>et al.</i> , 1983a
TM	大肚魚 (<i>Gambusia patruelis</i>)		組織碎塊	Wang <i>et al.</i> , 1987
BR	錦鯉 (<i>Cyprinus carpio</i>)		腦	Chen <i>et al.</i> , 1989
FI	錦鯉 (<i>C. carpio</i>)		鰓	Chen <i>et al.</i> , 1989
GON	錦鯉 (<i>C. carpio</i>)		生 殖 腺	Chen <i>et al.</i> , 1989
CE	鯉魚 (<i>C. carpio</i>)		鱗	Chen <i>et al.</i> , 1983
LF	泥鰍 (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)		鱗	Chen <i>et al.</i> , 1989a
SK	臺灣鱧 (<i>Channa maculata</i>)		腎 臟	Chen <i>et al.</i> , 1989b
BGF	青石斑 (<i>Epinephelus awoara</i>)		鱗	Chen <i>et al.</i> , 1989
BGK	青石斑 (<i>E. awoara</i>)		腎	Chen <i>et al.</i> , 1989

除了魚類養殖外，文蛤 (hard clam)，牡蠣 (oyster) 及對蝦類 (penaeid shrimp) 等也是臺灣重要水產養殖項目。由於市場的需求，養殖面積及密度逐年增加，惟養殖蝦貝類不斷有大量死亡的報導，嚴重影響蝦貝養殖業。造成水產生物大量死亡的原因很多，其中主要為外界環境的改變，如氧氣的缺乏，溫度與鹽度急驟上升或下降，海水污染、或寄生蟲、黴菌、細菌亦或病毒感染所致 (Jahromi, 1977; Oprandy *et al.*, 1981; Sindermann, 1970; Sparke, 1972; Vago, 1966)。由於臺灣養殖蝦貝類已確定有病毒感染的情形 (Lightner *et al.*, 1987; Lightner and Redman, 1981; Lightner *et al.*, 1983b; Lo *et al.*, 1988)，因此極待蝦貝類細胞株的建立，以供病毒的分離與研究。現階段，臺灣蝦貝類細胞培養技術已漸臻純熟，初級細胞培養技術已建立。陳等(1986)，於培養基 (Leibovitz's L-15) 中添加草蝦肌肉萃取液 (grass prawn muscle extract) 及龍蝦或草蝦的血淋巴 (lobster or grass prawn hemolymph)，結果成功地培養出草蝦卵巢細胞，並且經過三次繼代培養 (subcultures)。利用類似培養基，亦可用來培養紅尾蝦 (red-tailshrimp, *Penaeus penicillatus*) 的淋巴或卵巢組織 (lymphoid and ovary tissue) 細胞。在該培養基中

，蝦細胞可形成單一細胞層 (monolayer)，並對草蝦桿狀病毒 (monodon-type baculovirus) 有感受性 (Chen *et al.*, 1986; Chen and Kou, 1988; 1989)。至於文蛤細胞培養，最近亦有突破。以含 2 倍 L-15 的培養基中，加入 15% 文蛤血淋巴及 5% 胎牛血清配成文蛤培養基 (hard clam culture medium, HCCM)，來培養文蛤鰓細胞 (gill cells)，結果鰓細胞可在此培養基中懸浮生長 (suspension culture)，而且可觀察到細胞分裂現象。利用相同培養基可成功地達到繼代培養 (Chen and Kou, 1988)，由上述研究觀之，蝦貝類細胞之建立是指日可待。

病毒的分離及其特性的研究

1. 魚類病毒

魚類病毒的存在對養殖業是一嚴重威脅，因為多數魚類病毒會造成魚羣發生突發性死亡。魚類病毒的研究始於 1941 年，但至 1960 年 Wolf 等人經分離及再接種實驗，確定第一個魚類病毒症——魚類傳染性胰臟壞死症 (Wolf and Quimby, 1962)。

雖然魚類病毒症自發現至今僅短短數十年，但它的發展却非常迅速。研究範圍包括病理學，病毒分離和一般特性的測定，病毒生化及血清學特性分析，以及分子生物學研究 (Chen *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1985a, b; Chou *et al.*, 1989; Dobos *et al.*, 1979; Hedrick *et al.*, 1983; Hsu, *et al.*, 1989a, b; Tung *et al.*, 1982; Ueno *et al.*, 1984; Underwood *et al.*, 1977; Wolf *et al.*, 1960)。

近年來國內經濟養殖魚類備受病毒威脅，引起各方面的注意，並加強魚類病毒的研究，茲將國內所發現之病毒，依病毒種類分述如下。

(1) 傳染性胰臟壞死病毒，IPN 病毒

Hedrick 等自 1980 年起嘗試由國內一些養殖魚，如吳郭魚、虱目魚 (milkfish, *Chanos chanos*)、鯉魚、白鯪 (silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*)、金魚 (goldfish, *Carassius auratus*)、鰻魚、虹鱒 (rainbow trout, *Salmo gairdneri*) 等分離病毒，結果在鹿港附近的虹鱒分離出 IPN 病毒 VR-299 株，而在臺灣北部，淡水附近的日本鰻及吳郭魚，以及鹿港附近的日本鰻魚分離出 IPN 病毒 Ab 株。爾後，又由多位研究者，相繼自虱目魚、泥鰍及鱸魚 (*Perch, Lateolabrax japonica*) 等分離出類 IPN Ab 病毒株，顯見 IPN 病毒在臺灣分布非常廣，無論中部、南部或北部，都曾發現 IPN 病毒感染魚 (Chen *et al.*, 1984; Hedrick *et al.*, 1983; Lipipun *et al.*, 1989)。

雖然，由生化特性及血清學上之研究顯示，臺灣的 IPN 病毒與歐洲的 Ab 株近似，但臺灣所發現之類 IPN 病毒 Ab 株却有其獨有的特性，即一般 IPN Ab 病毒株無法在 FHM 細胞株 (fathead minnow cell line) 中增殖，但臺灣所分離之類 IPN Ab 株，如泥鰍兩段核糖核酸病毒 (loach birnavirus, LBV)，會使 FHM 細胞株形成明顯細胞病變 (cytopathic effect)。又這些病毒之最適增殖溫度為 25°C~30°C，而 30°C 對一般 IPN 病毒而言是過高溫而無法增殖。因此臺灣的 IPN 病毒可能是隨國外引進之發眼卵或魚苗傳入國內，之後可能因寄主的變遷或某種環境因子的影響而改變了特性 (Chen *et al.*, 1984; Chou *et al.*, 1989)。

鑑於臺灣所發現之類 IPN 病毒與 IPN Ab 病毒原株特性上有差別，中央研究院動物所與美國緬因州大學微生物系合作以單株抗體 (monoclonal antibodies) 分析在亞洲所發現的兩段核糖核酸病毒間抗原性關係 (antigenic relationships)。他們選用 AS-1, W1, W2, W3, W4, W5, E1, E2, E3, E5, E6 等 11 種單株抗體，來測試 18 種由亞洲地區水產動物所分離的病毒。在此 13 種病毒分離株中，13 種是自臺灣地區養殖魚所分離出，分別為自鰻魚分離之 E1S, 288, 321, 339, 409, 553, 3371, 3372, 3748, 6194，自虱目魚的 MFK，鱒魚的 TF 及鱸魚 PV 之等病毒。結果顯示這

些病毒和北美及歐洲所分離出之 IPN 等病毒，都有一共通的血清型特異性抗原位 (serogroup-specific epitope)。由日本所分離出之鰻魚兩段核糖核酸病毒 EVE (European eel virus) 至少有 1 抗原決定位與 Ab IPN 病毒相異，可用單株抗體 E3 鑑識出來。而上述病毒中，E1S, PV 及 TF 的單株抗體反應型式與 EVE 完全相同。至於其它 10 種鰻魚和虱目魚病毒的反應型式，和美國及歐洲所分離出之已確認的 9 種血清型的反應型式有極大的不同 (Lipipun *et al.*, 1989)。

(2) 傳染性造血組織壞死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus; IHNV)。

陳等 (1983) 自養殖虹鱖稚魚分離出病毒，由電子顯微鏡的觀察顯示病毒為長型， 90×180 nm 的大小，且其型態上之特徵和桿狀病毒 (rhabdovirus) 相似。由組織病理觀察發現感染魚的造血組織壞死，再則以血清中和試驗 (serum neutralization) 及螢光抗體測試 (fluorescent antibody test) 可確定所分離出之病毒和傳染性造血組織壞死病毒有極相近的關係 (Chen *et al.*, 1983)。

傳染性造血組織壞死病毒常作虹鱖及各種鮭魚發生急性病，而且死亡率非常高，病魚腹部腫大、眼睛凸出 (exophthalmus)。在 1983 年前，臺灣並未有 IHN 病毒的病例，但 1983 年 2 月，養殖戶自日本引進受精卵 (fertilized egg)，結果該批卵所孵化的稚魚都發生典型的傳染性造血組織壞死症病徵，而且最後都死亡。因此將來自國外引進魚苗必須要謹慎，而且事先檢疫是絕對必要的。

(3) 呼腸孤病毒 (reo-like virus)

Hsu 等 (1989) 自大甲溪上游，近武陵農場處的陸封性鮭魚 (landlocked salmon; *Oncorhynchus masou* Brevoort) 分離出一種新的類呼腸孤病毒，並定名為陸封性鮭魚病毒 (landlocked salmon virus; LSV)。本病毒可在 AS, BF-2, BB, CCO 及 CHSE-214 細胞株中增殖。但在 RTG-2 及 TO-2 細胞株中病毒產量非常少。在 CHSE-214 細胞株中的最適生長溫度為 20°C 。本病毒具二層病毒蛋白質外鞘 (capsid)，直徑 78 nm，二十面體對稱型，在氯化鈉中之浮力密度為 1.365 g/ml 。由上述特徵所示，本病毒屬呼腸孤病毒科 (reoviridae)。將 LSV 和自運魚分離的 GSV (golden shiner virus)，水道鯰的 CRV (channel catfish reovirus)，美國牡蠣的 13P2 (American oyster virus) 以及人類的 Reo-3 (human reovirus type 3, dearing strain) 相比較，結果 LSV 的 RNA 電泳泳動型 (mobility) 與 CSV 近似，但病毒粒子蛋白質泳動型則與 13P2 類似。由於每一種水產動物呼腸孤病毒之蛋白質與 RNA 的泳動型都不一樣，因此上述結果顯示 LSV 是一新的類呼腸孤病毒 (Hsu *et al.*, 1989a)。至於 LSV 之病原性，本病毒和發現在其它魚類的呼腸孤病毒一樣，屬低傳染性及弱病原性，但由於其寄主廣泛，因此仍建議需常檢視臺灣水產生物感染此種病毒的情況。

2. 貝類病毒

貝類與魚類同是高經濟效益生物，因此有關養殖及一般性疾病的研究相當豐富，唯病毒的研究則屬較弱的一環，Lo 等自 1983 年起，即嘗試以電子顯微鏡切片觀察臺灣貝類病毒感染狀況，結果發現臺灣貝類確有疑似病毒病的存在。利用吳郭魚卵巢細胞株，TO-2 細胞，可由採自嘉義及彰化之文蛤分離出病毒。分離出病毒之文蛤都因潰爛而變黑。由電子顯微鏡觀察文蛤鰓部組織，發現在壞死細胞質中有病毒聚合體，而且大部分鰓細胞都被病毒侵害。比較 TO-2 細胞中之病毒與文蛤鰓部病毒之形態，二者並無差異，顯見以 TO-2 細胞所分離出之病毒是出現在文蛤潰爛鰓部的病毒。文蛤病毒在 TO-2 細胞中之最適增殖溫度為 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ，在 25°C 的複製週期為 24 小時。由血清學及生化特性上之研究所示，該病毒為類 IPN Ab 病毒株 (Lo *et al.*, 1988)。以 IPN 病毒之單株抗體羣，分析自臺灣文蛤所分離出之病毒 CV-1, CV-HB-1, CV-TS-1，結果顯示所有文蛤類 IPN 病毒與所採用之單株抗體羣反應型式，都與鰻魚病毒 EVE 相同 (Lipipun *et al.*, 1989)。

文蛤病毒的病原性，因實驗設計的困難及客觀因素的複雜性，至今仍無法瞭解，文蛤病毒與文蛤重死亡之關係也未有定論，所以此方面之研究仍待加強。雖然如此，由病理觀察所示，病毒感染後會

造成文蛤鰓部組織潰爛，而鰓又是文蛤進行呼吸作用的地方，再則文蛤為濾食性動物，因此鰓對文蛤而言亦是重要攝食器官，鰓部的潰爛，無疑會對文蛤造成傷害，根據此點推測嚴重感染病毒應會使文蛤死亡 (Lo *et al.*, 1988)。

有關國外貝類病毒之研究也是這幾年才開始。根據 Rosenfield (1976) 的綜論，Bonami 等在 1971 年最早報導歐洲牡蠣 (European oyster; *Ostrea edulis*) 消化腺細胞含有病毒顆粒之圓形內涵體，這些內涵體和甲殼類的類病毒粒相似。不過後來將他所發表之照片和別人在美國牡蠣 (*Crassostrea virginia*) 及硬蛤 (*Abra ovata*) 體內所發現之簡孢蟲 (Haplosporidian parasites) 相比較，該文描述之類似涵體的圓形顆粒實為簡孢蟲之某一孢子時期 (Rosenfield, 1976)。接著 Walker 和 Barry 亦在貽貝 (*Mya arenaria*) 的鰓腫瘤中發現 50 nm 之類病毒粒 (Rosenfield, 1976)。Farley 等人 (1972) 指出美國牡蠣也受到病毒侵害。當他研究高水溫對牡蠣生長及活存的影響時，發現提高水溫會造成牡蠣高死亡率。經觀察受高溫影響的牡蠣的組織切片，結果顯示牡蠣細胞核中有內涵體 (intranuclear inclusion) 這些內涵體與感染其他動物的疱疹病毒 (herpesvirus) 相似。在核內涵體中可見 70~90 nm 具單層蛋白質鞘之六角形病毒。一般 28°C~30°C 高水溫對健康牡蠣並不足為害，唯一旦罹病後，則對高水溫敏感，實驗結果顯示在 28°C~30°C 之罹病牡蠣較在 18°C~20°C 者更易在其細胞核內出現類似疱疹病毒內涵體，且這些內涵體又和實驗牡蠣高溫致死有密切相關 (Dobos, 1979)。除此之外 Farley 還在美國牡蠣體內發現類乳突多樣瘤水泡病毒 (Papovavirus-like particles) 粒子。由於疱疹病毒和乳突多樣瘤水泡病毒已由實驗上證明會誘發兩生類、鳥類、及包括靈長類的哺乳動物產生腫瘤，因此軟體動物腫瘤 (molluscan neoplasm) 也許也是由這些病毒引起的 (Rosenfield, 1976)。Underwood 等 (1977) 引述 Buchanan (1973) 及 Hill (1976) 的觀察指出，有一族羣的櫻蛤 (*Tellina tenuis*) 的殼既薄且呈粉狀，而且其消化腺不若平時的暗棕色反為淡黃色。在此消化腺中專門製造殼前驅物質 (precursor material) 的細胞大都壞死，而且細胞質中有膜狀構造圍繞的內涵體。在此內涵體中可發現直徑 70 nm 類呼腸孤病毒的二十面體病毒粒子。在健康櫻蛤體內則無此病毒粒子。Underwood (1977) 在研究此病毒之物理化學及血清學上之特性時，發現櫻蛤病毒和 IPN 病毒是同樣病毒 (Underwood *et al.*, 1977)，Elston (1979) 以電子顯微鏡檢視人工孵化太平洋稚蚶 (Pacific oyster; *Crassostrea gigas*) 時發現某種六角形類病毒粒子與稚蚶面盤 (velar) 的明顯損傷有關。類病毒粒子僅在面盤上皮細胞 (velar epithelium) 出現，其直徑為 228 nm 左右。由連續切片觀察結果顯示，含類病毒粒子之細胞呈空泡化 (vacuolated)，細胞界線模糊，且在光學顯微鏡即可見細胞質內涵體 (intracytoplasmic inclusion body)。電子顯微鏡下顯示類病毒粒子僅在損傷部位出現，因此該病毒極可能就是病原 (Elston, 1979)。Meyers (1979) 及 Meyers 和 Hirai (1980) 以美國稚蚶之組織均質濾液接種至 BF-2 魚類永久細胞株，結果產生了細胞病變。分析該病毒結果知其屬於呼腸孤病毒類 (Meyers, 1979; Meyers and Hirai, 1980)。以由美國牡蠣所分離出之呼腸孤病毒 13P2 做病原性試驗，結果證實它對美國稚蚶有病原性。Oprandy 等 (1981) 自貽貝造血組織腫瘤分離及純化出病毒粒子。此病毒粒子具被膜，外形不一，平均大小為 120 nm，核酸不在病毒粒子中心，在氯化鉀中的浮力密度為 1.17~1.18 g/ml，260/280 nm 紫外光吸收比值為 1.23。就其特性而言與 B 型反轉錄病毒 (retrovirus) 相似。自健康貽貝無法分離出此種病毒，又若將已分離出之反轉錄病毒再打入健康的貽貝中，結果也產生了造血組織腫瘤，因此證實該病毒為貽貝造血組織腫瘤之病原 (Oprandy *et al.*, 1981)。

由國外之報告而知貝類可被多種病毒侵害，而且大多具病原性。目前在國內所發現之貝類病毒僅限於 IPN 病毒類及呼腸孤病毒，因此若自國外引進貝種時必須注意檢疫，慎防將貝類病毒病傳入國內。又當貝類細胞株建立後，宜對臺灣貝類病毒再做詳細調查，以防止高病原性貝類病毒在臺灣蔓延。

3. 蝦類病毒

自民國 57 年草蝦 (*P. monodon*) 之人工繁殖技術建立後，草蝦養殖已成為本省重要水產養殖項目。近年來臺灣養蝦業發展更為迅速，養殖蝦的種類也日益繁多，養殖密度也逐年增高。由於集約養殖的結果，養殖蝦罹病並造成大量死亡的事件不斷發生，造成的損失已達不可忽視的地步 (Wolf and Quimby, 1962)。廖等 (1985) 報導 1984 年及 1985 年屏東地區常見養殖蝦類疾病為紅鰓症 (red gill disease)、爛鰓症 (gill rot)、黑斑病 (black spot disease)、爛尾症 (tail rot)、鐘形蟲寄生病 (protozoan epizooism)、線蟲寄生病 (nematode parasitism)、絲藻附著症 (ectozoic algal growth)、等腳水蚤寄生病 (isopods associates) 和蝦體彎曲症 (body cramp)。病因包括細菌、真菌、寄生蟲等的感染或營養性疾病。至於蝦類病毒則尚未被發現 (廖等, 1985)。Lightner 等 (1987) 於 1986 年 3 月、選擇臺灣南部一些發生蝦大量死亡或生長不良的養殖池，調查蝦病發生狀況。經檢視草蝦、紅尾蝦 (*P. penicillatus*)、白蝦 (*P. vannamei*) 及熊蝦 (*P. semisulcatus*)，結果在草蝦及熊蝦發現草蝦桿狀病毒 (*P. monodon*-type baculovirus; MBV)，在白蝦發現下表皮及造血組織壞死病毒 (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus; IHNV) (Lightner *et al.*, 1987)。

草蝦桿狀病毒對草蝦的感染非常普遍，除了臺灣、菲律賓、馬來西亞、新加坡、墨西哥、夏威夷、大溪地等都有病例報告 (Lightner, 1983; 1987; Lightner and Redman, 1981; Lightner *et al.*, 1983b; Lightner *et al.*, 1987; Tsing and Bonami, 1984)。草蝦桿狀病毒的寄主非常廣泛，蝦體於感染本病毒後，會有體弱、厭食和減少用附肢整理體表的動作等現象。嚴重感染草蝦桿狀病毒者，大多體型較小，體色較暗，體表和鰓易有矽藻、鐘形蟲和絲狀菌附著。在後期幼生以後的各期蝦體均有草蝦桿狀病毒感染實例 (Lightner *et al.*, 1987; 廖等 1985)。本病毒主要侵害蝦類肝胰腺 (hepatopancreas)，在肝胰腺細胞內形成包涵體，利用孔雀綠和不褪綠 (fast green) 在短時間內，即可將包涵體染成綠色。用蘇木紫——伊紅複染法 (homatoxylin-eosin stain) 染色，顯示包涵體為嗜伊紅性 (陳、張, 1988; 廖等 1985)。

草蝦肝胰腺有 E、F、B、R、M 等五種形態不同的細胞，除了 E 細胞外，其餘四種細胞都發現被草蝦桿狀病毒感染，並在細胞核內形成包涵體，俟細胞瓦解後包涵體和游離病毒會流入肝胰腺的管腔中，隨糞便排出體外 (Chen *et al.*, 1989c; 廖等 1985)。

陳和張 (1989) 指出本省草蝦、沙蝦、紅尾蝦及熊蝦都可感染草蝦桿狀病毒，其中尤以草蝦感染情況最為嚴重，無論蝦苗或養成蝦的感染率都高達 80% 以上。再則自新加坡或馬來西亞的進口母蝦的感染率皆在 50% 以上。為了篩選無病毒母蝦以培育蝦苗，陳及張 (1989) 建立草蝦桿狀病毒診斷系統。有關養殖蝦類感染草蝦桿狀病毒之診斷，有下列幾種方法 (1) 光學顯微鏡組織病理檢查法 (2) 電子顯微鏡組織病理檢查法 (3) 肝胰臟抹片之快速診斷法 (4) 排泄物 (糞便) 中包涵體之檢查法。以上各法皆有其優缺點，但只要技術純熟，每一種方法皆可發揮其最佳效果，甚至以直接觀察而不經染色的方法，亦可精確的檢查出草蝦桿狀病毒包涵體，成功篩選出無病毒母蝦，以供培育健康而無病毒之蝦苗 (陳、張, 1988)。

桿狀病毒會造成繁殖場草蝦後幼生期蝦苗死亡。對一般養殖期之草蝦而言，只要減少水中緊迫因子之存在，亦即降低養殖密度，提高水中溶氧，保持良好水色，減少水中有機物或有毒物之存在，則感染草蝦桿狀病毒的蝦子，仍會有良好的存活率及生長率。反之若不加強養殖池的管理，則草蝦桿狀病毒會急遽於蝦體內增殖，導致細胞破裂甚或細菌或其它病原體之二次感染，造成蝦子死亡 (Lightner *et al.*, 1987; Wolf and Quimby, 1962) 因此環境因子與罹患草蝦桿狀病毒的蝦子死亡間之關係，是不容忽視之課題。

下表皮及造血組織壞死病毒 (IHNV) 為小 RNA 病毒羣 (picornavirus)，主要侵害蝦的發源自外胚層及中胚層的組織。本病毒亦會在細胞核內形成包涵體。臺灣白蝦之後幼生有罹患本病毒症

之病例。感染蝦的鰓、前腸角皮層 (foregut cuticular epithelium) 及下皮層 (subcutis)、血細胞 (hemocyte) 及觸角腺上皮組織 (antennal gland epithelium) 以及頸胸部 (gnathothorax) 的疏鬆性結締組織 (loose connective tissue) 等都可發現 IHNV 病毒之內涵體。臺灣的蝦類 IHNV 病毒可能是由巴拿馬 (Panama) 隨感染蝦引進臺灣，目前僅在白蝦中發現 (Lightner 等, 1987) 至於一種非對蝦類 (可能為 *Palaemon japonicus*) 可能為病毒貯存體 (reservoir host)，因此蝦胚胎有被 IHNV 病毒明顯感染跡象，但在成體則未發現此病毒之感染，如果 *P. japonicus* 確定為 IHNV 病毒之貯存寄主，則會造成本病防疫之困擾 (Lightner *et al.*, 1987; Lightner *et al.*, 1983a)。

在對蝦發現的病毒除了草蝦桿狀病毒下表皮及造血組織壞死病毒外，在國外尚有中腸腺壞死桿狀病毒 (baculoviral midgut gland necrosis virus; BMNV)，對蝦桿狀病毒 (*Baculovirus penaei* virus; Baculovirus BP)，肝胰腺類小 DNA 病毒 (hepatopancreatic parvovirus; HPV) 和在斑節蝦 (*P. japonicus*) 肝胰腺內發現的類呼腸孤病毒 (Couch, 1974a, b; Lightner, 1983; Lightner and Redman, 1985; Sano *et al.*, 1981; Sparke, 1972)。由於這些病毒尚未在臺灣地區發生，因此由國外引進蝦苗或種蝦時，宜嚴格檢疫，以防止引進新病毒，造成不可收拾的地步。

綜觀臺灣過去有關魚蝦貝類病毒症之研究，其涉及的層面深，範圍亦廣，唯有關檢疫及防疫上的研究則較缺乏。今後的研究宜加強生物科技在魚蝦貝類病毒症診斷及防疫上之應用，以達成下列目標(1)生產特異性單株抗體供診斷(2)生產高特異性之核酸探子 (nucleic acid probe) 供檢疫用(3)選殖魚蝦貝類病毒基因，以供合成病毒蛋白質做為疫苗之材料(4)開發如桿狀病毒表現載體系等之真核表現載體系，以生產經醱化作用之病毒蛋白質，供疫苗的製備。

REFERENCES

- Chen, J. H., S. N. Chen and G. H. Kou (1982). Primary monolayer culture of common carp (*Cyprinus carpio*) fin and its susceptibility of fish viruses. *Rep. Fish Dis. Res.*, 4: 98-100.
- Chen, J. H., S. N. Chen, H. H. Shih and G. H. Kou (1983). A cell line derived from common carp (*Cyprinus carpio*) fin. *Proc. ROC-Jap. Coop. Sci. Seminar Fish. Dis. NSC Symp. Ser.*, 10: 93-101.
- Chen, S. N., J. H. Chen and G. H. Kou (1989). A cell line derived from tissues of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Rep. Fish Dis. Res.* (D) (In press).
- Chen, S. N., J. H. Chen and G. H. Kou (1989). Two cell lines derived from tissues of banded grouper (*Epinephelus awoara*). *Bull. Europ. Ass. Fish Path.*, (Submission).
- Chen, S. N., P. S. Chang, G. H. Kou and D. V. Lightner (1989). Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeus monodon* Baculovirus (MBV) in the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Fish Path.* (In press).
- Chen, S. N., S. C. Chi, J. J. Chu, J. C. Chen and G. H. Kou (1984). Pathogenicity of a birnavirus isolated from loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *COA Fish. Ser. No. 1, Rep. Fish Dis. Res.*, (6): 6-11.
- Chen, S. N., S. C. Chi, G. H. Kou and I. C. Liao (1986). Cell culture from tissues of grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Path.*, 21(3): 161-166.
- Chen, S. N., S. C. Chi, H. H. Shih and G. H. Kou (1983). The occurrence on infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Taiwan. *Proc. ROC-Jap. Coop. Sci. Sem. Fish Dis., NSC Symp. Ser.*, 10: 56-58.
- Chen, S. N., K. J. Jong and G. H. Kou (1988). Cell cultures from lymphoid tissue and ovary of penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. In *Proc. 7th Internatl. Congr. Invert. Fish Tissue Culture* (E. E. Kurstak and Y. Kuroda, eds.) (In press).
- Chen, S. N., K. J. Jong and G. H. Kou (1988). Cell cultures derived from tissues of *Penaeus penicillatus* and hard clam, *Meretrix lusoria*. In *Invertebrate Tissue Culture* (J. Mitsuhashi, ed.) (In press).
- Chen, S. N. and G. H. Kou (1981). A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary. *Jap. Soc. Fish Path.*, 16(3): 129-137.

- Chen, S. N. and G. H. Kou (1982). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis studies of cell lines derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary and kidney. *CAPD Fish. Ser. No. 8, Rep. Fish Dis. Res.*, (6): 1-7.
- Chen S.N. and G.H. Kou (1989). Infection of culture cells from lymphoid organ of *Penaeus monodon* by monodon-type baculovirus (MBV). *J. Fish Dis.* (In Press).
- Chen, S. N., G. H. Kou, R. P. Hedrick and J. L. Fryer (1985). The occurrence of viral infections of fish in Taiwan. *Fish and Shellfish Path.*, 313-319.
- Chen, S. N., H. H. Shih and G. H. Kou (1985). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and eel virus european (EVE) in tissue cultures and infected fish. *COA Fish. Ser. No. 4, Fish Dis. Res.*, (7): 1-8.
- Chen, S. N., Y. Ueno and G. H. Kou (1982). A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) kidney. *Proc. Natl. Sci. Council*, 6(1): 93-100.
- Chen, S. N., Y. Ueno and G. H. Kou (1983). A cell line derived from tilapia ovary. *Fish Path.*, 18 (1): 13-18.
- Chen, S. N., S. C. Wen, Y. Ueno and G. H. Kou (1983). Establishment of a cell line from kidney of tilapia. *Bull. Europ. Ass. Fish Path.*, 3: 1-4.
- Chen, S. N., S. C. Yeh and G. H. Kou (1989). Three cell lines derived from tissues of gold carp (*Cyprinus carpio*). *Rep. Fish Dis. Res. (D)* (In press).
- Chi, S. C., S. N. Chen and G. H. Kou (1982). Monolayer culture of goldfish (*Carassius auratus*) swimming bladder. *CAPD Fish. Ser. No. 8, Rep. Fish Dis. Res.*, (4): 96-97.
- Chou S. Y., C. F. Lo, M. C. Tung and C. H. Wang (1989). The general characteristics of a birnavirus isolated from cultured loach (*Misgurnus*) in Taiwan. *Fish Path.* (In press).
- Couch, J. A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invert. Path.*, 24: 311-331.
- Couch, J. A. (1974). Free and occluded virus, similar to baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature*, 247: 229-231.
- Dobos, P., B. J. Hill, R. Hallett, D. T. C. Kells, H. Becht and D. Tenings (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.*, 32: 593-605.
- Elston, R. (1979). Viruslike particles associated with lesions in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Invert. Path.*, 33: 71-74.
- Farley, C. A., W. G. Banfield, G. Kasnic Jr. and W. S. Foater (1972). Oyster herpes-type virus. *Science*, 178: 759-760.
- Hsu, Y. L., B. S. Chen and J. L. Wu (1989). Characteristics of a new reo-like virus isolated from land-locked salmon (*Oncorhynchus masou BREVOORT*). *Fish Path.*, 24: 37.
- Hsu, Y. L., S. Y. Chiang, S. T. Lin and J. L. Wu (1989). The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by immuno dot blot. *J. Fish Dis.* (in press).
- Hedrick, R. P., J. L. Fryer, S. N. Chen and G. H. Kou (1983). Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Jap. Soc. Fish Path.*, 18(2): 91-97.
- Jahromi, S. S. (1977). Occurrence of rhabdovirus-like particles in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Gen. Virol.*, 36: 485-493.
- Johnson, P. T. (1976). A herpeslike virus from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Invert. Path.*, 27: 419-420.
- Johnson, P. T. (1977). A viral disease of the blue crab, *Callinectes sapidus*: histopathology and differential diagnosis. *J. Invert. Path.*, 29: 201-209.
- Johnson, P. T. and J. E. Bodammer (1975). A disease of blue crab, *Callinectes sapidus* of possible viral etiology. *J. Invert. Path.*, 26: 141-143.
- Johnson, P. T. and C. A. Farley (1980). A new-enveloped helical virus from the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Invert. Path.*, 35: 90-92.
- Kou, G. H. and S. N. Chen (1988). Establishment and application of 14 cell lines from warm-water Fish (E. Kurstak and Y. Kuroda, eds.). In *Proc. 7th Internatl. Congr. Invert. Fish Tissue Culture* (In Press).
- Lightner, D. V. (1983). Diseases of cultured penaeid shrimp. In *Mariculture* (J. P. McVey, ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 289-320.
- Lightner, D. V. and R. P. Hedrick, J. L. Fryer, S. N. Chen, I. C. Liao and G. H. Kou (1987). A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important disease. *Fish Path.*, 22(3): 127-140.

- Lichtner, D. V. and R. M. Redman (1981). A baculovirus caused disease of penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invert. Path.*, 38: 299-302.
- Lichtner, D. V. and R. M. Redman (1985). A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert. Path.*, 45: 47-53.
- Lichtner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invert. Path.*, 42: 62-70.
- Lichtner, D. V., R. M. Redman and T. A. Bell (1983b). Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 32: 209-233.
- Lipipun, V., P. Caswell-Reno, Y. L. Hsu, J. L. Wu, M. C. Tung, P. W. Reno, W. Wattanavijarn and B. L. Nicholson (1989). Antigenic analysis of Asian aquatic birnavirus isolates using monoclonal antibodies. *Fish Path.*, 24(3): 155-160.
- Lo, C. F., Y. W. Hong, S. Y. Huang and C. H. Wang (1988). The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Path.*, 23(3): 147-154.
- Meyers, T. R. (1979). A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Gen. Virol.*, 43: 203-212.
- Meyers, T. R. and K. Hircei (1980). Morphology of a reo-like virus isolation from juvenile American oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Gen. Virol.*, 45: 249-253.
- Oprandy, J. J., P. W. Chang, A. D. Pronovost, K. R. Cooper, R. S. Brown and V. J. Yates (1981). Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invert. Path.*, 38: 45-51.
- Rosenfield, A. (1976). Recent environmental studies of neoplasms in marine shellfish. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 20: 263-274.
- Sano, T., T. Nishimura, K. Oguma, K. Monoyama and N. Takeno (1981). Baculovirus infection of culture kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) in Japan. *Fish Path.*, 15: 185-191.
- Sindermann, C. T. (1970). Principal disease of marine fish and shellfish. Academic Press., N. Y. and London.
- Sparke, A. K. (1972) Invertebrate pathology, noncommunicable disease. Academic Press., N. Y.
- Tsing, A. and J. R. Bonami (1984). A new virus disease in the shrimp *Penaeus japonicus*. *Prem. Colloq. Internatl. Path. Aquacult. Mar., Lab. Path. Comp., Montpell. Cedex, France, 11-14 Sept., 1984*.
- Tung, M. C., S. C. Lin, S. S. Tsai, C. I. Liu and C. F. Lo (1982). Outbreaks of branchionephrosis among cultured eel (*Anguilla japonica*) in Southern Taiwan, *NSC Symp.*, 116-125.
- Ueno, Y., S. N. Chen, G. H. Kou, R. P. Hedrick and J. L. Fryer (1984). Characterization of a virus isolated from Japanese eels (*Anguilla japonica*) with nephroblastoma. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica*, 23(1): 47-55.
- Underwood, B. O., C. J. Smale and F. Brown (1977). Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.*, 36: 93-109.
- Vago, P. O. (1966) A virus disease in crustacea. *Nature*, 209-1290.
- Wang, S. Y., S. N. Chen and G. H. Kou (1987). Establishment of a cell line derived from top-minnow (*Gambusia paturelis*). *Proc. Natl. Sci. Council.*, B, 11(3): 245-252.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1962). Established eurythermic line of fish cell *In vitro*. *Science*, 135: 1065-1066.
- Wolf, K., C. E. Dunbar and S. F. Snieszko (1960). Infectious pancreatic necrosis of trout. 1. Tissue-culture study. *Prog. Fish-Cult.*, 22: 64-68.
- 林敏雄, 陳秀男, 郭光雄 (1983). 臺灣地區魚病研究之回顧。農委會漁業特刊第九號, 魚病研究專集 5: 1-9。
- 張朴性 (1988). 臺灣養殖蝦類之桿狀病毒感染研究。臺灣大學碩士論文。
- 陳秀男, 張朴性 (1988). 草蝦桿狀病毒 (MBV) 之診斷方法及其應用 1988(4): 42-52。
- 廖一久, 郭光雄, 陳秀男, 賴靜誼 (1985). 屏東地區之養殖蝦類疾病初步調查。農委會漁業特刊第四號, 魚病研究專集 7: 86-94。



臺灣魚蝦貝類病毒症之研究

郭光雄·陳秀男·羅竹芳

自 1981 年陳和郭建立世界第一個鰻魚細胞株以來，陸續有許多溫水魚細胞株建立。這方面的研究不僅提升了水生動物細胞培養技術，也促使本地魚貝類病毒病的研究。近 10 年來，陸續發現多種水產動物如：鰻魚、虹鱒、泥鰍、草蝦、文蚶的病毒病。這些疾病在病理學、病源學、血清學、生化、分子生物學等各領域均有廣泛的研究。

本篇針對臺灣魚、貝類病毒症的研究，分成兩大主題來討論，(1)魚、貝類細胞株建立(2)魚、貝類病毒研究。同時亦將比較國內外相關研究之結果，並建議未來的發展方向。

(轉載自中華民國農學團體七十八年聯合年會特刊)

