

出國報告(出國類別：其他)

第一屆魚貝類免疫學國際研討會 報告

服務機關： 行政院農業委員會水產試驗所

姓名職稱： 李佳芳 助理研究員

派赴國家： 西班牙

出國期間：102年6月23日至102年6月28日

報告日期：102年7月22日

摘要

第一屆魚貝類免疫學國際研討會(First International Conference of Fish and Shellfish Immunology)於本(2013)年 6 月 25 日至 28 日於西班牙比戈舉行。本次研討會主題共有 14 大議題，發表 316 篇研究成果，參與國家至少 26 國，共同交流當前水產生物免疫及疾病相關研究。會議中筆者以張貼海報方式發表神經壞死病毒感染石斑魚鰭細胞株之差異性表現蛋白質體研究(Proteomic analysis of differentially expressed proteins in grouper fin-1 cells infected with nervous necrosis virus)，增進學術交流及汲取科學研究新知。

目次

1. 前言及目的.....	3
2. 過程.....	5
3. 心得及建議事項.....	10
4. 附圖.....	11

1. 前言及目的

第一屆魚貝類免疫學國際研討會(First International Conference of Fish and Shellfish Immunology) 係由魚貝類免疫學國際學會(The International Society of Fish and Shellfish Immunology, ISFSI) 於本(2013)年 6 月 25 日至 28 日於西班牙比戈(Vigo)舉辦。本次會議雖為第一屆國際研討會，但始於 1990 年，北歐魚類免疫學專家為降低水產養殖疾病問題發起研究合作，因而建立此學會，同年，免疫學會在丹麥的哥本哈根舉行第一次會議，之後並在挪威(1991 年)、瑞典(1993 年)、冰島(1995 年)、丹麥(1998 年)、挪威(2001 年)、芬蘭(2004 年)、蘇格蘭(2007 年)及義大利(2010 年)召開研討會。該學會於 2007 年將名稱更改為歐洲魚類免疫學組織(European Organization of Fish Immunology, EOFFI)，將其擴大到北歐以外之國家，並於 2010 年建立新的魚貝類免疫學國際學會(ISFSI)，2013 年召開第一屆魚貝類免疫學國際研討會。

本次研討會主題包含 crustacean immunity、immune cells and molecules、molluscan immunity、antimicrobial peptides、immunoglobulin superfamily and MHC、fish antiviral response、functional genomics: invertebrates、fish antiparasite and antibacterial response、functional genomics: fish、effect of pollutants on immune response、TLR signaling and inflammation、effect of diet on immune system、immunomodulation 及 vaccines 等 14 個議題，共有 154 篇口頭論文及 162 篇壁報論文發表研究成果，參與國家包括澳洲、日本、挪威、台灣、泰國、加拿大、比利時、大陸、智利、丹麥、德國、義大利、英國、埃及、美國、紐西蘭、葡萄牙、西班牙、法國、俄羅斯、菲律賓、古巴、韓國、墨西哥、荷蘭及印度等 26 個國家，交流當前水產生物研究，汲取科學研究新知。

本次會議中筆者以張貼海報方式發表神經壞死病毒感染石斑魚鰭細胞株

之差異性表現蛋白質體研究(Proteomic analysis of differentially expressed proteins in grouper fin-1 cells infected with nervous necrosis virus)，本研究探討石斑魚重要病毒性疾病-神經壞死病毒，此病毒會引發病毒性神經壞死症造成石斑魚魚苗大量死亡，導致水產養殖產業嚴重經濟損失。該研究應用蛋白質體技術分析神經壞死病毒感染石斑魚鱗細胞株之差異性表現蛋白質，以了解神經壞死病毒引起之宿主反應及致病機制。

2. 過程

本次研討會在西班牙的比戈(Vigo)召開，其位於西班牙西北方，西臨大西洋，是西班牙加利西亞(Galicia)自治區中最大也最重要的城市。比戈以其漁業著名，全球有一半的貽貝來自於加利西亞，在比戈海港可以看到許多養殖貽貝或牡蠣木製養殖平台。此外比戈亦是重要海洋研究中心，其具有 Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)所設立的海洋研究機構(Instituto de Investigaciones Marinas, IIM)。IIM 共有海洋學、海洋生態與資源、生物技術與水產養殖及食品科學技術等 4 個研究部門，所屬員工 227 名，該研究機構也參與本研討會的籌備。

有關本次研討會內容重點摘錄如下：

- 神經壞死病毒研究

神經壞死病毒(Nervous Necrosis Virus, NNV)為結病毒科(Nodaviridae), Betanodavirus屬的魚類病毒，由兩段單股正意核酸所組成，此病毒會造成病毒性神經壞死病或病毒性腦病及視網膜病，在魚苗及幼魚時期常造成高死亡率。此疾病感染之硬骨魚類遍佈歐洲、亞洲、美洲等國家，造成水產養殖業嚴重損失。

魚類對抗病毒感染主要的免疫機制中，干擾素(interferon)信息傳遞路徑及細胞媒介細胞毒殺(cell-mediated cytotoxic, CMC)作用均很重要，而在細胞媒介細胞毒殺方面相關研究較少。歐洲海鱸(*Dicentrarchus labrax*)對NNV具有高感受性，然而金頭鯛(*Sparus aurata*)則為無病徵之帶原者，研究者為了解病原-宿主間差異性，自歐洲海鱸及金頭鯛頭腎分離白血球，將其與神經壞死病毒感染之細胞株培養後，分析CMC相關的基因(natural killer enhancing factor, non-specific cytotoxic cell receptor 1, granzymes 及 perforin)，結果發現金頭鯛CMC相關基因在病毒感染後表現顯著增加，而

歐洲海鱸則無差異，顯示細胞媒介細胞毒殺作用可能與歐洲海鱸對神經壞死病毒具高感受性有關。

神經壞死病毒感染會造成魚類腦及視網膜嚴重受損，但其機制仍不明瞭。目前已知神經壞死病毒會造成宿主細胞後凋亡壞死(post-apoptotic necrosis)，而其細胞壞死與粒線體膜電位流失有關。神經壞死病毒的鞘蛋白會造成粒線體膜電位流失，導致粒線體cytochrome C釋放，而使得細胞產生後凋亡壞死，當細胞大量表現Bcl-2家族抗凋亡蛋白zfBcl-xL，則能抑制粒線體膜電位流失，增加細胞存活率。

非甲基化 CpG 寡去氧核糖核酸(CpG oligodeoxynucleotides, CpG ODNs) 被廣泛用在哺乳類動物以活化類鐸受體九號(Toll-like receptor 9, TLR9) 免疫反應或作為疫苗佐劑。研究者設計 2 種 CpG ODNs(class A 及 class B) 分析其對石斑免疫調節之影響，研究發現 class A CpG ODNs 可以誘發石斑魚細胞 TLR9 信息傳遞路徑及促進前發炎細胞激素 IL-1 β 產生，而 class B CpG ODNs 則否，顯示 class A CpG ODNs 可以作為佐劑使用，以促進抗體產生。

- 基因體及蛋白質體研究

本次研討會中也針對基因體及蛋白質體建立了一個議題，探討如何藉由基因體及蛋白質體瞭解疾病與水產生物之交互關係。

近年來歐洲逐漸發展頭足類的商業養殖，而章魚養殖過程中會發生腸胃道寄生蟲-球蟲(*Aggregata octopiana*)感染問題而造成經濟損失，研究者經由比較蛋白質體探討高度感染及低度感染球蟲對血淋巴蛋白質表現之影響，並從中選取 7 個主要差異性蛋白質作為生物指標候選蛋白質，而這些蛋白質體結果並可提供進一步瞭解章魚免疫系統及對抗球蟲感染之反應。

美洲龍蝦 (*Homarus americanus*) 在野生環境中會遭受纖毛蟲 (*Anophryoides haemophila*) 感染產生 bumper car disease。研究者以轉錄體分析龍蝦在纖毛蟲感染時其肝胰臟基因表現情形，結果顯示纖毛蟲感染會誘

導許多免疫基因表現 (anti-lipopolysaccharide factor isoforms (ALFHa), acute phase serum amyloid protein A (SAA), serine protease inhibitor, toll-like receptor, haemocyanin subunits, phagocyte signaling-impaired protein, vitelline membrane outer layer protein-1, trypsin 及 C-type lectin receptor), 其中SAA可作為美洲龍蝦免疫活化及健康指標蛋白質。

在美國，美東牡蠣(*Crassostrea virginica*) 養殖受許多疾病影響，瞭解牡蠣對病原感染之反應，可提供作為疾病耐受性及健康指標。學者分析美東牡蠣在細菌 (*Roseovarius crassostreae*、*Vibrio tubiashii*) 或寄生蟲 (*Perkinsus marinus*) 感染後，對病原具感受性及抵抗性牡蠣之轉錄體，以尋找對病原具抵抗性或感受性之指標，研究結果顯示免疫基因spil (serine protease inhibitor-1) 可能可作為對疾病抵抗性的指標基因。

研究者以基因體及蛋白質體分析中國對蝦(*Fenneropenaeus chinensis*) 感染白點病毒後之宿主反應，結果發現proPO活化可能參與抗病毒過程，此外鑑定的基因及蛋白質亦可提供作為中國對蝦在病毒感染時誘發之免疫機制的重要資訊。

- 環境對水產生物基因調控之影響

表觀遺傳學(epigenetics) 係研究生物體在基因序列沒有改變之情況下，經由 DNA 甲基化 (DNA methylation) 或組蛋白修飾 (histone modifications) 等過程調控基因表現。在 2011 年，西班牙研究團隊利用表觀遺傳學揭示魚類性別分化與溫度之關係，歐洲海鱸在性腺成熟前溫度會影響性別比例，在發育早期鱸魚暴露於不同溫度會影響芳香酶 (aromatase) 啟動子甲基化程度，而芳香酶為雄性素轉換成雌性素之酵素，是非哺乳類脊椎動物卵巢發育所必需之酵素。當鱸魚在發育早期暴露於高溫中，會增加芳香酶啟動子甲基化，而抑制芳香酶基因表現，使得基因型雌性的魚其表現型由雌性

轉換成雄性。Dr. Roberts 為了解環境改變(海洋酸化、緊迫等)對海洋生物生理之影響，以比較基因體學方式分析環境改變對海洋生物 DNA 甲基化之程度，該實驗室目前完成長牡蠣(*Crassostrea gigas*) DNA 甲基化研究，並以此評估生殖細胞基因之甲基化與適應環境變遷之關連性，另一方面也可了解貝類對環境適應及疾病耐受性之免疫系統變化。

- 抗菌肽研究

抗菌肽為生物先天性免疫防禦機制之一，除可對抗細菌感染外，有些亦與對抗寄生蟲及病毒感染有關，其主要是由陽離子胺基酸及半胱胺酸(cysteine)組成短鏈勝肽。

在吳郭魚研究中，於鰓組織發現 3 種新的抗菌肽(Oreoch-1、Oreoch-2 及 Oreoch-3)，其勝肽與魚類抗菌肽 piscidin 具高度相似性，其合成之勝肽具有抗革蘭氏陰性菌、革蘭氏陽性菌及真菌之功能。

在大西洋鱈魚中也發現新的抗菌肽- β -defensin，其會在幼魚的皮膚、泳鰓、腹膜、頭腎及卵巢中表現，當 *Vibrio anguillarum* 感染時，在頭腎的表現量會增加 25 倍，而重組之 β -defensin 也顯示具有抗革蘭氏陽性菌之能力。

Crustin 為蝦類重要抗菌肽之一，在斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 研究中發現 crustin-like peptide 之抗菌肽，其主要表現在血細胞，感染 *Vibrio penaeicida* 及白點病毒時，會造成斑節蝦 crustin-like peptide 表現量改變，當注射 crustin-like peptide 干擾性核糖核酸(RNAi)抑制 crustin-like peptide 表現，發現在感染 *Vibrio penaeicida* 及白點病毒時其死亡率明顯增高，顯示 crustin-like peptide 與抵抗 *Vibrio penaeicida* 及白點病毒感染有關。

血紅素是紅血球中主要之蛋白質成分，血蚶(*Tegillarca granosa*)是少數具有血紅素的貝類，血蚶血紅素有 Tg-HbI、Tg-HbIIA 及 Tg-HbIIB 等 3 種，

研究發現血紅素及其蛋白質水解後肽具有抗菌能力，為抵抗微生物入侵重要的先天性免疫反應。

亞得里亞海北部沿岸的歐洲海鱸，每年因鰓部單殖類吸蟲(*Diplectanum aequans*)感染造成約 5~10%損失。研究中發現嚴重感染單殖類吸蟲的鱸魚，以組織免疫染色發現抗菌肽 piscidin 3 及 piscidin 4 在鰓部肥大細胞表現均較輕度感染及未感染的魚隻明顯增加。而在鰓部嚴重感染大角魚蝨(*Ergasilus* sp.)的金頭鯛(*Sparus aurata*)中，也發現 piscidin 3 在鰓部肥大細胞表現均較輕度感染及未感染的魚隻明顯增加，顯示鰓部肥大細胞及抗菌肽在魚類鰓寄生蟲感染時扮演重要角色。

近年來也有研究指出魚類抗菌肽具有抗病毒之作用，包含對抗魚類神經壞死病毒。在哺乳動物中發現抗菌肽會在生殖道表現，且可能是生殖器官對抗病原重要的先天性免疫反應。在魚類，神經壞死病毒會經由垂直感染方式傳給子代，因而研究者想了解抗菌肽在生殖器官表現情形與病毒感染之關係。組蛋白(histone)主要被知道的功能是染色體中與 DNA 結合的鹼性蛋白質，但其也是抗菌肽的一種，在歐洲海鱸性腺中，組蛋白 H1 及 H2B 可能也扮演抗菌肽角色。

- 免疫細胞研究

水生動物呼吸系統長期暴露於水體環境中，使得鰓成為病原入侵的途徑之一，因此呼吸器官除了呼吸功能外，也具有免疫機制以對抗外來病原。研究者發現鮭魚鰓部具有淋巴組織-鰓間淋巴組織(interbranchial lymphoid tissue, ILT)，其位於鰓絲基部與鰓絲基部間，此組織含有大量的T細胞、部分帶有MHC II的細胞及少數B細胞，此為T細胞聚集之組織，主要T細胞為 α β 及 γ δ 等2種。鰓間淋巴組織與黏膜免疫相關，其可能與對抗病原及免疫調節有關。

3.心得及建議事項

來自世界各地學者研討水產養殖疾病問題，以不同方向探討魚、蝦、貝類免疫機制及疾病對水產生物之影響，以促進其免疫能力及降低疾病的發生。會議中可以看到每個國家發展的養殖魚種不同，研究的魚種也有差異，在歐洲主要研究魚種有大西洋鮭魚、虹鱒、歐洲海鱸、金頭鯛、比目魚及貽貝等，在亞洲則為吳郭魚、石斑及金目鱸，美洲為虹鱒、大西洋鮭魚及鯰魚，雖然魚種不同，但其在免疫調控及疾病方面均可以作為相互參考。此外，在國際研討會上，可以看到許多不同領域的研究，有些研究議題及方向是台灣沒有的，若非參加國際研討會，也少有機會接觸到不同領域，拓寬視野幅度。

在台灣，由於高密度養殖造成魚、蝦、貝類疾病問題增加，充分了解其免疫調控及疾病-宿主影響，可經由飼料、益生菌、免疫刺激物進行免疫調節，或運用疫苗等方式，增強魚、蝦、貝類免疫及抵抗病原能力，以降低疾病的發生，減少藥物使用及對環境之破壞。

先前本組籌辦第三屆國際牡蠣研討會，筆者在會議當時協助論文集出刊、會議籌劃等事宜，因此這次參加國外研討會，對於主辦單位如何辦理研討會及籌辦過程，也是提供一次珍貴親身歷練機會。

4. 附圖



研討會會議地點-比戈(Vigo)地理位置圖



研討會會議中心



會議提供之論文集、期刊等資料



研討會歡迎酒會



研討會人員參訪聖地牙哥康波斯特拉(Santiago de Compostela)



研討會晚宴



台灣與會人員合影



比戈港灣貝類養殖