

甲殼素及多醣體增進吳郭魚免疫能力之研究

黃世鈴、楊豐隆、劉富光
淡水繁養殖研究中心

飼料中添加甲殼素 (chitosan) 或多醣體 (β -1.3 glucan)，目的在於檢測試驗魚巨噬細胞的吞噬能力，測試甲殼素或多醣體是否可以有效提高巨噬細胞吞噬細菌的活性，亦即運用免疫學的方法來增強魚類細胞性免疫的能力，進而達到預防或減少魚類病害的發生率。

脾臟磨碎後取出細胞懸浮液，經 34/51% (v/v) percoll gradient 離心，可以適當的分離巨噬細胞 (圖 1)，將巨噬細胞培養在 15 mm 圓形玻璃片 (放入 4 well flask 中)，純化完成的巨噬細胞，顯示大小均一的細胞相 (圖 2)，待巨噬細胞粘附在圓形玻璃片上 (圖 3)，在 *in vitro* 的環境下進行 latex bead 或 *Vibrio anguillarum* 的吞噬試驗，細菌吞噬試驗結束後細胞以中性福馬林固定，進行 giemsa solution 染色，entella 封蓋，最後放在顯微鏡下觀察。巨噬細胞吞噬 latex bead，染色後吞噬細胞及吞噬顆粒呈藍色，但細胞外未被吞噬的顆粒在染色的過程中會褪色，不再顯出明顯的藍色 (圖 4)。

試驗結果顯示，細菌免疫試驗組巨噬細胞吞噬 *V. anguillarum* 的數量比吞噬 latex bead 的

數量多，甲殼素飼食+細菌免疫試驗組和多醣體飼食 + 細菌免疫試驗組也顯出類似的結果 (表 1)，也就是試驗魚經過 *V. anguillarum* 死菌疫苗免疫後，會適當增強試驗魚巨噬細胞對於 *V. anguillarum* 的吞噬能力，所以結果顯示細菌免疫試驗組、甲殼素飼食 + 細菌免疫試驗組、和多醣體飼食 + 細菌免疫試驗組等試驗魚都會增強其巨噬細胞吞噬 *V. anguillarum* 的能力，而不會增強對 latex bead 的吞噬能力。各組間的比較巨噬細胞吞噬之能力，試驗結果顯示，多醣體飼食 + 細菌免疫試驗組的試驗結果最好，對於吞噬 latex bead 或 *V. anguillarum* 都有很強的增強效力，對於甲殼素飼食 + 細菌免疫試驗組和細菌免疫試驗組，也會增強吞噬 latex bead 或 *V. anguillarum* 的能力，但效力比多醣體飼食 + 細菌免疫試驗組弱，且甲殼素飼食 + 細菌免疫試驗組和細菌免疫試驗組兩組間試驗魚的吞噬能力大約相等，顯示甲殼素並未能適度增強試驗魚的細胞吞噬能力，對照組試驗魚的巨噬細胞的吞噬能力最弱 (表 1)。

表 1 從各試驗組試驗魚分離及培養巨噬細胞，巨噬細胞吞噬細菌及微小顆粒的情形

	對照試驗組	細菌免疫試驗組	甲殼素飼育 + 細菌免疫試驗組	多醣體飼育 + 細菌免疫試驗組
吞噬 latex bead	+	++	++	+++
吞噬 <i>V. anguillarum</i>	+	+++	+++	++++

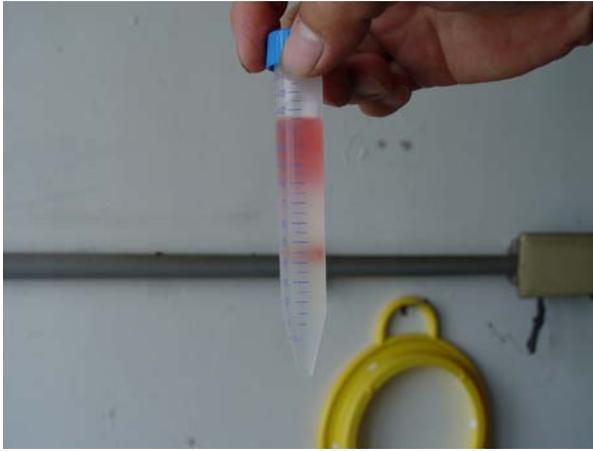


圖 1 脾臟磨碎後，細胞懸浮液經 34/51% (v/v) percoll gradient 梯度離心，離心條件為 $400 \times g$ ， 4°C ，30 min，巨噬細胞懸浮在 gradient 界面



圖 2 將純化完成的巨噬細胞培養在 4 well flask 中之 15 mm 圓形玻璃片，顯示大小均一的細胞相

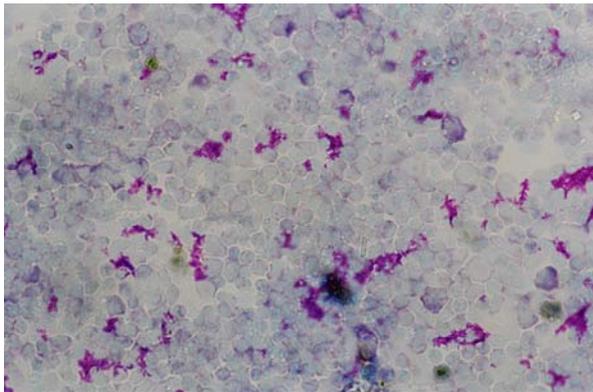


圖 3 培養的巨噬細胞粘附在培養皿底部的情形

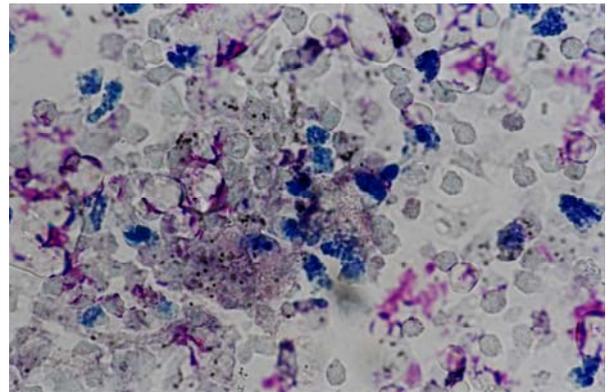


圖 4 巨噬細胞吞噬 latex bead，染色後吞噬細胞及吞噬顆粒呈藍色，但細胞外未被吞噬的顆粒在染色過程中會褪色，不再顯出明顯的藍色

