

Oxytetracycline 對鰻魚免疫系統的影響—I.

對抗體產生之影響

Immunosuppressive Effects of Oxytetracycline in Eel—I.

Effects on agglutinin formation

郭 光 雄*

Guang-Hsiung Kou

Abstract

When Oxytetracycline was inoculated into muscle of eel with a dose of 50 mg/kg body weight, a significant increase of lymphocyte counts or agglutinating titers against *Edwardsiella tarda* or SRBC was observed. In contrast, decrease of lymphocyte was obtained when a dose of 200 mg/kg body weight was used. However, at an inoculation dose of 100 mg/kg body weight, no significant change in lymphocyte counts was observed for the experimental eels.

Variation of granulocyte against Oxytetracycline was also observed in the present study. The results showed that a significant increase of granulocytes was demonstrated when 100 or 200 mg/kg body weight was inoculated into eels intramuscularly. However, in comparison with the control fish, no change of granulocyte was detected when a dose of 50 mg/kg was used.

緒 言

我國之鰻魚養殖為高密度之集約養殖，在養成過程中常常發生病害⁽¹⁾，為減少損失，至目前為止，使用藥物以防治乃為有效及切合實際的方法，而藥物中以抗生素之使用最為普遍，尤以 Oxytetracycline 為甚。由過去之研究結果，知道 Oxytetracycline (OTC) 使用適當的話（適量），可促使豬抗布魯氏桿菌（*Brucella*）的凝集力價昇高⁽²⁾，但亦有報告指出 OTC 會抑制豬抗丹毒的免疫系統⁽³⁾以及家鼠（rat）與小白鼠（mice）抗 *Salmonella enteritidis* 的抗體產生⁽⁴⁾。而有關 OTC 對魚類免疫機制影響的研究非常少，有關鰻魚的研究更是闕如^(5,6)。

關於抗生素對魚類免疫機制影響的研究，在過去是偏重於細胞性免疫方面^(7,8)，本研究乃以鰻魚為材料，探討 OTC 對鰻魚之體液性（humoral）免疫機制的影響。另一原因，著者多年從事鰻魚潰瘍病（*Edwardsiellosis*）之研究，開發可用之疫苗，雖然實驗室內之研究結果良好⁽⁹⁾，但田間實驗之結果，却不盡理想，推測其原因之一，可能與 OTC 廣被使用於潰瘍病防治有關，為究明此點，乃進行本研究。

* 國立臺灣大學理學院動物學系 Department of Zoology, College of Science, N. T. U.

材 料 與 方 法

抗生素：使用之 Oxytetracycline (OTC)，為 Pfizer 藥廠之 Terramycin/LA 之注射液，每 ml 中含 200 mg 的 OTC。

供試魚：為鰻魚，直接選購自養殖場，購回後，先蓄養於實驗室內之水箱中三天，以觀察是否在外觀上有症狀出現。鰻魚之大小為體重 150~200g，體長為 34~39cm。

抗原：

1. *Edwardsiella tarda* (*E. anguillimortifera*) 菌懸浮液：*E. tarda* (800129-1 Ib) 為著者由病鰻分離得到的。在 TSA agar 上，於 37°C 下培養 24 小時後，以 0.85% 食鹽水將培養菌沖洗下來，並以食鹽水清洗三次，然後以 0.3% 之福馬林處理，製成濃度為 1.8×10^9 cells/ml 之死菌懸浮液，做為抗原。保存於 5°C 下以供實驗用。

2. 羊紅白球 (SRBC) 懸浮液：SRBC 得自臺大醫院血液科，經 PBS (phosphate buffered saline, pH: 7.2) 三次清洗後，以 Alseveis solution 製成懸浮液，濃度為含 SRBC 20%。保存於 5°C 下以供實驗用。

OTC 處理：以肌肉內注射方式，將 OTC 接種於鰻體內，接種部位為背部肌肉（背鰭前）。實驗分為四組，其中一組為對照組，其他三組為接種組，接種之劑量分別為每公斤魚體重 50mg, 100mg 及 200mg，每組魚為 20 尾。每隔一天接種一次，接種五次後，蓄養於水溫為 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 之水箱中一天，以供免疫實驗用。

免疫實驗用：

1. *E. tarda* 抗原：取 OTC 處理過之鰻魚，每組 10 尾，每尾每 100 g 體重接種 0.3 ml (0.5×10^9 cells/100 g) 死菌懸浮液，每隔一天接種一次，共接種五次，鰻魚被接種後，皆收容於水溫 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 之水箱內，於最後一次接種後的第四天，將魚犧牲，取其血液，測定血液中各種白血球數及抗體之凝集效價。

2. SRBC 抗原：處理方式與 *E. tarda* 抗原完全相同，仍於第五次接種後的第四天，將魚犧牲而測定血液中抗體之凝集效價。

白血球之測定：*E. tarda* 抗原處理過之魚，在處理後的第四天，由動脈球採血，取其一滴製成抹片，經 Giemsa stain 染色後，在顯微鏡下，計數每 10000 個紅血球時，淋巴球、單核球及顆粒球 (granulocyte) 之出現數目。

凝集效價之測定：由動脈球採血後，先以 3000 rpm 將血液離心 15 分，取上澄液（血清）貯存於 -80°C 中備用。以 PBS 將血清稀釋為一系列之二倍稀釋液 ($2 \sim 10^{12}$)，分注 0.05 ml 於 microtiter plate 中，然後加入貯存於 5°C 下之等量抗原（*E. tarda* 抗原或 SRBC 抗原），而測定血清中抗體之凝集效價。

結 果

A. 白血球組成之變動：

鰻魚血液中各種白血球的研究報告幾乎沒有，著者經過仔細的觀察與研究，亦無法確定淋巴球中，胞核略大者是否為單核球，且此種胞核略大之淋巴球，數目不多，估計約佔 10%，因此著者將其與淋巴球合併計算。經過 OTC 處理後，血液中淋巴球（包括單核球）與顆粒球之消長，如 Table 1 所示。由 Table 1 可知，劑量 50 mg 處理組之淋巴球（包含單核球）與對照組比較，略為增加，約增加 9%，但 100 mg 處理組，則顯示相反的結果，略為減少，降低 3.5%，而 200 mg 處理組之結果，則顯示大為降低，單核球與淋巴球數降低了 31% 之多。另一方面，顆粒球之消長，恰與淋巴球（包含單核球）之變化相反，50 mg 處理組與對照組幾無差異，但 100 mg 與 200 mg 組，則顯示增加的結

Table 1. Differential blood cell counts of formalin killed *Edwardsiella trada* inoculated eels pre-treated with Oxytetracycline.

OTC-inoculation dose mg/kg of body weight	Number of cells/10,000 erythrocytes	
	Lymphocytes+ Monocytes	Granulocytes
Control	308*	55
50	328	53
100	279	60
200	212	71

* Arithmetic mean (n=10)

果，分別增加了 9.1% 與 29.1%。由這些結果，可知在 50 mg 劑量處理下，與免疫有關之淋巴球數不僅無減少之現象，反而增加，同時具吞噬作用之顆粒球數不受影響，換言之，50 mg 劑量對鰻血液中白血球數之消長具正的影響。

B. 凝集效價之影響：

經 OTC 處理後，血液中原抗原 *E. tarda* 與 SRBC 抗原之凝集效價，如 Table 2 所示。

Table 2. Sero-agglutination titers of antigens inoculated eels pre-treated with Oxytetracycline

Antigen	OTC-inoculation dose mg/Kg of body weight	Agglutination titer
Formalin Killed <i>E. trada</i>	Control	736*
	50	1,536
	100	704
	200	256
Sheep RBC	Control	1,280
	50	1,536
	100	1,536
	200	1,152

* Arithmetic mean (n=10)

1. *E. trada* 抗原：50 mg 劑量處理組，凝集效價與對照組比較，增加了一倍以上 (108.7%)，100 mg 組則顯示相反之結果，略為減少 (4.3%)，而 200 mg 組却大為減少，達 65.2% 之多。凝集效價增減之情形，恰與淋巴球數 (包含單核球) 之消長情況相同。

2. SRBC 抗原：50 mg 處理與 100 mg 處理，顯示相同之結果，與對照組比較，凝集效價增加了 20%，但 200 mg 處理組，却顯示相反之結果，降低了 10%。

由上述之結果，可以看出，在 50 mg 劑量之處理下，凝集效價，無論是抗 *E. trada* 抗原或是抗 SRBC 抗原，皆顯示增加之結果，而在 200 mg 處理下，則顯示降低之結果，與淋巴球之消長呈相反之變動。

討 論

有關魚類免疫機制之研究並不多，特別是抗生素與免疫系統間之關係的究明，更是缺乏，尤其是有

關 Oxytetracycline 與鰻魚免疫系統間的關係，完全是白紙一張。我國年產鰻魚四萬多噸，由於實際之需要，在病害的防治上，大量使用抗生素，OTC 之使用更為厲害⁽¹⁾。近年來，著者從事鰻魚潰瘍病 (Edwardsiellosis) 之研究，開發可用之疫苗，雖然實驗室內之研究結果良好，但田間實驗却不盡理想⁽⁹⁾，推測其原因之一，可能與 OTC 廣被使用於潰瘍病防治有關，因此本研究，究明 OTC 與鰻魚免疫系統之關係，有其重要意義存在。

本實驗結果顯示鰻在 OTC 處理後，血液中之淋巴球 (包含單核球) 在劑量 50 mg 下，有增加的現象，但在 100 mg 下則呈降低的現象，而在 200 mg 下，其降低之幅度相當大，達 31% 之多，此情形，與 Rijers (1980) 以 OTC 處理鯉魚所得之結果相同⁽⁵⁾。另一方面，顆粒球之消長，恰與淋巴球之變化相反，50 mg 下顆粒球幾無增減之現象，但在 100 mg 與 200 mg 下，則顯示增加的現象，其中 200 mg 之增加非常顯著，達 29% 之多。Rijers (1980) 在有關 OTC 處理鯉魚之報告中，亦指出顆粒球有增加之現象⁽⁵⁾。另，著者曾將病原菌 *Aeromonas hydrophila*，經由動脈球打入鰻魚血液循環系內，亦造成同樣之結果，即淋巴球減少而顆粒球增加⁽¹⁰⁾。一為抗生素，一為病原菌，對鰻免疫系統之影響相同，到底是 *A. hydrophila* 與抗生素 OTC 具同樣之影響因子？還是鰻之與免疫有關之器官 (腎臟與脾臟)⁽¹¹⁾，一受刺激，不拘是何種刺激，即呈相同之反應？有待進一步的瞭解。Rijers (1980) 指出將 OTC 混於飼料，投與鯉魚，却對鯉淋巴球與顆粒球之出現無影響⁽⁵⁾，由於本實驗將鰻魚收容於小型水箱中，雖將 OTC 混於飼料而投與鰻魚，却不攝餌，無法完成此部分之實驗，今後應克服困難，以究明投餌與注射，將 OTC 送入鰻體內，是否會造成對淋巴球同樣之影響，以便對 OTC 使用於細菌性疾病防治，提供切合實際之參考資料。

由 Table 2 知道 OTC 在 50 mg 劑量下，可促進鰻魚抗 *E. tarda* 抗原與抗 SRBC 抗原之抗體的產生，但在 200 mg 下，則顯示相反之現象。此現象與淋巴球之增加情形一致，即抗體增加，淋巴球數亦增加，抗體減少，淋巴球數亦減少。這種現象，與過去之研究結果是相同的，因淋巴球與抗體的產生具密切之關係，抗體是由淋巴球產生出來的⁽¹¹⁾。在抗體產生過程中，macrophage 是扮演很重要的角色⁽¹¹⁾，今後應針對 OTC 之處理是否會影響 macrophage 數之增減進行研究，以便更進一步瞭解 OTC 與鰻免疫系統之關係。

總而言之，在 50 mg OTC 劑量下，鰻血液中抗體的產生，有增加之現象，但在 200 mg OTC 劑量下，却呈降低之現象。換言之，在適量下，OTC 似有促進免疫機能之作用，當然尚待究明之處乃多。不過在病害之防治上，使用抗生素除應注意量的問題外，亦應注意抗藥性細菌的產生以及其消長⁽¹²⁾，因為大量、廣泛及經常使用抗生素，容易致使抗藥性細菌產生及增加。

摘 要

以肌肉內接種方式，將 Oxytetracycline 打入鰻體內，在劑量每公斤魚體量 50 mg 下，血液中淋巴球數 (包含單核球) 及凝集效價 (抗 *E. tarda* 或 SRBC) 呈增加之現象，在 100 mg 下，無顯著之增減，但在 200 mg 下，則與 50 mg 之情形恰好相反。另，血液中顆粒球數之變化，在 50 mg 下幾無變異，100 mg 與 200 mg 下，則顯示增加之結果。因此推斷，在適當之劑量下，OTC 似有促進鰻免疫機能之作用。

謝 辭

本研究承國科會之 NSC72-0201-B001a-38 研究計劃，支持得以完成，謹此誌謝。

參 考 文 獻

1. 林曜松、蕭世民 (1977)。魚池生態環境與魚病關係之研究(1)——臺灣鰻魚疾病之統計分析。JCRR Fish Ser. No. 29: 57~61。

2. Popovic, M., M. Galic, T. Dujin and G. Majstorovic (1973). Effect of parenteral injection of therapeutic doses of penicillin and oxytetracycline on the titre and persistence of *Brucella agglutinins* in the blood of immunized pigs. *Vet. Glas.*, 27: 647~651.
3. Fortushnyi, V. A., V. M. Novikov and V. K. Genserovskaya (1973). Influence of antibiotics on formation of immunity in experimental *Erysipelothrix* infection in pigs. In: *Immunitet sel'skokhozyaistivennykh. Izdatel'stvo Kolos, Moskva*, pp. 196~201.
4. Slanetz, C. A. (1953). Influence of antibiotics on antibody formation. *Antibiot Chemother., Wash., D. C.* 3: 629~633.
5. Rijkers, G. T., A. G. Teunissen, R. Van Costerom and W. B. Van Muiswinkel (1980). The immune system of Cyprinid fish. The immuosuppressive effect of the antibiotic Oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 19: 177-189.
6. _____ (1981). The immune system of *Cyprinid* fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Immuno. and Immuno Path.* 2: 281-290.
7. Hildemann, W. H. and E. L. Cooper (1963). Immunogenesis of homograft reaction in fishes and amphibians. *Fed. Proc.* 22: 1145~1151.
8. Levy, L. (1963). Effect of drugs on goldfish scale homograft survival. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 14: 47~50.
9. Song, Y. L. and G. H. Kou (1981). The Immuno. responses of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsicella anguillimortifera* as studied by the immersion method. *Fish Path.* 15: 249~255.
10. 郭光雄、鍾虎雲 (1979)。魚類病原菌 *Aercomonas hydrophila* (*A. liquefaciens*) 之研究—IV，經由動脈球接種後鰻魚血液中細菌及白血球之變動。 *Aquiculture* 2: (3): 17~21。
11. Anderson, D. P. (1974). *Fish immunology*. T. F. H. Publications. Inc. pp. 82-88.
12. 郭光雄、鍾虎雲 (1980)。養鰻池之R⁺抗藥細菌。 *CAPD. Fish Ser. No.* 3: 1~8。