

浸泡後弧菌抗原於蝦體組織內之分佈

宋延齡

國立臺灣大學漁業生物試驗所

摘 要

以加熱殺死之弧菌 *V. vulnificus* 浸泡草蝦 3 小時後，取整隻蝦體固定。經包埋並做成組織切片後，利用間接螢光抗體染色法追蹤蝦體內弧菌抗原的分佈情形。追蹤的時間由浸泡後 5 分鐘，3, 6, 12 小時，1, 3, 7 至 14 天。結果顯示除心臟外，其它組織包括鰓，胃，肝胰臟，腸道，造血組織及淋巴器官均可偵測到弧菌，但留存在組織內之時間長短與螢光強度有異。由螢光出現或消失之時間顯示，浸泡後 5 分鐘弧菌即在鰓組織出現，並延續至第 7 日；留存在肝胰臟與造血組織內至第 3 日；在胃及中腸可留存至浸泡後 24 小時；而在後腸僅能於前 6 小時內被偵測到。至於淋巴器官中抗原出現於浸泡後 6 小時，延至 7 天後才消失。但在所有組織內之弧菌於浸泡後第 14 日都無法再測得。由螢光強度可看出浸泡處理後，鰓及胃立刻堆積大量弧菌；3 及 6 小時肝胰臟及中腸的前段可偵測到大量的弧菌；12 小時肝胰臟及淋巴器官可測到較明顯螢光反應；1 至 3 天之間除淋巴器官依然有明顯的螢光反應外，其它組織內的螢光強度均減弱或消失。因此推論，浸泡過程中弧菌可同時經由消化及循環系統進入蝦體內，應可誘發草蝦全身性的抗病能力。

一、前 言

Coons 等人於 1942 年，發展出利用螢光抗體標定法 (fluorescent antibody technique, FAT) 來偵測細菌感染宿主的途徑。由於 FAT 為一靈敏度高 (sensitive) 及檢測快速的方法。目前許多魚病研究者採用它來追蹤被感染魚的組織或器官內抗原或病原菌的蹤跡 (Braun et al. 1990, Kawahara et al. 1986, Kawahara and Kusuda 1988, Kawahara et al. 1990,

Nelson et al. 1985)。Nelson等人(1985)利用螢光標定組織法追蹤弧菌疫苗 *V. anguillarum* 在鮭魚體內的去向與停留情形，顯示菌苗從腹腔注射或浸泡後可達魚體的鰓表面，胃腸道與腎臟等組織。因而推論腹腔注射或浸泡菌苗可誘導出魚的全身性免疫反應(systemic immunity)；而菌苗經口服僅能引起局部性黏膜反應，無法在魚體的其它組織診測到。Kawahara與Kusuda(1988)用 *Pasteurella piscicida* 抗原浸泡yellowtail後進行追蹤。結果在心臟，小腸及吞噬細胞中發現抗原，因而提出抗原是經由yellowtail的鰓部進入魚體，透過全身性的循環系統，最後被吞噬細胞吞噬，而啟動了全身性的免疫反應。因此，利用間接螢光抗體法追蹤抗原進入蝦體之途徑，對草蝦體內防禦機制應有初步瞭解。

二、材料與方法

(一)、實驗蝦：

實驗用草蝦來自東港水試所，體重為15-20克，放養密度為120公升25尾，飼養期一個月。

(二)、免疫過程：

以65°C，加熱1小時去活性之弧菌(*Vibrio vulnificus* TG617)細胞懸浮液以養殖池海水稀釋使濃度為10E7細胞 / 毫升。取25尾草蝦浸泡三小時，浸泡密度為15公升浸泡25尾。處理完畢後草蝦直接放養於養殖池。蓄養期間每日餵食三次。浸泡後5分鐘，3, 6, 12小時，1, 3, 7, 14及21天分別採2隻備用。

(三)、免疫組織化學法(Immunohistochemical methods)：

1. 採樣和固定：採取經浸泡過後健康良好之蝦子，於現場立即浸泡在10倍蝦體積的Davidson's固定液中。攜回實驗室後於肝胰臟前方及兩側；腹節前，後部分別注入蝦體重5-10%量的固定液。為了固定更完全，再從蝦體背側沿中線由第6腹節將外殼剪開至頭胸部，不可傷及下層組織。若蝦體重超過12克，必須於頭胸部與腹節交接處及體節中央各自橫向剪開再固定。處理完畢，將蝦子放回固定液於室溫下浸漬24至72小時，再轉存於50%酒精中。
2. 包埋和染色：進行石臘包埋前需將樣品切成小於一立方公分小塊，再經脫水(50, 70及100%酒精)，透明化(xylene)。以石臘完全浸透樣品後進行包埋。包埋後切片成6 μ m的臘片。將臘片黏貼在以黏著劑(Vectabond reagent, Vector)處理過之載玻片上。玻片經xylene脫臘，水化(100, 90, 70, 50, 及30%酒精)後進行染色。染色分二部份進行：(A)Mayer's Hematoxylin及Eosin (H and E)染色法，提供正確的組織位置作對照。(B)間接螢光標定組織染色法：先以PBS(0.02M, pH7)洗組織切片10分鐘，再以Block緩衝液(1%

horse serum, 10% BSA, 0.1% Tween 20, 0.01M PBS, pH 8.0)於室溫作用一小時去除背景干擾。將含抗*V. vulnificus*之單株抗體的腹水(Sung et al. 1993)以Block緩衝液(含5% BSA)作1000倍稀釋後加在組織切片上, 室溫下作用一小時後以PBST溶液洗滌10分鐘。其後加上FITC偶合的horse antimouse-IgG(以含有2% horse血清之PBS作40X稀釋)染色30分鐘, 並用PBST洗滌10分鐘。用Evan's blue作負染色後即可在螢光顯微鏡下觀察。

三、結 果

草蝦浸泡弧菌抗原後, 使用免疫組織化學染色法偵測抗原在蝦體組織中的分佈, 結果如表一。浸泡後5分鐘至6小時, 在鰓、胃、肝胰臟, 前後段中腸, 後腸及造血組織均可發現抗原。但淋巴器官遲至第6小時才出現抗原。此抗原持續存在於蝦體內, 至第12小時由後腸消失; 3天後又從胃及中腸消失。第7天抗原僅在鰓與淋巴器官被發現, 且螢光強度減弱。浸泡後14天所有組織均無法測到抗原。

在胃組織, 浸泡後初期僅在胃腔(lumen, 圖一a)與胃篩板上之剛毛(gastric sieve setae, Gss)(圖一b)處發現抗原。接著出現在剛毛間溝(longitudinal inter-setal grooves, Lsg)(圖一c)與胃—肝胰臟接合處(stomach-hepatopancreatic junction, Shj)(圖一d)。三天後在胃組織無法再測得抗原。

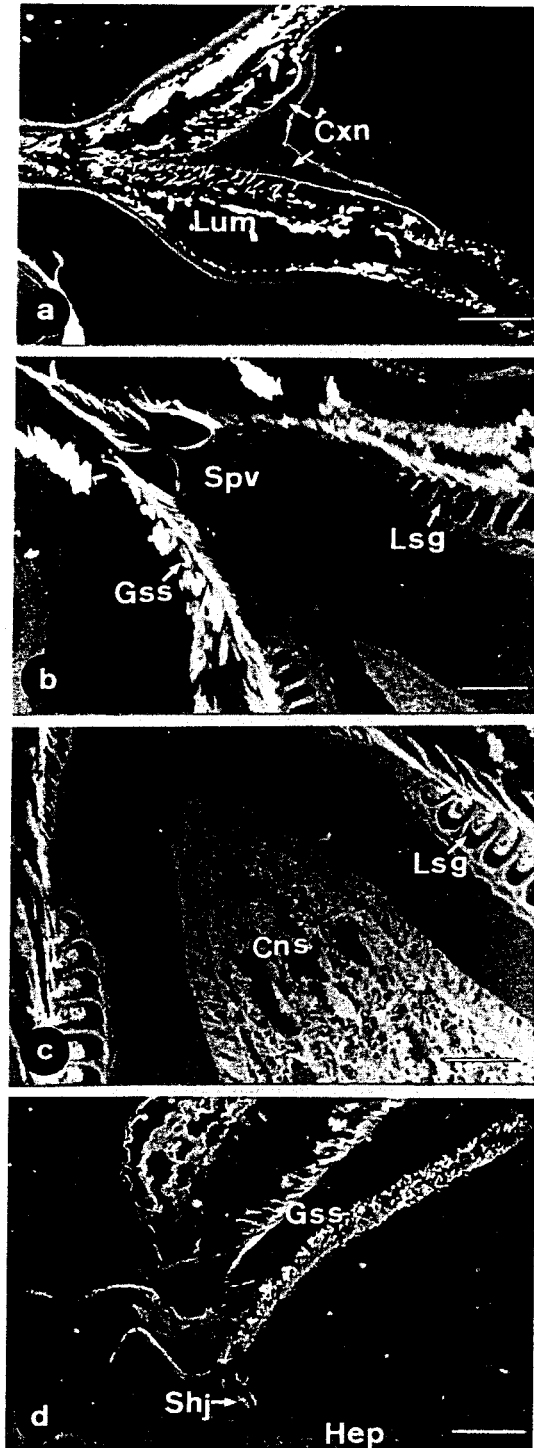
在肝胰臟中, 浸泡後立即可於頂端血管中(圖二a), 靠中央管

表一 Tissue locations of heat-killed *V. vulnificus* cells in tiger shrimp at different times following exposure via immersion.

Tissue	Time after immersion							
	5 min	3 h	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d	14 d
Gill	+++	+	+	+	+	+	+	-
Stomach	+++	++	++	+	+	-	-	-
Hepatopancreas	+	+++	++	++	+	+	-	-
Midgut (anterior) ^a	+	+++	+++	+	+	-	-	-
Midgut (posterior)	+	++	+	+	+	-	-	-
Hindgut	+	++	+	-	-	-	-	-
Hematopoietic tissue	+	+	+	+	+	+	-	-
Lymphoid organ	-	-	+	++	++	++	+	-
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-

a: located in the central part of the hepatopancreas.

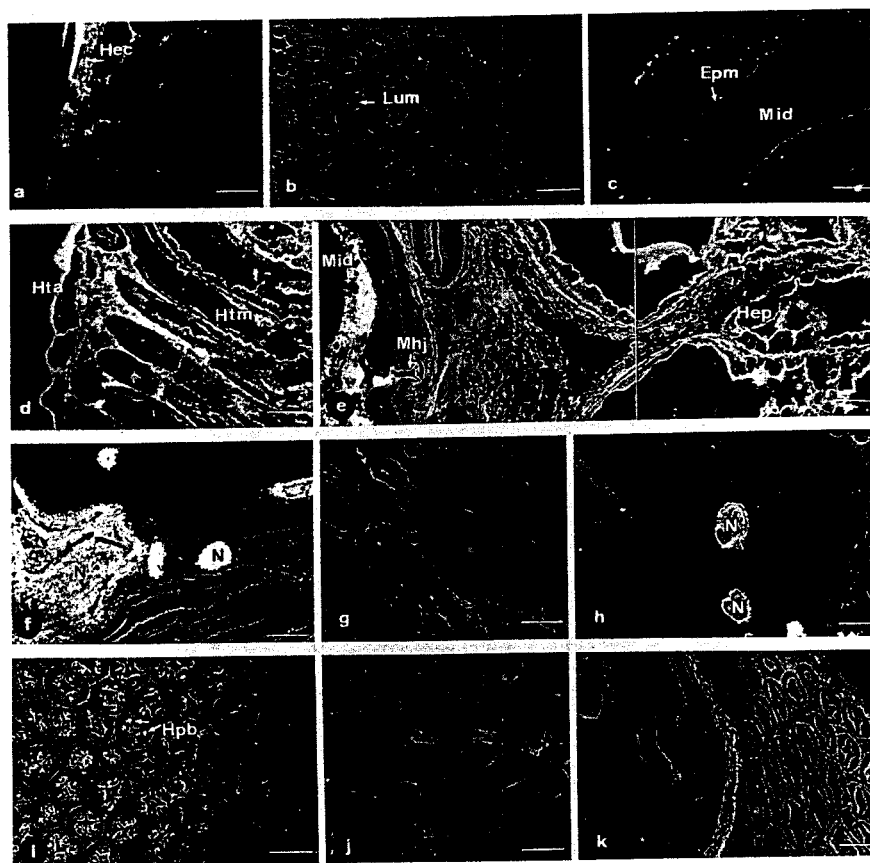
Fluorescent intensity: +++ > ++ > +



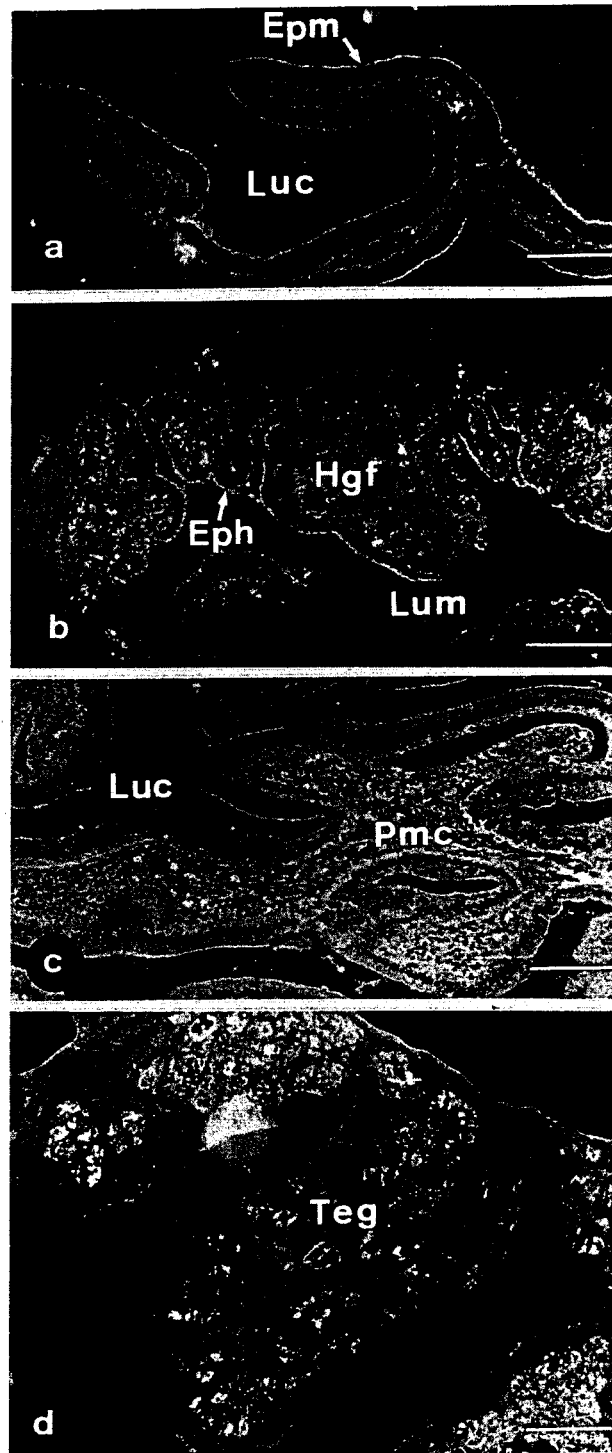
圖一 Heat-killed *Vibrio vulnificus* cells stained via IFA technique in the posterior chamber of a tiger shrimp stomach at 5 min (a) and 3 h (b-d) following immersion. Cns, spongy connective tissue; Cxn, cuticle sublayers; Gss, gastric sieve; Hep, hepatopancreas; Lsg, longitudinal inter-setal grooves; Shj, stomach-hepatopancreatic junction; Spv, ventral subchambers. (a, bar = 100 μm ; b-d, bar = 25 μm).

腔(圖二b)及穿過肝胰臟中央之前段中腸的表皮細胞外(圖二c)發現抗原；接著抗原由血管頂端向中央移動(圖二d)，最後擴散整個器官。在第3小時，抗原螢光強度大量增加，且在中腸—肝胰臟接合處midgut-hepatopancreatic junction, Mhj)出現(圖二e)。第6至12小時，在肝胰管間具有螢光反應的癆結(nodule)形成(圖二f, h)；但肝胰管間血管中之螢光抗原量減少(圖二g, 箭頭)。此外，在肝胰管B細胞內也發現螢光抗原(圖二i)。浸泡後1至3天，螢光強度漸減(圖二j, k)。七日後在肝胰臟無法再測到抗原。

位於肝胰臟中央之前段中腸，於浸泡後立即在管腔發現大量抗原堆積。隨著時間抗原量不斷增加，於第3至6小時達到最高，其後則漸減。浸泡後在後段中腸盲管表皮細胞外(圖三a)，及後腸表皮細胞外與管壁內之組織可立即測到螢光抗原(圖三b)。第3小



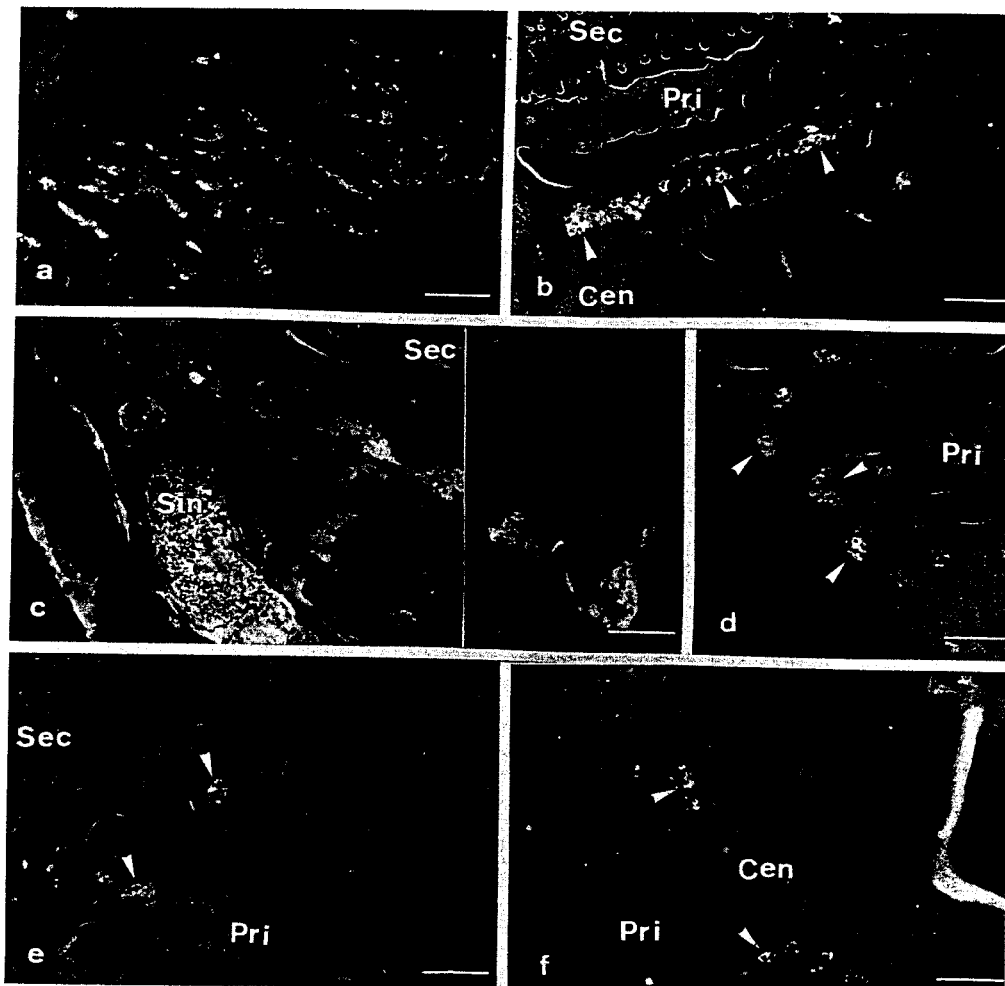
圖二 Route of detected antigen in the hepatopancreas (Hep) at 5 min (a-c), 3 h (d and e), 6 h (f and g), 12 h (h and i), 1 d (j), and 3 d (k) following immersion. Epm, epithelium of midgut; Hec, hemocoel; Hpb, hepatopancreatic B-cell; Hta, apical hepatopancreatic tubule; Htm, medial hepatopancreatic tubule; Lum, lumen; Mhj, midgut-hepatopancreatic junction; Mid, midgut; N, nodule. (bar = 100 μ m).



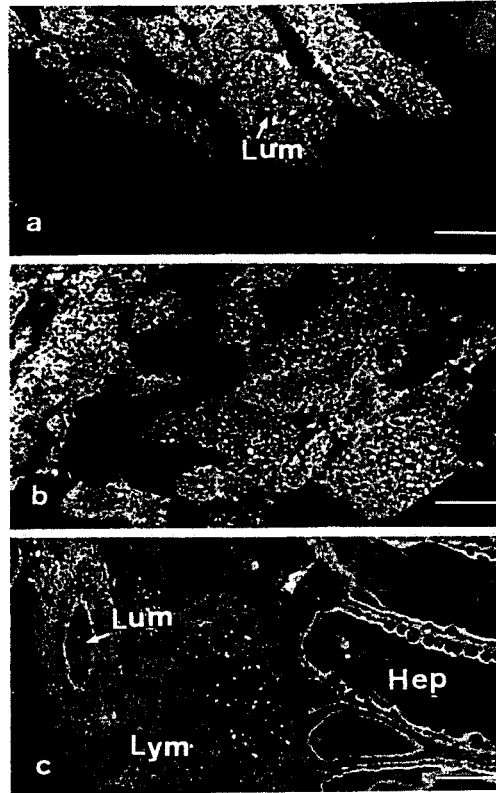
圖三 Fluorescent antigen observed in the posterior midgut cecum (a and c) and hindgut (b and d). Epm, epithelium of midgut; Eph, epithelium of hindgut; Hgf, hindgut folds; Luc, cecal lumen; Lum, lumen; Pmc, posterior midgut cecum; Teg, tegmental gland. (a-c, bar = 100 μ m; d, bar = 25 μ m).

時，在中腸盲管(*posterior midgut cecum, Pmc*)內組織(圖三c)與後腸*tegmental glands (Teg)*(圖三d)仍可測到抗原，卻由腸表皮組織外消失。第12小時，就無法在後腸測到抗原；在中腸內抗原直至浸泡後3日才消失。

在鰓組織，抗原由浸泡後5分鐘直到第7天均可測到。然而最初抗原堆積在鰓絲之間(圖四a)；從3小時開始於鰓絲內可看到螢光抗原在血球細胞聚集(*hemocyte clump*)處(圖四b，箭頭)；第6小時於鰓中央軸血腔之血球細胞聚集處測到抗原(圖四c)；第12小時至第7天鰓絲內依然可見血球聚集，僅參與的血球數減少(圖四d, e, f, 箭頭)。抗原在淋巴器官內直至7天後才消失(圖五)。整



圖四 Antigen detected in the gill at 5 min (a), 3 h (b), 6 h (c), 12 h (d), 3 d (e), and 7 d (f) following delivery via immersion vaccination. Arrow, cell clump; Cen, central axis; Pri, primary filaments; Sec, secondary filaments; Sin, sinus. (bar = 100 μ m).



圖五 Antigen in tiger shrimp lymphoid tissue at 12 h (a), 1 d (b), and 7 d (c) following immersion. Hep, hepatopancreas, Lum, lumen; Lym, lymphoid tissue. (bar = 100 μ m).

個觀察時期均無法於心臟內測到抗原。

四、討 論

本實驗以弧菌細胞抗原浸泡處理草蝦後，追蹤抗原在蝦體內的分佈。結果顯示，抗原可同時經由消化系統與循環系統進入體內。此外於中腸後段及後腸的tegument glands測到抗原。顯示弧菌抗原也可經蝦之肛門直接進入。Nelson等人(1985)浸泡免疫鱒魚(*Salmo gairdneri*)後，在鰓的表面，腸胃道及腎臟內測到菌苗。因而推論，菌苗以浸泡免疫的方式對鱒魚造成全身性免疫力。我們相信，以弧菌抗原浸泡處理草蝦後，也可誘導出蝦之全身性免疫力。

實驗期間觀察發現所有的消化組織內幾乎均可發現螢光抗原，尤其是出現縱向剛毛間溝(Lsg)，胃—肝胰臟之連結處(Shj)，中腸—肝胰臟之連結處(Mhj)，與肝胰臟的管腔及B細胞。此結果顯示，抗原經由口進入並由消化系統吸收的方式與食物的吸收雷同。目前並無任何有關報告提到蝦或其它甲殼類動物腸胃道具有與防禦

相關之組織。本實驗室曾以 β -glucan經浸泡刺激草蝦後可提高蝦子抗病力(Sung et al. 1993)與增強殺菌物質活性(Song and Hsieh 1993)，因而推測抗原經由消化系統進入蝦體或許能增進蝦之抗病力。不過還需更多及更進一步的研究，才能得知抗原經由蝦之消化器官進入並與其組織或細胞接觸後，是否許具有與脊椎動物類似的mucous response來誘導並增強蝦之防禦力。此外，經由肛門進入的抗原在後腸存留時間非常短，推測對抗病力的增加實為有限。

在蝦之鰓，造血組織，淋巴器官，及血腔均觀察到螢光抗原。由於脊椎動物的造血組織及淋巴器官能誘發全身性免疫力。因此推論抗原經浸泡進入蝦之循環系統並與造血及淋巴器官接觸，或許能誘導蝦的全身性免疫力。

浸泡處理後，在蝦的鰓及肝胰臟組織中有cell clumps形成。此現象顯示，當抗原大量進入蝦體後，可能經循環作用由體腔之血淋巴液中移至一些特殊器官。曾有報告指出，當細菌大量出現在節肢動物的血腔時，血球細胞會經由黑色素癩結(melanized nodules)或cell clumps的形成進行細菌清除。癩結的形成代表著血球細胞對細菌可同時進行吞噬及包膜作用(encapsulation) (Ratner and Vinson 1983)。從蟹類(*Carcinus maenas*)的研究發現，進入蟹體內之細菌能被快速地從體液移至鰓及肝胰管間的血竇(sinus)，形成hemocyte clumps，進而經由血球細胞的分解作用(lysis)將細菌由這些器官中清除(Smith and Ratcliffe 1978 and 1980, White and Ratcliffe 1982)。本實驗在草蝦肝胰臟與鰓絲內觀察有癩結及cell clumps的形成。因此推論，細菌經由血球分解後的殘體透過血淋巴液可再回到循環系統，並再次分佈至各個器官。因而延長對蝦的誘導時期。

間接螢光抗體染色法雖然為一個專一性高的偵測法，但是僅能就抗原在組織內的位置提供一粗略的觀察。此方法的靈敏度不足以對單一或部分被分解的細胞所產生之微弱螢光進行準確判讀。然而在本實驗中，此方法對弧菌細胞抗原如何經由浸泡進入蝦體的途徑依然提供了相當認知。至於抗原分佈的更詳細情形，則需改進追蹤染色的方法，如用免疫酵素法或電子顯微鏡法取代之。

總結，由於弧菌抗原浸泡草蝦可增強草蝦短暫的抗病力。應該是經由誘導蝦之局部或全身性免疫力而達成的。

謝 辭

本實驗承蒙行政院農業委員會經費補助(計畫編號：82-科技-1.1-漁業-56(70-3))才得以順利完成，特此致謝。

參考文獻

- Braun R, J A Arnesen, A Rinne, K Hjelmeland. 1990. Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting cell layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 13: 233-238.
- Kawahara E, JS Nelson, R Kusuda. 1986. Fluorescent antibody technique compared to standard media culture for detection of pathogenic bacteria for yellowtail and amberjack. Fish Pathol. 21: 39-45.
- kawahara E, R Kusuda. 1988. Location of *Pasteurella piscicida* antigens in tissue of yellowtail *Seriola quinqueradiata* vaccinated by immersion. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1101-1105.
- Kawahara E, F Salati, S Nomura, R Kusuda. 1990. Location of *Edwardsiella tarda* antigens in tissue of eel (*Anguilla japonica*) after intramuscular injection. Fish Pathol. 25: 213-216.
- Nelson JS, JS Rohovec, JL Fryer. 1985. Tissue location of *Vibrio* bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral routes to *Salmo gairdneri*. Fish Pathol. 19: 263-269.
- Ratner S, SB Vinson. 1983. Phagocytosis and encapsulation: Cellular immune response in Arthropoda. Am. Zool. 23: 185-194.
- Smith VJ, NA Ratcliffe. 1978. Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), in vitro. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 58: 367-379.
- Smith VJ, NA Ratcliffe. 1978. Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): Clearance and distribution of injected test particles. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 60: 89-102.
- Song YL, YT Hsieh. 1993. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for the generation of microbicidal substances—An analysis of reactive oxygen species. Dev. Comp. Immunol. Submitted
- Sung HH, GH Kou, YL Song. 1993. Characterization of monoclonal antibodies and corresponding epitopes of *Vibrio vulnificus*. Fish Pathol. 28: 181-188.
- Sung HH, GH Kou, YL Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol. 29: 11-17.

White KN, NA Ratcliffe. 1982. The segregation and elimination of radio-and fluorescent-labelled marine bacteria from the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* J. Mar. Biol. Assco. U. K. 62: 819-833.