

第五章 魚蝦類免疫系統、疫苗與抗病物質

一、魚蝦類的免疫系統

(一) 魚類

為避免病原性微生物的侵襲，魚類可以識別自體與非自體組織，並有排除非自體組織的機制。所有的脊椎動物都具有免疫系統，能對體外侵入的大型分子產生反應，如產生抗體或刺激活化其白血球，而對此外來侵入者產生高度專一性的免疫反應，並消滅之。

1. 特異性免疫系統

魚類之免疫系統與高等脊椎動物一樣 (Iwama and Nakanishi, 1996)，可分成特異性免疫系統 (specific immune system) 及非特異性免疫系統 (non-specific immune system)，各含體液及細胞性免疫，其免疫細胞和免疫物質與哺乳動物有很多的相似性，最主要的差別是魚類缺乏骨髓和淋巴結。對硬骨魚而言，胸腺、頭腎 (head-kidney) 和脾臟是主要的淋巴樣器官，擔負免疫細胞的製造、成熟及淋巴系統的整合功能 (Roitt et al., 1996)。貝類及甲殼類則屬於無脊椎動物，僅具非特異性免疫系統 (亦各含體液及細胞性免疫)，但缺乏特異性免疫的抗原及抗體反應。

2. 免疫反應的產生途徑

當魚類以抗原浸泡後，抗原由鰓中之巨噬細胞 (macrophage) 所攝取，經血液系統送達脾臟、腎臟及心外膜中之黑色素巨噬細胞中心 (melanomacrophage centers)，在有些小型魚類則會到達胸腺 (thymus)。這些免疫器官中的淋巴球 (細胞) 隨即暴露於抗原中，並開始產生細胞性 (cell-mediated, T 細胞) 或抗體性 (體液) (antibody-mediated; humoral, B 細胞) 免疫反應 (Ellis, 1988)。

由於魚類被感染時引發的初級免疫反應 (primary immune response) 和續發性免疫反應 (secondary immune response) 與溫血動物相比，不論在時間或規模上都比較晚、比較小，所以在抵抗外來感染源時，非專一性免疫的防禦系統必須首當其衝的擔負起防禦的角色 (Blazer, 1991)。免疫初級反應來自胸腺 T 細胞，飼育鱒魚的水溫若高於 4℃，即具此活動力，持續時間也比較長，胸腺可能是 T 細胞及 B 細胞的起源處。硬骨魚類似乎僅有一種凝集性抗體，即免疫球蛋白 IgM，其可分為具有四個次單元組成的 IgM 及單一單元的 IgM (Gudding et al., 1997)。魚類在經由各種抗原刺激後所產生的特異細胞性與體液性免疫反應能產生記憶細胞，當再次遇到同一抗原時，能迅速、大量的產生免疫反應而消滅之，此即上述的續發性免疫反應。

3. 非特異性防禦系統

魚類的非特異性防禦系統可分為：物理屏障 (physical barrier)、細胞性免疫 (cellular factors) 及體液性免疫 (humoral factors)。

物理屏障是抵禦外來病原的第一道防線，包括皮膚、黏膜、鰓、鱗片及腸胃道。完整的皮膚可防止病原侵入；其次，黏液中含有許多酵素，如溶解酵素、蛋白分解

酵素 (proteinase) 及溶胞酵素 (lysins) 等，均具有抑制病原增殖、殺菌之能力；最後，呼吸道及胃腸道則藉纖毛擺動來移除黏液所帶來的微生物。此外，僅少部分的病原能存活於低 pH 值的胃酸中。

在非特異性細胞性防禦方面，主要是由顆粒球 (granulocytes)、單核球與巨噬細胞等組成 (Secombes, 1996)。當病原菌侵入時，這些具吞噬性的白血球會經由許多細胞膜上的接受器和病原菌結合後將其吞入細胞內，進而將之殺滅。

吞噬細胞也是主要的抗原呈現細胞 (antigen presenting cell, APC)，可促進淋巴球對抗原產生進一步反應。吞噬細胞之毒殺作用可分為氧化型 (oxygen dependent) 及非氧化型 (oxygen independent) 兩種。氧化型的殺菌能力，可產生活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 及活性氮物質 (reactive nitrogen species, RNS)。

活性氧物質是吞噬細胞進行吞噬作用時，因細胞呼吸性功能突進 (respiratory burst) 產生活性氧離子，加以細胞內氧的代謝速率同時增加，經由 NADPH oxidase 將氧和 NADPH 反應成具有殺菌能力的活性氧物質，如：超氧離子 (O_2^-)。超氧離子再經超氧歧化酵素 (superoxide dismutase, SOD) 轉換成過氧化氫 (H_2O_2)，過氧化氫可再經 myeloperoxidase 作用成次氯酸根 ($HOCl^-$)、氯酸根 (OCl^-) 等，細胞即利用這些 O_2^- 、 H_2O_2 、 $HOCl^-$ 、 OCl^- 活性氧物質來殺菌。

近年來發現魚類含有之活性氮物質，為吞噬細胞經由一氧化氮合成酵素 (nitric oxide synthetase) 合成一氧化氮 (NO) 後，再產生其他氮的超氧化物，如 NO_2 、 N_2O_3 、 NO_2^+ ，這些氮的氧化物同樣也具有殺菌能力。非氧化型的殺菌能力是指吞噬細胞將外來物吞噬之後，利用自身細胞內的酵素如吞噬體 (phagosome) 內的溶菌酵素或細胞自溶酵素 (cathepsin G) 來分解侵入物質。影響魚體內溶菌酵素濃度的因子，有溫度、季節、餌料及生殖週期等，但發生疾病感染時，溶菌酵素量會顯著增加。

4. 魚類的補體系統

魚類的補體系統如同哺乳動物，分為古典補體路徑 (classical complement pathway) 和替代性補體路徑 (alternative complement pathway)，肝臟及單核吞噬球合成古典及替代性路徑所需大多數的蛋白質。古典路徑藉由抗原、抗體結合之 C1 啟動，開始一連串酵素連鎖反應 (enzyme cascades reaction)，替代路徑則由侵入物質之成分活化 C_3 後進行連鎖反應。在活化補體路徑時，反應序列的 C_3 、 C_5 部分會對吞噬作用產生影響， C_3a 、 C_5a 的釋放，使嗜酸性球分泌血清素 (serotonin) 造成血管擴張、血液通透量增加及形成調理作用 (opsonization)，使吞噬細胞更容易與侵入物反應，提昇吞噬效率。而 C_5a 的釋放則對噬中性球及巨噬細胞有很強的趨化性 (Matsuyama et al., 1992)，可加速發炎反應 (inflammatory response) 的進行。

因魚體內的替代性補體活性遠高於哺乳動物，所以與高等脊椎動物相較，更能有效保護初期感染的魚體 (Yano, 1995)。其他具保護魚體感染之物質，如凝集素 (醣蛋白)，與致病微生物作用，使其聚集成團塊，並抑制其膨大增生 (Yano, 1996)。此外，細胞激素可促進造血先驅細胞及免疫細胞的分化。

5. 魚類的干擾素

在魚類發現的干擾素有 α 、 β 、 γ 三種， α 、 β 型可抑制病毒複製， γ 型可刺激白血球增生 (De Kinkelin and Dorson, 1973 ; Graham and Secombes, 1988) ; C 型-反應蛋白，在哺乳動物屬急性蛋白，魚類亦有發現，在免疫系統中具有調理作用，可增進吞噬球的作用、移動及產生活性氧物質 (Nakanishi et al., 1991)。

多數的免疫刺激物，主要藉由刺激魚類的非特異性免疫系統提昇對病原的抵抗能力，所以並沒有免疫記憶的特性，因此反應持續時間也較短，但對水生生物而言，非特異性免疫的細胞性免疫 (Sakai, 1999) 是水生生物清除外來微生物最有效的方法，也是水生生物最重要的防禦機制 (Ellis, 1989 ; Evan and Jaso-Friedmann, 1992)，其中吞噬細胞的呼吸性爆發-產生超氧陰離子，提供了主要的殺菌能力。

(二) 蝦類

甲殼類為開放式循環系統，其免疫機制以非專一性免疫反應為主 (Anderson, 1992)，為立即而非緩慢誘發式的防禦反應，以應付病原入侵及擴散 (Soderhall et al., 1990)。Ratcliffe et al. (1985) 認為甲殼類之防禦反應主要由血球細胞 (hemocytes) 產生之原酚氧化酵素激活系統 (prophenoloxidase system, proPO system) 來完成。

1. 甲殼類的血球細胞

可利用密度梯度離心 (density gradient centrifugation) 技術依比重的不同來分離甲殼類血球細胞。Soderhall and Smith (1983) 以 pH 4.6 citrate/EDTA buffer 做為抗凝劑，在 7℃ 下配合 60% Percoll 的梯度離心，成功的將數種甲殼類十足目動物 (decapods) 的血淋巴球分成三群：比重最大的是顆粒血球 (granular cell)，比重最小的是透明血球 (hyaline cell)，介於二者間者則是混合的透明血球和半顆粒血球 (semigranular cell)。各群血球不但在形態上有所區別，生化分析及功能方面的研究也發現它們各具特性。

透明血球體積較小，核質比 (nucleus-to-cytoplasm ratio) 最高，不具有或有極微量的顆粒，能伸出偽足附著於玻片上，並具有吞噬作用與凝血能力 (Goldenberg et al., 1984 ; Soderhall et al., 1986 ; Martin et al., 1991)。

顆粒血球之大小及核質比均介於透明血球和顆粒血球之間，含有少數顆粒和數目最多的內質網，可伸出短而寬扁的偽足 (Mix and Sparks, 1980)。其顆粒中含有 proPO system，可直接受到脂多醣類 (lipopolysaccharide) 或 β -1,3-glucan 的誘發而釋出血球內之顆粒 (Johansson and Soderhall, 1985)。其在未釋出顆粒前稍具吞噬能力，但顆粒釋出後則失去此功能 (Soderhall et al., 1986)。經由各種體外實驗發現，半顆粒血球是最敏感的血球，能直接受到外在的刺激而活化 (Johansson and Soderhall, 1989a)。

半顆粒血球體積最大、核質比最小、細胞核緻密並呈腎形或馬蹄形、含有大量顆粒 (Bauchau, 1981)。其顆粒中亦含有 proPO system (Soderhall and Smith, 1983)，但並不直接受脂多醣類或 β -1,3-glucan 的刺激而釋出，它必須經由 β -1,3-glucan binding

protein 或 76kDa 蛋白質的作用，才會釋出顆粒 (Johansson and Soderhall, 1989a; Barracco et al., 1991)，而且釋出顆粒後，不會像半顆粒血球般容易破裂 (Soderhall et al., 1986)。

2. 原酚氧化酵素系統

原酚氧化酵素系統是一種與補體系統相似的酵素系統 (complement-like enzyme cascade)，但與補體不同的是，該系統的組成因子以非活化的狀態存在於血球的顆粒中 (Soderhall and Smith, 1983)，能被脂多醣類、 β -1,3-glucan、peptidoglycan、加熱或鈣離子濃度下降等因子活化 (Johansson and Soderhall, 1985 ; Soderhall et al., 1986)。經活化的 proPO system 含有許多組成因子與酚氧化酵素 (phenoloxidase, PO)，可以活化甲殼類血球的免疫反應，包括：

- (1) 可催化酚 (phenol) 變為黑色素 (melanin)，而黑色素及其中間代謝產物可以殺死真菌 (Soderhall et al., 1990)。
- (2) 透明血球的吞噬作用 (Soderhall et al., 1986)。
- (3) 顆粒血球和半顆粒血球內的顆粒釋出 (Johansson and Soderhall, 1985)。
- (4) 顆粒血球和半顆粒血球的附著作用 (Johansson and Soderhall, 1988)。
- (5) 半顆粒血球的包膜作用 (Persson et al., 1987)。
- (6) 某些機制尚未明瞭的凝血作用 (Johansson and Soderhall, 1989b)。

3. 血球之活化機制

Soderhall et al. (1986) 已證實，血球功能的活化，並非全部來自 PO 本身的刺激，proPO system 中的其他因子，在獨自或與其他因子相互作用下，也會有活化血球之功能。已在甲殼類 proPO system 中純化出具有促進血球功能及交互作用的分子是 76 kDa 蛋白質與 β -1,3-glucan binding protein。

76 kDa 蛋白質是由 Johansson and Soderhall (1988) 從螯蝦 (*Pacifastacus leniusculus*) 被活化之 proPO system 中發現。在鈣離子的存在下，可促進顆粒血球或半顆粒血球附著於玻片上。利用抗體追蹤該因子的位置，證實 76 kDa 蛋白質原來存在於顆粒血球與半顆粒血球之中，隨 proPO system 的活化而釋出，並可進一步促進顆粒血球與半顆粒血球釋出顆粒、半顆粒血球的包膜作用與促進透明血球的吞噬作用 (Johansson and Soderhall, 1989 ; Kobayashi et al., 1990)。

β -1,3-glucan binding protein 是由 Duvic and Soderhall (1991) 在螯蝦的血淋巴液中發現，為一種可和 β -1,3-glucan 結合的醣蛋白。以 SDS-PAGE 鑑定其為分子量約 100 kDa；其本身不具任何酵素活性，但結合 laminarin 後便可活化血球，進而活化原酚氧化系統，並與顆粒血球的表面聯結，促使顆粒血球釋出顆粒，活化而擴張與伸展並改變形狀 (Barracco et al., 1991)。

草蝦的血球細胞依據形態，亦可分為透明、半顆粒及顆粒球。雖然各種血球之功能尚未很清楚，但依據 Song and Hsieh (1994) 之研究，草蝦具有原酚氧化酵素激活系統，以免疫刺激物 zymosan, phorbol myristate acetate (PMA) 和 β -glucan 刺激血球細胞後，血球細胞可測到類似人類 myeloperoxidase (MPO) 的酵素活性，並且會產

生殺菌物質 H_2O_2 與 O_2^- ，三種刺激物中以 β -glucan 對產生 H_2O_2 與 O_2^- 之刺激效果最強。

許多微生物細胞壁，如真菌 (fungi)，酵母菌 (yeast) 與部分藻類細胞壁的抽出物—多醣類 (polysaccharides; β -glucans, β -1,3-glucans and β -1,6-linkage polyglucose) 能誘發哺乳類、魚類與甲殼類，甚至於植物等之非專一性免疫反應，加強抗病力 (Robertson et al., 1994)。

二、疫苗

(一) 作用機制

疫苗係用致病性被減弱、消失或死菌或病毒等抗原所製成的一種懸浮液或萃取液，當其進入魚體之後，可刺激個體產生主動免疫，而且下次再受到同一病原感染時，可立即產生防禦作用，預防疾病侵害。養殖業者所希望使用的疫苗須便宜、易於使用且要有效，而製造廠商則須考慮疫苗之市場以及利潤，所以疫苗的組成及製備朝向儘量單純化，或可考慮單劑多力價之疫苗，這些都是量產疫苗需要考慮的問題。現已商業化疫苗可有效防治 *Aeromonas salmonicida*、*Yersinia ruckeri*、*Vibrio anguillarum*、*V. ordalii*、*V. salmonicida* 及 *Rhabdovirus carpio* 等病原引起之魚病 (Gudding et al., 1997)。

自從 Duff (1942) 發表第一篇有關使用氯仿 (chloroform) 不活化癰瘡病 (病原：*A. salmonicida*，病名：Furunculosis) 菌體之有效口服疫苗的文章之後 20 年間，需利用新發現之抗生素做為疾病控制的主要利器，但長期使用抗生素的結果，往往造成許多抗藥性菌株的出現 (Anderson, 1997)，影響到疾病的控制，成為養殖產業發展的問題 (Aoki, 1992)。直到 1976 年美國才先後核准紅嘴病 (病原：*Y. ruckeri*，病名：Enteric redmouth, ERM) 及弧菌症 (病原：*V. anguillarum*, *V. ordalii*，病名：Vibriosis) 等抗五種細菌之疫苗上市，結果證明具相當良好的保護效果，從而奠定了魚類疫苗發展的基礎。而癰瘡病疫苗之使用也在 50 年 (1992 年) 後正式在英國蘇格蘭及挪威確立，目前已經製成具某種程度保護力的實用疫苗。欲使用於挪威養殖大西洋鮭的冷水弧菌症疫苗，在最近的田間實驗已獲成功，不久的將來也可望商業化上市 (Ellis, 1997)。

(二) 佐劑

過去在大多數哺乳動物及家禽疫苗中使用之佐劑皆顯現出其重要性，目前已有使用礦物油及 glucans 兩種佐劑之魚類疫苗，效果良好。第一個在魚類疫苗中使用的佐劑為 FIA (Freund's incomplete adjuvant) 可使抗 *A. salmonicida* 抗體在鱒魚體內維持兩年之久，未使用該佐劑者，鱒魚體內之抗體只能維持 6 個月，曾使用之佐劑

有 FCA (Freund's complete adjuvant)、Aluminium adjuvants 及 Cholera toxin β -subunit (CTB)，而如何減輕佐劑或免疫刺激物所產生的副作用是今後魚類疫苗試驗中應注意及研究之課題 (Gudding et al., 1997)。

在不同養殖環境中，可以不同的方法使用疫苗來治療魚病，目前常用的方法有浸泡（含噴灑）、口服或注射的方式進入魚體產生免疫反應，商業化疫苗目前已可使用於鮭鱒類、鯉魚及龍蝦等。腹腔注射可產生最高程度之免疫力，口服疫苗只能產生最低免疫力，而浸泡及噴灑法能產生中等程度的保護作用。

(三) 使用疫苗的條件

以鮭鱒類進行實驗時，進行疫苗接種試魚之體重若低於 1 克，其年齡太小尚未展出免疫能力，而以體重高於 2.5 克的魚有較佳的反應，日常處理時之最適體重通常建議為 4 克，對疫苗的免疫反應認為考慮魚體大小比考慮其年齡為重要。進行疫苗接種的水溫不可低於 5–6°C，最好在該魚種之最適生活水溫範圍內，且接種後達到保護效果之抗體量所需時間依溫度而定，例如以疫苗在 10°C 時浸泡 5 秒，魚於 10 天內可產生有效性保護，18°C 時則需 5 天。一般認為，接種疫苗後 14 天，魚體就能產生有效的免疫力 (Ellis, 1988)。

免疫力持續期間顯然是依魚體重量而定的，在魚體重 1 克時施行疫苗接種，其免疫力持續期間約 120 天；魚體重 2 克時持續期間約 180 天；而如鮭鱒魚類體重大於 4 克時接種，則免疫力能超過 1 年 (Ellis, 1988 ; Gudding et al., 1997)。

除體重會影響免疫持續能力外，給予路徑也會有影響，雖然浸泡方式的給予方式因省人工而成本較低，但腹腔注射可獲致最佳免疫表現效果。以少量疫苗注射腹腔，即可得快速且較可靠的保護效果，但是比較耗費人力。在蘇格蘭一個熟練人員利用半自動注射系統每小時可注射約 1,000–2,000 尾 20 公克魚；在環境較差及操作技術不熟練的狀況下，每小時至少也可注射約 600–700 尾魚，目前挪威已經開發使用自動注射系統，速度當可更快，缺點是小於 15 公克魚目前尚無法注射 (Ellis, 1988)。

浸泡疫苗的成本較低且有效，最早係利用高張滲入法，此為一兩階段方法：先將魚於浸於高滲透壓溶液中，然後轉入對魚會造成緊迫之疫苗水溶液。之後，發展出較不具緊迫性及傷害性的直接浸泡法，幾年後藥浴法、噴灑法及沖洗法等也陸續被發展出來。

口服接受疫苗應會是養殖業者使用的理想方法，因為不會對魚產生緊迫，也不需額外的時間，只要將疫苗混入飼料中即可，此法適合各種大小體型的魚類，缺點是需要大量疫苗及不知道每隻魚的攝取量。魚的腸道對有能力吸收疫苗的部分可能在末端，鮭鱒類的胃酸會使抗原在通過胃部時不活化，目前已有許多研究者嘗試開發各種保護性口服疫苗 (Ellis, 1988)。

表1 魚類疫苗使用方式之比較 (Gudding et al., 1997 ; Ellis, 1988)

	浸泡	注射	口服
操 作	容易	中等	簡單
緊 迫	輕微	中等	無
大 小	不拘	>15 克	不拘
勞 力	少	密集	無
有 效 性	佳	極佳	普通
保護期間	3—12 月	12—24 月	2—4 月

表2 疫苗稀釋比率及使用時間 (Gudding et al., 1997 ; Ellis, 1988)

路徑	疫苗稀釋比率	使用時間
浸泡	1:3 ; 1:10 ; 1:100	5—60 秒
藥浴	1:500 ; 1:5000	1 小時以上
噴灑	1:3 ; 1:10 ; 1:100	2—5 秒
注射	不稀釋 (0.1 ml)	直接注射
口服	混入飼料	1 週以上

由於近年來分子生物技術的進步，目前已有將魚類病毒 (IHNV 及 VHSV) capsid glycoprotein (殼醣蛋白，為免疫注射鮭鱒後具免疫保護性之病毒表面抗原) 基因轉殖入不具毒力之癰瘍病原菌 *A. salmonicida* 變異株中，再以此轉殖過菌株生產製備成活菌疫苗並於魚體免疫後可有效對抗各相關病原體的試驗報告。

三、免疫刺激物 (immunostimulants)

過去以來水產養殖在疾病的控制，多以各種抗生素及化學藥物來控制，但長期使用的結果，常造成許多抗藥菌株的出現，影響到疾病的控制 (Anderson, 1997)，近幾年來，水產疫苗的研發及相關產品生產使用，成為疾病防治上最有效的方法。但對於濾過性病毒及部分細菌性感染，仍尙未能研發出有效疫苗。因此，除發展疫苗外，開發免疫刺激物，可以補償有關疫苗及化學藥劑使用發展上的限制，提升水產生物免疫力以對抗疾病。

(一) 化學合成物

如 levamisole、FK-565 (lactoyl tetrapeptide) 及 MDP (muramyl dipeptide) 等，可

增強鱒魚對 *V. anguillarum* 和 *A. salmonicida* 的抵抗力。

(二) 真菌衍生物：

如葡聚糖 (glucan)、Schizophyllan 及其衍生物、FCA (Freund's complement adjuvant)、EF203、脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 等，可增強鮭魚、青甘鱈、鱒魚及鯉魚對 *V. anguillarum*、*Enterococcus seriolocida*、*Pasteurella piscicidae*、*Streptococcus* sp. 的抵抗力。

1. 葡聚糖類 (β -glucans)

葡聚糖類 (β -glucans) 曾被用作疫苗的佐劑及飼料的添加劑，而且在上述兩種方式中之角色皆被認為可增強抵抗力及反應；其作用機制被認為可能是由於葡聚糖會增加水產生物體內溶菌酵素 (lysozymes)、吞噬細胞 (phagocytes) 及補體 (complement) 的活性，是屬於增強非特異性免疫功能的範疇。最近幾年來，許多研究者試驗以 β -glucans 來增強魚體或蝦體對抗各種疾病的非特異性免疫能力。雖然目前在 β -glucans 有效成分、劑量、來源形式、給予方法及作用模式仍未完全明瞭，但已大致上認為使用本類產品於水產養殖生物可輔助疫苗之功效。

目前水生生物免疫刺激物的研究，仍以葡聚糖及其衍生物最為普遍，但因價格昂貴 (3,000–5,000 元/公斤)，尚未能廣泛應用。

免疫刺激物的研究中以葡聚糖為最多，使用後之效果也最佳。在魚類方面： β -glucan 能激活溪鱒 (*Salvelinus fontinalis*) 的巨噬細胞 (macrophages)、淋巴球 (lymphocytes) 和自然殺手細胞 (natural killer cells) 等，降低受 *A. salmonicida* 感染的死亡率 (Olivier et al., 1986)。 β -glucan 亦能增加比目魚 (*Psetta maxima*) 的呼吸性突進作用與 gilthead seabream (*Aparus aurata*) 血球的吞噬作用 (Castro et al., 1999)。

鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 注射由酵母菌、真菌與其他植物抽出之葡聚糖後，以 *Edwardsiella tarda* 注射感染，未處理組全在三天內死亡，而以真菌抽出之葡聚糖處理組存活率達 60–80%；其他細菌、藻類等抽出之葡聚糖處理組存活率為 55–75%；但是酵母菌抽出之葡聚糖處理組則沒有保護效果 (Yano et al., 1989)。另外，Robertson et al. (1990)，Chen and Ainsworth (1992)，Matsuyama et al. (1992) 與 Jeney and Anderson (1993) 等之研究指出，葡聚糖能強化大西洋鮭 (*Salmon salar*)、美國鯰 (*Ictalurus punctatus*)、黃尾鱈 (*Seriola quinqueradiata*) 與虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) 等魚類對抗 *Vibrio* sp.、*E. tarda*、*A. salmonicida* 感染的免疫能力。

葡聚糖能活化甲殼類馬蹄蟹 (*Limulus* sp.) 血球細胞的凝血作用 (Ohno et al., 1990) 及有效增加 *Astacus astacus* 與沙蟹 (*Carcinus maenas*) 血淋巴球細胞的吞噬能力，並能加強淡水螯蝦 (*Pacifastacus leniusculus*) 與 shore crab 體內不同種類血球間功能上的連繫，以抵禦侵入體內的微生物，提高防禦系統的嚴密性 (Soderhall et al., 1986)。Itami et al. (1994) 則發現斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 投給 peptidoglycan 與 Schizophyllan (a β -1,3-glucan with a β -1,6-linked D-glucose residue) 可增強其血球細胞的吞噬能力與對海水弧菌的抵抗力。而 Song and Hsieh (1994)，Sung et al. (1994；1996) 以酵母菌抽出含 β -1,3-1,6-glucan 之多醣類刺激草蝦血球細胞後，會增加殺菌物質

H₂O₂ 與 O₂⁻產生量與增強對病原弧菌感染的抵抗力，提高草蝦之活存率。

真菌 *Schizophyllum commune* 的細胞壁所純化出之多醣類 (β-1,3-1,6-glucan)，化學結構為β-1,6-branched-β-1,3-glucans，含有可溶於水之 Schizophyllan 與不可溶於水之其他多醣。Schizophyllan 用於人類醫學，為對抗子宮頸癌與其他癌症及腫瘤的之免疫增強佐劑，配合放射線療法在臨床上有非常顯著之效果 (Furue, 1987)。

1986 年多醣類開始被應用於水產動物，如對鯉魚 (Yano et al., 1989 ; 1991)、青甘鱖 (Matsuyama et al., 1992) 與斑節蝦 (Itami et al., 1994, 1998) 均可強化免疫能力，增強對細菌與病毒的抵抗力。Song et al. (1997 ; 1998) 與 Huang and Song (1999) 等利用萃取自酵母菌細胞壁的多醣類 (β-1,3-1,6-glucan)，餵飼草蝦稚蝦或注射草蝦母蝦或浸泡無節幼蟲與後期幼蟲，發現均能夠增強草蝦抵抗 WSSV 感染的能力。由於養殖草蝦發生嚴重病原感染，為增強池蝦之免疫能力，減少疾病的發生，增進生長，提高活存率。本所以真菌 *Schizophyllum commune* 純化出之多醣 (濃度 2.5%)，針對草蝦進行一系列基礎免疫功能探討與增強免疫能力的研究。將上述多醣添加於草蝦飼料中，經長時間對草蝦免疫系統與抗菌能力進行試驗研究 (Su et al., 1995 ; Chang et al., 1996 ; Liao et al., 1996 ; Chang et al., 1999 ; Chang et al., 2000 ; Chang et al., 2003) 發現：

- (1) 連續口投含多醣飼料餵飼草蝦 18 週後，不會影響草蝦之生長。而添加量至少應需 2 克/公斤、飼料，並且需連續餵飼 10 天以上，才能增強抵抗弧菌之感染。
- (2) 飼料中添加多醣 2 克/公斤、飼料可強化草蝦苗抗 *V. harveyi* 感染能力。
- (3) 多醣與多聚磷酸態維生素 C 混合添加於飼料中，對草蝦之抗弧菌能力有加成效果。
- (4) 餵飼草蝦種蝦含多醣 2 克/公斤、飼料連續 20 天，可增強種蝦血淋巴球之附著、吞噬能力與超氧離子產生量及提高活存率。
- (5) 以添加多醣 2 克/公斤、飼料餵飼草蝦後期幼蟲 PL15 蝦苗 15 天可對強化草蝦苗抵抗白點症病毒 (WSSV) 之感染。
- (6) 餵飼含不同劑量之多醣 (0, 1, 2, 10, 20 克/公斤、飼料) 飼料，分別餵飼草蝦 20 天後，對 WSSV 之抵抗能力，以添加 10 克/公斤、飼料組之活存率為最高。並能增強蝦體血球吞噬能力及酚氧化酵素、超氧離子與超氧岐化酵素產生量。

綜合以上之結果，草蝦連續攝食20天多醣後，蝦體之免疫功能會達到最高點，而可持續7—10天。故在目前養殖草蝦正處於強烈病毒性疾病侵襲感染期間，建議添加多醣之養殖方式與策略如下：在種蝦方面，一方面配合PCR無病毒種蝦之篩選，另一方面發展人工催熟飼料，並配合多醣2克/公斤、飼料添加餵飼20天、休息10天方式，增強種蝦之免疫能力，培養出健康種蝦。

在蝦苗方面，多醣2克/公斤、飼料可藉由浸泡方式或添加於微粒飼料中餵飼5—10天，以增強蝦苗之活力與對病原之抵抗能力，生產出健康蝦苗。在池塘養殖方面，放養前先以漂白水50—100 ppm消毒蝦池，再進行「做水」，待池水穩定才放養蝦苗。

因草蝦在放養後30—90天，最易受WSSV感染，故建議添加多醣之養殖方式與策略如下：放養一個月內養殖池中之天然餌料充足時儘可能不餵食餌料；31—50天：

添加多醣10克/公斤、飼料；51－60天：不含多醣之飼料；61－80天：添加多醣10克/公、飼料之飼料；81－90天：不含多醣之飼料；91－110天：添加多醣2克/公斤、飼料之飼料；111－120天：飼料中不需加多醣；121－140天：添加多醣2克/公斤、飼料。

(三) 醣類 (polysaccharide)：

如幾丁質 (chitin)、幾丁聚醣 (chitosan)、lentinan、及寡醣類 (oligosaccharide) 等，可增強鱒魚、鯉魚及青甘鰻對 *V. anguillarum*、*A. salmonicida*、*E. tarda*、*E. seriolocida* 的抵抗力。

1. 幾丁質之來源與結構

幾丁質是白色不溶於水的角質多醣，廣泛存在於蝦、蟹等甲殼類及昆蟲的外骨骼及植物、藻類及真菌類等的細胞壁，為自然界中含量僅次於纖維素的高分子聚合物 (Knorr, 1984)，較葡聚醣容易獲得，而且由幾丁質、幾丁聚醣去乙醯化的幾丁寡醣 (chitooligosaccharides)，目前已被利用作為食品添加劑，也逐漸發展成用於魚蝦類飼料的添加劑，以增強養殖魚蝦免疫能力對抗病原菌之感染。由於我國之養殖、近海及遠洋漁業頗為發達，其中蝦、蟹加工的產量及產值高，已成為台灣水產加工品的主要項目，在其廢棄物中富含蛋白質、蝦紅素及幾丁質等，若能加以利用，就能大大增加附加之經濟價值。

蝦蟹殼加工廢棄物之利用，除蛋白質與蛋白質酵素利用與複合調味料與蝦醬油之製造外，幾丁質製造與利用及蝦紅素之萃取的利用價值較高、用途很廣 (江，1996)。尤其是幾丁質之用途，涵括了醫藥、食品加工、保健食品、農業、化工、環境保護、生物技術的研究及其他方面如擴音器震動膜材料等。目前台灣地區所行銷的幾丁質產品主要用在健康食品，只有少量用在化妝品，淨水器及工業用途，而農業與水產方面則仍處於嘗試性推廣階段 (江，1996)。

幾丁質 (chitin) 是結構類似纖維素的直鏈多醣化合物，在自然界中主要出現於昆蟲與甲殼類動物的外骨骼及植物、藻類與真菌類等的細胞壁，為含量僅次於纖維素的高分子聚合物 (Knorr, 1984)，常與蛋白質結合成粘多醣體 (mucopolysaccharide)，並以此形式存在自然界中；在溶解狀態下帶有正電 (Chen et al., 1998)，此特性具有獨特的生物活性、生物相容性及生物分解性，易於被消化吸收，並可滲透到所有細胞，將細胞活化。而幾丁聚醣 (chitosan) 則是幾丁質經脫乙醯作用後產物的總稱，具游離胺基，其去乙醯基程度由 65－95%不等，一般以 70－90%最為常見 (劉，1994)。

在魚類方面之試驗：Hoffman et al. (1997) 用去乙醯化程度不同的幾丁寡醣、幾丁聚醣刺激大西洋鮭魚頭腎巨噬細胞，並進行不同分子量、不同培養時間及不同濃度的處理，觀察巨噬細胞超氧離子產生量，發現不管去乙醯化程度高低，皆具免疫刺激效果。巨噬細胞在短時間 (2 天) 培養下，以去乙醯化高 (80%)、分子量小 (N-乙醯幾丁二十四醣)、顆粒小、水溶性低且劑量低 (25 µg/ml) 的幾丁寡醣所刺激之巨噬細胞的超氧離子產生量較高。另外，虹鱒腹腔注射幾丁質 100 µg/g 5 天後，會增強 10 倍以上之魚體對 *V. anguillarum* 感染的抵抗能力，且處理後的巨噬細胞吞噬

能力及超氧離子產生量也明顯提昇，只有替代性補體反應及溶菌酵素能力則無反應 (Sakai et al., 1992)。

Anderson and Siwicki (1994) 對溪鱒分別用幾丁聚醣、葡聚醣施予 1 $\mu\text{g/g}$ 腹腔注射或 100 $\mu\text{g/mL}$ 浸泡處理後，進行 *A. salmonicida* 感染，發現注射處理較浸泡處理具保護魚體的效果，並且幾丁聚醣與葡聚醣兩者保護魚體的效果相同。唯 Kolman et al. (1998) 對俄羅斯鱒魚之試驗，以幾丁聚醣及葡聚醣浸泡處理後，經過 1 個月及 4 個月，各項免疫能力分析並無明顯不同。

在佐劑效果方面，Kawakami et al. (1998) 分別以 *V. anguillarum* 疫苗與疫苗及 50 $\mu\text{g/g}$ 幾丁質混合，腹腔注射金黃頭鯛後進行 *P. piscicidae* 感染，發現幾丁質不具佐劑的效用。

口服研究上，在虹鱒飼料中分別添加 0.5% 的幾丁聚醣、市售不同廠牌之葡聚醣、可增強免疫力之維他命複合劑及胺基酸，投餵 7 天後 *A. salmonicida* 感染，結果以幾丁聚醣及葡聚醣組的累計死亡率最低、非特異性免疫生理反應最佳，且兩者保護魚體的效果相當 (Siwicki et al., 1994)。

Esteban et al. (2000) 認為顆粒大小是幾丁聚醣影響免疫系統的因素，所以使用小於 10 μm 的幾丁質顆粒，對金黃頭鯛分別做腹腔及靜脈注射，結果指出，腹腔注射 3–5 天後，明顯的提昇了巨噬細胞趨化、吞噬及超氧離子產生等之非特異性免疫能力，然而替代性補體反應則沒有明顯增強；但若以靜脈注射，則各項免疫生理指標並未增強。

根據以上對養殖魚類的研究中，在試管內試驗發現，短時間下，以去乙酰化高、分子量小、水溶性低且劑量低的幾丁寡醣可促進巨噬細胞毒殺能力；在活體試驗上，大部分的研究以使用幾丁聚醣為主，注射處理以腹腔注射法可提供有效的免疫促進作用，並且成效與葡聚醣相當；口投處理上，連續投餵幾丁聚醣 7 天，可有效降低細菌感染後的死亡率，效果亦與葡聚醣相當。由上述研究，發現幾丁聚醣確實可促進魚類的免疫能力，特別是魚類的非特異性免疫。

2. 飼料添加幾丁質對蝦類成長的影響

部份甲殼類的消化道中可檢測到具水解幾丁質或幾丁聚醣活性的酵素，因此幾丁質能被這些甲殼類消化利用。含 5% 幾丁質飼料可被草蝦利用而有最佳的成長 (游, 1997)，若在飼料中添加 10% 幾丁質及 2、5、10% 幾丁聚醣則會降低草蝦對飼料中脂質的消化率並影響其成長。Clark 等人在 1993 年針對三種對蝦類 *L. vannamei*、*L. setiferus* 及 *M. duorarum*，餵食含 1、2、4% 之幾丁質飼料，探討幾丁質的表面消化率；研究結果發現，*L. vannamei* (16.9 g) 幼蝦對幾丁質之表面消化率為 36%，*L. setiferus* (35.4 g) 成蝦表面消化率為 33%，*M. duorarum* (17.4 g) 幼蝦表面消化率為 36%，不同對蝦類消化幾丁質的能力稍有不同。

(四) 動、植物萃取物：

如 Ete (Tunicate)、Hde (Abalone)、firefly squide、quillaja saponin (soap tree)、glycyrrhizin (licorice) 等，可增強鰻魚、鱒魚及青甘鯪對 *A. hydrophila*、*V. anguillarum*

及 *E. seriolocida* 的抵抗力。

(五) 營養因子：

如維他命 C、E，可增強鱒魚及鮭魚對 IHNV (infectious hematopoietic necrosis virus) 和 *A. salmonicida* 的抵抗力。

1. 維生素 C

(1) 生理功能與代謝

維生素 C 最重要之生理功能是參與組成膠原 (collagen) 先趨物質的合成，在羥化反應 (hydroxylation) 的過程中，協助將脯胺酸 (proline) 或離胺酸 (lysine)，轉變為羥脯胺酸 (hydroxyproline) 與羥離胺酸 (hydroxylysine)，而其所合成的膠原，對於組織受傷後之修補助益很大。兩棲類、爬蟲類及多數的哺乳類可由 glucuronic acid 合成維生素 C，但大多數的魚、蝦類沒有這種能力，需從外界攝食足夠量的維生素 C 來維持正常之成長與生理功能。

維生素 C 極易溶於水中，又為一強還原劑，進入生物體後，很快氧化而代謝。天竺鼠與鼠，給予各種不同之維生素 C 的衍生物，經口服或靜脈注射後，血液中維生素 C 含量都在 4 小時達最高，但是在 24 小時後又恢復到未試驗前的含量 (Yamamoto et al., 1990)。

對小鯉魚而言，維生素 C 在魚體內的周轉時間 (turnover time) 為 5.5 天，平均每日周轉 164.65 nmol/g (Ikeda and Sato, 1965)。一歲之成熟虹鱒 (*Salmo gairdneri*) 的頭腎組織中維生素 C 含量耗減至原來一半量所需的時間 (生物半衰期, $T_{1/2}$) 為 20—21 天，其體內之組織只有卵巢會蓄積維生素 C (Hilton et al., 1978a,b)。比目魚給予 2,000 毫克/公斤、飼料 (Coustans et al., 1990) 之濃度後，在成熟魚體內之維生素 C 的分佈，以卵巢含量為最高；在未成熟魚體，則以腦部含量最高，其次依序為腎、脾、肝、心，而已膽囊與肌肉為最低 (Ikeda et al., 1963 ; Hilton et al., 1978a)。因此，當飼料中缺乏維生素 C 時，可由這些器官釋放出來。

(2) 缺乏症

維生素 C 缺乏時魚類會產生許多缺乏症狀，如鮭、鱒、鯰等魚類，會發生脊椎前凸 (lordosis)、脊椎側凸 (scoliosis)、成長不良、嗜眠、受傷癒合力差、容易受感染及死亡率高等現象 (Halver, 1972 ; Lim and Lovell, 1978 ; Agrawal and Mahajan, 1980 ; Sato et al., 1978 ; 1982)。當虹鱒缺乏維生素 C 時，體內之羥脯胺酸與脯胺酸之比例會下降，因此膠原合成量會減少，造成骨頭易碎，受傷之組織復原慢 (Cordinal et al., 1975 ; Sato et al., 1982)。鯰魚餵食缺乏維生素 C 之飼料 8—10 週，骨頭中之膠原含量會降低，並出現缺乏症狀。

若在飼料中添加維生素 C 60 毫克/公斤/飼料，則在 10 日內受傷的組織就可復原。而飼料中含 30 毫克/公斤/飼料，即可維持膠原之正常形成 (Lim and Lovell, 1978)。當維生素 C 缺乏時吳郭魚膠原的合成亦會受阻 (Jauncey et al., 1985)。因此在魚體組織中維生素 C 的含量，會影響膠原的生成，進而發生缺乏症。另一方面，食用多量之維生素 C 能增加魚類對細菌之抵抗力與魚體內抗體的形成 (Durve and Lovell, 1982 ;

Li and Lovell, 1985 ; Yano et al., 1988 ; Hardie et al., 1991 ; Kawahara et al., 1991) , 降低虹鱔受白點病感染時之死亡率 (Wahli et al., 1986) , 並提高卵的孵化率與幼苗之活存率 (Sandnes et al., 1984) 。

對蝦類 *P. californiensis* 與 *P. stylirostris* 缺乏維生素 C 時, 會發生黑死病 (black death disease) , 其主要之症狀為, 在體表殼、食道壁、胃壁、腸壁、鰓與鰓蓋等處有黑色素沈積, 每日死亡率為 1—5% (Lightner et al., 1977 ; Magarelli et al., 1978) 。足量的維生素 C 對傷口之癒合有很大的幫助 (Lightner et al., 1979) 。又如 *P. japonicus* 缺乏維生素 C 時, 腹部下緣與步腳前端有灰白斑點出現 (Deshimaru and Kuroki, 1976 ; Iwata and Shigueno, 1980) 。但是 Shigueno and Itoh (1988) 以斑節蝦為材料進行實驗時, 卻發現維生素 C 缺乏症狀為頭胸甲與腹節之體表殼下層有黑色素沈積, 此與黑死病相似。此外飼料中維生素 C 不足時, *P. japonicus* 之脫殼數會減少 (Guary et al., 1976) 。另外, 在草蝦方面, Shiau and Jan (1992) 研究發現, 草蝦缺乏維生素 C 6—8 週後, 黑色素只出現在蝦體表結締組織, 但是蝦體死亡率高。

(3) 魚蝦類對維生素 C 之需求

魚蝦類對維生素 C 之需求, 因魚蝦種類、大小、水質環境與魚蝦體的健康狀況而有所不同。在魚類方面, 研究者較多的虹鱔, 維持正常生長時需 70—100 毫克/公斤、飼料, 而受傷時, 則需 500 毫克/公斤、飼料 (Halver et al., 1972) 。鯰魚在 20℃ 下, 要維持正常的生長需 60 毫克/公斤、飼料 (Lim and Lovell, 1978) , 在 29—32℃ , 維持正常的生長需 30 毫克/公斤、飼料, 要抵抗細菌感染, 則需 150 毫克/公斤、飼料 (Li and Lovell, 1985) 。六週大的虹鱔魚苗以不含維生素 C 之飼料餵飼, 在第 21—24 週時, 生長遲緩, 並有出血及骨骼彎曲等壞血病的症狀出現。但以相同的飼料, 餵飼十個月大之魚, 在六十週內, 生長良好且無缺乏症出現 (Sato et al., 1978) 。

當魚或蝦正處於快速成長階段或受傷時, 維生素 C 的需求量就會增加。而當魚或蝦體健康, 成長已經緩慢時, 則維生素 C 的需求量, 相對的就會降低。Mazik et al. (1987) 維生素 C 缺乏的鯰魚對氨忍受力較低。而烏魚暴露在油脂與銅下, 鰓、肝臟、腎臟與心臟中之維生素 C 量均會減少 (Thomas et al., 1982 ; Thomas, 1987) 。當鹽度由 30 ppt 降至 5 ppt 時, 烏魚鰓部維生素 C 含量會上升 2 倍, 而腎臟中維生素 C 含量則下降。水溫升高及鹽度下降亦導至烏魚腦部之維生素 C 含量下降 (Thomas, 1984) 。由此可知, 環境中的各項因子, 均會影響到維生素 C 的需求量。

在蝦類方面, 相關研究資料較少。Deshimaru and Kourki (1976) 發現斑節蝦維持正常成長與避免黑死病之需求量為 3,000 毫克/公斤、飼料, 但 Guary et al. (1976) 認為 10,000—20,000 毫克/公斤、飼料為斑節蝦之需求量。此二研究之結果, 差距很大。另方面 Lightner et al. (1977) 則指出, 2,000 毫克/公斤、飼料為 *P. californiensis* 正常生長所需之量。Shiau and Jan (1992) 發現草蝦如果餵食不含維生素 C 之飼料經 6—8 週後, 出現生長遲緩與黑死病的症狀, 其對維生素 C 需求量為 2,000—2,500 毫克/公斤、飼料。

維生素 C 之需求量會隨著魚蝦的大小、成長速度、溫度、水質環境與有無緊迫

等因素而會有所不同 (Halver, 1988)。通常在稚魚蝦期、快速成長、水溫高、有受傷與受細菌或原蟲類感染時，需求量會上升。如虹鱔，在維持正常成長時需求量為 100 毫克/公斤。若在受傷情形下，需要 500—1,000 毫克/公斤之量，才有較好的癒合能力 (Halver, 1988)。Navarre and Halver (1989) 亦指出，當有細菌感染時，需要有 5—10 倍的生長需求量，才能抵抗細菌感染，並增進抗體的生成。

(4) 維生素 C 之衍生物

維生素 C 屬於強還原劑，相當不安定，其碳鏈 C-2 與 C-3 上的氫離子，極易跑掉而與其他物質結合。我國之魚蝦養殖均採用高密度集約方式，完全需仰賴人工配合飼料，提供魚蝦生長所需的營養。然而在飼料加工混合、擠壓、運送及貯藏之過程，部分營養，特別是維生素，易被高溫、高壓所破壞，降低其於飼料中的含量。若無法由養殖池中之天然餌料來補充，魚蝦會產生成長不良及體內很多生理功能無法進行的問題，並易罹患各種不明原因的疾病。業者不明究理，又大量投藥，對養殖生物造成更大之傷害。普通型態維生素 C 相當不安定，當加工或貯藏時之溫度、氧氣、光線與 pH 質等不適合時，極易被破壞 (Wanhinger, 1972 ; Hilton et al., 1977 ; Soliman et al., 1987)。雖然飼料製造業者，在製造配合飼料時，均會添加過量之維生素 C，試圖補足加工之損耗，但依據 Soliman et al. (1987) 之研究，當蝦飼料製造完成後，維生素 C 之含量只剩原來的 20—40%，再撒至水中餵蝦時，又會隨時間而溶出 15—50%，故極易造成維生素 C 之缺乏。

由於維生素 C 純劑不穩定，不易實際使用於水產飼料上，因此有許多包覆態 (coated) 與複合型態維生素 C 的發展出來。Hilton et al. (1977) 用 ethylcellulose 包覆維生素 C 發現在飼料擠壓過程中，比單純用普通型態維生素 C 的安定性高出 15%。Skelbake et al. (1990) 用 polymer 包覆維生素 C 後，在製造飼料過程中，只損失 19%，在室溫下貯存 6 週後，還保存 73%。而直接用普通型態維生素 C 製造飼料組損失 29%，6 週後只剩下不到 10%。

複合型態維生素 C 的使用方面，Grant et al. (1989) 以 L-ascorbic acid-2-polyphosphate 及 Schuep et al. (1989) 使用 ascorbate-2-sulfate，來配製鱒魚飼料並在 37°C 下貯藏 24 週後，所剩餘維生素 C 都比用普通型態維生素 C 的安定性高出 83 倍。但這些維生素 C 的衍生物並不完全適用於所有魚蝦類，如 ascorbic acid-2-sulfate 可被虹鱔及鮭魚利用 (Halver et al., 1975 ; Dabrowski et al., 1990 ; Sato et al., 1991a)，但吳郭魚及鯰魚利用效果差 (Murai et al., 1978 ; Soliman et al., 1986 ; El Naggat and Lovell, 1991a, b)。L-ascorbyl-2-monophosphate 與 L-ascorbyl-2-polyphosphate 則適用於虹鱔及鯰魚，且添加後魚體內維生素 C 蓄積量比添加普通型態維生素 C 還高 (Wilson et al., 1989 ; El Naggat and Lovell, 1991b ; Mustin and Lovell, 1992)。

Shigueno and Itoh (1988) 添加 Mg-L-ascorbyl-2-phosphate 於斑節蝦飼料中，發現除在飼料的配製、貯藏、浸泡過程時較普通型態維生素 C 安定外，只需 215—430 毫克/公斤、飼料含量，就能維持良好成長並避免黑死病，遠低於以普通型態維生素 C 所定出之需求量 (3,000—20,000 毫克/公斤、飼料)。

在草蝦方面，經多年之研究探討草蝦對多聚磷酸態維生素 C (polyphosphorylated L-ascorbic acid) 的需求與利用後發現，草蝦可以吸收與利用多聚磷酸態維生素 C，做為維生素 C 的來源。多聚磷酸態維生素 C 進入草蝦體內後，在 4 小時內血液、肝胰臟與肌肉中維生素 C 的含量達到高峰，而在 24 小時內就全被代謝完。草蝦缺乏維生素 C 65 天後，體內肝胰臟與肌肉在維生素 C 蓄積量分別為 146.353 nmol/g 及 42.15 nmol/g 時，開始出現維生素 C 缺乏症。在試驗中草蝦所顯現之缺乏症狀為：蝦體表外殼、腹部肌肉、步腳與泳腳等處黑色素沉積，鰓蓋向外翻及傷口無法復原。當飼料添加多聚磷酸態維生素 C 後一個月內，所有症狀在蝦脫殼後就逐漸消失。由草蝦之成長、肝胰臟與肌肉內維生素 C 的蓄積量結果分析，利用多聚磷酸態維生素 C 為來源時草蝦幼苗維生素 C 的最適需求量為 208.95–220.24 毫克/公斤、飼料 (Chen and Chang, 1994)。

(六) 荷爾蒙 (hormones)、細胞激素 (cytokines) 及其它：

如乳鐵蛋白 (lactoferrin)、干擾素 (interferon)、成長荷爾蒙 (growth hormone) 及泌乳激素 (prolactin) 等，可增強鱒魚及比目魚對 *V. anguillarum*、HRV (hirame rhabdovirus) 的抵抗力。

上述免疫刺激物，雖可有效提升水生生物對細菌、濾過性病毒及寄生蟲的抵抗力，但並不是對所有致病微生物有效，有些細菌性感染：如 *Cytophaga* 等，病毒性感染，如 VHS (viral haemorrhagic septicaemia) 及 IHN (infectious hematopoietic necrosis) 等就沒有增強防禦力的作用。魚類防禦力的增強受免疫刺激物之使用時間、使用方法及使用劑量的影響，抗病效力會產生不同的結果。

參考文獻

- Agrawal, N. K. and C. L. Mahajan (1980) Nutritional deficiency in an Indian major carp, *Cirrhina mrigala*, due to a vitaminosis C during early growth. *Journal of Fish Disease*, 3: 321-348.
- Anderson, D. P. (1992) Immunostimulant, adjuvant and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 281-307.
- Anderson, D. P. (1997) Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P. J., Brown, F (Eds.), *Fish Vaccinology. Developments in Biological Standardization*, Basel, Karger, 90: 257-265.
- Anderson, D. P. and A. K. Siwicki (1994) Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *The Progressive Fish-Culturist*, 56: 258-261.
- Aoki, T. (1992) Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. In: Shariff, M., Subasighe, R. P., Arthur, J. R. (Eds.), *Disease in Asian Aquaculture 1. Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 519-529.
- Barracco, M. A., B. Duvic and K. Soderhall (1991) The β -1,3-glucan binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* when reacted with β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res.*, 266: 491-497.
- Bauchau, A. G. (1981) Crustacean. In *Invertebrate blood cell*, (Rowley, A. F. eds.). London: Academic Press, 387-417.
- Blazer, V. S. (1991) Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3: 77-86.
- Castro, R., N. Couso, A. Obach, and J. Lamas (1999) Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 9: 529-541.
- Chang, C. F., H. Y. Chen, M. S. Su and I C. Liao (2000) Immunodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the gross prawn *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 10: 505-514.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen and I C. Liao (1996) Vibriosis resistance and wound healing enhancement of *Penaeus monodon* by beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune* and polyphosphorylated l-ascorbic acid. *J. Taiwan Fish Res.*, 4: 43-54 (in Chinese with English abstract).
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen and I C. Liao (2003) Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with White Spot Syndrome Virus. *Fish Shellfish Immunol.* (in press)
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, C. F. Lo, G. H. Kou and I C. Liao (1999) Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 163-168.
- Chen H. Y. and C. F. Chang (1994) Quantification of vitamin c requirements for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L-ascorbic acid. *Journal of Nutrition*, 124: 2033-2038.

- Chen, D. and A. J. Ainsworth (1992) Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J. Fish Dis., 15: 295-304.
- Clark, D. J., A. L. Lawrence and D. H. D. Swakon (1993) Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. Aquaculture, 109: 51-57.
- Cordinal, G. J., L. H. Stassen and R. Kuttan (1975) Activation of propyl hydroxylase in fibroblast by ascorbic acid. Annals of the New York Academy of Sciences, 98: 268-286.
- Coustans, M. F., J. Guillaume, R. Metailler, O. Dugornay and J. L. Messenger (1990) Effect of an ascorbic acid deficiency on tyrosinemia and renal granulomatous disease in turbot (*Scophthalmus maximus*) interaction with a slight polyhypo-vitaminosis. Comparative Biochemistry and Physiology, 97A(2): 145-152.
- Dabrowski, K., N. El-Fiky, G. Kock, M. Frigg and W. Wieser (1990) Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. Aquaculture, 91: 317-337.
- De Kinkelin, P. and M. Dorson (1973) Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) experimentally infected with Egtved virus. Journal of General Virology 19: 125-127.
- Deshimaru, O. and K. Kuroki (1976) Studies on a purified diet for prawn-VII. Adequate dietary levels of ascorbic acid and inositol. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 42: 571-576.
- Duff, D.C.B. (1942) The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. J. Immunology, 44: 87-94.
- Durve, V. S. and R. T. Lovell (1982) Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 39: 948-951.
- Duvic, B. and K. Soderhall (1991) Purification and characterization of a β -1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J. Biol. Chem., 265: 9327-9332.
- El Nagggar, G. O. and Lovell, R. T. (1991a) Effect of source and dietary concentration of ascorbic acid on tissue concentration of ascorbic acid in channel catfish. Journal of the World Aquaculture Society, 22(4):201-206.
- El Nagggar, G. O. and R. T. Lovell, (1991b) L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. Journal of Nutrition, 121: 1622-1626.
- Ellis, A. E (ed) (1988) Fish Vaccination. London: Academic Press. 255.
- Ellis, A. E. (1989) The immunology of teleosts. In: Roberts, R. J., (Eds.), Fish Pathology. Bailliere Tindall, London, England, 137-152.
- Esteban, M. A., V. Mulero, A. Cuesta, J. Ortuno and J. Meseguer (2000) Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology, 10: 543-554.
- Evans, D. L. and L. Jaso-Friedmann (1992) Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. Annual Review of Fish Diseases, 2: 109-121.
- Fox, C. J. (1993) The effect of dietary chitin on the growth, survival and chitinase levels in the

- digestive gland of juvenile *Penaeus monodon* (Fab.). *Aquaculture*, 109: 39-49.
- Furue, H. (1987) Biological characteristics and clinical effect of sizofilan (SPG). *Drugs of Today*, 23: 335-346.
- Goldenberg, P. Z., E. Huebner and A. H. Greenberg (1984) Activation of lobster hemocytes for phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 77-83.
- Graham, S. and C. J. Secombes (1988) The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology*, 65: 293-297.
- Grant, B. F., P. A. Seib, M. L. Liao and K. E. Corpton (1989) Polyphosphorylated L-ascorbic acid: A stable form of vitamin C for aquaculture feeds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 20(3): 143-157.
- Guay, M., A. Kanazawa, N. Tanaka and H. J. Ceccaldi (1976) Nutritional requirements of prawn-VI. Requirement for ascorbic acid. *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University*, 25: 53-57.
- Gudding, R., A. Lillehaug, P. J. Midtlyng, F. Brown (eds) (1997) *Fish Vaccinology. Developments in Biological Standardization*. Basel: Karger, 90: 484.
- Halver, J. E. (1972) The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38: 79-92.
- Halver, J. E. (1988) Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. *Nutrition and Feeding in Fish*, Edited by Cowey C. B., Mackie, A. M. and Bell, J. G. Academic Press, Inc., London, 415-431.
- Halver, J. E., R. R. Smith, B. M. Tolbert and E. M. Baker (1975) Utilization of ascorbic acid in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 258: 81-102.
- Haride, L. J., T. C. Fletcher and C. J. Secombes (1991) The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214.
- Hilton, J. W., C. Y. Cho and S. J. Slinger (1977) Factors affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 34: 683-687.
- Hilton, J. W., C. Y. Cho and S. J. Slinger (1978b) Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 35: 431-436.
- Hilton, J. W., C. Y. Cho, R. G. Brown and S. J. Slinger (1978a) The synthesis, half-life and distribution of ascorbic acid in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 63A: 447-453.
- Hoffman, J., A. Johansen, K. Steiro, A. Gildberg, E. Stenberg and J. Bogald (1997) Chitooligosaccharides stimulated Atlantic salmon, *Salmo salar* L., head kidney leukocytes to enhanced superoxide anion production in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118: 105-115.
- Huang, C. C. and Y. L. Song (1999) Maternal transmission of white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 545-552.

- Ikeda, S., M. Sato and R. Kimura (1963) Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animals-II. distribution in various parts of fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 29(8): 765-770.
- Ikeda, S., M. Sato and R. Kimura (1965) Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animals-IV. metabolism of L-ascorbic acid-1-C¹⁴ in carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 31(10): 814-817.
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo and M. Takahashi (1998) Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277-288.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). *In The Third Asian Fisheries Forum*, (Chou, L. M., Munro, A. D., Lam, J. J., Chen, T. W., Cheong, L. K. K., Ding, J. K., Hooi, K. K., Khoo, H. W., Phang, V. P. E., Shim, K. F. and Tan, C. H. eds.). Asian Fisheries Society, Manila, Philippine, 375-378.
- Iwama, G. and T. Nakanishi (1996) *The Fish Immune System. Organ, Pathogen, and Environment*. Academic Press, San Diego, 380.
- Iwata, H. and K. Shigeno (1980) Vitamin C-deficiency symptoms of prawn, *Penaeus japonicus*. *The Abstract of the Annual Meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Fukuoka)*. 3.
- Jauncey, K., A. Soliman and R. J. Roberts (1985) Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas), *Aquaculture and Fisheries Management*, 16: 139-149.
- Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1985) Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. *J. Comp. Physiol.*, 156: 175-181.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1988) Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.*, 106: 1795-1803.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1989b) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasit. Today*, 5: 171-176.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1989a) A cell adhesion factor from crayfish hemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochem.*, 2: 183-190.
- Kawahara, E., T. Inarimori and S. Nomura (1991) Humoral immune response of white-spotted char *Salvelinus leucomaenis* to *Aeromonas salmonicida*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(6): 1057-1063.
- Kawakami, H., N. Shinohara and M. Sakai (1998) The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathology*, 33: 287-292.

- Knorr, D. (1984) Use of chitinous polymer in food-A challenge for food research and development. *Food Technology*, 38: 85-97.
- Kobayashi, M., M. W. Johansson and K. Soderhall (1990) The 76kD adhesion factor from crayfish hemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell Tissue Res.*, 260: 13-18.
- Kolman, H., A. K. Siwicki and R. Kolman (1998) The effect of natural immunomodulators applied in immersion on non-specific immune responses in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt). *Archives of Polish Fisheries*, 6: 391-410.
- Li, Y. and R. T. Lovell (1985) Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *Journal of Nutrition*, 115: 123-131.
- Liao, I C., M. S. Su, C. F. Chang, B. Y. Her and T. Kojima (1996) Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by beta-1,3-glucan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 23: 109-116.
- Lightner, D. L., B. Hunter, P. C. Jr. Magarelli and L. B. Colvin (1979) Ascorbic acid: Nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proceedings World Mariculture Society*, 10: 513-528.
- Lightner, D. L., L. B. Colvin, C. Brand and D. A. Donald (1977) Black death, a disease syndrome of penaeid shrimp related to a dietary deficiency of ascorbic acid. *Proceedings World Mariculture Society*, 8: 611-623.
- Lim, C. and R. T. Lovell (1978) Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition*, 108: 1137-1146.
- Magarelli, P. C. Jr. and L. B. Colvin (1978) Depletion/ Repletion of ascorbic acid in two species of penaeid: *Penaeus californiensis* and *Penaeus stylirostris*. *Proceedings World Mariculture Society*, 9: 235-241.
- Martin, G. G., J. E. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbboy and N. Mckrell (1991) Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 517-522.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203.
- Mazik, P. M., T. M. Brandt and J. R. Tomasso (1987) Effect of vitamin C on growth, Caudal fin development, and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Progressive Fish-Culturist*, 49: 13-16.
- Mix, M. C. and A. K. Sparks (1980) Hemocyte classification and differential counts in the dungeness crab, *Cancer magister*. *J. Invertebr. Pathol.*, 35: 134-143.
- Murai, T., Andrews, J. W. and Bauernfeind, J C. (1978) Use of L-ascorbic acid, ethocel coated ascorbic acid and ascorbic 2-sulfate in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Nutrition*, 108:1761-1766.
- Mustin, W. G. and R. T. Lovell (1992) Na-L-ascorbt-2- monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. *Aquaculture*, 105: 95-100.
- Nakanishi, Y., H. Kodama, T. Murai and H. Izawa (1991) Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American Journal of Veterinary Research*, 52: 397-401.

- Navarre, O. and J. E. Halver (1989) Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.
- Ohno, N., Y. Emori and T. Yadomae (1990) Reactivity of *Limulus* amoebocyte lysate towards (1→3)- β -D-glucans. *Carbohydr. Res.*, 207: 311-318.
- Oliver, G., C. A. Eaton and N. Campbell (1986) Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12: 223-234.
- Ratcliffe, N. A., A. F. Rowley, S. N. Fitzgerald and C. P. Rhodes (1985) Invertebrate immunity-Basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.*, 97: 183-349.
- Robertsen, B., E. R. Engstad and J. B. Jorgensen (1994) β -Glucans as immunostimulants in fish. *Modul. Fish Imm. Res.*, 1: 83-99.
- Robertsen, B., G. Rostad, R. Engstad and J. Raa (1990) Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmon salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. fish Dis.*, 13: 391-400.
- Roitt, I., J. Brostoff and D. Male (1996) *Immunology*. London: Mosby. 422.
- Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Sakai, M., H. Kamiya, S. Ishii, S. Atsuta and M. Kobayashi (1992) The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Shariff, M., Subasighe, R. P., Arthur, J. R. (eds.), *Disease in Asian Aquaculture 1*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 413-417.
- Sandnes, K., Y. Ulgenes, O. R. Braekkan and F. Utne (1984) The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43: 167-177.
- Sato, M., R. Yoshinake and S. Ikeda (1978) Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 44(9): 1029-1035.
- Sato, M., T. Kondo, R. Yoshinake and S. Ikeda (1982) Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48(4): 553-556.
- Schuep, W., J. Marmet and W. Studer (1989) Stability of ascorbate-2-sulfate in trout feed measured by HPLC. *Aquaculture*, 79: 249-258.
- Secombes, C. J. (1990) Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In *Techniques in Fish Immunology* (Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Van Muiswinkel, W. B. eds.). pp 137-154. Fair Haven, NJ: SOS Publications.
- Secombes, C. J. (1996) The nonspecific immune system: cellular defenses. In: *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*. Iwama, G., Nakanishi, T. (eds.). *Fish physiology*, 15: 63-157. Academic Press, Sandiego.
- Shiau, S. Y. and F. L. Jan (1992) Ascorbic acid requirement of grass shrimp *Penaeus monodon*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(2): 363.
- Shigueno, K. and S. Itoh (1988) Use of Mg-L-ascorbic-2-phosphate as a vitamin C source in

- shrimp diets. *Journal of the World Aquaculture Society*, 19(4): 168-174.
- Siwicki, A. K., D. P. Anderson and G. L. Rumsey (1994) Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41: 125-139.
- Skelbake, T., N. G. Andersen, M. Winning and Westergaard (1990) Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. *Aquaculture*, 84: 335-343.
- Soderhall, K. and V. J. Smith (1983) Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and pro-phenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.*, 7: 229-239.
- Soderhall, K., V. J. Smith and M. W. Johansson (1986) Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.*, 245: 43-49.
- Soliman, A. K., K. Jauncey and R. J. Roberts (1986) The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 52: 1-10.
- Soliman, A. K., K. Jauncey and R. J. Roberts (1987) Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. *Aquaculture*, 60: 73-83.
- Song, Y. L. and Y. T. Hsieh (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201-209.
- Song, Y. L., C. C. Huang, Y. F. Kao and C. I. Yu (1998) Application of yeast glucan to prevent diseases of culture shrimp (*Penaeus monodon*) in the field. In *Research and Application of Biotechnology in Aquaculture*, (Chao, N. H., Liang, C. I. and Hsu, H. W. eds.). Council of Agriculture, Taiwan, 167-183.
- Song, Y. L., J. J. Liu, L. C. Chan and H. H. Sung (1997) Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Vaccinol.*, 90: 413-421.
- Su, M. S., K. F. Liu, C. F. Chang and I C. Liao (1995) Enhancement of gross prawn *Penaeus monodon* postlarvae viability by beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*. *J. Taiwan Fish. Res.*, 3: 125-132. (in Chinese with English abstract).
- Sung H. H., Y. L. Yang and Y. L. Song (1996) Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. *J. Crustacean Biol.*, 16: 278-284.
- Sung. H. H., G. H. Kou and Y. L. Song (1994) Vibriosis resistance induce by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 29: 11-17.
- Thomas, P. (1984) Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L., tissues. I. Effect of salinity, capture-stress, and temperature. *Journal of Fish Biology*, 25: 711-720.
- Thomas, P. (1987) Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* Linn., tissues. III. Effect of exposure to oil. *Journal of Fish Biology*, 30: 485-494.
- Thomas, P., M. Bally and J. M. Neff (1982) Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* Linn.,

- exposure to cadmium. *Journal of Fish Biology*, 20: 183-196.
- Wahli, T., W. Meier and K. Pfister (1986) Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Tropica*, 43: 287-289.
- Wanhinger, L. A. (1972) Mathematical model predicts stability of ascorbic acid in food products. *Food Technology*, 26: 42-45.
- Wilson, R. P., W. E. Poe and E. H. Robinson (1989) Evaluation of L-ascorbyl-2- polyphosphate (AsPP) as a dietary ascorbic acid source for channel catfish. *Aquaculture*, 81: 129-136.
- Yamamoto, I., S. Suga, Y. Mitoh, M. Tanaka and N. Muto (1990) Antiscorbutic activity of L-ascorbic acid 2-glucoside and its availability as a vitamin C supplement in normal rats and guinea pigs. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 13(11): 688-695.
- Yano, T. (1995) Fish complement. *Fish Pathology*, 30: 151-158.
- Yano, T. (1996) The non-specific immune system: humoral defenses. In: Iwama, G, and Nakanishi, T. (eds.), *The Fish Immune System. Organism, Pathogen, and Environment*. Academic Press, San Diego, California, USA, 105-157.
- Yano, T., H. Matsuyama and R. E. P. Mangindaan (1991) Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish. Dis.*, 14: 577-582.
- Yano, T., M. Nakao and M. Furuichi (1988) Effect of dietary choline, pantothenic acid and vitamin C on the serum complement activity of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(1): 141-144.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection by some β -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1815-1819.
- 江晃榮 (1996) 幾丁質與幾丁聚醣產業現況與展望。財團法人生物技術開發中心。93 pp。
- 游宜屏 (1997) 幾丁質與幾丁聚醣對吳郭魚及草蝦成長及營養素消化率之影響。國立台灣海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。
- 劉瓊淑 (1994) 幾丁質，幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用。食品工業，26(1): 26-36。