

## 甲殼素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) 與多醣體 ( $\beta$ -glucan)，誘導增強吳郭魚細胞性免疫能力，從魚體分離純化出 macrophage，在 *in vitro* 的條件下，進行 macrophage 吞噬葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 之試驗。目的在於檢測試驗魚 macrophage 胞的吞噬能力，測試甲殼素或多醣體是否可以有效提高 macrophage 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。

篩選試驗吳郭魚。試驗分三組進行，分別為甲殼素飼育組、多醣體飼育組、及對照組等。甲殼素飼育組吳郭魚平均魚體重為 130.07 g，平均魚體長為 18.7 cm，飼料為福壽牌成鰻鰻粉，投餌量為 1.5% 魚體重，甲殼素添加量為 3% 鰻粉量，平均每尾魚供應 0.058 g 甲殼素 (0.045% 魚體重)。多醣體飼育組吳郭魚平均魚體重為 133.90 g，平均魚體長為 18.9 cm，飼料為福壽牌成鰻鰻粉，投餌量為 1.5% 魚體重，多醣體添加量為 3% 鰻粉量，平均每尾魚供應 0.060 g 多醣體 (0.045% 魚體重)。對照組吳郭魚平均魚體重為 137.13 g，平均魚體長為 19.4 cm，飼料為福壽牌成鰻鰻粉，投餌量為 1.5% 魚體重。

無菌摘取脾臟組織放在含 1% penicillin/streptomycin (p/s)，5% fetal calf serum (FCS) 之 L-15 培養液中，剪碎組織。細胞懸浮液加入 34/51% (v/v) percoll gradient，離心條件為  $400 \times g$ ， $4^{\circ}C$ ，30 min，再離心一次，沉澱巨噬細胞懸浮在 10% FCS 之 L-15，細胞濃度為  $3.3 \times 10^7$ 。取 15 mm 圓形玻璃片放入 4 well flask 中，用 pipette 吸取細胞懸浮液滴入 well 中培養，在  $20^{\circ}C$  培養箱培

養，培養時間為 1.5 小時，讓巨噬細胞沉澱，並粘附在圓形玻璃片上，準備進行細菌吞噬試驗。

從冷凍乾燥管取出真空冷凍乾燥葡萄球菌，培養在 Tryptic Soy Agar (TSA) 培養基，溫度為  $24-48^{\circ}C$ ，充分活化細菌，再轉入 Tryptic Soy Broth (TSB) 中大量培養 24-36 小時 ( $30^{\circ}C$ )。加入 0.5% formalin solution 充分殺死細菌，細菌用 phosphate buffer saline (PBS) 洗 5 次，可完全去除 formalin，將細菌懸浮在 10% FCS 之 L-15 培養液中備用，細菌濃度調整為  $1.6 \times 10^7$  cfu/mL。

巨噬細胞經 1.5 h 培養，細胞充分粘附在 4 well flask 中之圓形玻璃片上，以 L-15 + 2% FCS 洗 3 次，洗去未附著的細胞，加入含 10% FCS 之 L-15 之細菌懸浮液，靜置培養 10 分鐘，進行巨噬細胞吞噬細菌試驗，細菌吞噬試驗結束後細胞以中性福馬林固定 5 分鐘，用 PBS 洗 3 次，滴入 1% Giemsa solution 進行染色 1.5 小時，再用 PBS 洗 3 次，洗去殘留的染劑，室溫靜置乾燥，用 Entella 封蓋，放在顯微鏡下觀察。在顯微鏡下觀察時，隨機取樣，隨機選取 100 個巨噬細胞，詳細計算其吞噬葡萄球菌的數量，同時，比較甲殼素飼育組、多醣體飼育組、及對照組等試驗組，其巨噬細胞吞噬能力之差異。

*in vitro* 試驗巨噬細胞吞噬葡萄球菌之能力，試驗結果顯示，甲殼素飼育組與對照組，吞噬細菌的數量都小於 20 個，主要的吞噬範圍集中在 1-10 細菌，平均吞噬細菌的數量分別為 4.28 及 4.31，但多醣體飼育組吞噬能力很強，可以吞噬較多數量的葡萄

球菌，有 17%細胞可以吞噬 21–25 個細菌，34%細胞可以吞噬 > 25 個細菌，平均吞噬細菌的數量 > 17.66。

表 1 以甲殼素與多醣體飼育吳郭魚，*in vitro* 試驗巨噬細胞吞噬葡萄球菌之能力

組別	吞噬葡萄球菌的數量						平均吞噬量
	1–5	6–10	11–15	16–20	21–25	> 25	
對照組	71 (71%)	23 (23%)	5 (5%)	1 (1%)	0	0	4.28
甲殼素飼育組	84 (84%)	19 (19%)	3 (3%)	5 (5%)	0	0	4.31
多醣體飼育組	11 (11%)	19 (19%)	11 (11%)	8 (8%)	17 (17%)	34 (34%)	17.66 *

\* 多醣體飼育組巨噬吞噬量 > 25 的部分，均以 25 計算