

本省養殖石斑魚及嘉臘魚之病毒性疾病 初步調查研究

高主道 張素容 周信佑

國立臺灣海洋大學水產養殖系

針對臺灣地區海水養殖作疾病普查結果顯示，本省海水魚苗和幼魚之疾病發生率遠比成魚來的高，其中有 37.10% 為不明原因之疾病發生，有多數養殖場都曾發現有魚隻不明原因的大量死亡，無明顯徵狀，僅發現有不正常迴游及不明原因的成長遲緩等現象。疾病發生的季節大都集中在早晚溫差變化大的夏秋兩季之間，而以六、七、八月為高峰。

針對調查結果之疑是有病毒性疾病發生地區進行魚隻採樣及病毒分離，包含石斑、嘉臘及石斑魚卵，十一次採樣結果均無法在接種之六種淡水魚類細胞株上發現病毒所產生之細胞病變效應。

本研究亦嘗試嘉臘魚、烏魚、花身鵝魚及黑鯛各組織細胞之初代培養，結果顯示生殖腺、腎臟、心臟及脾臟細胞，其細胞形狀有表皮樣細胞及纖維樣細胞，可在添加 10% 胎牛血清之培養基中生長達數週之久。

前 言

由於本省致力於高經濟價值海水魚之養殖，近期內可望成為養殖對象之種類達十數種如：鯛類、石斑類等，在發展養殖技術的同時，疾病的防治亦逐漸受到重視，本省養殖海水魚之疾病研究以病害性原蟲類及細菌類所引起之疾病為主，疫情調查報導亦然，病毒性疾病的研究歷史尚短(郭等，1989)。

目前全球已發現之海水魚類病毒約有二十多種，此外，在數種魚類之腫瘤中也發現似病毒顆粒的感染 (Ito *et al.*, 1976; Emerson *et al.*, 1985; Smith & Wang, 1990)，由於有報告指出，數種海水魚之病毒性疾病並無明顯病徵，只是感染魚行為異常，而在各種緊迫因子 (stress) 如：溫度改變、溶氧不足、捕撈、運輸等刺激下，會爆發疾病並引起高死亡率。近年來，更由於發現病毒感染和海水魚仔稚魚大量死亡有密切關連，海水魚之病毒疾病備受重視，如：自 1985 年來在法國引起養殖鱸魚稚魚大量死亡之腦炎推測和病毒有關 (Breil *et al.*, 1991)，日本鸚鵡魚幼魚的病毒性神經壞死症造成連續三年高達 100% 的死亡率 (Yoshikoshi & Inoue, 1990)，以及澳洲養殖鱸魚亦因病毒性腦炎而引發大量死亡 (Glazebrook *et al.*, 1990)。

海水魚苗存活率過低一直是本省海水魚養殖的瓶頸，澎湖地區海水魚苗(石斑、嘉臘)曾發生平衡力喪失而在水表面旋轉游泳，最後沉底死亡之情形，所有魚體皆沒有明顯外傷及病徵，此情形和報告中本種病毒感染情形極為類似，因此本研究針對養殖海水魚不明原因之死亡、羣異常行為、養殖環境資料、死亡發生之情形及餌料生物異常情形等做一之調查並配合採樣。

此外魚類病毒學之研究，魚類細胞株 (cell lines) 的建立極為重要，但目前已建立之細胞株，大部份屬於淡水魚類的細胞株，鑑於病毒都有其特定之寄生範圍，而不同細胞又僅對部份病毒具感受性 (susceptibility)，近年來國內魚病學者積極致力於各種重要海水魚類永久細胞株之建立，目前已有青石斑 (*Epinephelus awoara*) 鱗、腎及黑鯛 (*Acanthopagrus schlegeli*) 脾、腎等由來之細胞株建立 (Chen *et al.*, 1989; Tung *et al.*, 1991)。本研究亦嘗試嘉臘魚、烏魚、花身鵝魚及黑鯛心臟、腎、脾、生殖腺細胞之初代培養研究。

材料與方法

臺灣地區養殖海水魚之初步調查

由臺灣省漁業局、基隆水產試驗所總所、水產試驗所屏東分所和澎湖分所取得養殖戶之基本資料，篩選出海水魚養殖業者，確定調查目的後，擬訂最初問卷調查表，再根據實地的電話試查結果來修改問卷調查表（表一），最後以郵件來進行問卷調查。

表一 問 卷 內 容

1. 您目前是否還從事水產養殖業？ 是 否
2. 您目前的養殖用水種類？ 海水（包括鹹水，半淡鹹水） 淡水
3. 您目前所養殖或繁殖的海水魚種類為何？（可複選）
石斑 嘉臘 黑鯛（黑格） 黃錫鯛（邦頭） 黃鰭鯛（赤翅） 鮒魚 烏魚
海水吳郭魚 花身鷄魚 虱目魚 其它.....
4. 您目前的海水魚養殖面積有多少公頃？ []公頃 []甲
5. 您從事海水魚養殖有多久歷史？ 1年以下 1—3年 3—5年 5年以上
6. 您所經營為養殖場或種苗繁殖場？（可複選） 養殖場 種苗繁殖
7. 您目前的養殖型式？ 淺海養殖（魚塢） 箱網養殖
8. 從您養殖開始到目前有無疾病發生？ 有 無
9. 貴養（繁）殖場所發生的疾病大都出現在那一時期？（可複選） 魚苗 幼魚 成魚
10. 若有疾病發生，你知道大都為何種疾病嗎？（可複選）
知 道..... 車輪蟲感染 海水性白點蟲感染 卵圓鞭毛蟲感染 黴菌感染
弧菌性疾病 鏈球菌感染疾 寄生蟲感染 其它.....
不知道..... 那有何疾病徵狀？ 無徵狀 有徵狀.....
11. 貴養（繁）殖場曾發生過以下那些現象？（可複選）
魚隻不明原因的大量死亡 魚隻不明原因的不正常迴旋（螺旋）游泳
魚隻死亡但外表無任何徵狀 魚隻不明原因的成長不良（長不大或遲緩）
12. 貴養（繁）殖場疾病的發生大多在何種情況下出現？（可選）
早晚溫差變化大（換季之際） 水質酸鹼度的變化 水質的污染
其 它.....
13. 通常有疾病發生在那幾月或那一個季節？（可複選）
1月 2月 3月 4月 5月 6月 7月 8月 9月 10月 11月 12月
春季 夏季 秋季 冬季
14. 您認為海水魚在養殖上最大的困難為何？.....

採 樣

針對調查結果之疑是有病毒性疾病發生地區來進行魚隻採樣，包括每月一次定期採樣及不定期採樣。

魚類細胞株及細胞培養

以六種經常用於魚類病毒研究之魚類細胞株進行病毒分離。BB (Brown bullhead)、BF-2 (Bluegill fin)、CHSE-214 (Chinook salmon embryo)、EPC (Epithelioma papillosum cyprini)、FHM (Fathead minnow) 及 RTG-2 (Rainbow trout gonad) 等細胞株皆屬於淡水

魚類細胞株，以 Eagle's MEM (Minimum essential medium) 培養基培養。Eagle's MEM 培養基的配製方法是以市售之粉末 (日水製藥株式會社) 完全溶解於二次蒸餾水中後，直接以高壓蒸氣 (Autoclave) 在 121°C、1.2 atm、滅菌處理二十分鐘，再以無菌操作將此溶液以 7.5% NaHCO₃ 調整 pH 值至 7.2~7.4 左右，並加入 0.292 mg/ml 的麩胺酸 (Glutamine)。如果是配製細胞生長基 (Growth medium)，則添加 4% 經 56°C 處理 30 分鐘之胎牛血清 (FBS)，簡稱 MEM-4。若是用以培養病毒或做為接種病毒稀釋液者，則添加 2% FBS 及 13-14 mM/ml 之 HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])，並以 1N 之 NaOH 調整 pH 值至 7.2-7.4，簡稱 MEM-2H。

海水魚類組織細胞之初代及繼代培養

將實驗魚經消毒麻醉後，移至無菌操作箱 (Laminar flow) 中，以滅菌解剖儀器依序將海水魚之心臟、腎臟、脾臟、及生殖腺組織取出放入冰浴，再以添加 60 mM NaCl 及抗生素 (青黴素 Penicillin, 200 I. U./ml、鏈黴素 Streptomycin, 200 μ g/ml 及殺黴素 Fungizone, 7.0 μ g/ml；簡稱 PSF) 之 PBS(-) 溶液清洗後，置於含有 60 mM NaCl 及抗生素之 MEM-4 中，將各組織剪碎後，置於 24-well plate 中，嘗試以添加 10% FBS 之不同培養基 (MEM、MEM-H、MEM- α 及 Leibovitz's L-15 培養基) 培養於 26°C，每天觀察細胞生長情形。

當初代培養細胞長成細胞層後，即可進行細胞繼代培養。倒掉舊培養基，用 PBS 緩衝液清洗細胞層後，加入少量 0.1% 胰蛋白酶 -EDTA，待細胞自生長面游離出完全分散成單一細胞，即可加入新的培養基懸浮細胞成細胞懸浮液，將二分之一細胞分到新的培養瓶中，再靜置於培養箱中，如此便完成細胞之繼代培養。

病毒分離

最先由澎湖地區私人養殖場 (兩處) 採樣，一為石斑之淺海養殖場 (林慶祥先生)，另一為嘉臘魚箱網養殖場 (蔡建郎先生)。所採回之樣本隔天進行病毒分離步驟，所收集的病毒液一部分儲存於 -80°C 一部分接種於現有之細胞株。

病毒分離以魚苗和幼魚為主要之採樣對象，魚苗整隻研磨，幼魚則取腦、鰓、肝、腎、脾和心臟等組織加少量滅菌海砂充份研磨後，加入約組織四倍量之 MEM-2H 稀釋後，以無菌吸管將研磨液吸入離心管中，於 4°C、3,000 rpm 下離心 20 分鐘。離心完成後以孔徑 200 nm 之過濾器中過濾，將濾液接種至海水魚之初代培養細胞及 BB、BF-2、CHSE-214、EPC、FHM 及 RTG-2 細胞株上，觀察是否有細胞病變效應 (Cytopathic effect, CPE) 產生。

結 果

臺灣地區養殖海水魚之初步調查

此次問卷以澎湖、屏東、嘉義及宜蘭地區為主 (調查期間 81 年 6 月至 81 年 10 月)，發出問卷共 236 份，回收 79 份，其中從事海水養殖者 68 戶。養殖海水魚種石斑為 14.10%，黑鯛 13.18%，

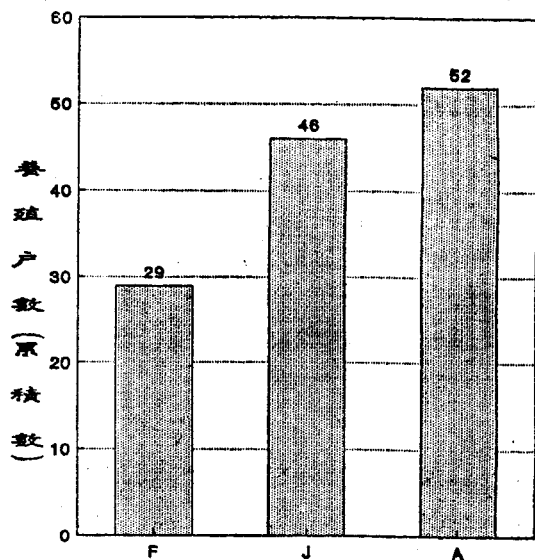
表二 問卷調查中主要的調查地區及問卷回數

地 區 (縣)	澎 湖	屏 東	高 雄	臺 南	嘉 義	雲 林	彰 化
問卷回收數*	20	9	11	6	15	6	1
問卷回收數百分每%	29.41	13.24	16.18	8.82	22.06	8.82	1.47

* 問卷回收數 (海水魚養殖戶) 合計 68 戶。

黃鰭鯛 10.00%，鱸魚 9.55%，黃錫鯛 9.10%，海水吳郭魚、虱目魚 8.18%，花身鷄魚 6.36%，烏魚 4.10%。經營養殖場者 64.1%，種苗繁殖場 4.48%，兩者皆有經營者為 30.88%。淺海養殖（魚塭養殖）有 62/68 戶（91.18%），箱網為 3/68 戶（4.41%），兩者皆有者佔 3/68 戶（5%）。

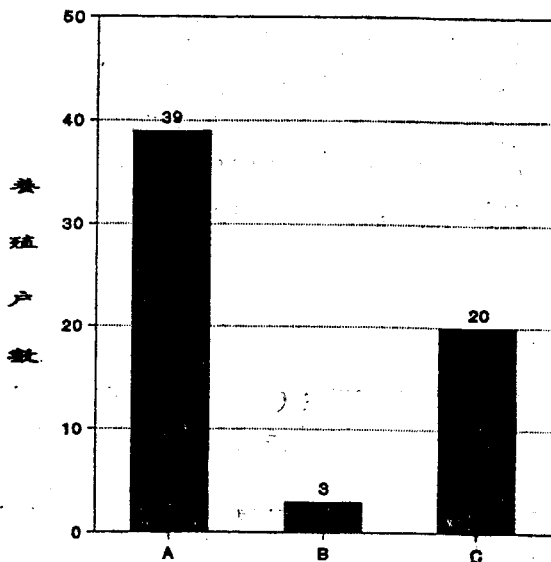
養殖魚疾病發生率高達 100%，其中魚苗及幼魚發生比例較高，佔 59.1%，成魚 40.94%（圖一），而養殖戶本身知道為何種疾病者有 62.9%，不知道原因者佔 4.84%，而不明確者佔 32.26%（圖二）



圖一 問卷調查，海水養殖場中大都在魚苗，幼魚，成魚三個不同時期魚隻發生疾病之戶數。

註：“F”表示魚苗。“J”表示幼魚。“A”表示成魚。

* 因為在一養殖戶（場）中有重複者，以上統計圖為累計數。



圖二 問卷調查中，海水養殖戶知道，不知道或不確定罹患為何種疾病養之殖戶數。

註：“A”表示養殖戶知道為何種疾病者。

“B”表示養殖戶不知道為何種疾病者。

“C”表示養殖戶不確定為何種疾病者。

。已知疾病中以白點蟲 22.97% 最高，而車輪蟲 17.57%，黴菌 14.86%，弧菌 12.16%，卵圓鞭毛蟲 8.11%，鏈球菌 6.10%，其它 3.38% (圖三)。養殖場中曾發生魚隻不明原因之大量死亡有 20.37%，其中死亡但外表無任何徵狀者 26.85%，不明原因的不正常迴旋(螺旋)游泳 35.2%，不明原因的成長不良(成長遲緩)有 17.6% (圖四)。

疾病大多出現在早晚溫差大(換季之際)時期，從季節來看以夏季最高，從月份看疾病發生以六、七、八月份較高(圖五)。

海水魚類組織細胞之初代及繼代培養

嘉臘魚、黑鯛、烏魚及花身雞魚等各組織細胞在 26°C 下作初代培養，其細胞形狀有表皮樣細胞(Epitheloid cells)及纖維樣細胞(Fibroblast-like cells)(圖六、七、八、九)。這四種海水魚類各組織之初代培養結果顯示，生殖腺組織細胞之培養情形最佳，腎臟及心臟次之，脾臟較差，生殖腺細胞於第四天開始細胞自組織塊游離出，並附著於培養面，約七至十天後形成細胞層。而各組織之初代培養細胞在不同培養基之生長情形結果，以在 MEM-H 培養基生長最佳，L-15 次之，但在 MEM- α 培養基沒有發現細胞生長。初代培養細胞的壽命很長，在每週一次更換培養基的情況下，培養三週至一個月仍能維持其原有細胞形態，而無退化及死亡現象。

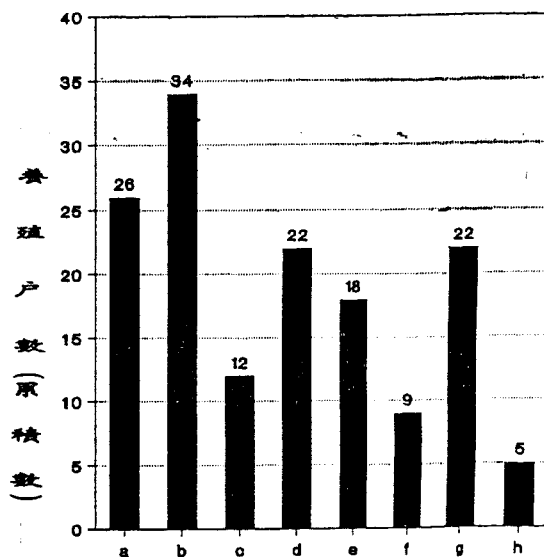
嘉臘魚之生殖腺、腎臟及心臟組織以一：二方式進行繼代培養至第三代，生長情形良好。

病毒分離

此間共採樣十一次，其中石斑採了四次(包括石斑魚卵)，嘉臘七次，這幾次病毒分離結果，在所接種之六種魚類細胞株上皆無發現細胞病變效應產生。

討 論

爲了加強對本省海水魚養殖有所了解而作了海水魚養殖的問卷調查，因爲事先篩選過養殖戶原始資

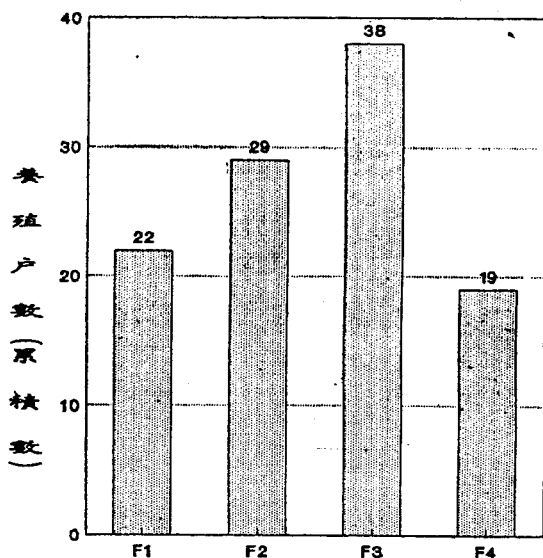


圖三 問卷調查中，海水養殖戶罹患各疾病之養殖戶數

註：a：車輪蟲 b：海水性白點蟲 c：卵圓鞭毛蟲
d：黴菌 e：弧菌 f：鏈球菌 g：寄生蟲
h：其它

* 因爲在一養殖戶(場)中有重複者，以上統計圖爲累計數。

料，所以回收問卷大都為五年經驗以上之海水魚養殖業者，養殖魚種大多為高經濟魚種養殖，其中主要是淺海養殖（魚塭養殖），這是因為臺灣不像日本和韓國多海灣可以抵擋風浪，因此箱網養殖只有澎湖地區較為可行。疾病方面調查結果顯示，魚苗和幼苗的疾病發生率比成魚來的高，魚類病毒感染的對象



圖四 問卷調查中，海水魚養殖中會出現魚隻不明原因的大量死亡，不正常迴游，成長不良及魚隻死亡但外表無任何徵狀等現象之養殖戶數。（累積數）

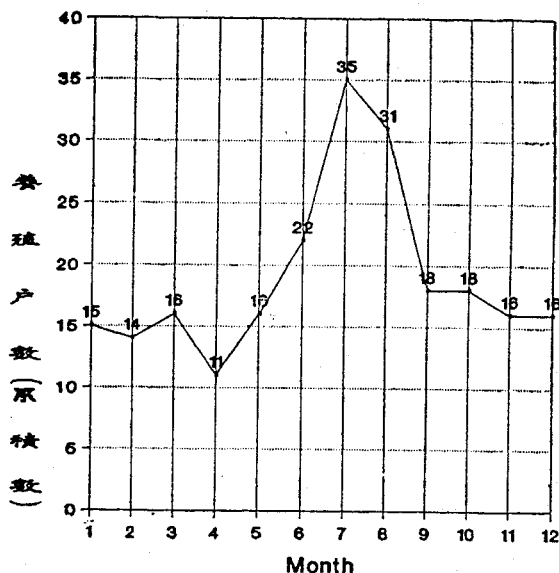
註：F 1：表示魚隻不明原因的大量死亡。

F 2：表示魚隻死亡但外表無任何徵狀。

F 3：表示魚隻不明原因的不正常迴旋（螺旋）游泳。

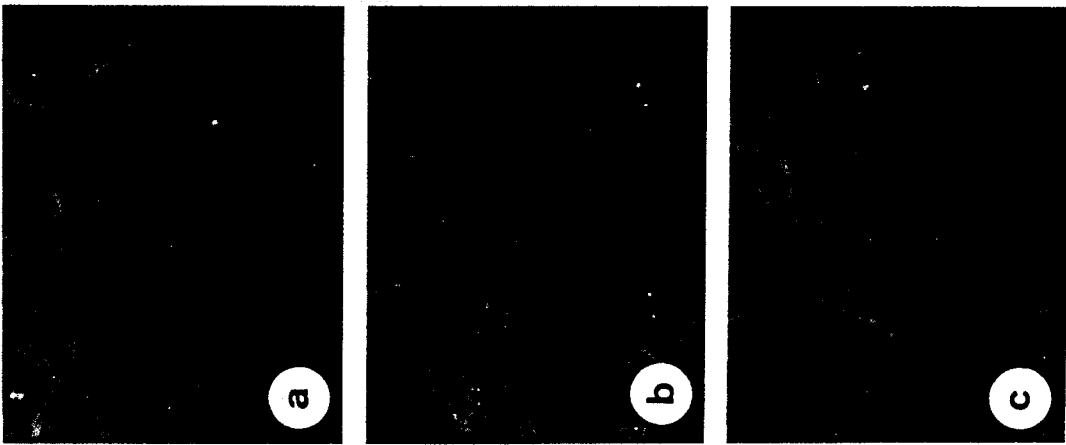
F 4：表示魚隻不明原因的成長不良。

* 因為在一養殖戶（場）中有重複者，以上統計圖為累計數。



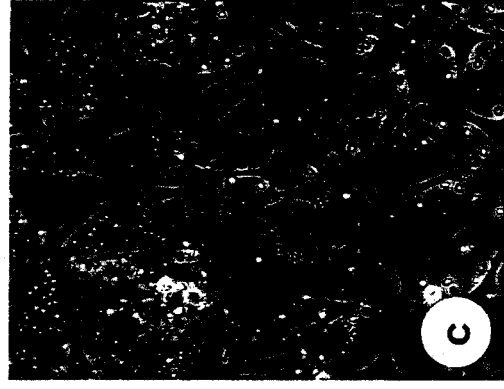
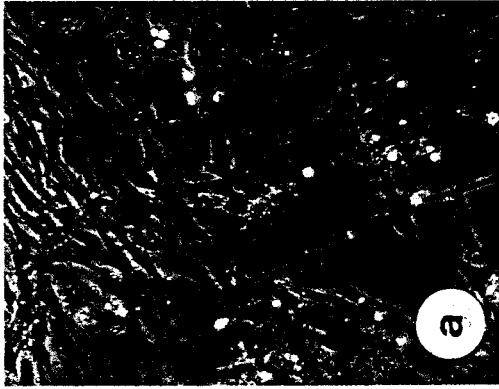
圖五 問卷調查中，海水魚養殖場大都在以下那一個月份發生疾病之養殖戶數

* 因為在一養殖戶（場）中有重複者，以上統計圖為累計數。



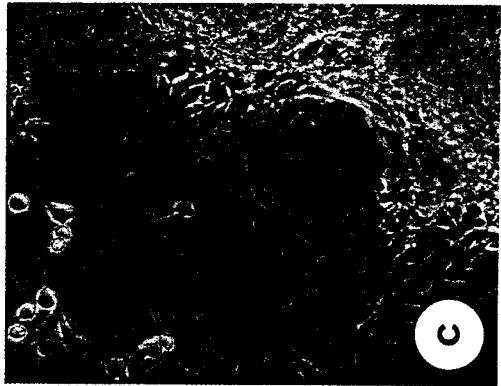
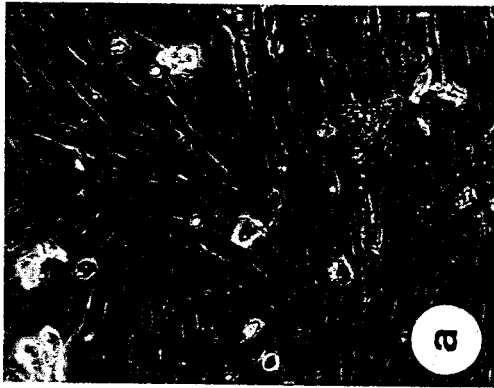
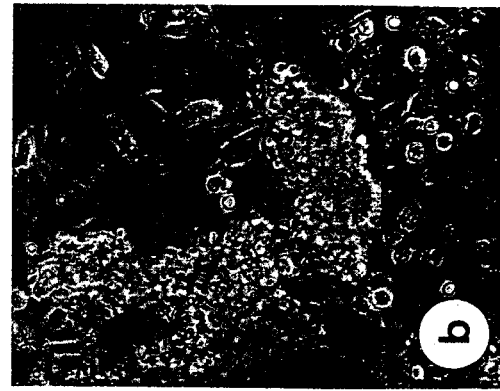
圖六 嘉臘魚組織於 26°C 之第三代培養細胞。(×99)

a. 生殖腺細胞； b. 腎臟細胞； c. 心臟細胞。



圖七 黑鯛組織於 26°C 之初代培養細胞第五天之生長情形。(×146)

a. 生殖腺細胞； b. 腎臟細胞； c. 心臟細胞； d. 脾臟細胞。



圖九 花身鷄魚組織於 26°C 之初代培養細胞第五天之生長情形。(×146)

a. 生殖腺細胞； b. 腎臟細胞； c. 心臟細胞； d. 脾臟細胞。

圖八 烏魚組織於 26°C 之初代培養細胞第五天之生長情形。(×146)

a. 生殖腺細胞； b. 腎臟細胞； c. 心臟細胞； d. 脾臟細胞。

也大多是小魚，調查結果中有 37.1% 的比率為不明原因的疾病發生，其中蠻高比例的養殖場都曾發現有魚隻不明原因的大量死亡，死亡魚無明顯徵狀，但死亡前有不正常迴游及魚隻成長遲緩等疑似病毒感染的現象。疾病發生的季節大都集中在早晚溫差變化大的夏秋兩季之間，也就是 5 月到 10 月之間，可能因魚隻在這時期抵抗力較弱，極易造成疾病病原體入侵的佳機。此外亦有報告指出病毒並不一定單獨存在於魚體中，有可能伴隨著其它疾病共存於魚體中，如可在罹患鰓黴菌的養殖日本鰻中觀察到病毒體的存在(劉等, 1983)。此外 Comps 等學者(1991) 指出似傳染性胰臟壞死病毒(IPNV) 可經由餌料生物(如：輪蟲) 的攝入而進入魚體中，而造成法國鱸魚仔魚的死亡。海水魚苗存活率過低一直是本省海水魚養殖的困難，病毒感染亦是可能原因之一。此外養殖海水魚不明原因之死亡，魚羣異常行為，養殖環境資料，死亡發生之情形及餌料生物異常情形等做一通盤性之調查研究，將有助於海水魚病毒疾病之研究。

由於沒有使用二氧化碳培養箱，海水魚組織細胞之初代培養以在 MEM-H 培養基效果最好，可能和其 pH 值穩定維持在 7.2-7.4 之間有關。組織上殘留的血液造成紅血球過多亦會影響細胞情形。由本研究之結果發現海水魚生殖腺、腎臟之初代培養細胞易由組織塊游離出，且生長速度快，應可嘗試將之用於病毒分離之研究。

本研究病毒分離結果，於 BB、BF-2、CHSE-214、EPC、FHM 以及 RTG-2 等魚類細胞株並未發現細胞病變效應，可能因為：

- 一、採樣之地區不够廣，樣本區不够分散，以至樣本數仍有不足。
- 二、所採之樣本魚隻太大，因大魚對病毒之抵抗力較強。
- 三、病毒分離所使用之細胞株為淡水溫帶魚細胞株，對海水魚病毒之可能沒有感受性。

針對以上三點將來應增加分散採樣地區，以魚苗、幼魚及魚卵為採樣對象，且加強建立海水魚之細胞培養作為海水魚病毒研究之工具。

誌 謝

本研究承農業發展委員會經費補助，得以完成，謹此致謝。研究期間承蒙臺灣省漁業局李孟頌先生、基隆水產試驗所總所盧民益先生、水產試驗所東港分所張賜玲先生提供養殖戶之基本資料，澎湖分所林金榮先生，澎湖地區私人養殖場李慶祥先生、蔡建郎先生的熱心協助使本研究得以順利進行，在此謹致萬分謝意。

參 考 文 獻

- 郭光雄、陳秀男、羅竹芳(1989) 臺灣魚貝類病毒症之研究。J. Fish Soc. Taiwan, 16(4): 303-312。
- 劉國鈞、麥麗敏、簡肇衡(1983) 自罹鰓黴菌之養殖日本鰻魚所觀察到之病毒。農委所漁業特刊第九號，魚病研究專集(四)：65-68。
- Breuil, G., J.R. Bonami, J.F. Redin and Y. Pepin and Y. Pichot (1991) Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. Aquaculture. 97: 109-115.
- Chen, S.-N., J.-H. Chen and G.-H. Kou (1989) A cell line derived from tissues of banded grouper (*Epinephelus awoara*). Bull. Europ. Ass. Fish Path., (Submission).
- Comps, M., B. Menu., G. Breuil and J.R. Bonami (1991) Viral infection with rotifer mortalities in mass culture. Aquaculture. 93: 1-7.
- Emerson, C. J., J.F. Payne and A.K. Bal (1985) Evidence for the presence of a viral non-lymphocystis type disease in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), from the north-west Atlantic. J. Fish Dis., 8: 91-102.

- Glazebrook, J. S., M. P. Heasman and S. W. De Beer (1990) Picornalike viral particles associated with mass mortalities in larval barramuundi, *Lates calcarifer* Bloch. J. Fish Dis., 13: 245-249.
- Ito, Y., I. Kimura and T. Miyake (1976) Histopathological and virological investigations of papillomas in soles and gobies in coastal waters of Japan. Prog. Exp. Tumor Res., 20: 86-93.
- Smith, A. C. and T. Y. Wang (1990) A large tumour from the fray snapper, *Lutianus griseus* (L.). J. Fish Dis., 13: 311-316.
- Tung, L. C., S. N. Chen and G. H. Kou (1991) Three cell lines derived from spleen and kidney of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). Fish Pathol., 26: 109-117.
- Wolf, K. (1988) Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press.
- Yoshikoshi, K. and K. Inoue (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) J. Fish Dis., 13: 69-77.

Preliminary Investigation on the Viral Diseases of Cultured Grouper (*Epinephelus* spp.) and Red Sea Bream (*Pagrus major*) in Taiwan

Tsu-Tao Kao, Su-Jung Chang and Hsin-Yiu Chou

Department of Aquaculture, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, Republic of China

The results of preliminary investigation on the viral diseases of culture marine fish in Taiwan reveal that the occurrences of diseases on fry and fingerling are much frequent than on adult fish. 37.10% of the diseases are caused by unknown factors. The asymptomatic victims, unusual swimming patterns and progressive growth are found in the outbreaks of mass mortalities on several culture ponds. The diseases occur when weather fluctuates between summer and autumn, especially in June, July and August.

In the suspicious areas, fish sampling and virus isolation are proceeded. No cytopathic effect on six tested fish cell lines were observed from eleven times of fish sampling, including cultured grouper (*Epinephelus* spp.) and red sea bream (*Pagrus major*).

This study attempts to establish primary cultures derived from various tissues of red sea bream, mullet (*Nugial cephalus*), thornfish (*Terapon jarbua*) and black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). The results showed that the gonad, kidney, heart and spleen cells which revealed epitheloid and fibroblastic morphology could be obtained in media supplemented with 10% FBS for several weeks.