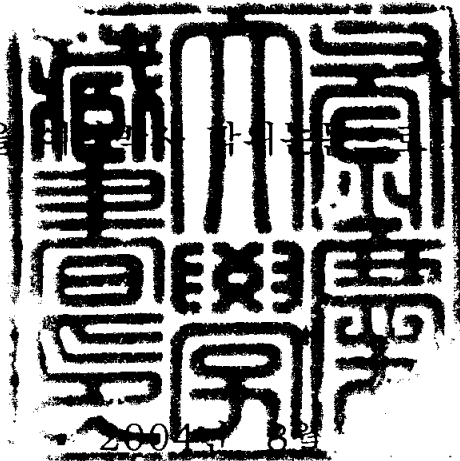


이학박사 학위논문

Edwardsiella tarda ECPs가 넙치,
*Paralichthys olivaceus*의 면역
기능에 미치는 영향

지도교수 박 수 일

이 논문을 제출한 학위논문은 다음에 제출함.



부경대학교 대학원

어 병 학 과

이 덕 찬

이덕찬의 이학박사 학위논문을 인준함.

2004년 6월 24일

주 심 수산학박사 방 종 득



위 원 약 학 박 사 정 준 기



위 원 이 학 박 사 이 명 숙



위 원 수산학박사 김 진 우



위 원 농 학 박 사 박 수 일



목 차

Abstract	vi
List of Tables	ix
List of Figures	x

제 1 장 <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs의 특성	7
I. 서론	7
II. 재료 및 방법	8
1. 시험 균주	8
2. ECPs의 제조	9
1) ECPs의 추출	9
2) 단백질 정량	9
3. ECPs 생성의 적정 조건	9
1) 실험 조건	9
2) 균수 측정	10
3) ECPs 량 측정	10
4) Statistical analysis	10
4. ECPs의 효소 활성 시험	11
1) API zym kit에 의한 효소 활성	11
2) Proteolytic activity	11
3) Hemolytic activity	11
4) Phospholipase activity	11
5. ECPs의 in vitro cytotoxicity	12
6. ECPs의 치사 독성	13
7. Immunological double-diffusion	13

1) Anti-rabbit ECPs 항체의 제작	13
2) Immuno-diffusion technique	14
8. 전기 영동	14
III. 결과	15
1. ECPs 생성의 적정 조건	15
1) 배양 온도	15
2) 염분 농도	17
3) 배양 시간	19
4) 배지 종류	21
2. ECPs의 효소 활성 시험	23
1) APIzym kit에 의한 효소 활성	23
2) Proteolytic activity	23
3) Hemolytic activity	23
4) Phospholipase activity	25
3. ECPs의 in vitro cytotoxicity	25
4. ECPs의 치사 독성	28
5. Immunological double-diffusion	29
6. 전기 영동	30
IV. 고 찰	31
V. 요 약	36
 제 2 장. 넙치에 대한 <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs의 영향	37
I. 서론	37
II. 재료 및 방법	38
1. 어류	38
2. 시험 균주	38

3. ECPs의 분리 및 정제	38
4. Crude ECPs의 독성 시험	38
5. ECPs 분획과 독성 시험	39
6. 채혈	39
7. ECPs가 넙치의 혈액 성상에 미치는 영향	39
1) Hematocrit	39
2) 혈청의 분리와 보존	40
3) 혈청 내 성분 조사	40
8. ECPs가 넙치의 면역반응에 미치는 영향	40
1) 혈청 내 lysozyme 활성	40
2) 혈청의 세균 살해능	41
3) CL response	41
9. Statistical analysis	42
III. 결과	43
1. 시험 군주	43
2. ECPs의 독성 시험	44
3. ECPs 분획화와 독성 시험	45
4. Hematocrit	47
5. 혈액 내 성분의 검사	48
1) Glucose 농도	48
2) Total protein	49
3) AST와 ALT	50
6. ECsP가 넙치의 면역반응에 미치는 영향	52
1) 혈청 lysozyme 활성	52
2) Serum의 bactericidal activity	53
3) CL response	53

IV. 고 찰	56
V. 요 약	60
제 3 장 <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs의 넓치 면역 기능에 미치는 영향	62
I. 서론	62
II. 재료 및 방법	64
1. 실험어	64
2. <i>E. tarda</i> ECPs의 분리와 정제	64
3. Bacterial invasion assay	64
1) Bacterial invasion assay	64
2) 세균 집락 계수	65
3) MTT 환원 시험	65
4. 신장 macrophage의 식작용능	65
5. 말초 혈액 식세포의 식작용능	66
1) 항원의 제작	66
2) 식작용능	66
6. Chemiluminescence response	67
1) 신장 식세포의 준비	67
2) 감작 zymosan의 준비	68
3) CL response	68
7. 신장 식세포의 세균 살해능	68
1) 신장 식세포 monolayer의 준비	69
2) 시험 균액 제작	69
3) Bactericidal activity	69
8. Nitric oxide (NO) assay	69
9. 두신 macrophage의 생존 상태 측정	70

10. 림프구 증식	71
1) 림프구의 분리	71
2) costimulation 용액의 준비	71
3) 림프구 증식 시험	71
11. Statistical analysis	73
III. 결과	74
1. Bacterial invasion assay	74
2. 신장 식세포의 식작용능	76
3. 말초 혈액 식세포의 식작용능	77
4. CL response	79
5. 세균 살해능	80
6. Nitric oxide assay	82
7. ECPs에 대한 두신 대식세포의 생존능	84
8. 림프구 증식	85
IV. 고 찰	87
V. 요 약	93
 총 합 고 찰	 95
요 약	101
감사의 글	104
참고문헌	106

Effects of *Edwardsiella tarda* ECPs on immune function in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Deok-Chan LEE

Department of Fish Pathology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Edwardsiellosis, affecting various species of cultured freshwater and marine fishes is a serious bacterial disease causing high level of morbidity and mortality. The many factors in pathogenic mechanisms of *Edwardsiella tarda*, causative agent of edwardsiellosis need to elucidate yet, although some of the pathogenic mechanisms on *E. tarda* were known to slime layer, lipopolysaccharide and siderophore. Among these factors, the extracellular products (ECPs) will be also deeply concerned to the pathogenicity.

The main purpose of this work was to study the characteristics of ECPs produced by *E. tarda* and their physiological and immunological effects on olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected with *E. tarda* ECPs. In addition, the effects of ECPs on the immune responses of olive flounder were surveyed in peripheral blood leucocytes, head kidney macrophages and lymphocytes *in vitro*.

1. Characteristics of *E. tarda* ECPs

Five different strains of *E. tarda* isolated from various regions in Korea were used in this work.

Samples were tested for the optimum conditions of ECPs production. The optimum temperature and salinity of *E. tarda* strains for ECPs production were 2

8°C and 0.5-1% (w/v), respectively. The effects of the culture media for ECPs production did not show any significant differences among tested kinds of media.

The properties of ECPs were examined enzymatic activity, hemolytic activity to the sheep and the olive flounder erythrocytes, cytotoxic activity in the three types of cell lines and the macrophage monolayer and the lethality of olive flounder.

There were observed that the ECPs had various enzymatic activity but protease, gelatinase and phospholipase within ECPs. Hemolytic activity of ECPs was detected weak and slow against olive flounder-RBC and sheep-RBC. The cytotoxicity of ECPs in the fish origin cell-lines, occurred weakly after 72hrs incubation with ECPs. The ECPs protein of *E. tarda* showed lethal activity to the olive flounder with a LD₅₀ of 6.8-12.5 µg protein g⁻¹ fish.

2. Effects of *E. tarda* ECPs on the olive flounder

In this study, *E. tarda* KE-1 was selected to the representative test strain because of the highest virulence among tested strains.

The effects of *E. tarda* ECPs on the physiological and immunological function in the olive flounder were evaluated for 7 days through intramuscularly injected with 0, 4 and 40 µg fish⁻¹ of 59.1 g, respectively.

The fish injected with 40 µg protein fish⁻¹ showed a significant increase in the glucose and total protein concentration in sera compared with the untreated control, but showed a significant decrease in chemiluminescence (CL) response compared with the untreated control.

These results were suggested that *E. tarda* ECPs could be a affecting factor in the progress of edwardsiellosis.

3. Effect of *E. tarda* ECPs in immune response of olive flounder

The effect of supplementation of *E. tarda* ECPs on the cellular immune system in

olive flounder was investigated. The bacterial invasion and bactericidal activity of kidney macrophage in olive flounder and changed according to the ECPs concentration. Also peripheral leucocyte-mediated phagocytosis was effected by the ECPs concentration. Low concentrations of *E. tarda* ECPs could give an activating effect to the bacterial invasion activity, CL response and bactericidal activity of the macrophage at the concentration between 0.18-11.74 $\mu\text{g protein ml}^{-1}$. But the activity of macrophage was significantly decreased in the higher concentration of *E. tarda* ECPs, such as 40.17 $\mu\text{g protein ml}^{-1}$.

Lymphocyte proliferation showed activated levels at high concentration (187.88 $\mu\text{g protein ml}^{-1}$) of ECPs, although the level of stimulation effect was lowered compared with others mitogens such as Concanavalin A, PHA and *E. tarda* crude LPS.

From these results, the higher concentration of *E. tarda* ECPs may suppressive effect of the phagocytosis and bactericidal activity of peripheral leucocytes and head kidney macrophages, as the non-specific cellular immune systems of olive flounder. Resultly, *E. tarda* ECPs could make a environmental condition to multiply of pathogen in the macrophages.

From the above results, it will be suggested that ECPs of *E. tarda* could work as a virulence factor with the hemolytic and cytotoxic activities, the change of physiological factors, glucose and total protein concentration, and suppress the phagocytosis and/or bactericidal activity of peripheral leucocytes and head kidney macrophages.

List of Tables

Table 1. Bacterial strains used in this study	8
Table 2. The cell-line strains used in vitro cytotoxicity test with ECPs	13
Table 3. Enzymatic activity of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs in APIzym kit	24
Table 4. Proteolytic, hemolytic, phospholipase and cytotoxic activity of <i>Edwardsiella tarda</i> extracellular products	26
Table 5. Pathogenic effect and LD ₅₀ on the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> injected with <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs or injected with each bacterium	28
Table 6. Lethal dose, LD ₅₀ value in tested <i>Edwardsiella tarda</i>	43
Table 7. <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs virulence assay to the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	44
Table 8. Viability of head kidney macrophage from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> stimulated by <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	84

List of Figures

Fig. 1. Effect of temperature on the production of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs in the tryptic soy agar for 48hrs	16
Fig. 2. Effect of salt concentration on the production of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs in the tryptic soy agar for 48hrs	18
Fig. 3. Effect of culturing time length on the production of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs in the tryptic soy agar at 28°C	20
Fig. 4. Effect of each culture medium on the production of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs at 28°C for 48hrs	22
Fig. 5. Phase-contrast micrographs of three cultured cell lines, BF-2 (A and B), CHSE-214 (C and D) and EPC (E and F) and head kidney macrophage monolayer of olive flounder(G and H) administrated with different <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	27
Fig. 6. Ouchterlony immunodiffusion analysis of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	29
Fig. 7. Protein profile of ECPs, test strains and reference strains in 12% polyacrylamide gel	30
Fig. 8. Elution profile and lethality of ECPs, proteins of <i>Edwardsiella tarda</i> (KE-1) in the high pressure liquid chromatography	45
Fig. 9. Hematocrit value in the serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> injected intramuscularly with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs for 7 days	47
Fig. 10. Glucose concentration in the serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> injected intramuscularly with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs for 7 days. An asterisk are significantly different from the untreated	

control	48
Fig. 11 Total protein concentration in the serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> injected intramuscularly with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs for 7 days	49
Fig. 12. Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) value in the serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> injected intramuscularly with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs for 7 days	50
Fig. 13. Lysozyme activity in the serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> injected intramuscularly with different concentrations of <i>Edwardsiella tarda</i> extracellular products for 7 days	52
Fig. 14. Bactericidal activity of serum inoculated olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> with <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs. The response assessed at 1, 3 and 7 days post-injection of ECPs	54
Fig. 15. Chemiluminescence response of head kidney macrophages from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> i.m injected with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs. The response assessed at 1, 3 and 7days after ECPs injection	55
Fig. 16. Bacterial invasion assay in the kidney macrophages of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	75
Fig. 17. Phagocytic index of kidney macrophages of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> inoculated with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	76
Fig. 18. Phagocytic activity of whole blood leucocytes from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> stimulated by <i>Edwardsiella tarda</i> KE-1 ECPs	78
Fig. 19. Chemiluminescence responses of head kidney macrophage from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> inoculated with each concentrations of	

<i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	79
Fig. 20. Bactericidal activity of head-kidney macrophages from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> inoculated with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	81
Fig. 21. Dose-response activity of Nitric oxide production in the head kidney macrophage from olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> stimulated by various concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs	83
Fig. 22. Measurement of the activation of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> kidney lymphocytes after treated with each concentration of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs by cell proliferation agent WST-1	85
Fig. 23. Measurement of the activation of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> kidney lymphocytes after treated with each concentration and mitogen of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay	86
Fig. 24. Effects of <i>Edwardsiella tarda</i> ECPs in the phagocytes	98

서 론

우리 나라 해산 양식 어류의 총생산량은 이미 72,393 M/T이며, 그 중에서도 넙치와 조피볼락이 주 생산 대상 어류인데, 특히 넙치의 경우 전체 생산량의 약 48%인 34,533 M/T를 차지하는 대표적인 양식 어류이다 (해양수산부, 2003).

최근 해산 어류 양식 규모가 증가하면서 과잉 생산에 의한 영세 양식 업자의 도산, 가격의 하락에 의한 생산성의 저하, 사료의 과다 투여에 따른 어장의 오염과 이로 인한 생산성 감소 및 질병의 발생 등으로, 양식 산업이 어려워지고 있는 실정이다. 이러한 양식 산업의 어려움을 극복하기 위해서는 적정 생산과 효율적인 관리를 통하여 양식 수산물에 대한 부가 가치를 높일 수 있는 대책을 수립해 나아가야 할 것이다.

어류의 질병 관리를 위하여 항생제와 화학요법제를 사용하고 있는데 이러한 약제의 사용량은 질병 발생 증가와 함께 증가하고 있으며 또한, 정확한 진단에 의한 진료와 원인 구명 없이 무원칙적으로 약제를 사용함에 따라 내성균의 출현 등 많은 문제점이 대두되고 있다. 그러므로 정확한 진단으로 원인 병원체의 특성을 파악하여 어류 질병에 대한 적절한 치료와 대책이 수립되어야 할 것이다.

우리 나라와 주변국인 일본의 양식 넙치에서 발생하고 있는 질병으로 rhabdovirus 감염증, 연쇄구균증, edwardsiellosis, pasteurellosis, scuticociliatidosis 등이 알려져 있다 (Nakatsugawa, 1983; Kusuda and Kawai, 1998; 방 등, 1992). 최근 세균성 질병에 의한 양식 넙치의 피해가 증가하고 있으며, 넙치에 질병을 일으키는 병원성 세균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus* sp. 등의 그람양성균과 *Edwardsiella tarda*, *Tenacibacterium maritimum*, *Photobacterium damsela*, *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *Vibrio* sp. 감염증 등을 들 수 있다. 이 중 *E. tarda*에 의한 피해의 비중이 매우 높는데, 이 원인체에 의하여 감염된 넙치는 복수 저류에 의한 복부팽만과 이로 인한 장관의 탈장이 관찰되며 간과 신장에 농양이 관찰된다 (Kusuda and Kawai, 1998; Austin and Austin, 1999). 특히 결절을

형성하는 병원균의 특성으로 인하여 화학요법제 등의 효과가 제한적이어서 질병의 발생 기구를 밝히는 것은 이 질병의 치료와 대책에 있어 매우 중요하다.

어류 병원성 세균인 *E. tarda*는 O-agglutination analysis에 의하여 4 serotype (A, B, C and D)으로 분류할 수 있으며, 그 중에서 serotype A group이 어류(특히, 뱀장어)에 있어 가장 강한 독성을 나타낸다 (Park *et al.*, 1983). 또한 이러한 *E. tarda*에 의한 감염은 담수에서 처음 보고 되었지만, mullet, *Mugil cephalus* (Kusuda *et al.*, 1976), Crimson sea bream, *Erynnis japonicus* (Kusuda *et al.*, 1977), olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Nakatsugawa, 1983; Rashid *et al.*, 1994; 방 등, 1992), red sea bream (Yasunaga *et al.*, 1982) 등의 해산어에서도 피해를 나타내었다. 특히, 우리나라에서의 주요 피해 대상 어종인 넙치는 수온 상승기인 5월경에 발병하기 시작하여 8월에서 10월경에 최고의 폐사를 나타내며, 최근 현장 조사에서는 전장 9cm 정도의 소형어에서도 발생하여 높은 누적폐사량을 나타내는 것으로 조사되었다 (방 등, 1992).

병원체의 독성 인자 (virulence factor)는 병증(病症) 유도에 관여할 뿐만 아니라 질병을 심화시키는 물질들을 가지고 있다 (Rudolph *et al.*, 1994). 그러므로 어류는 질병을 유발하는 세균의 다양한 독성 인자에 의한 병원성의 발현으로 질병에 걸리게 된다. 세균이 성장하며 생성하는 독성인자에는 독소, 세포외 효소 (extracellular enzyme)와 세포내 효소 (intracellular enzyme) 및 기타 인자로 나눌 수 있다 (박, 1996). 독소에는 외독소 (exotoxin)인 세포용해소 (cytolysin)와 내독소(endotoxin)인 리포다당질 (lipopolysaccharide, LPS) 및 세포벽 단백질 (cell wall protein)이 포함된다. 다양한 세포외 효소로서 amylase, chitinase, chondroitinase, collagenase, DNase, elastase, gelatinase, lipase, mucinase, lecithinase (or phospholipase) 및 protease 등의 다양한 효소가 있으며, 세포내 효소로는 superoxide dismutase (SOD)와 catalase 등이 있다 (Yamada and Wakabayashi, 1999). 또한 기타 인자로서는 siderophore (Kokubo *et al.*, 1990), 협막, antiphagocytic surface antigen 그리고 편모 등이 있다. 독소와 세포외효소는 직접 숙주 세포들을 공격하거나 기능을 저하시키며, 숙주세포, 염증세포 및 내분

비 기관으로부터 많은 염증 매개 물질이나 생체활성물질, 호르몬 등을 비정상적으로 분비하게 하여 임상 증상이나 병리조직학적 변화를 일으킨다 (Lamas *et al.*, 1994; 박, 1996). 세포내 효소는 식작용 후 숙주 식세포가 생성하는 oxygen radicals의 활성을 저하시킴으로서 균체를 보호하는 역할을 한다 (Totora *et al.*, 2002).

어류 병원성 세균의 세포외 생성물에 의한 pathogenicity와 관련한 보고는 많다. *A. salmonicida*의 ECPs에는 phospholipase (Huntly *et al.*, 1992), hemolysins (Rockey *et al.*, 1988) 및 acetylcholinesterase (Pérez *et al.*, 1998)를 함유하며, 배양 상정액을 주사하면 독성을 나타낸다 (Cipriano *et al.*, 1981)고 보고하였다. 또한 typical 및 atypical *A. salmonicida* ECPs에 포함되어있는 major toxin은 metallo-caseinase 즉, AsaP1라고 표현되며 Atlantic salmon에 강한 항원성을 나타낼 뿐만 아니라 (Gudmundsdóttir *et al.*, 1990), Atlantic salmon leucocyte의 mitogen 역할도 하는 것으로 보고 되었다 (Gudmundsdóttir *et al.*, 1995). coldwater vibriosis에 감염된 어류는 심한 anemia와 extensive hemorrhages를 나타내는데, 특히 어류의 internal organs 주위를 둘러싼 외피에 나타난다. 더욱이 이러한 변화는 liver, spleen, nephrons 및 muscle tissues의 endothelial cells에서도 나타난다 (Totland *et al.*, 1988). 이러한 증상은 exotoxin과 cytolytic enzymes에 의한 것으로 추정하였으며 (Toranzo and Barja, 1993), ECPs의 이러한 독성은 *L. anguillarum* (Inamura *et al.*, 1984), *V. vulnificus* (Amaro *et al.*, 1992) 및 *P. damsela* subsp. *damsela*(Wang *et al.*, 1998)에서도 보고되었다. 또한 tiger prawn (*Penaeus monodon*)으로부터 분리된 *V. harveyi* ECPs 내의 protease, phospholipase, haemolysins 또는 exotoxins가 병원성에 중요한 인자일 것으로 추정하였으며 (Liu *et al.*, 1996; Zhang and Austin, 2000), cysteine protease가 major exotoxin임을 증명하였다 (Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997).

Densemores *et al.* (1998)에 따르면, *R. salmoninarum* ECPs는 brook trout splenic phagocytes의 respiratory burst와 phagocytic activity를 저하시키며, *A. hydrophilla* exotoxin을 주사한 후 6시간째에 생균을 주사한 증상과 유사한 병증이 관찰되었으며

(Kanai and Takagi, 1986), 이러한 독성은 hemolysins라고 추정하였다 (Thune *et al.*, 1986; Paniagua *et al.*, 1990). 그러나 *R. salmoninarum* (Sakai *et al.*, 1989; Grayson *et al.*, 1995), *A. hydrophilla* (Santos *et al.*, 1987; Khalil and Mansour, 1997), *A. salmonicida* (Cipriano *et al.*, 1981; Gunnlaundsdóttir and Gunnlaundsdóttir, 1997)과는 달리 *E. tarda*가 생성하는 toxins에 대한 연구는 아주 빈약하며, hemolysin (Watson and White, 1979; Janda and Abbott, 1993; Kusuda and Kitadai, 1993; Hirono *et al.*, 1998)과 dermatotoxin (Ullah and Arai, 1983a, b)에 대한 보고가 있다.

Inflammatory reaction과 specific immune response는 병원성 미생물에 대한 숙주의 방어기작에서 매우 중요하다 (Lamas *et al.*, 1994). ECPs를 이용한 vaccination은 turbot과 rainbow trout에 대한 *L. nguillarum* (Santos *et al.*, 1991), sole에 대한 *V. harveyi*와 *V. parahaemolyticus* (Zorrila *et al.*, 2003) 및 잉어에 대한 *A. hydrophila* (Chadran *et al.*, 2002) 등에서 보고되었다. 그러나 양식 넙치에서는 *E. tarda* ECPs의 vaccine 효과가 나타나거나 (Salati *et al.*, 1983) 나타나지 않는다 (Mekuchi *et al.*, 1995)는 상이한 보고가 있다. 즉, BHI broth에 배양한 뱀장어 유래 *E. tarda*의 culture filtrate를 뱀장어에 주사하면 항체가 생성되며, 생성된 항체는 formalin killed cell과 높은 응집항체가를 나타내었다 (Salati *et al.*, 1983). 또한 25℃에서 96시간 배양한 후 얻은 *E. tarda* ECPs를 원액으로하여 2³으로 희석한 액 50μl를 3.2g의 넙치 근육에 주사하였고 반수치사 농도를 얻었으나 2⁵ 희석액에서는 6일간 폐사가 나타나지 않았으며, ECPs로 면역시켰으나 생균 공격에 대한 방어력에는 유효한 차이가 없었다 (Mekuchi *et al.*, 1995).

ECPs에 포함된 microbial superantigens는 가공된 항원이 conventional mechanisms, 즉 antigen presenting cell의 MHC-restricted mechanisms에 의하여 T-cell receptor로 전해질 때 관여하는 protein family로서 (Marrack *et al.*, 1990), T-cell을 활성화하여 proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor alpha(TNFα), Interleukin(IL)-6, interferon gamma(IFNγ) 및 IL-2의 분비 등을 증가시키는 기능이 있

다 (Choi *et al.*, 1990; Llewelyn and Cohen, 2002). 그러나 이러한 성분의 분비는 bacterial superantigen과 exotoxin의 host에 대한 독성 효과를 상승시키는 작용을 하며 (Schlievert, 1982), 이로 인하여 toxic shock syndrome을 유발하게 된다 (Miethke *et al.*, 1992).

양식 에드워드병에 감염되었을 때 치료 약물로서 다양한 항생제를 사용하고 있으나 최근에는 항생제에 대한 다제내성균의 증가로 양식 현장에서 치료에 어려움을 겪고 있고, 이러한 약물에 의한 치료 효과의 저하와 약물 사용과 관련된 경비의 증가는 양식 산업의 생산성 저하의 주요 요인으로 작용하고 있다 (Aoki and Kitao, 1981; Aoki *et al.*, 1987; Kou and Chung, 1980). 또한 치료 약제의 어체 내 잔류 가능성과 환전수로의 확산에 따른 공중위생적인 문제에 대한 국민 정서적 측면을 고려할 때 어류의 생체 방어 기작을 이용한 에드워드병에 대한 효과적인 제어기술의 개발이 요구되고 있다.

어류에 예방백신의 사용은 1960년대 생산 보급되기 시작하여 현재까지 지속적으로 증가하고 있으며 (Evelyn, 1997), Edwardsiellosis에 대한 vaccine의 사용 예를 보면 red sea bream에서 FKC와 LPS (Salati *et al.*, 1987a), eel에서 HKC, FKC와 LPS 등 균체나 균체로부터 정제된 항원에 대한 방어력의 효과가 검증된바 있다 (Song and Kou, 1981; Song *et al.*, 1983; Salati *et al.*, 1987b). 방과 박 (1994)은 FKC를 복강 주사 하였을 때 높은 방어 효과를 보고하였다. 그러나 Mekuchi *et al.* (1995)은 넙치에 대한 면역 반응에서 FKC의 주사 면역 후 방어력은 나타났지만 충분하지 않다는 보고 결과가 있어, *E. tarda*의 vaccine은 제작 방법이나 투여 방법에 따라 다양한 결과를 나타내는 것으로 생각된다.

본 연구의 목적

본 연구의 목적은 넙치 양식에서 발생하는 중요 질병 원인체 중의 하나인 *E. tarda*가 생산하는 세포외생성물 (extracellular products, ECPs)에 대한 기초 자료를 얻고,

질병 발생과 관련한 감염 기작에서 ECPs의 기능을 파악하고자 하였다. 이를 위하여 *E. tarda*가 생성하는 ECPs의 특성을 알아보고, 이 세포외 생성물이 투여되었을 때 숙주인 넙치의 생리 반응 및 면역 기능에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 *in vitro*에서 세포외생성물이 면역 기구, 특히 세포성 면역 기작에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

제 1 장. *Edwardsiella tarda* ECPs의 특성

I. 서론

질병에 감염된 어류는 원인 및 원인체에 따라서 다양한 행동의 변화, 내외부 증상 및 조직학적 병변을 나타낸다. 이러한 병증들은 어체의 외부 영향에 대한 반응으로 해석되며, 이러한 외부 요인에는 virus, 세균 및 기생충과 같은 생물학적 원인 병원체가 포함된다. 우리 나라 넙치 양식에서 크게 영향을 미치는 생물학적 원인체 중에는 세균성 병원체로서 *E. tarda*가 중요하다.

*E. tarda*에 감염된 넙치는 다양한 병증을 나타내는데, 체색 흑화, 복수 저류에 의한 복부 팽만 및 탈장 등의 외부 증상과 간, 신장 및 비장의 출혈과 결절, 각 장기의 비대 등의 내부 증상을 나타내며 폐사에 이르게 된다 (Kusuda and Salati, 1993). 이와 같이 숙주에 질병을 일으키거나 폐사에 이르게 하는 데에는 병원성 요인이 관여하며, 이 중에는 병원체가 생성하는 ECPs도 포함될 것으로 생각되나 ECPs가 질병 발생 및 폐사에 미치는 영향에 대한 연구 결과는 거의 없는 실정이다. 다만, *E. tarda*가 생성하는 'exotoxin'에 대한 연구에서 ECPs 내 hemolysins 작용 (Watson and White, 1979; Janda and Abbot, 1993; Hirono *et al.*, 1998)과 독성 물질의 분자량 크기가 약 37kDa 이며 (Suprpto *et al.*, 1996) 토끼에 대한 dermatotoxic activity (Ullah and Arai, 1983a, b) 등이 알려져 있는데 불과하다.

본 장에서는 *E. tarda*가 생성하는 세포외 생성물의 특성과 활성화에 대한 것을 밝히고자 하였다. 이를 위하여 분리 시기와 장소가 다른 시험용 대표 균주를 선정하였으며, 이들로부터 ECPs를 분리하였다. 그리고 *E. tarda* ECPs의 생성에 관계되는 최적의 환경 요인과 배지를 선정하고, 이러한 환경 하에서 얻은 ECPs의 효소 활성화와 각종 배양 세균에 대한 cytotoxic activity, 넙치의 LD₅₀ 및 항원적 특성을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 균주

본 연구에 사용된 시험 균주와 참조 균주는 Table 1에 나타내었다. 먼저 시험 균주로는 1999년부터 2002년까지 국내의 다양한 지역에서 넙치, *Paralichthys olivaceus*와 turbot, *Scophthalmus maximus*으로부터 분리된 5 균주의 *E. tarda* 균을 사용하였다. 참조 균주로는 Gram-positive 구균인 *Streptococcus iniae* 1종, Vibrionaceae 중 ECPs의 어류 병원성이 있다고 보고된 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (본 실험실에서 분리 동정된 균, 넙치 성어로부터 분리) 1종과 Enterobacteriaceae의 중 *Escherichia coli* 1종 및 *E. tarda* 2종 (FSW910410 and SU100) 등 5종을 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strains			Origin	
Refrence strains	<i>Streptococcus iniae</i>	ATCC49156	-	-
	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>		olive flounder	Uljín, 1999
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	-	-
	<i>Edwardsiella tarda</i>	FSW910410	olive flounder	Geoje, 1991
		SU100	eel pond water	Shizuoka (Japan), 1980
Test strains	<i>Edwardsiella tarda</i>	KE-1	olive flounder	Phohang, 2000
		KE-2	olive flounder	Uljín, 1999
		KE-3	olive flounder	Jeju, 2000
		KE-4	olive flounder	Ulsan, 1999
		KE-5	turbot	Geoje, 2002

참조 균주 중 *P. damsela* subsp. *damsela*, *E. coli* 및 *E. tarda* 2균주(FSW910410과 SU100)는 ECPs enzymatic activity 시험 대조구로 사용하였으며, *S. iniae*는 ECPs 항원의 특성 파악에서 대조구로 사용하였다.

또한 *E. tarda* SU100 균주는 일본의 Shizuoka 현 소재 뱀장어 양식장의 사육수로부터 분리되었으며 비독성 균주이다.

2. ECPs의 제조

1) ECPs의 추출

시험균의 ECPs 추출은 Austin *et al.* (1998)에 의한 cellophane overlay 방법을 사용하였다. 실험에 사용된 cellophane membrane은 121℃, 15분간 멸균하였다. 미리 제작된 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) 평판배지 위에 cellophane membrane을 깔고, Tryptic Soy Broth(TSB, Difco)에 24시간 동안 전배양된 세균 배양액 200 μ l를 이 membrane 위에 붓고 멸균 삼각유리병으로 고르게 도말하였다. 시험균이 접종된 이 배지를 27℃에서 48시간 배양한 후, cellophane membrane을 새로운 petridish에 옮기고 0.1M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4) 1ml로 세척하여 모았다. 이 현탁액을 12,000 $\times$ g, 4℃, 15분간 원심 분리하여 상정액을 얻었으며, 이 상정액은 0.45 및 0.2 μ m pore size의 syringe filter (Corning Inc.)로 여과하여 ECPs 액으로 사용하였다.

2) 단백질 정량

여과되어 준비된 ECPs의 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA, Sigma)을 표준으로 하여 Bradford (1976)에 의한 방법으로 측정하고, -20℃에서 보관하면서 필요에 따라 녹여서 사용하였다.

3. ECPs 생성의 적정 조건

1) 실험 조건

E. tarda ECPs 생성의 적정 조건을 알아보기 위하여 배양 온도, 배양 시간, 염분 농도 및 배지 종류를 변화시키면서 실험하였다. 배양 온도의 영향 실험은 10, 18, 28 및 38℃에서 0.5% (w/v) NaCl이 첨가된 TSA (Difco)배지를 사용하여 48시간 동안 시험균을 배양하여 수행하였으며, 배양 시간의 영향 실험은 38℃에서 0.5% (w/v) NaCl이 첨가된 TSA (Difco)배지를 0, 12, 24, 48, 72 및 96시간 동안 시험균을 배양하면서 행하였다. 그리고 배지 내 염분 농도의 영향 실험은 0.5, 1, 3, 5 및 7% (w/v) NaCl이 첨가된 TSA (Difco)를 48시간 동안 시험균을 배양하여 수행하였다. 그리고 배지 종류의 영향 실험은 TSA, Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco), Heart Infusion Agar (HIA, Difco) 및 Sheep-Blood Agar (아산제약)에 0.5% NaCl이 첨가된 배지를 38℃, 48시간 균을 배양하여 배지 내의 총균수와 ECPs 생성량을 측정하였다.

2) 균수 측정

배지 내의 총균수를 확인하기 위하여 cellophane membrane 위의 세균을 ECPs 추출 과정에서와 같이 0.1M PBS (pH 7.4) 1ml로 세척하고 이를 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 PBS (pH 7.4)로 단계 희석하여 TSA (Difco)에 적하하고 27℃, 48시간 배양한 후 균수를 측정하였다. 균수는 colony forming unit (cfu) plate⁻¹로 나타내었다.

3) ECPs 량 측정

또한 ECPs 양을 측정하기 위하여 상기의 ECPs 제조의 방법에서와 같이 단백질을 측정하였다.

4) Statistical analysis

배양 조건에 따른 ECPs의 생성능에 대한 결과는 Student's *t*-test로 분석하여 $P < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 가지는 것으로 판단하였다.

4. ECPs의 효소 활성 시험

1) API zym kit에 의한 효소 활성

ECPs 내의 다양한 효소 활성을 측정하기 위하여 APIzym kit (BioMerieux, Spain)을 사용하여 측정하였다. 즉, ECPs를 0.1M PBS (pH 7.4)로 희석하여 $12-16\mu\text{g protein ml}^{-1}$ 농도로 만들고 이 용액을 APIzym kit의 capsule에 각각 분주한 다음 27°C, 4시간 동안 배양하여 결과를 판정하였다.

2) Proteolytic activity

ECPs의 proteolytic activity는 Sarath *et al.* (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 기질인 azocasein (Sigma) 0.1M tris-HCl (pH 7.2)로 2% (w/v) 용액에 만들어 사용하였다. 이 기질 용액 $250\mu\text{l}$ 를 1.5ml microcentrifuge tube에 넣고 여기에 ECPs $150\mu\text{l}$ 를 첨가하여 25°C에서 30분 동안 혼합 배양하였다. 배양 후 1.2ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 $8,000\times g$, 5분간 원심 분리하였다. 상정액 1.2ml을 취하여 시험관에 옮기고 여기에 1.0M NaOH solution 1.4ml를 첨가하여 440nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 0.1M tris-HCl (pH 7.2) 용액을 이용하여 trypsin 농도가 5, 10, 20, 30, 40 및 50 mg ml^{-1} 이 되도록 제작하여 사용하였다.

3) Hemolytic activity

Hemolytic activity는 Fouz *et al.* (1993)의 방법에 따라 실험하였다. 즉, 5% 양 적혈구와 넘치 적혈구가 첨가된 TSA (Difco)를 각각 제작하여 punch로 구멍을 만들고 여기에 100 및 $400\mu\text{g ml}^{-1}$ 농도로 조정된 ECPs $100\mu\text{l}$ 를 주입하였다. ECPs를 접종한 배지를 27°C, 96시간 동안 배양하고, 구멍 주위에 투명대가 형성되었을 때 hemolytic activity 양성으로 판정하였다.

4) Phospholipase activity

ECPs의 phospholipase activity의 측정은 Liu *et al.* (1996)의 방법에 따라 실험하였다. 즉, 1% (v/v) egg yolk emulsion (Sigma)이 포함된 TSA (Difco) 배지에 punch로 구멍을 만들고 여기에 100 및 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 농도로 조정된 ECPs 100 μl 를 주입하였다. ECPs를 접종한 배지를 27°C, 48시간 동안 배양하고, 구멍 주위에 유백광(乳白光)이 관찰되면 phospholipase activity 양성으로 판정하였다.

5. ECPs의 *in vitro* cytotoxicity

E. tarda ECPs의 세포 독성은 어류 유래의 주화세포 (cell-line), 즉 BF-2 (Bluegill fry), CHSE-214 (Chinnook salmon embryo) 및 EPC (*Epithelioma papillosum cyprini*)을 사용하였다. 또한 ECPs의 넙치 세포에 대한 영향을 알아보기 위하여 신장 macrophage를 분리하여 monolayer로 제작하여 사용하였다 (Table 2).

Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma)에 10% Fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL)과 1% antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)가 되도록 첨가하고 위의 각 cell-line을 1 $\times 10^6$ cells ml^{-1} 의 농도가 되도록 조정하여 24-well plate (Corning Inc.)의 각 well에 1ml 씩을 접종하고 18°C에서 24시간 단층 배양하였다. 배양 후 각 well 내의 배지를 제거하고, 각 시험 균주의 ECPs를 10% FBS가 첨가된 EMEM으로 단백질 농도가 0, 100 및 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 가 되도록 제작하여 각 well에 다시 주입하였다. 각 균의 ECPs가 접종된 24-well plate는 18°C, 96시간 동안 배양하며 cell-line의 세포 형태를 도립현미경 (Olympus, CK-2)으로 관찰하였다. 현미경 관찰에서 ECPs를 첨가하지 않은 well의 cell-line을 대조구로 하여 세포변성효과 (cytopathic effects)를 확인하였다 (Suprpto *et al.*, 1996).

Table 2. The cell-line strains used *in vitro* cytotoxicity test with ECPs

Cell type		Origin
Cell-line	BF-2	Bluegill fry cells
	CHSE-214	Chinnook salmon embryo
	EPC	<i>Epithelioma papillosum cyprini</i>
Macrophage monolayer*		FMa olive flounder

* The cells isolated from the head kidney macrophage in olive flounder, used to pre-culture.

6. ECPs의 치사 독성

넙치에 대한 ECPs의 치사 독성은 Reed and Muench (1938)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 순치 중인 $5.6 \pm 1.4\text{g}$ 크기의 넙치에 다양한 농도의 ECPs $100\mu\text{l}$ 를 복강 주사하고, 대조구의 넙치에는 어류 당 $100\mu\text{l}$ 의 PBS를 주사하였다. 각 시험구는 6마리이었으며, 결과는 반수 치사 농도 (50% lethal dose, LD_{50})로 표현하였다.

7. Immunological double-diffusion

E. tarda ECPs의 면역학적 특성을 비교하기 위하여 Ouchterlony 법에 의한 double-diffusion technique을 사용하였다 (Haeney, 1990).

1) Anti-rabbit ECPs 항체의 제작

E. tarda ECP에 대한 항혈청을 얻기 위하여 $128\mu\text{g ml}^{-1}$ 로 조정된 ECPs 용액을 Freund's complete adjuvant에 흡착시켜 약 1.5kg의 수컷 토끼 피하 5곳 이상에 주사하였다. 1차 주사 후 동량의 ECPs 용액을 FIA에 흡착하여 1차 접종과 동일한 방법으

로 매주 1회에 걸쳐 3주간 주사하였으며, 1차 주사 후 5주째에 동량의 ECPs 용액을 adjuvant 첨가 없이 주사하고 3일 후에 전채혈하였다. 채혈한 혈액은 실온에서 2시간 동안 방치하고 4℃에서 혈병을 수축시켰다. 이 혈액을 12,000×g, 4℃, 5분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 비동화하여 -70℃에서 보관하며 필요에 따라 녹여서 사용하였다 (Catty and Raykundalia, 1988).

2) Immuno-diffusion technique

일회용 소형 plastic petridish (50φX12mm)에 0.05M Veronal buffer (pH 8.6)를 이용하여 1% agarose plate를 제작한 후 punch를 이용하여 구멍을 만들고 여기에 각 실험 군주로부터 분리된 ECPs와 anti-rabbit ECPs 항체 100μl 주입하여 실온에서 overnight 하여 관찰하였다. 반응의 결과는 침강선의 유무와 형태로 판정하였고, 관찰을 쉽게 하기 위하여 petridish에 1% alcian blue 용액을 첨가하였다.

8. 전기 영동

E. tarda ECPs의 profile을 확인하기 위하여 Laemmli (1970)의 방법으로 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 하였다. ECPs는 400μg protein ml⁻¹로 조정하여 2×sample buffer와 동량 혼합하고 5분간 끓였다. 시료는 5% (v/v) stocking gel과 12% (v/v) resolving gel 상의 sample running은 mini-protean II system (BioRad)으로 40mA에서 90분간 시행하였다. Marker는 Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas)를 사용하였으며, 전기 영동한 gel은 Coomassie brilliant blue R-250 staining solution으로 염색하고, 탈색액으로 탈색하여 관찰하였다.

III. 결과

1. ECPs 생성의 적정 조건

1) 배양 온도

시험 균주 3종과 참조 균주 1종의 *E. tarda* 균을 이용한 배양 온도에 따른 균수의 변화와 ECPs 생성능에 대한 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

시험 균주 모두 배양 온도에 따라서 균수의 변화가 다르게 나타났다 (Fig. 1-A). 참조 균주인 FSW910410 균주와 KE-1 균주는 28℃에서 가장 잘 자라는 것으로 확인되었다. 그러나 KE-3와 KE-5는 온도에 대한 반응에서 상반되는 현상을 보였는데, KE-3 균주는 18℃에서, 그리고 KE-5 균주는 38℃에서 다른 균주들에 비하여 잘 자라는 것으로 확인되었다. KE-3 균주는 다른 3가지 균주에 비하여 10℃에서 잘 자라는 것으로 관찰되었으며 ($P<0.05$), 18℃에서는 실험 균주 모두가 비슷한 균수를 나타내었다. FSW910410 균주와 KE-1 균주의 적정 성장 온도 영역은 28℃로 확인되었으며, KE-1 균주가 FSW910410 균주와 KE-3 균주에 비하여 많은 균수를 나타내었다 ($p<0.05$). 그리고 38℃에서 KE-5 균주는 다른 세 균주의 균수가 줄어드는 경향을 보이는 것과 반대로 오히려 더 늘어나 FSW910410 균주와 KE-3 균주에 비하여 더 많은 균수를 나타내었다 ($P<0.05$).

배양 온도에 따른 *E. tarda* 균의 ECPs 생성량을 조사한 결과는 Fig. 1-B에 나타내었다. 28℃에서 배양하였을 때 모든 실험 균주에서 가장 많은 ECPs를 생성하였다. 다만 KE-3의 경우 18 및 38℃에서도 다른 3종의 시험 균주에 비하여 많은 ECPs를 생성하는 것으로 관찰되었다.

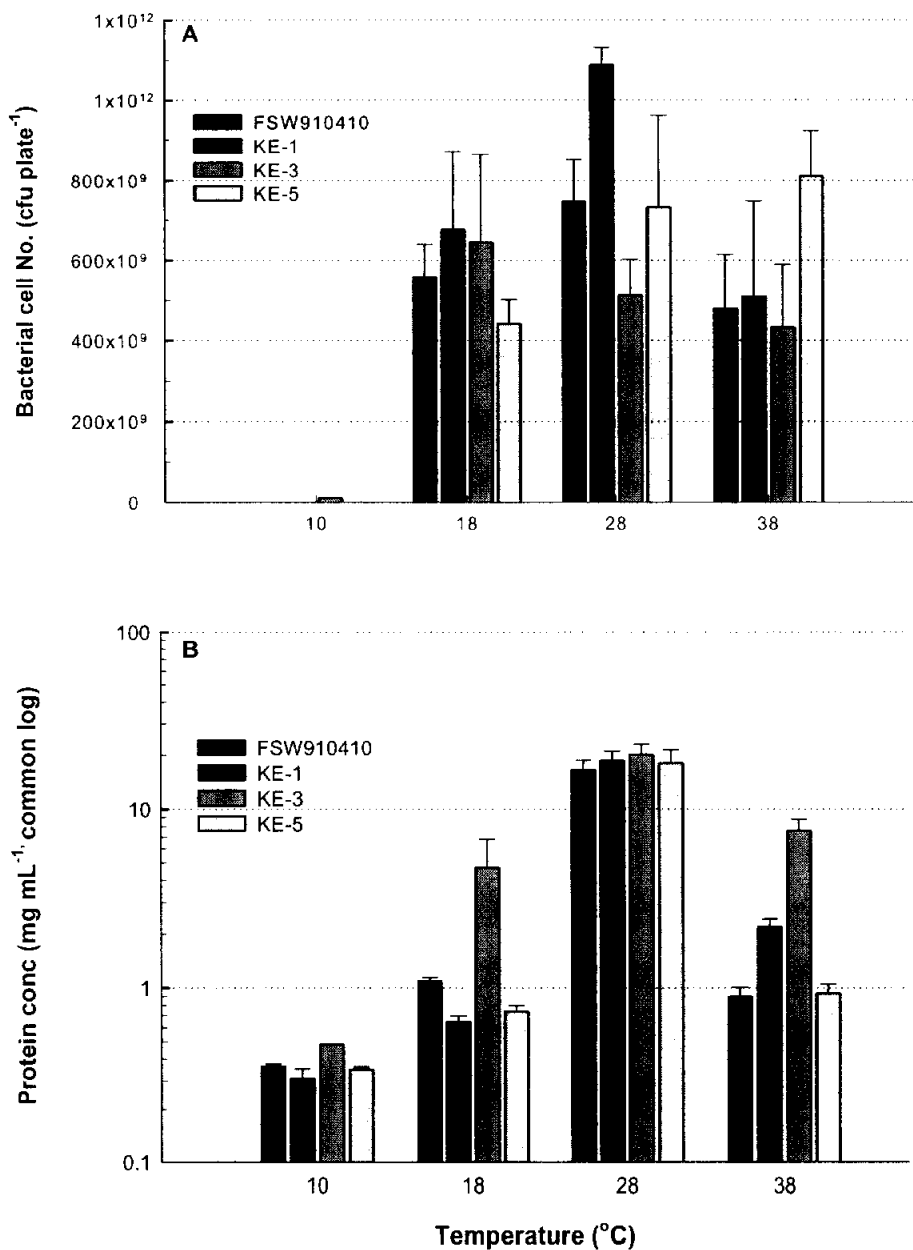


Fig. 1. Effect of temperature on the production of *Edwardsiella tarda* ECPs in the tryptic soy agar for 48hrs. A, Bacterial cell number and B, ECPs concentration in each temperature.

2) 염분 농도

시험 균주 3종과 참조 균주 1종의 *E. tarda* ECPs 생성에서 배지 내 염분 농도가 미치는 영향에 대한 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

다양한 염분 농도가 첨가된 TSA 배지에서 *E. tarda* 균수의 증가 결과는 Fig. 2-A에 나타내었다. 균을 접종한 배지를 48시간 배양한 후 각 염분 농도에 따른 균수를 확인하면 배지 내 총 NaCl 첨가량이 1%이었을 때 가장 잘 자라는 것으로 조사되었으며, 이후 염분 농도가 증가할수록 균의 증가는 급격히 감소되는 경향을 보였다. 참조 균주로 사용된 FSW910410 균주의 성장이 1 및 3%에서 다른 시험 균주의 성장에 비하여 좋은 것으로 나타났다 ($p < 0.05$).

다양한 염분 농도에서 배양한 균주의 ECPs의 생성에 대한 결과는 Fig. 2-B에 나타내었다. 배지에 첨가된 염분 농도가 0.5 및 1% (w/v) 이었을 때 ECPs 생성능이 높게 나타났으며, 염분 농도가 3% 이상에서는 급격히 감소하여 5% 이상에서는 거의 생성하지 못하는 것으로 확인되었다. 그러나 동일한 농도에서 자란 각 시험 균주 사이에 유의적 차이는 나타나지 않았다 ($p < 0.05$).

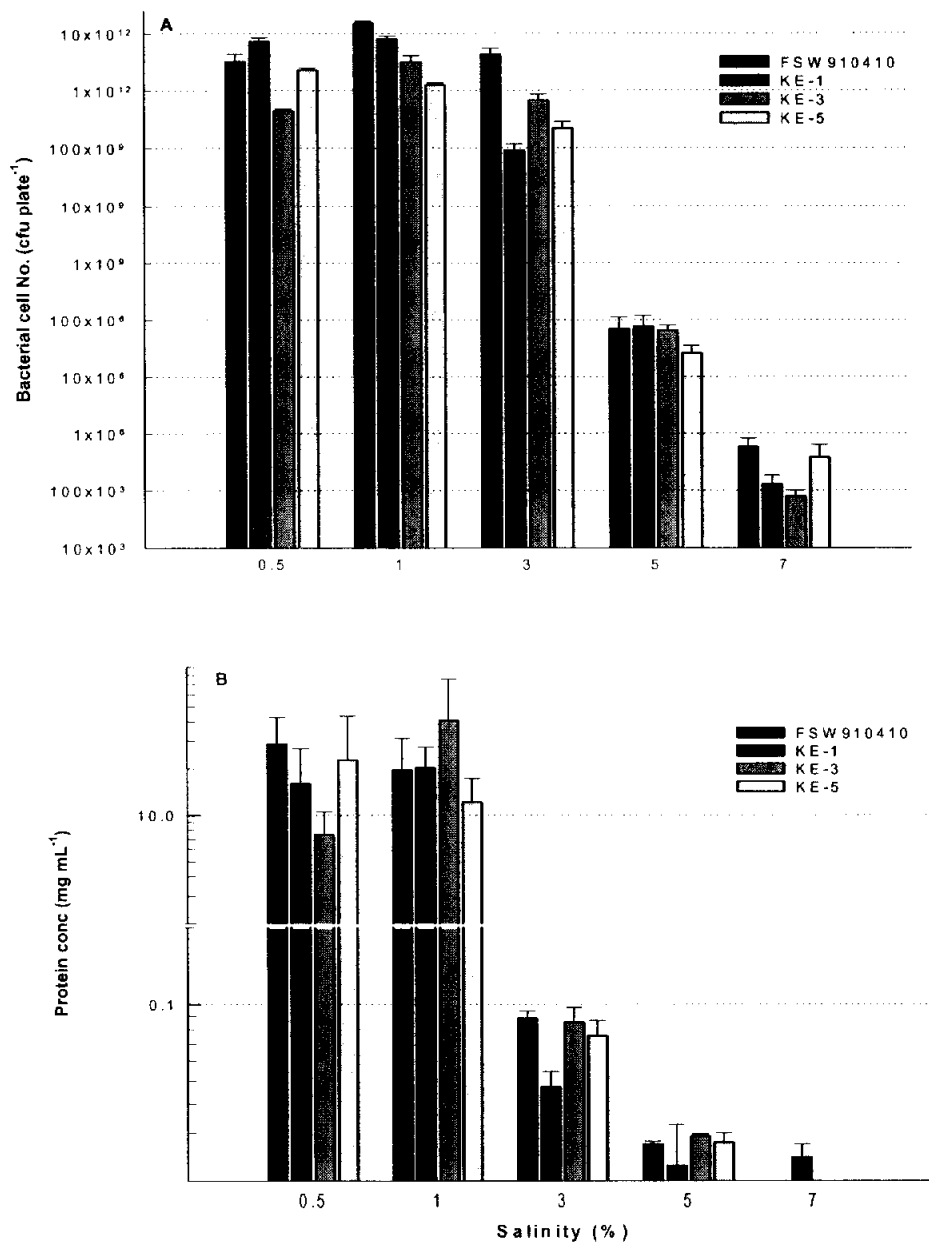


Fig. 2. Effect of salt concentration on the production of *Edwardsiella tarda* ECPs in the tryptic soy agar for 48hrs. A, bacterial cell number and B, concentration of ECPs in under the each NaCl culturing conditions.

3) 배양 시간

E. tarda 균의 ECPs 생성에 미치는 배양 시간의 영향을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

배양 시간 경과에 따른 각 시험균의 균수 변화는 Fig. 3-A와 같다. 균수는 배양 후 48 시간째까지 빠르게 증가하여 약 72시간에 최대 균수를 나타내었다. 이후 약간의 비슷하게 유지되거나 감소 현상은 관찰되었지만 48시간부터 96시간까지의 균수 변화에서는 유의적 차이가 관찰되지 않았다 ($p<0.05$).

Fig. 3-B는 배양 시간 경과에 따른 *E. tarda* ECPs의 생성량을 조사한 결과를 나타낸 것이다. ECPs 생성량 또한 48시간까지 그 양이 급격히 증가하였으며, 48시간 이후에는 배양 시간 간에 유의적 차이는 나타나지 않았다 ($p<0.05$). 다만, KE-3 균주의 경우 배양 시간에 따른 ECPs 생성량의 증가가 다른 균주들에 비하여 낮은 것으로 조사되었으며, 특히 배양 후 24시간째에는 ECPs 생성량이 다른 3종의 균주에 비하여 유의적으로 낮았다 ($p<0.05$).

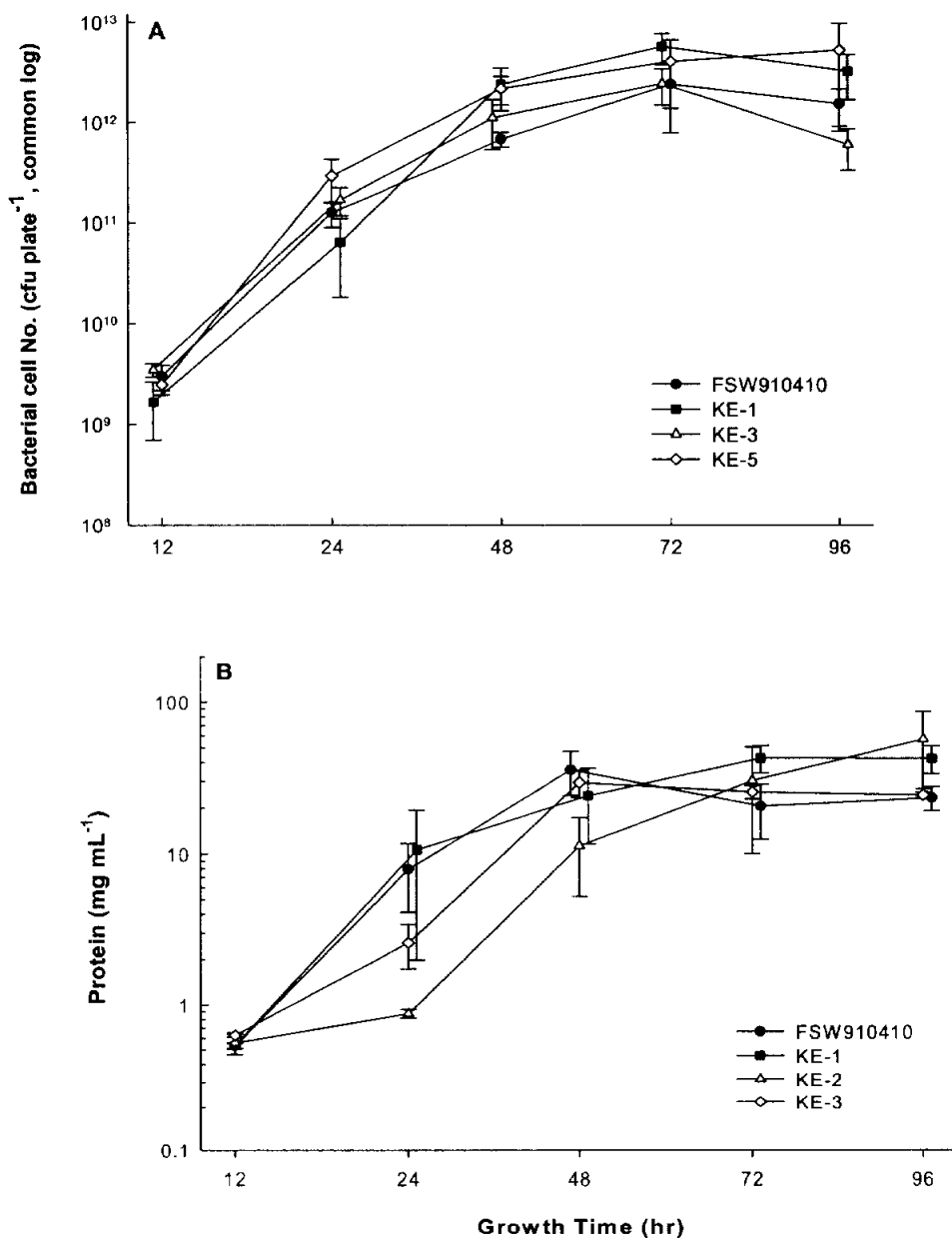


Fig. 3. Effect of culturing time length on the production of *Edwardsiella tarda* ECPs in the tryptic soy agar at 28°C. A, bacterial cell number and B, ECPs concentration in each culturing time.

4) 배지 종류

배지 종류가 *E. tarda* 균의 성장과 ECPs 생성에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

각 균주를 접종한 배지를 배지 종류에 따라 28℃, 48시간 동안 배양 하였을 때 세균수의 차이에 대한 실험 결과는 Fig. 4-A에서와 같다. 즉, 배지 종류에 따른 균수는 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ($p < 0.05$).

배지 종류에 따른 ECPs의 생성량을 측정한 결과는 Fig. 4-B에서와 같다. BHIA에서 ECPs 생성량이 많았으나, 배지 종류에 따른 ECPs 생성량에서의 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ($p < 0.05$).

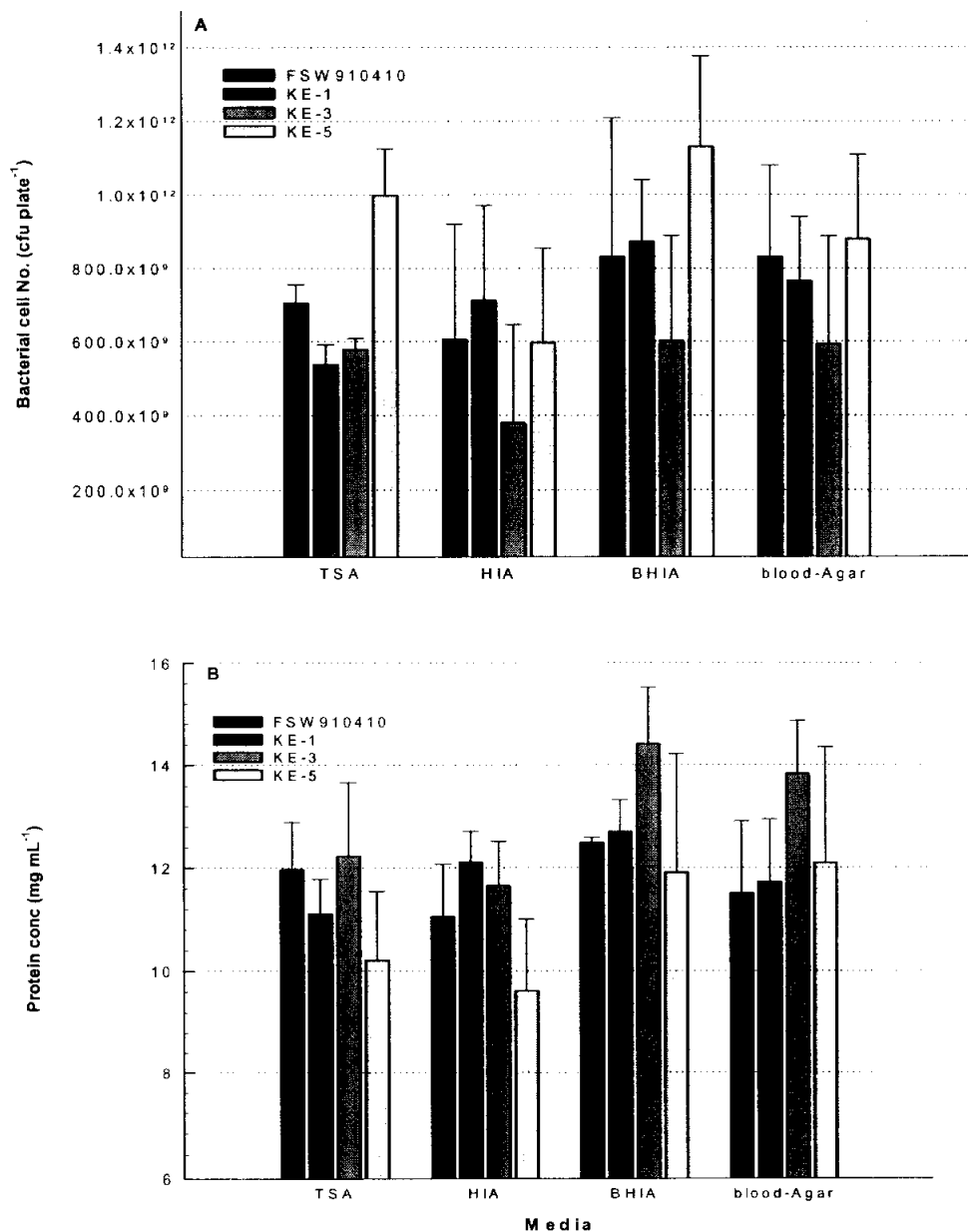


Fig. 4. Effect of each culture medium on the production of *Edwardsiella tarda* ECPs at 28°C for 48hrs. A, bacterial cell number and B, ECPs concentration in each culture media.

2. ECPs의 효소 활성 시험

1) APIzym kit에 의한 효소 활성

각 시험 균주와 대조 균주의 ECPs를 APIzym kit에 접종하여 enzymatic activity를 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. 시험 균주 모두 alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphthol AS-BI phosphohydrolase 및 N-acetyl- β -glucosaminidase에서 양성을 나타내었고, 이외의 효소 활성에서는 모두 음성을 나타내었다. 또한 esterase의 경우 KE-2에서 음성을 나타내었으나 다른 *E. tarda* 균주들은 양성을 나타내었다. 참조 균주 중 *E. tarda* SU100은 esterase와 naphthol AS-BI phosphohydrolase에서 다른 *E. tarda* 균주들과는 차이를 나타내었다.

2) Proteolytic activity

Trypsin을 standard control로 하여 실험 균주와 참조 균주 ECPs의 protease activity를 조사한 결과, 2종의 *E. tarda* 참조 균주인 FSW910410와 SU100, 그리고 5종의 실험 균주 모두에서 protease activity가 나타나지 않는 것으로 조사되었다 (Table 4).

3) Hemolytic activity

양 적혈구와 넙치 적혈구를 첨가한 배지에 구멍을 뚫고 각 실험 균주로부터 분리된 ECPs를 주입하여 24시간 및 72시간에 hemolytic activity를 조사하였다. 반응 24시간 후 양 적혈구를 첨가한 배지에서 KE-3 균주의 ECPs 만이 hemolytic activity를 보였으나 반응은 약하게 나타났으며, *P. damselae* subsp. *damselae*, *E. coli* 및 나머지 6종의 *E. tarda* ECPs에서는 나타나지 않았다.

Table 3. Enzymatic activity of *Edwardsiella tarda* ECPs in APIzym kit

Characteristics	<i>P. damsela</i> ¹	<i>E. coli</i> ²	<i>Edwardsiella tarda</i>						
			FSW 910410	SU100	KE-1	KE-2	KE-3	KE-4	KE-5
alkaline phosphatase	+	+	+	+ ^w	+	+	+	+	+
esterase	+	-	+ ^w	-	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w
esterase lipase	+	-	-	-	-	-	-	-	-
lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
leucine arylamidase	+	-	-	-	-	-	-	-	-
valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cysteine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acid phosphatase	+	+	+	+ ^w	+	+	+	+	+
naphthol AS-BI phosphohydrolase	-	+	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+ ^w
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*.

2, *Escherichia coli*.

w, weakly reaction.

넙치 적혈구가 첨가된 배지에서의 hemolytic activity는 *S. iniae* 균의 ECPs에서 강하게 나타났으며 (자료는 나타내지 않음), *E. coli*와 6종의 *E. tarda* ECPs를 첨가하였을 때 hemolytic activity가 나타나지 않았다. 그러나 6종의 *E. tarda* ECPs를 접종한 후 72시간째에 넙치 적혈구를 첨가한 배지에서 약한 hemolytic activity가 나타나는 것이 확인되었다 (Table 4).

4) Phospholipase activity

Egg yolk emulsion이 첨가된 TSA 배지에 접종하여 배양한 2종의 *E. tarda* 참조 균주인 FSW910410와 SU100 및 5종의 실험 균주 ECPs의 phospholipase activity는 관찰되지 않았다 (Table 4).

3. ECPs의 *in vitro* cytotoxicity

어류 유래의 cell-line 3종과 넙치의 신장으로부터 분리된 macrophage monolayer에 대한 cytotoxicity를 측정한 결과는 Table 4와 Fig. 5에 나타내었다. 어류 유래의 cell-line인 BF-2, CHSE-214 및 EPC, 그리고 macrophage monolayer에 *E. tarda* ECPs를 $400\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 최종 농도가 되게 첨가하여 18℃에서 배양하였다. 배양 후 48 시간째에 모든 시험구에서 cytotoxic activity가 나타나지 않았지만, 배양 72시간째에 BF-2와 CHSE-214에서 ECPs를 첨가하였을 때 세포 변성 효과 (cytopathic effect, CPE)가 약하게 관찰되었다. 그러나 EPC와 macrophage monolayer에서는 세포 변성 효과가 나타나지 않았다 (Table 4).

Table 4. Proteolytic, hemolytic, phospholipase and cytotoxic activity of *Edwardsiella tarda* extracellular products

ECPs of strain			<i>Photobacterium damselae</i> ssp. <i>damselae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>						
					FSW 910410	SU100	KE-1	KE-2	KE-3	KE-4	KE-5
Proteolytic activity			+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hemolytic activity	24hrs	S-RBC	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		F-RBC	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	72hrs	S-RBC	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		F-RBC	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Phospholipase activity			+	-	-	-	-	-	-	-	-
Cytotoxic effect	BF-2	8hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		48hr	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		72hr	+	+	+	+	+	+/_	+/_	+/_	-
	CHSE -214	8hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		48hr	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		72hr	+	+/_	+	+	+	+	+/_	+/_	-
	EPC	8hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24hr	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		48hr	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		72hr	+	+/_	+	+/_	+	+	+	+/_	-
	FMa	8hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		24hr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		48hr	+/_	-	-	-	-	-	-	-	-
		72hr	+/_	-	-	+/_	-	+/_	-	-	+/_

R-RBC, rabbit red blood cells; F-RBC, flounder red blood cells; BF-2, bluegill fry; CHSE-214, Chinook salmon embryo; EPC, *Epithelioma papillosum cyprini*; FHM, fathead minnow ; FMa, flounder macrophage, macrophage monolayer.

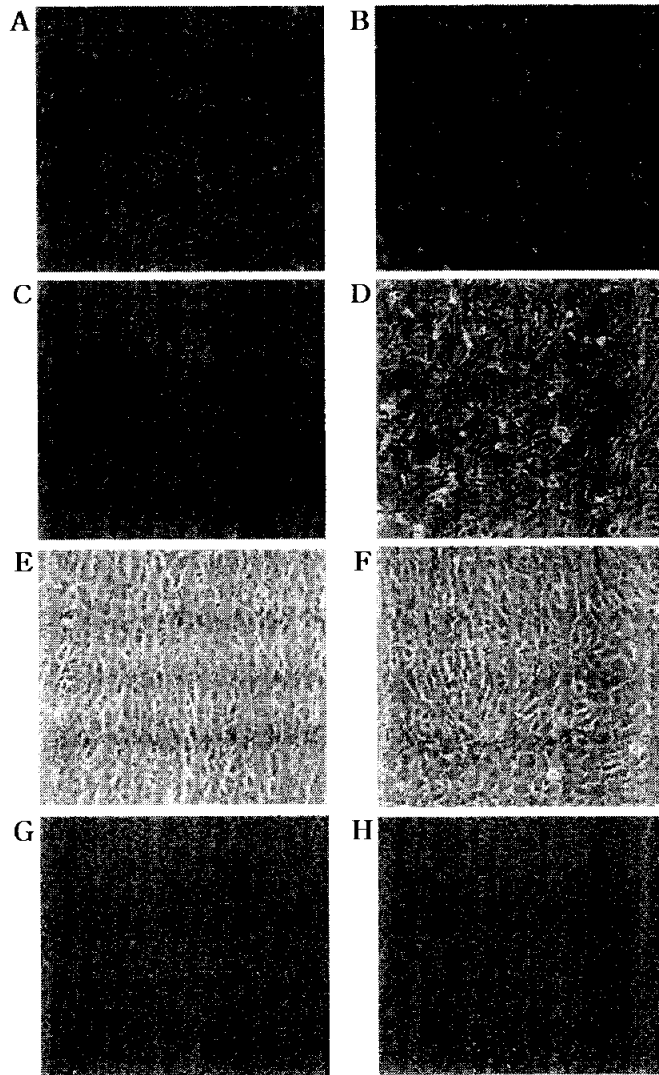


Fig. 5. Phase-contrast micrographs of three cultured cell lines, BF-2 (A and B), CHSE-214 (C and D) and EPC (E and F) and head kidney macrophage monolayer of olive flounder (G and H) administrated with different *Edwardsiella tarda* ECPs. The left columns (A, C, E and G) were unadministrated control and The right columns (B, D, F and H) were administrated with ECPs ($400\mu\text{g ml}^{-1}$) for 72hrs.

4. ECPs의 치사 독성

각 균주의 병원성 정도와 ECPs의 독성 정도를 측정하기 위하여 각 균주와 ECPs를 복강 및 근육 주사를 하여 LD₅₀을 측정하였으며 결과는 Table 5에 나타내었다. 시험 결과, 실험 균주인 *E. tarda*의 LD₅₀은 10^{2.50}-10^{5.17} cfu fish⁻¹로 나타나 KE-1 균주의 병원성이 가장 강한 것으로 확인되었으며 SU-100은 10^{8.50} cfu fish⁻¹의 농도에서 폐사가 발생하지 않았다. 또한 ECPs의 LD₅₀은 6.80-12.50 µg g⁻¹ fish로 확인되었다. SU-100과 *E. coli*의 ECPs의 LD₅₀ 측정에서 30.0 µg g⁻¹ fish의 농도에서 폐사가 나타나지 않았다.

Table 5. Pathogenic effect and LD₅₀ on the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected with *Edwardsiella tarda* extracellular products or injected with each bacterium

ECP of strain	<i>Photobacterium damselae</i> ssp. <i>damselae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>						
			FSW 910410	SU-100	KE-1	KE-2	KE-3	KE-4	KE-5
96hr-LD ₅₀ , ECPs µg protein g ⁻¹ fish	12.50	>30	7.50	>30	7.14	12.50	8.20	ND	6.80
96hr-LD ₅₀ , bacterium cfu (i.m. injection)	ND	ND	10 ^{5.25}	>10 ^{8.50}	10 ^{2.50}	10 ^{5.17}	10 ^{4.25}	10 ^{3.50}	10 ^{3.75}

LD₅₀, 50% lethal dose; cfu, colony forming units; ND, not determined; i.m. injection, intramuscularly injection.

5. Immunological double-diffusion

참조 균주 중 병원성 균주인 *E. tarda* FSW910410 ECPs를 항원으로 하여 얻은 항토끼 혈청과 각 균주의 ECPs를 반응시킨 결과는 Fig. 6에서와 같다. 반응 결과 *E. coli*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *S. iniae*와 *E. tarda* SU100 균주와는 침강선이 나타나지 않았으나 참조 균주인 *E. tarda* FSW910410 및 다른 시험 균주와는 침강선을 형성하였다.



Fig. 6. Ouchterlony immunodiffusion analysis of *Edwardsiella tarda* ECPs. The Ouchterlony plate showing a single precipitin line with rabbit anti-*E. tarda* KE-1 ECPs in the center well and bacterial ECPs the side well. The single precipitin line suggests a single protein in the *E. tarda* KE-1 ECPs used as antigen.

6. 전기 영동

각 *E. tarda* ECPs를 전기 영동하여 얻은 protein profile에 대한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 실험 균주 ECPs의 protein profile은 균주 간 차이가 나타나지 않았으며, 참조 균주인 FSW910410과 SU100과의 비교에서도 protein profile의 차이는 나타나지 않았다.

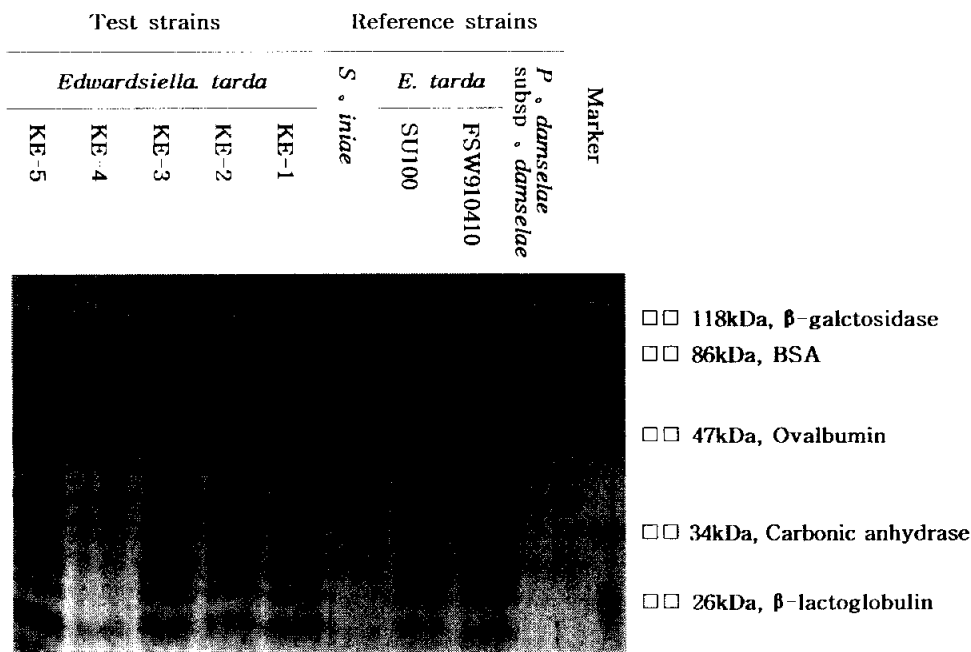


Fig. 7. Protein profile of ECPs, test strains and reference strains in 12% polyacrylamide gel.

IV. 고 찰

어류 병원성 세균의 세포외생성물 (ECPs)은 독소와 다양한 효소를 함유하고 있어 조직 손상을 일으킨다. *A. hydrophila*는 cytotoxins와 protease를 함유하고 있어서 염증 반응을 유도하는 motile aeromonas septicemia (MAS)가 나타나며 (Ventura *et al.*, 1988), *L. anguillarum* ECPs는 *A. salmonicida*의 주요 glycerophospholipid cholesterol acyltransferase (GCAT)를 함유하고 있으며 (Lee and Ellis, 1990), *V. vulnificus*의 신경 독소 성분인 anhydrotetrodotoxin을 함유하는 것 (Simidu *et al.*, 1987)으로 확인되었다. Atypical *A. salmonicida* ECPs에 포함되어 있는 protease (metalo-caseinase, AsaP1)와 membrane-damaging toxins (cyolysins, hemolycins and phospholipase) 등은 이 균의 병원성에 중요한 역할을 하며 (Rockey *et al.*, 1988; Austin *et al.*, 1998; Ellis, 1997; Gunnlaugsdóttir and Gudmundsdóttir, 1997; Høie *et al.*, 1999), 배양 상정액을 주사하면 독성을 나타내었다 (Cipriano *et al.*, 1981). 그러나 *R. salmoninarum* (Bandin *et al.*, 1991), *P. anguillaceptica* (Wakabayashi and Egusa, 1972) 및 *V. ordalii* 등이 분비하는 ECPs는 독성이 없거나 아주 약하게 나타났다 (Kodama *et al.*, 1984). 양식 넙치의 주요 병원체인 *E. tarda*가 생성하는 ECPs의 경우, dermatotoxin (Ullah and Arai, 1983a, b)과 hemolysin (Kusuda and Kitadai, 1993; Watson and White, 1979) 등이 보고되어 있으며, 이상의 성분뿐만 아니라 ECPs에 존재하는 다양한 성분의 특성 규명은 병원성 기작을 밝히는데 중요하므로 본 장에서는 *E. tarda*가 생성하는 ECPs의 특성에 대하여 조사하였다.

배양 조건에 따른 *E. tarda* ECPs의 생성능을 확인하기 위하여 배양 온도, 염분 농도, 배양 시간 및 배양에 사용되는 배지의 종류에 대한 결과를 얻었다. 또한 균주는 *E. tarda* 참조 균주인 FSW910410 균주를 사용하였고 실험 균주으로써 KE-1, KE-3 및 KE-5 균주를 사용하였는데 이는 예비실험 결과 KE-2와 KE-4의 배양 특성이 KE-1과 유사하였기 때문이다.

*E. tarda*의 각 균은 배양 온도에 따른 균수의 변화가 다르게 나타났다. 48시간 배양 후 참조 균주로 사용된 FSW910410 균주와 KE-1 균주가 28℃에서 가장 잘 자라는 것으로 확인되었으며, KE-3 균주는 18℃에서 그리고 KE-5 균주는 38℃ 이상에서도 다른 균주들에 비하여 잘 자라는 것으로 확인되었다. 1979년, 일본의 양식 뱀장어로부터 분리된 *E. tarda* EF-1 균주의 배양 온도는 10~45℃ 이었으며, 적정 온도는 37℃ 이었으며, 이 온도 보다 높은 영역에서는 생존율이 급격히 감소하였다 (Ishihara and Kusuda, 1982). 이것은 어류의 사육 온도에 따라 감염균의 적정 배양 온도가 다를 수 있음을 의미하며, 지역에 따라 또는 담수와 해수에 분포하는 균이 다를 수 있음을 의미하는 생각된다. 또한 배양 온도에 따른 각 시험 균주의 ECPs 생성량을 측정한 결과 28℃에서 배양된 균에서 가장 높게 생성되었다.

E. tarda 균의 ECPs 생성에 미치는 염분 농도의 영향을 측정한 결과, 배양 후 48시간째에 배지 내 총 NaCl 첨가량이 1% (w/v)이었을 때 가장 잘 자라는 것으로 조사되었으며, 이후 염분 농도가 증가할수록 균의 증가는 급격히 감소되는 경향을 보였다. 염분 농도에 따른 ECPs의 생성능에 대한 결과, 0.5 및 1%의 NaCl이 첨가된 배지에서의 ECPs 생성능이 높게 나타났으며, 이후 급격히 감소하여 5% 이상에서는 거의 생성하지 못하는 것으로 확인되었다. Ishihara and Kusuda (1982)에 의하면 양식 뱀장어로부터 분리된 *E. tarda* 균주의 적정 염분 농도는 1% (w/v) 이었으며, 이후 염분농도가 증가할수록 생존율이 떨어져 5%에서는 성장하지 못한다는 결과와 그 경향이 일치하며, 본 연구에서 7%의 염분이 첨가된 배지에서 ECPs를 소량 생성하였는데 이것은 본 연구에 사용된 *E. tarda* 균주들이 해산어로부터 분리된 것이기 때문일 것으로 생각된다.

E. tarda ECPs 생성에서 배양 시간은 48시간째까지 급격하게 증가한 이후 완만하여 약 72시간에 최대 균수를 나타내었으나 48시간째와 72시간째 사이에 유의적 차이는 관찰되지 않았다 ($p < 0.05$). 또한 배양 시간에 따른 *E. tarda* ECPs의 생성량을 조사한 결과, KE-1을 제외한 3 균주의 ECPs 생성량은 배양 후 48시간에 가장 높게 나타났으

며, 이후에는 유의적 증감이 나타나지 않았다 ($p < 0.05$).

배지 종류에 따른 ECPs의 생성량을 조사하였을 때, BHIA에서 ECPs 생성량이 많았으나 TSA, HIA, BHIA 및 sheep blood Agar 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 *V. carchariae*는 TSA에 비하여 peptone agar, nutrient agar 또는 BHIA에서 성장하였을 때 protease activity가 높게 나타난다고 하였으며 (Lee *et al.*, 1999), *V. vulnificus*는 HI broth에서 ECPs 생성능이 가장 좋은 것으로 나타났다 (박, 1996). 이것은 위의 세균들이 사용하는 영양 성분이 plant source 보다는 animal source (horse serum, grouper meat or peptone)를 첨가하였을 때 ECPs protease activity가 높기 때문인 것으로 보았다 (Lee *et al.*, 1999; 박, 1996).

각 참조 균주와 시험 균주 ECPs에 대한 enzymatic activity를 측정한 결과, 시험 균주 모두 esterase와 naphthol AS-BI phosphohydrolase에서 약간의 차이가 있으나 다른 enzymatic activity에서는 동일한 결과를 나타내었다. 즉 APIzym kit를 이용하여 다양한 효소 활성을 측정한 결과, *E. tarda* 시험 균주는 alkaline phosphatase, acid phosphatase 및 N-acetyl- β -glucosaminidase가 양성을 나타내었으며, SU100, KE-2 및 KE-5는 esterase 음성을, SU100은 naphthol AS-BI phosphohydrolase에서 음성을 나타내었다. 그리고 나머지 14가지의 enzymatic activity에서는 모두 음성의 값을 나타내었다. 뱀장어 양식장의 사육수로부터 분리된 비독성 균주인 SU100 (Iida and Wakabayashi, 1993)은 다른 병원성 *E. tarda* 균주와의 비교에서 esterase와 naphthol AS-BI phosphohydrolase의 활성을 나타내지 않아 이들 효소가 병원성과 관련이 있을 것으로 추측된다. 하지만 *E. tarda* 병원성과 관련한 ECPs 중의 효소에 대한 보고는 전무한 상태이다.

Proteolytic activity를 시험한 결과, 실험에 사용한 모든 *E. tarda* ECPs는 음성을 나타내었다. 또한 면양 적혈구를 이용한 hemolytic activity 측정에서 시험 균주 중 KE-3를 제외한 모두 균주의 ECPs가 음성을 나타내었으나, 넙치 적혈구를 이용한 실험에서 모든 시험 균주 ECPs는 48시간째에 음성을 나타내었으나 72시간째에는 약한 양성을

나타내었다. 어류 유래 세포주인 BF-2, CHSE-214 및 EPC를 이용한 cytotoxic activity에서는 각 시험 균주 ECPs를 접종한 후 약 72시간째에 BF-2와 CHSE-214에서 약한 세포 변성 효과가 나타내었으나 EPC와 넙치 macrophage monolayer를 이용한 cytotoxic activity 측정에서는 어떤 세포 변성 효과도 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *L. anguillarum* ECPs를 EPC에 반응시키면 40분 후부터 세포의 변형이 일어나며, 약 90분 후에는 거의 파괴되며 (Wang *et al.*, 1998), *A. salmonicida*가 생성하는 ECPs는 어류 유래 cell-line을 2시간 이내에 파괴하는 것 (Madetoja *et al.*, 2003)에 비하여 *E. tarda* ECPs의 hemolytic 및 cytolytic activity는 매우 약한 것으로 보이며, 72시간 이후에 이러한 활성이 나타나는 것은 *E. tarda* ECPs가 가지는 독성이 넙치에 장기적으로 작용하는 숙주 특이성을 가지거나 또는 세포내 기생체적 성질을 가지는 *E. tarda* 균의 특성 때문일 것으로 생각된다.

*L. anguillarum*의 ECPs에 의한 LD₅₀치는 4.5-7.3 μ g ECPs protein g⁻¹ fish이며 (Kodama *et al.*, 1984), *V. ordalii*는 >1,080 (Mohamed *et al.*, 1985), *V. damsela* (Fouz *et al.*, 1993)는 0.05-3.7, *A. salmonicida* (Hackett *et al.*, 1984)는 2.5-9.8 μ g ECPs protein g⁻¹ fish이었다. Inamura *et al.* (1984)은 *L. anguillarum*의 ECPs에 대한 proteolytic activity의 측정에서 ECPs의 lethal toxicity와 protease level 사이에 관련성이 있음을 처음 보고하였다. 그러나 Kodama *et al.* (1984)은 어류의 vibriosis 형성에 ECPs가 간접적인 독소로서 영향을 미친다고 하였다. 본 연구에서 *E. tarda* 시험 균주 ECPs의 독성을 LD₅₀으로 나타내었으며, 그 범위는 6.80-12.50 μ g protein g⁻¹ fish로 나타났다.

Double-diffusion 방법과 SDS-PAGE에 의한 단백질 경향 분석에서 각 실험 균주 사이에 항원성과 단백질 조성 차이가 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

본 연구의 결과, *E. tarda* ECPs는 28℃, 0.5-1%의 염분 농도가 함유된 배양 배지에서 생성이 가장 많았다. 넙치 적혈구에 대한 hemolytic activity, 그리고 어류 유래의 세포주인 BF-2와 CHSE-214에 대한 cytotoxic activity가 ECPs와 반응한 후 72시간째에 나타나기 시작하였으며, 실험 균주의 LD₅₀은 6.80-12.50 μ g protein g⁻¹ fish로 나타났다.

그러므로 *E. tarda* ECPs는 넙치에 대한 독성이 강하지 않으며, 그 작용에 대한 영향이 장기간 동안 서서히 나타나서 숙주에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

V. 요 약

다양한 지역에서 분리된 *E. tarda* 균주가 생성하는 ECPs의 생성능을 조사한 결과, 배양 온도는 27℃, 염분 농도는 0.5-1% (w/v)에서 ECPs의 생성능이 가장 좋았으며, 배지 종류에 따른 영향은 적은 것으로 확인되었다.

위의 최적 생성 조건에서 생성된 ECPs의 특성은 실험 균주 모두 esterase와 naphthol AS-BI phosphohydrolase에서 약간의 차이가 있으나 다른 enzymatic activity에서는 동일한 결과를 나타내었다. proteolytic activity는 나타나지 않았으며, hemolytic activity 또한 약하거나 거의 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 다만 KE-3 균주에서 반응 24시간 후에 sheep-RBC가 포함된 plate에서 약한 양성으로 나타났다. 시험한 균주 모두에서 반응 후 24시간 이전에 cytotoxicity가 확인되지 않고, 72시간 이후에 약한 양성을 양성 반응을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 *E. tarda*가 생성하는 ECPs는 효소활성을 강하게 나타내지 않는 것으로 생각된다.

또한 *E. tarda*가 생성하는 ECPs는 Ouchtelony 법을 이용한 immunodiffusion과 SDS-PAGE에 의한 실험에서 시험 균주간 항원적 차이를 나타나지 않았다.

제 2 장. 넙치에 대한 *Edwardsiella tarda* ECPs의 영향

I. 서론

*A. hydrophila*의 ECPs 내 α - 및 β -hemolytic toxin은 잉어와 무지개송어의 폐사에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 정제된 toxin을 주사한 잉어는 생균을 주사했을 때와 유사한 외부 증상과 말초 혈액의 hemolysis가 관찰된다고 보고 되었으며 (Kanai and Takagi, 1986; Thune, 1986). *A. salmonicida*의 ECPs를 주사한 연어과 어류는 furunculosis와 관련한 병소가 확인되었다 (Ellis *et al.*, 1981). 그러나 어류 병원체인 *E. tarda*가 생성하는 ECPs와 관련한 생리학적 변화나 병증과 관련한 연구는 전무한 실정이며, 특히 toxins에 대한 보고는 dermatotoxin (Ullah and Arai, 1983a,b)과 hemolysin (Kusuda and Kitadai, 1993; Watson and White, 1979) 등에 대한 단편적인 연구가 거의 전부이다. 이 또한 *E. tarda* ECPs를 정제하여 2.5-3kg 크기의 토끼에 주사하였을 때, 3-8시간 후 홍반 (erythema)가 나타나며, 5-7일 후 부종 (oedema)을 일으키는 피부독성을 나타내며, 80℃ 이상과 산 및 알칼리에서 불활성화 된다고 하였다 (Ullah and Arai, 1983).

본 장의 목적은 *E. tarda* ECPs를 넙치에 직접 투여하였을 때, 어떠한 생체반응이 일어나는지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 0, 4 및 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 인 crude ECPs solution을 제조하여 넙치에 투여하였을 때 생리학적 변화의 지표로서 hematocrit 치, 혈중 glucose, total protein 량 및 Alanine aminotransferase (ALT)와 Aspartate aminotransferase (AST) 량의 변화를 확인하였으며, 면역학적 지표로서 혈청 lysozyme activity와 bactericidal activity 및 신장 macrophage의 chemiluminescence (CL) response를 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 어류

실험에 사용된 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 제주도와 기장의 양어장으로부터 분양 받았다. 전자는 체중 5.6 ± 1.4 g의 넙치로 ECPs의 독성 시험에 사용하였으며, 후자는 체중 59.1 ± 3.1 g의 넙치로 ECPs 주사 후 나타나는 생리학적인 및 면역학적 영향을 조사하기 위한 실험어로 사용하였다. 분양 받은 넙치는 운반 후 2주일간 순치를 하였으며 순치 기간 중에는 1일 1회 상업용 사료 (천희제일사료)를 공급하였다. 실험 수온은 $16-18^{\circ}\text{C}$ 이었고 실험 기간 동안 먹이를 공급하지 않았다.

2. 시험 균주

실험에 사용한 *E. tarda* 대조 균주와 실험 균주를 넙치에 주사하여 LD_{50} 치를 얻고, 이들 세균 중 독성이 가장 강한 KE-1 균주를 본 실험에 사용하였다 (Table 7).

3. ECPs의 분리 및 정제

시험균의 ECPs 추출은 제1장에서 언급한 Austin *et al.* (1998)의 cellophane overlay 방법을 사용하였으며, 준비된 ECPs의 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA, Sigma)를 표준으로 하여 Bradford (1976)에 의한 방법으로 측정하였다. 분리된 *E. tarda* ECPs는 -20°C 에서 보관하면서 필요에 따라 녹여서 사용하였다.

4. Crude ECPs의 독성 시험

넙치에 대한 *E. tarda* ECPs의 독성은 Amaro *et al.* (1992)의 방법으로 확인하였다. 단백질 농도는 0, 0.4, 4, 40 및 $400\mu\text{g ml}^{-1}$ 인 crude ECPs solution을 제조하였다. 각 농도로 준비된 ECPs를 평균 체중이 5.6g인 넙치 8마리씩에 각각 $100\mu\text{l fish}^{-1}$ 로 근육 주사하여 최종 주사 농도가 0, 0.0714, 0.0714 0.714 및 $7.14\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$ 가 되게 하였고,

주사 후 14일 동안 폐사를 관찰하였다. 폐사한 어류는 아가미와 표피에서의 기생충 검사와 간, 비장 및 신장으로부터 세균을 배양을 하여 폐사 원인을 확인하였다.

5. ECPs 분획화와 독성 시험

분획화한 ECPs의 독성 시험은 Suprpto *et al.* (1996)의 방법으로 하였다. Crude ECPs의 분획은 DEAE-sepharose column을 이용한 HPLC로 이루어졌다. 0.2 μ m pore size의 주사기용 여과기를 사용하여 여과한 ECPs를 column에 흡착시키고 1M NaCl이 포함된 0.01M Tris-HCl 완충액을 사용하여 1ml min⁻¹의 속도로 용출시켰다. 용출액의 각 fraction은 시험관 당 2ml를 취하여 흡광도 280nm에서 단백질 농도를 측정하고 각 흡광도 peak를 평균 체중이 약 5.6g 인 건강한 넙치 8 마리에 마리 당 100 μ l를 주사하여 10일간 폐사를 관찰하였다.

6. 채혈

넙치의 *E. tarda* ECPs에 대한 혈액 성상의 변화를 조사하기 위하여 ECPs 투여 후 경과 시간에 따른 혈액 성상을 조사하였다. 즉, 400 μ g ml⁻¹인 crude ECPs와 10배로 희석한 ECPs를 체중 59.1 $\pm$ 3.1g 크기의 넙치 복강에 100 μ l fish⁻¹로 주사하여 최종 농도가 각각 0.0677 및 0.677 μ g g⁻¹ fish가 되도록 하였다. 각 실험구의 어류는 25마리씩 있었다. 주사 후 1, 3, 5 및 7일째에 각 실험구로부터 각각 4마리의 넙치를 무작위로 취하여 50 ppm의 아미노안식향산 에틸 수용액으로 마취하고 미부정맥으로부터 1ml 용량의 1회용 주사기를 이용하여 채혈하였다. 채혈한 혈액의 일부는 실험어의 혈구 조성 확인과 hematocrit 치 확인을 위하여 사용하였으며, 나머지는 혈액 내 성분을 확인하기 위하여 혈청 분리에 사용하였다.

7. ECPs가 넙치의 혈액 성상에 미치는 영향

1) Hematocrit

실험어의 hematocrit 치는 Wedemeyer and Nelson (1975)의 방법에 따라 이루어 졌다. 각 실험구의 실험어로부터 분리된 혈액을 hematocrit 치 측정용 heparinized capillary tube (Chase Instrument Co.)에 삼투시키고 12,000×g, 5분간 원심 분리하였다. 실험어의 hematocrit 치는 전체 혈액량에 대한 적혈구의 %로 환산하였다.

2) 혈청의 분리와 보존

각 실험구의 실험어로부터 분리한 혈액을 1시간 동안 실온에서 방치하고, 4℃에서 2시간 동안 혈병을 수축시킨 후 10,000×g, 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 이렇게 분리된 혈청은 -70℃에 보관하며 필요에 따라 녹여서 각각의 실험에 사용하였다.

3) 혈청 내 성분 조사

분리하여 보관 중이던 혈청을 이용하여 glucose 량, AST (aspartate aminotransferase, GOT)와 ALT (alanine aminotransferase, GPT) 량, total protein 량의 변화를 조사하였다. 혈청 중 glucose 량은 효소법을, ALT와 AST는 Reitman-Frankel 법을, 그리고 total protein은 Biuret 법을 이용하였으며, 각 성분의 측정은 혈액 성분 검사용 kit (아산제약)을 사용하였다.

8. ECPs가 넵치의 면역반응에 미치는 영향

ECPs가 넵치의 면역반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험어의 혈청과 신장 macrophage를 분리하여 각각의 실험에 사용하였다.

1) 혈청 내 lysozyme 활성

혈청 내의 lysozyme activity 측정은 Lange *et al.* (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 96 well plate (Packard) 각 well에 100 μ l의 phosphate buffer sol. (PBS, pH 6.2)를 첨가하고 동량의 혈청을 첨가하여 2배로 8회 단계 희석하였다. *Micrococcus lysodeikticus*

용액은 PBS (pH 6.2)를 이용하여 0.4mg ml^{-1} 의 농도로 제조하였다. 이 용액 $100\mu\text{l}$ 를 혈청이 희석된 각 well에 첨가하고, 22°C 에서 배양하며 0, 15, 30 및 60분에 590nm 의 파장에서 흡광도로서 측정하였다. 양성 대조구로서 hen egg lysozyme (Sigma)을 음성 대조구로서 PBS (pH 6.4)를 사용하였으며, 라이소자임 활성은 1분당 흡광도 0.001을 감소시키는 시료의 양으로 환산하였다.

2) 혈청의 세균 살해능

혈청 내 보체에 의한 세균 살해능의 조사는 유 등 (1992)의 방법에 따라 실험하였다. 각 시료로부터 분리한 혈청은 혈청 분리 후 6시간 이내에 분석하였으며, 불활성화 혈청은 Sakai (1981)의 방법에 따라 45°C , 30분간 가온 처리하여 제조하였으며, 4°C 에 보관하며 실험에 사용하였다. 각 혈청의 희석은 GVB^{2+} (Gelatin veronal buffer: VB 200ml , $0.03\text{M CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5ml , $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5ml , 2% gelatin 50ml , DW 740ml , pH 7.4)를 사용하였다. 모든 시료는 GVB^{2+} 로 5배 희석한 후 $8\times 10^6\text{ cfu ml}^{-1}$ 로 조정된 *E. tarda* KE-1 균주와 동량 혼합하여 20°C 에서 배양하였다. 배양 후 0, 1, 3 및 6시간째에 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 TSA (Difco)에 배양 용액을 단계 희석하여 적하하고 27°C , 36시간 배양한 후 세균 집락수를 계수하였다.

3) CL response

① Kidney phagocyte의 준비

넵치의 전신을 무균적으로 적출하여 10 units ml^{-1} heparin, $100\mu\text{g ml}^{-1}$ penicillin/ 100 units ml^{-1} streptomycin이 첨가된 phenol red-free Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, pH 7.4)이 첨가된 petridish에 넣고 마쇄하여 nylon mesh에 통과시켰다. 이 현탁액을 34-51% percoll gradient (Sigma)에 중층한 후 $500\times g$, 30min, 4°C 에서 원심 분리하고 중앙부의 세포층을 1회용 1ml 주사기로 회수하여 분리하였다. 분리한 세포는 HBSS (pH 7.4)를 이용하여 $500\times g$, 5min, 4°C 에서 2회 반복 세척하고, 0.1% fetal calf serum이 첨가된 HBSS (pH 7.4)로 1회 세척하였다. 이 세포 용액을 trypan

blue exclusion method (Hudson and Hay, 1989)를 이용하여 1.5×10^6 cells ml^{-1} 의 농도로 조정하여 실험에 사용하였다 (생존율: $\geq 95\%$).

② 감작 zymosan의 준비

zymosan (Sigma) 0.02g을 정량하여 넙치의 신선 혈청 1ml와 20℃, 25분 동안 감작시켰다. 이 용액을 $2000 \times g$, 5분 동안 원심 분리하여 혈청을 제거하고 HBSS (pH 7.4)를 첨가하여 재현탁하였다. 상기와 동일한 조건에서 다시 원심 분리하여 상정액을 제거하고, HBSS (pH 7.4)를 첨가하여 총용량이 10ml되게 하여 사용할 때까지 얼음 안에서 보관하였다.

③ CL assay

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, Sigma)은 10mg ml^{-1} 의 stock solution으로 제작하여 aluminium foil로 감아 4℃에 보관하였으며, 이 용액의 10배 희석액을 working solution으로 사용하였다. White-adapted 96-well plate (Packard)에 well 당 1.0×10^5 cell suspension $100\mu\text{l}$, luminol $20\mu\text{l}$, 감작 zymosan $80\mu\text{l}$ 를 첨가하고 luminometer (LumiCountTM, Packard Bioscience Company, Netherlands)로 0.5 초의 노출 시간으로 각 well의 CL response를 측정하였다.

9. Statistical analysis

각 실험 결과는 Student's *t*-test에 의하여 분석되었으며, $P < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 가지는 것으로 판단하였다.

III. 결과

1. 시험 균주

실험에 사용한 *E. tarda*균의 반수 치사 농도 (LD₅₀)는 Table 6에서와 같다. 참조 균주 2종 (FSW910410 and SU100)과 실험 균주 5종에 대한 균주의 독성을 시험한 결과, KE-1 균주의 LD₅₀이 10^{2.50} cfu fish⁻¹로 가장 강하게 나타났다.

Table 6. Lethal dose, LD₅₀ value in tested *Edwardsiella tarda*

Strains		LD ₅₀ (cfu fish ⁻¹)
Reference strains	FSW910410	10 ^{5.25}
	SU100	-
Test strains	KE-1	10 ^{2.50}
	KE-2	10 ^{5.17}
	KE-3	10 ^{4.25}
	KE-4	10 ^{3.50}
	KE-5	10 ^{3.75}
	KE-6	10 ^{3.50}

2. ECPs의 독성 시험

넙치에 대한 *E. tarda* ECPs의 독성을 확인은 주사 실험에 의하여 확인하였다. 평균 체중이 5.6g 인 넙치 8마리씩에 0, 0.4, 4, 40 및 $400\mu\text{g ml}^{-1}$ 농도의 ECPs를 $100\mu\text{l fish}^{-1}$ 씩 근육주사 (최종농도는 0, 0.00714, 0.0714, 0.714, 및 $7.14\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$ 임)한 후 14일간 폐사를 확인한 결과는 Table 7에 나타내었다.

Table 7. *Edwardsiella tarda* ECPs virulence assay to the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The fish average weight is 5.6g

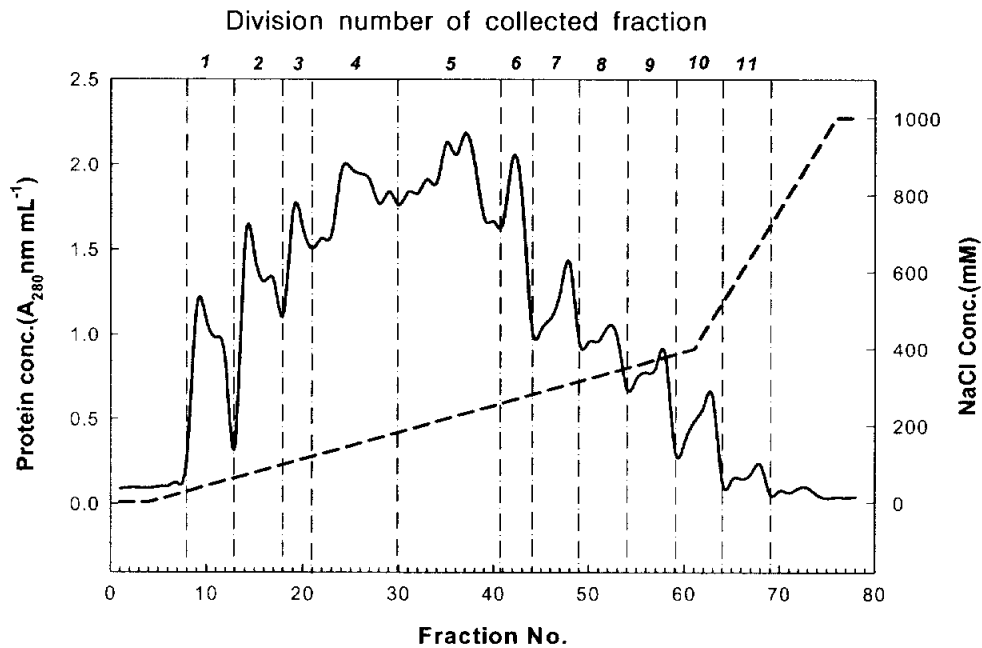
Injection conc. ($\mu\text{g fish}^{-1}$)	Tested fish No.	Mortality (Fish No.)														Cumulative mortality (%)
		Days after Injection														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
40	8	0	0	1	4	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	100
4	8	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	0	1	0	100
0.4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	12.5
0.04	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PS	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

PS, physiological saline (0.85% NaCl solution).

고농도인 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ ($7.14\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$) 주사 시험구에서는 주사 3일째에 폐사가 발생하기 시작하였으며 4일째에 4마리가 폐사하고 1주일 이내에 주사 전 개체가 폐사하여, 누적폐사량이 100%로 나타났다. 또한 $4\mu\text{g fish}^{-1}$ ($0.714\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$) 시험구에서 주사 1주일째에 폐사가 시작되어 13일째까지 거의 매일 꾸준한 폐사가 발생하였으며, $0.4\mu\text{g fish}^{-1}$ ($0.0714\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$)로 주사한 시험구에서 13일째에 폐사가 나타나기 시작하였다. 그리고 $0.04\mu\text{g fish}^{-1}$ ($0.00714\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$) 및 $0\mu\text{g fish}^{-1}$ 주사 시험구에서는 폐사가 발생

하지 않았다.

3. ECPs 분획과 독성 시험



	Division number of collected fraction											PS
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Injected No. of fish	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dead No. of fish	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Lethality(%)	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	0

PS, physiological saline (0.85% NaCl solution).

Fig. 8. Elution profile of ECPs proteins of *Edwardsiella tarda* (KE-1) in the high pressure liquid chromatography, and the lethality of each collected division from ECPs proteins.

DEAE column을 이용한 HPLC의 *E. tarda* ECPs에 대한 분석 결과는 Fig. 8의 그림과 같다. 11개의 주요 peak가 확인되었으며 이 분획들을 넘치에 주사한 10일간의 결과는 아래 표와 같다. 즉, '7'번 peak에서 40%의 폐사가 발생했을 뿐 다른 분획에서는 폐사를 나타내지 않았다.

4. Hematocrit

넙치에 대한 *E. tarda* ECPs의 투여 영향을 측정하는 요소의 하나로 hematocrit 치를 측정 한 결과는 Fig. 9에 나타내었다. ECPs를 0, 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사하였을 때 1주일간의 hematocrit 치의 변화를 관찰하였다. 4 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구에서의 hematocrit 치는 대조구 (0 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구)와 유사한 값을 나타내었으나 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구는 주사 1일후부터 감소하는 경향을 나타내어 1주일째까지 감소하는 경향을 나타내었으나 $P<0.05$ 수준에서의 유의차는 나타나지 않았다 (7일째, $P=0.0654$).

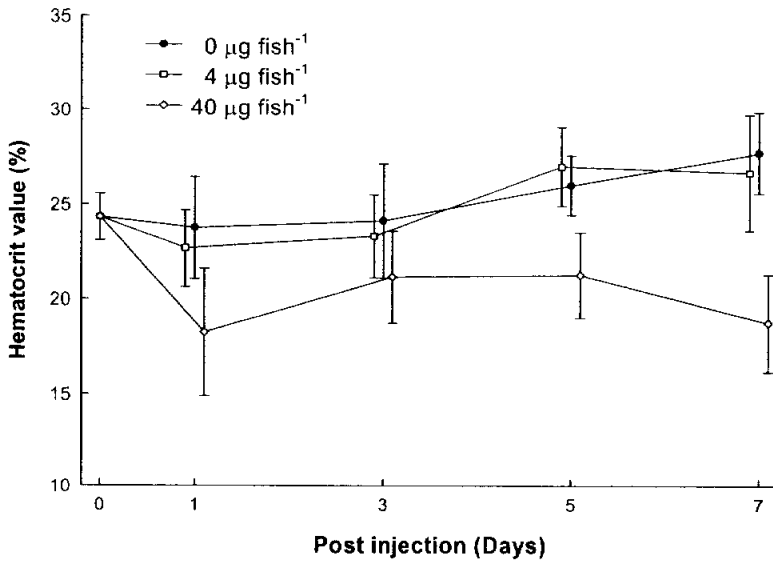


Fig. 9. Hematocrit value in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs for 7 days.

5. 혈액 내 성분의 검사

1) Glucose 농도

넙치에 *E. tarda* ECPs를 투여한 후 혈중 glucose 량을 측정한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. glucose 농도는 대조구 ($0\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도) 및 저농도 ($4\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도) 주사실험구에서는 1주일간 glucose 농도의 변화가 거의 나타나지 않았으나 고농도 ($40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도)로 주사한 실험구에서 3일째부터 급격히 증가하여 7일째까지 유의적으로 높은 상태로 유지되었다 ($P<0.05$).

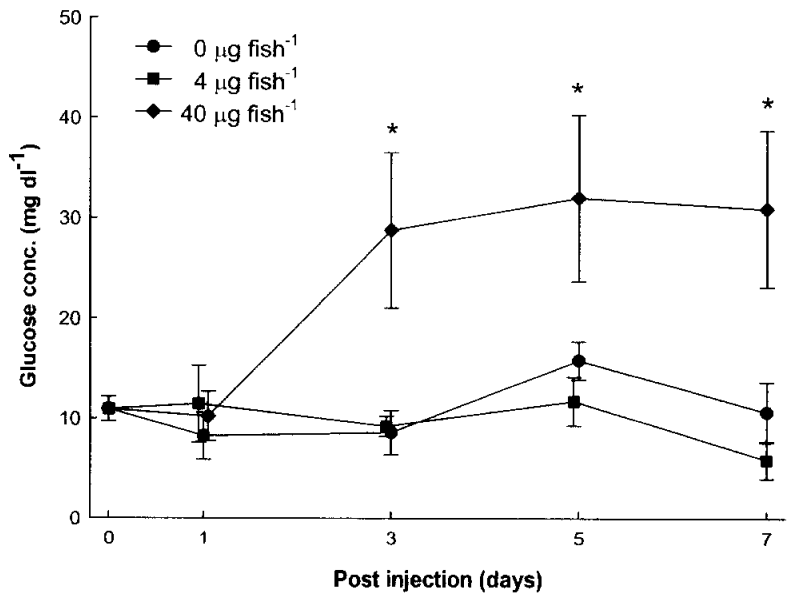


Fig. 10. Glucose concentration in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs for 7 days. An asterisk are significantly different from the untreated control.

2) Total protein

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후 혈청 내 total protein 량을 조사한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. ECPs를 0, 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사하였을 때 주사 5일째에 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구에서의 total protein 농도가 같은 시기의 대조구에서 보다 유의적 ($P<0.05$)으로 높게 나타났으며, 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구에서는 1주일째에도 대조구에 대하여 유의성 ($P<0.05$)을 나타내었다.

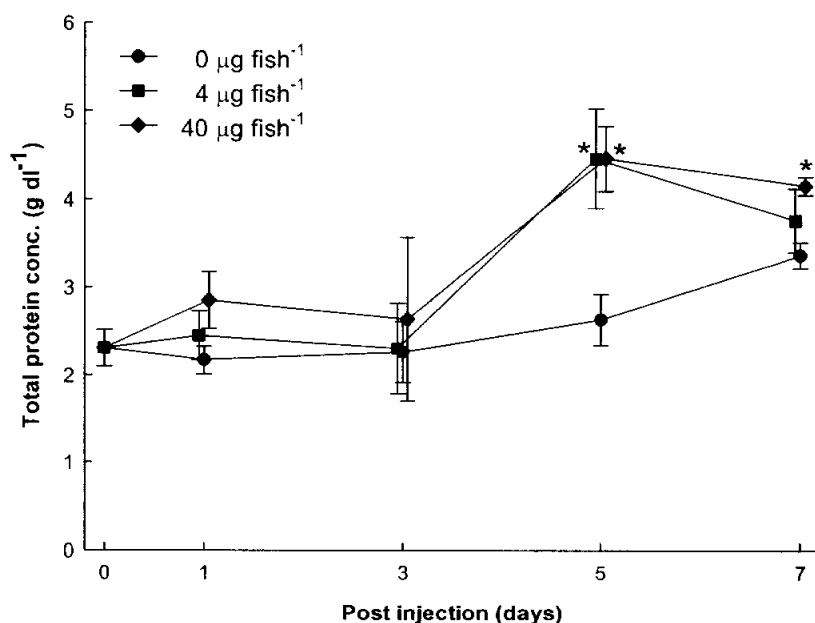


Fig. 11 Total protein concentration in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs for 7 days. An asterisk are significantly different from the untreated control.

3) AST와 ALT

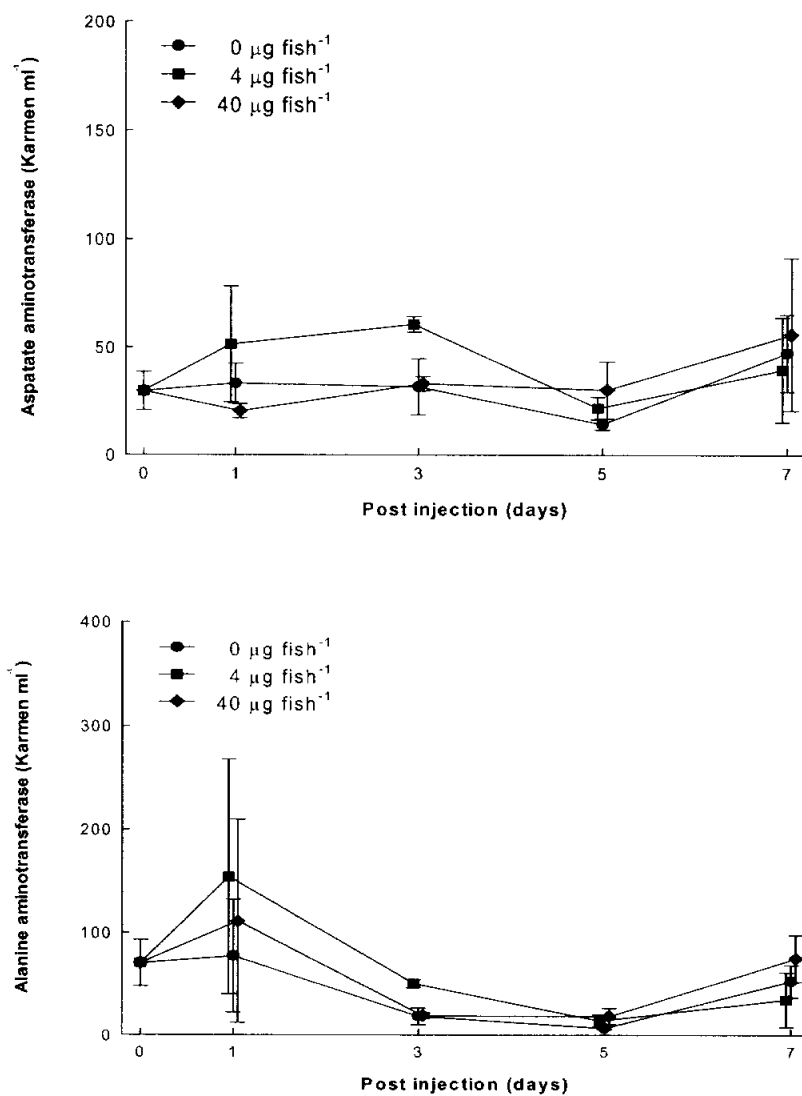


Fig. 12. Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) value in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs for 7 days.

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도 (0, 4 및 40 μ g fish⁻¹의 농도)로 주사한 후 혈청 내 AST와 ALT를 조사한 결과는 Fig. 12에 나타내었다. ECPs를 0, 4 및 40 μ g fish⁻¹의 농도로 주사하였을 때 실험기간 동안 유의적 변화는 관찰되지 않았다 ($P < 0.05$).

6. ECsP가 넙치의 면역반응에 미치는 영향

1) 혈청 lysozyme 활성

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후 혈청 내 lysozyme activity를 조사한 결과는 Fig. 13에 나타내었다. ECPs를 0, 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사하였을 때 실험기간 동안 대조구 (0 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도)에 대하여 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구의 유의적 차이는 나타나지 않았다 ($P<0.05$). 그러나 실험구의 결과가 대조구에 비하여 시간 경과에 따른 변동은 심하게 나타나는 것으로 관찰되었다.

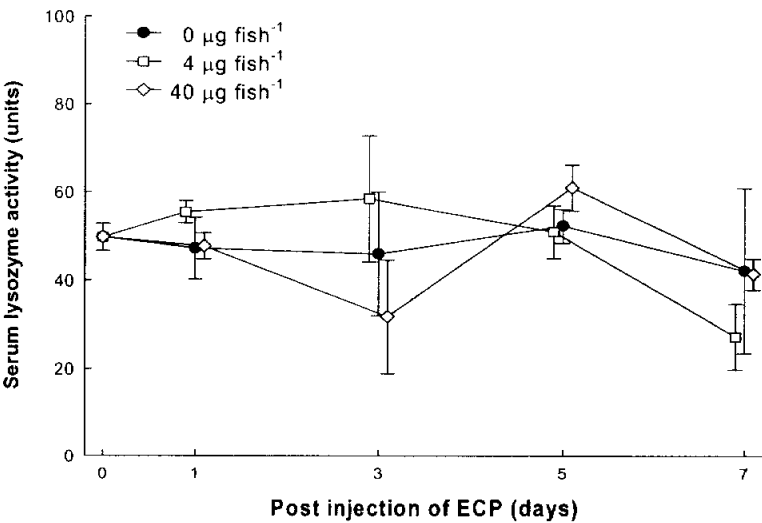


Fig. 13. Lysozyme activity in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs for 7 days.

2) Serum의 bactericidal activity

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도 (0, 4 및 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도)로 주사한 후 시간 결과에 따른 serum의 bactericidal activity를 조사한 결과는 Fig. 14에 나타내었다.

고농도 및 저농도로 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 47°C 에서 30분 간 불활화한 혈청에 대해서는 유의적인 차이를 나타내었으나 $0\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사된 넙치의 신선 혈청에 대해서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($p<0.05$).

3) CL response

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도 (0, 4 및 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도)로 주사한 후 시간 결과에 따른 CL response는 Fig. 15에 나타내었다.

고농도 ($40\mu\text{g fish}^{-1}$)로 ECPs가 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 대조구에 비하여 CL response가 낮게 나타났으며 시간이 경과함에 따라 CL response가 대조구와 유사한 형태의 반응성을 나타내었다. 저농도 ($4\mu\text{g fish}^{-1}$)로 ECPs가 주사된 시험구에서는 주사 3일 후 대조구에 비하여 낮게 나타났으나 7일째에는 대조구와 유사한 수준으로 회복되었다.

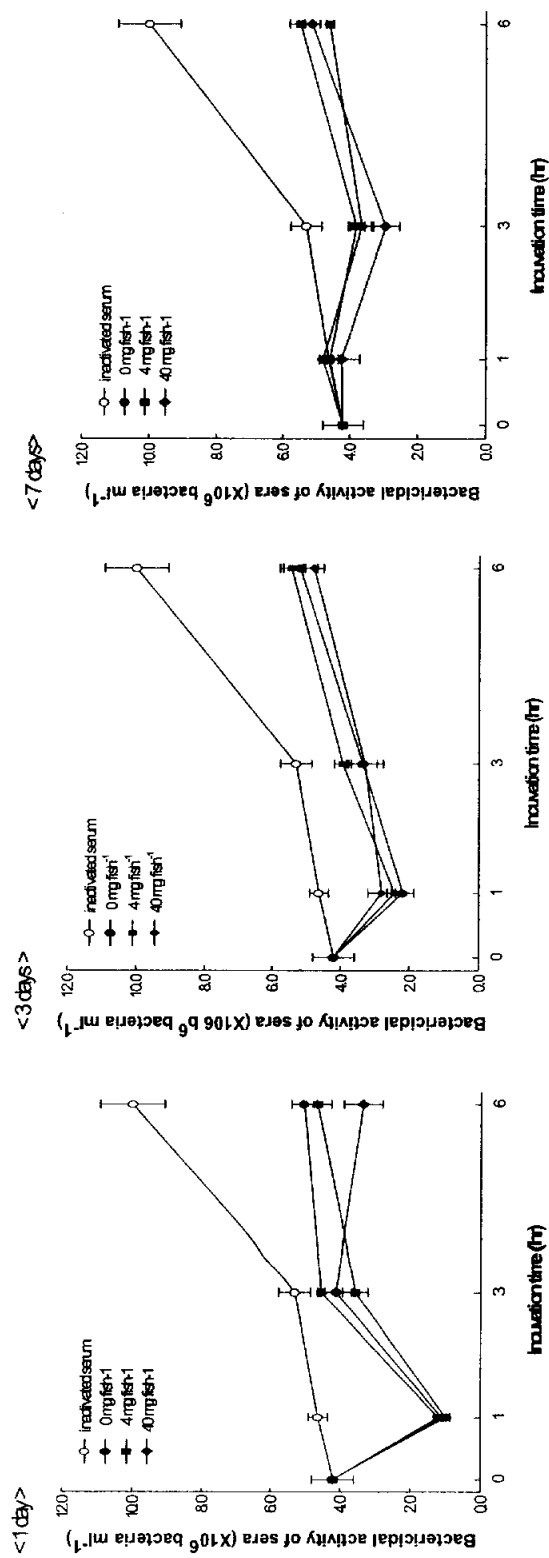


Fig. 14. Bactericidal activity of serum from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with *Edwardsiella tarda* ECPs. The response assessed at 1, 3 and 7 days after ECPs injection.

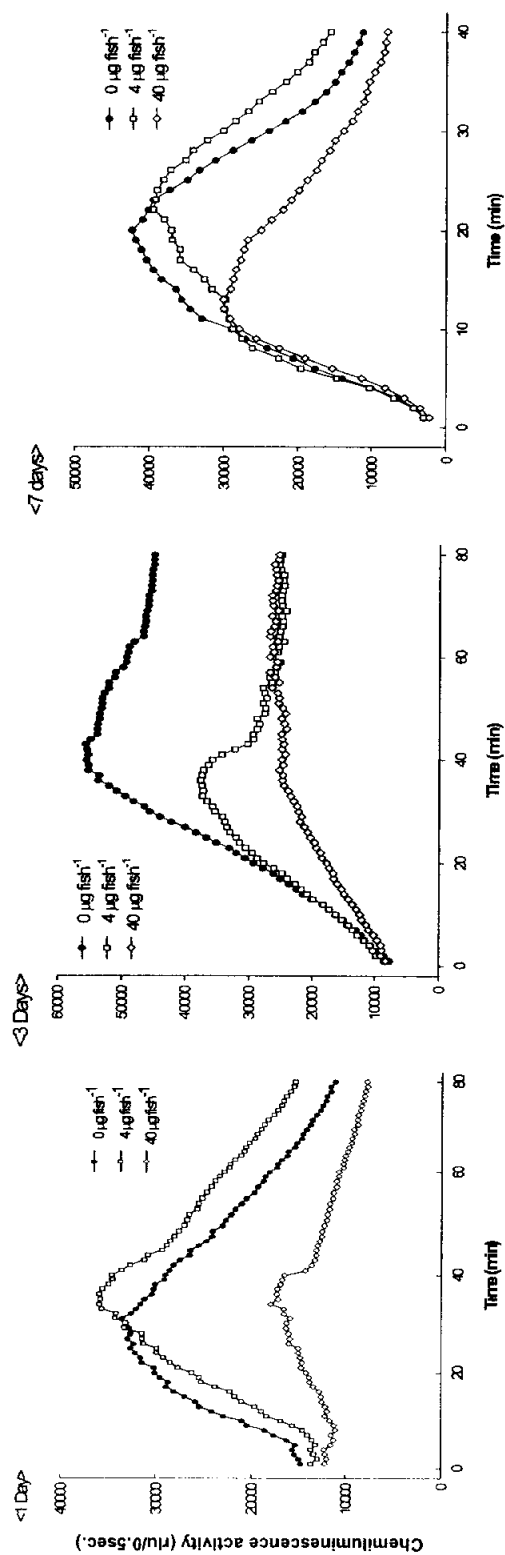


Fig. 15. Chemiluminescence response of head kidney macrophages from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intramuscularly with each concentration of *Edwardsiella tarda* extracellular products. The response assessed at 1, 3 and 7 days after ECPs injection.

IV. 고 찰

본 장에서는 *E. tarda* ECPs를 넙치에 근육 주사하여 투여되었을 때 생리학적 그리고 면역학적 영향에 대하여 조사하였다.

본 장의 실험에 사용한 *E. tarda* ECPs는 제 1장의 시험에서 생균의 치사 독성이 가장 강한 것으로 확인된 KE-1 균을 정하여 사용하였다. 적정 주사 농도를 확인하기 위하여 *E. tarda* KE-1 균주 ECPs의 넙치에 대한 96hr-LD₅₀를 구하였으며, 평균 체중 5.6g 크기의 넙치에 대한 LD₅₀은 $7.14\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$ ($40\mu\text{g fish}^{-1}$)로 확인되었다. 이 농도를 기준으로 하여 동일한 크기의 넙치에 ECPs를 근육 주사하여 폐사 경향을 확인하였다. ECPs의 주사에 의한 폐사는 고농도 시험구 뿐만 아니라 저농도 시험구에서도 지속적으로 나타나서 실험 14일째까지 폐사가 발생하였다. 이러한 폐사 경향은 *A. salmonicida* (Fyfe *et al.*, 1988)와 *P. damsela* subsp. *damsela* (Fouz *et al.*, 1993) 등의 세균 ECPs에 의하여 수 시간 또는 수 일 이내에 폐사가 나타나는 경향과 비교하여 장기적으로 그리고 서서히 진행되는 것으로 생각된다.

ECPs의 독성과 폐사에 대한 실험 결과를 바탕으로 하여 평균 체중이 $59.1\pm 3.1\text{g}$ 크기의 넙치에 0, 0.4 및 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 (주사된 ECPs의 최종 농도는 0, 0.15 및 $1.5\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$ 입) 농도로 근육 주사하여 주사 후 0, 1, 3, 5 및 7일에 hematocrit 치, 혈청 glucose, total protein, AST 및 ALT 등의 생리학적 인자에 대한 영향과 혈청 lysozyme 활성과 세균 살해능 및 CL response 등의 면역학적 인자에 대한 영향을 조사하였다. 이러한 농도의 설정은 ECPs 투여 후 폐사량을 측정한 결과 약 $0.714\mu\text{g g}^{-1}\text{ fish}$ 농도로 근육 주사하였을 때 1주일 후부터 폐사가 발생하므로 *E. tarda* ECPs에 의한 넙치의 비정상적인 생리학적 또는 면역학적 반응이 나타날 것으로 판단하였기 때문이다.

ECPs 주사 후 hematocrit 치의 변화를 조사한 결과, $4\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 시험구에서의 hematocrit 치는 대조구 ($0\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구)와 유사한 값

을 나타내었다. 그러나 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 시험구에서 주사 1일 이후부터 hematocrit 치가 감소하여 1주일째까지 유지되었으며, 대조구에 대하여 95% 신뢰 수준에서 유의적 차이가 나타나지 않았다 (7일째, $P=0.0654$). 이것은 *E. tarda* ECPs가 넙치의 적혈구에 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나, 제 1장의 hemolytic activity 측정에서 ECPs 첨가 약 72시간 이후에 적혈구 파괴가 관찰되는 실험 결과와 본 장의 ECPs 주사 1주일째의 hematocrit 치 변화를 연관하여 보면 *E. tarda* ECPs와 넙치 적혈구 사이에 생리학적 변화와 관련한 상호 작용이 있을 것으로 생각된다.

넙치에 *E. tarda* ECPs를 투여한 후 혈중 glucose 량을 측정한 결과, 대조구 ($0\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도) 및 저농도 ($4\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도) 주사실험구에서는 전과 김 (1998)의 보고와 유사한 수치 (14mg dl^{-1})를 나타내었으며, 1주일간 glucose 농도의 변화가 거의 나타나지 않았으나 고농도 ($40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도)로 주사한 실험구에서 3일째부터 급격히 증가하여 7일째까지 유의적으로 높은 상태로 유지되었다 ($P<0.05$). *E. tarda* FKCs와 LPS를 참돔에 투여하였을 때 total protein과 glucose 량에서는 대조구와 차이가 나타나지 않았지만, albumin 량은 대조구에 비하여 증가하는 것으로 보고된 것 (Salati *et al.*, 1987b)과 상반되는 결과를 나타내었다. 그러나 적혈구의 에너지 대사는 glucose에 의존하고 있으며 (노 등, 2001), ECPs 투여 후 hematocrit 치가 감소하는 것과 연계하면 *E. tarda* ECPs는 넙치의 적혈구 또는 적혈구막에 영향을 미쳐 glucose의 대사를 방해하며, 이로 인하여 적혈구 내에 흡수되지 못한 glucose로 인하여 혈청 내에서의 농도가 증가하는 것으로 판단된다.

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후 혈청 내 total protein 량을 조사한 결과, ECPs를 $0, 4$ 및 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사하였을 때 주사 5일째에 4 및 $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구에서의 total protein 농도가 같은 시기의 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며 ($P<0.05$), $40\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구에서는 1주일째에도 대조구에 대하여 유의성을 나타내었다($P<0.05$). 조피볼락을 45일간 기아 상태로 사육하면 total protein의 농도에는 변화가 없었으나, 장기간의 절식에 따른 단

백질원의 공급 차단에 의한 혈청 성분 중 단백질 농도의 저하를 보고한 예 (池田 등, 1986)와 total protein의 유의적 증가가 관찰되었으므로 1주일간의 절식에 따른 유의적 차이는 아닌 것으로 생각된다. 다만, 적혈구 파괴에 의한 세포 내 성분의 유리에 의한 total protein의 증가를 생각할 수 있으며, 이는 hematocrit 치의 감소와 혈청 내 glucose 농도의 증가와 관련이 있을 것으로 판단된다.

AST (Aspartate aminotransferase, GOT)와 ALT (Alanine aminotransferase, GPT)는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 아미노산과 α -케토산과의 사이에 아미노산기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포하고 있으며 (이와 김, 1988), 의학 분야에서는 이들의 측정으로 각종 질환, 특히 간질환 유무 판정에 이용되고 있다 (이와 정, 1975; 이와 김, 1988). ALT와 AST는 혈 중에 유출되는 대표적인 효소로 세포손상이 가벼운 경우 또는 투과성 변화에 의하여 팽창된 세포막을 통하여 세포질 내로부터 혈액 중으로 유출되기 때문이며, 간 손상 측정에 aminotransferase activity를 이용하는 것은 이러한 효소가 간에 많이 분포하며 손상을 받게 되면 혈액으로 빠르게 확산되기 때문이다 (Molander *et al.*, 1955; Asada, 1958; 이와 김, 1988). Gordon (1968)은 어류에서도 간에 장애를 받으면 이러한 효소의 수치가 상승하는 것으로 보고하였다. 또한 조피볼락에 장기간 동안 먹이를 주지 않아 기아 상태가 지속되거나 (명 등, 1997), 넙치에 수술 스트레스가 가하여 졌을 때 ALT 및 AST가 상승하여 간에 손상이 있는 것으로 보고하였다 (박 등, 1990). 본 연구에서의 ALT 및 AST의 변화를 조사하였을 때, 실험기간 동안 유의적 변화는 관찰되지 않았다 ($P < 0.05$).

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후의 반응에서 면역 factor 중 혈청 내 lysozyme activity의 결과는 실험기간 동안 대조구에 대하여 유의적 차이를 나타내지 않았다.

serum의 bactericidal activity를 조사하였을 때, 고농도 및 저농도로 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 47℃에서 30분간 불활성화한 혈청에 대해서는 유의적 차이를 나타내었으나 $0\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사된 넙치의 신선 혈청에 대해서는 유

의적 차이를 나타내지 않았다 ($p < 0.05$). 어류의 serum 내 complement에 의한 bactericidal activity는 non-immune fish의 방어에 중요한 역할을 하지만 (Iida and Wakabayashi, 1983; Nakai, 1985; Kanemori *et al.*, 1987), ECPs의 투여가 어류 serum 내의 보체 성분의 활성화에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

고농도 ($40\mu\text{g fish}^{-1}$)로 ECPs가 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 대조구에 비하여 CL response가 낮게 나타났으며 시간이 경과함에 따라 CL response가 대조구와 유사한 형태의 반응성을 나타내었다. 저농도 ($4\mu\text{g fish}^{-1}$)로 ECPs가 주사된 시험구에서는 주사 3일 후 대조구에 비하여 낮게 나타났으나 7일째에는 대조구와 유사한 수준으로 회복되었다. Densemore *et al.* (1998)에 따르면, *R. salmoninarum* ECPs는 brook trout splenic phagocytes의 respiratory burst와 phagocytic activity를 저하시키며, *A. hydrophilla* exotoxin을 주사한 후 6시간째에 생균을 주사한 증상과 유사한 병증이 관찰되었으며 (Kanai and Takagi, 1986), 이러한 독성은 hemolysins라고 추정하였다 (Thune *et al.*, 1986; Paniagua *et al.*, 1990). 또한 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상의 *V. pelagius* ECPs가 첨가된 turbot macrophage의 CL response가 유의적으로 감소한다고 하였다 (Villamil *et al.*, 2003).

이상의 결과에서 *E. tarda* ECPs는 넙치에 독성으로 작용하였다. 또한 혈액 glucose와 total protein량을 변화시키며, 신장 식세포의 활성을 억제하는 기능이 있는 것으로 확인되었다. 그러므로 ECPs는 넙치의 생리학적 및 면역학적 기능에 장기적으로 영향을 미치며, 생리학적 및 면역학적 인자에 대하여 장기적이며 다양한 영향을 나타내는 ECPs가 넙치 폐사와 관련하여 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

V. 요 약

전장의 실험 결과 생균 독성이 가장 강한 *E. tarda* KE-1 균주의 ECPs가 넙치에 인위적으로 투여되었을 때의 생리학적 그리고 면역학적 영향을 조사하고자 하였다.

평균 체중이 5.6g인 넙치에서의 *E. tarda* KE-1 균주 ECPs의 96hr-LD₅₀ 치는 약 0.714 μ g g⁻¹ fish가 되는 것으로 확인되었다. 또한 ECPs의 주사에 의한 폐사의 형태가 고농도뿐만 아니라 저농도에서도 지속적으로 나타나 실험 14일째까지 폐사가 발생하였다.

또한 평균 체중 59.1g 크기의 넙치에 0, 4 및 40 μ g fish⁻¹ 농도가 되도록 넙치의 근육에 주사하였을 때 나타나는 혈액 내 성분과 면역학적 반응을 조사하였다. 4 μ g fish⁻¹의 농도로 주사한 실험구에서의 hematocrit 치는 대조구 (0 μ g fish⁻¹의 농도로 주사한 실험구)와 유사한 값을 나타내었으나 40 μ g fish⁻¹의 농도로 주사한 실험구는 주사 1일 후부터 감소하는 경향을 나타내어 1주일째까지 감소하는 경향을 나타내었으나 P<0.05 수준에서의 유의차는 나타나지 않았다 (7일째, P=0.0654). 넙치에 *E. tarda* ECPs를 투여한 후 혈중 glucose량을 측정된 결과, 대조구 및 저농도 주사실험구 (4 μ g fish⁻¹의 농도)에서는 1주일간 glucose 농도의 변화가 거의 나타나지 않았으나 고농도 주사실험구 (40 μ g fish⁻¹의 농도)에서 3일째부터 급격히 증가하여 7일째까지 유의적으로 높은 상태로 유지되었다 (P<0.05). 혈청 내 total protein량을 조사에서는 주사 5일째에 4 및 40 μ g fish⁻¹의 농도로 주사한 실험구에서의 total protein 농도가 같은 시기의 대조구에서 보다 유의적 (P<0.05)으로 높게 나타났으며, 40 μ g fish⁻¹의 농도로 주사한 실험구에서는 1주일째에도 대조구에 대하여 유의적 차이를 나타내었다 (P<0.05). 그리고 ALT 및 AST의 변화를 조사하였을 때, 실험기간 동안 유의적 변화는 관찰되지 않았다 (P<0.05).

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후의 반응에서 면역 factor 중 혈청 내 lysozyme activity의 결과는 실험기간 동안 대조구에 대하여 유의적 차이를 나타내

지 않았으며, 고농도 ($40\mu\text{g fish}^{-1}$)로 ECPs가 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 대조구에 비하여 CL response가 낮게 나타났으며 시간이 경과함에 따라 CL response가 대조구와 유사한 형태의 반응성을 나타내었다. 또한 serum의 bactericidal activity를 조사하였을 때, 고농도 및 저농도로 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 47°C 에서 30분간 불활화한 혈청에 대해서는 유의적 차이를 나타내었으나 $0\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사된 넙치의 신선 혈청에 대해서는 유의적 차이를 나타내지 않았다 ($p<0.05$).

이러한 결과들을 종합해보면, 넙치 생체 내에 고농도의 ECPs가 투여되면 생체지표의 일부에 대하여 영향을 미치며, 면역 활성화에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

제 3 장 *Edwardsiella tarda* ECPs의 넘치 면역 기능에 미치는 영향

I. 서론

면역 반응이란 동물체 내에 존재하는 자기 방어 체계로서, 외부로부터 침입하는 각종 물질을 자기 자신과 구별해내어 이를 제거함으로써 생체 내의 항상성을 유지하는 생물학적 현상이다 (장 and 김, 1996).

숙주의 식세포는 외부 이물질을 제거하는 중요한 역할을 하며, 대표적인 식세포로서는 순환 혈액 중의 granulocyte와 신장의 macrophage가 잘 알려져 있다. 포유류의 경우, macrophage의 antimicrobial mechanism은 미생물이 분비하는 병원성 인자를 제거하는 작용과 미생물에 대한 살균 인자 등 독성 물질을 분비하는 것의 두 가지를 들 수 있으며 (Nathan and Gabay, 1992), 이러한 기작은 어류의 면역계에서도 적용되는 것으로 보인다 (Ellis, 1999). 어류의 granulocyte와 macrophage는 이물질을 투여하면 수일 이내에 그 수가 급격히 증가 (Secombes, 1996)하며, oxygen 및 nitrogen free-radical을 분비하여 세균이나 기생충 등의 병원체를 살해할 수 있다 (Secombes, 1990). 이러한 기능은 병원체의 침입에 의한 염증 반응 동안 뚜렷하게 나타나는데 (Suzuki and Iida, 1992), lipopolysaccharide나 muramyl depeptide 등의 생리활성 물질 (Kodama, 1994a) 뿐만 아니라 병원체 (Ellis, 1986; Suzuki and Iida, 1992; Woo, 1992)에 의해서도 유도된다.

Densmore *et al.* (1998)과 Chen *et al.* (2001)은 *Renibacterium salmoninarum*과 *Mycobacterium* sp.의 ECPs에 대한 연구 결과 ECPs가 강송어 (brook trout)와 무지개 송어 (rainbow trout) 식세포의 활성을 억제하며, 그 이유는 ECPs에 의한 respiratory burst 활성 억제에 의한 식세포의 세포 내 세균 살해능 저하와 관련이 있을 것으로 보았다. 그러나 Kawahara *et al.* (1991)은 *Aeromonas salmonicida* 균의 ECPs가 white-spotted char의 식세포에 대하여 영향을 미치지 않는다고 하였다.

그러므로 본 장에서는 *E. tarda* ECPs가 넙치의 면역 기능, 특히 peripheral blood phagocyte, head kidney macrophage와 lymphocyte에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 즉 peripheral blood phagocyte를 분리하여 phagocytic activity를 측정하였고, 넙치의 신장 macrophage를 분리하여 각 농도의 *E. tarda* ECPs를 첨가하였을 때 macrophage에 대한 bacterial invasion, respiratory burst 및 bactericidal activity에 대한 영향을 측정하였다. 또한 신장 lymphocyte를 분리하고 여러 가지 농도의 *E. tarda* ECPs를 첨가하여 proliferation에 대한 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

실험에 사용한 넙치는 부산시 기장군 소재의 양어장으로부터 공급받았다. 어류의 평균 전장은 24.9 ± 0.8 cm, 평균 체중은 222 ± 23.2 g이었다. 실험어는 1 ton 용량의 유수식의 수조에서 순치하였으며 수온은 15-17℃ 이었다. 사육 기간 동안 매일 일정량의 상업용 부상사료 (천하제일사료)를 넙치에 공급하였으며, 필요에 따라 무작위로 취하여 실험에 사용하였다.

2. *E. tarda* ECPs의 분리와 정제

시험균으로 선정된 *E. tarda* KE-1으로부터의 ECPs 분리는 제 1 장의 ECPs의 제조에서와 같게 하였다.

3. Bacterial invasion assay

ECPs가 *E. tarda*의 macrophage 내 포식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Tang *et al.* (1993)을 이용하였으며, macrophage 내의 세균수를 측정하기 위하여 Secombes (1990)의 방법을 이용하였다. 즉 식세포 내의 세균수는 세균 집락 계수 (colony count)와 3(4,5-di-methylthiazoyl-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) 용액의 환원량을 흡광도로 측정하였다.

1) Bacterial invasion assay

어체 통과한 *E. tarda* 균을 27℃에서 24시간 동안 배양하였다. 0.1% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 1.5×10^6 cell ml^{-1} 로 조정된 macrophage 현탁액 100 μl 를 96-well plate의 각 well에 첨가하고, 20℃에서 2시간 동안 배양한 후 비부착 세포를 제거하였다. Antibiotics free-RPMI-1640 (0.1% FBS)을 이용하여 2회 세척하고, 각 농

도로 조정된 *E. tarda* ECPs solution 100 μ l를 각 well에 첨가하였다. 20℃에서 1시간 동안 배양한 후 3 $\times$ 10⁷ cell ml⁻¹로 조정된 세균 현탁액 50 μ l (m.o.i. $\approx$ 10)를 첨가하여 20℃에서 2시간 동안 배양하였다. 100 μ g ml⁻¹ gentamicin을 첨가하여 extracellular bacteria를 살균하고, RPMI-1640 배지로 3회 세척하였다.

2) 세균 집락 계수

식작용에 관여한 macrophage 내의 세균수를 측정하기 위하여 1% Triton X-100 용액을 첨가하여 세포내 세균을 유출시켰다. 이 용액을 멸균 생리식염수로 10배 단계 희석하여 각 희석 단계의 용액 25 μ l를 TSA 배지에 접종하고 28℃, 36시간 동안 배양하여 세균 집락을 계수하였다 (Miles and Misra, 1938).

3) MTT 환원 시험

Macrophage 내의 세균수를 측정하기 위하여 1% Triton X-100 용액을 첨가하여 세포내 세균을 유출시켰다. 여기에 TSB 100 μ l를 첨가하여 18℃, 16시간 동안 배양하고 멸균 증류수로 5mg ml⁻¹의 농도로 제조한 MTT 용액 10ml를 plate의 각 well에 첨가하였다. plate는 15분간 진탕 배양하고 600nm의 파장에서 흡광도로 측정하였다.

4. 신장 macrophage의 식작용능

넙치 macrophage의 식작용능을 측정하기 위하여 Alcorn *et al.* (2002)의 방법으로 실험하였다. 밀도 구배법을 사용하여 분리한 백혈구를 0.1% FBS (FBS, GibcoBRL)와 1% antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)가 첨가된 RPMI-1640 (pH7.4, Sigma)을 사용하여 1 $\times$ 10⁶ leucocytes ml⁻¹로 조정하고 multiwell cell culture system (Sigma)에 100 μ l의 세포 현탁액을 2반복구로 분주하였다. 각 multiwell cell culture system을 20℃ 습윤 상자 내에서 2시간 동안 반응시키고 비부착 세포는 미리 20℃로 조정된 RPMI-1640 (1% FBS, pH 7.4) 500 μ l로 각각 2회 세척하였다. 여기에 ECPs의 최종 농

도가 0, 0.73, 2.94, 11.74, 46.97, 187.88 및 $375.76 \mu\text{g ml}^{-1}$ 되도록 첨가하고 20℃, 2시간 동안 배양한 후 RPMI-1640 (1% FBS, pH 7.4)으로 다시 2회 세척하였다. 그리고 10% FBS, 2% 넘치 신선 혈청이 포함된 RPMI-1640 (pH 7.4)을 이용하여 1×10^8 bacteria cells ml^{-1} 로 조정하고 이 세균 현탁액 200 μl 를 multiwell cell culture system의 각 well에 첨가하여 1시간 동안 배양하였다. 각 well에 1% paraformaldehyde가 포함된 PBS (pH 7.4) 500 μl 를 첨가하여 30분간 고정하고, PBS로 2회 세척 후 공기 건조하였다. 각 multiwell cell culture system은 May-Grünwald Giemsa stain으로 염색하고, 염색 표본을 건조하고 봉입하여 광학현미경 (Olympus BX41TF)으로 관찰하였다. Macrophage의 식작용능은 식세포 100 세포를 계수하고, 각 식세포 당 식작용된 세균수를 계수하였다.

5. 말초 혈액 식세포의 식작용능

말초 혈액 중 whole blood cells의 식작용능을 확인하기 위하여 Kusuda and Taira (1990)의 방법에 따랐다.

1) 항원의 제작

E. tarda KE-1 strain을 TSB (Difco) 배지에서 27℃, 24시간 동안 배양한 다음 $10,000 \times g$, 30분간 원심 분리하여 집균한 후 생리 식염수 (physiological saline, PS)로 2회 세척하였다. 세척된 세균을 PS로 5g ml^{-1} 의 농도로 세균 현탁액을 만들었다. 이 세균 현탁액에 0.5% (v/v) formaldehyde solution을 첨가하여 overnight 하고 동일한 방법으로 원심 분리하여 집균과 세척을 한 다음 PS를 이용하여 최종 농도가 200 mg ml^{-1} 의 농도로 재현탁한 것을 시험용 항원액으로 제작하여 냉장 보관하면서 필요에 따라 사용하였다.

2) 식작용능

heparin이 처리된 주사기를 이용하여 넙치의 미부정맥으로부터 채혈하였다. 준비된 혈액은 silicon 처리된 시험관에 500 μ l씩 분주하고 다양한 농도의 ECPs를 첨가하여 최종 농도가 0, 0.73, 11.74, 187.88 및 375.76 μ g ml⁻¹ 되도록 첨가하였다. 시험용 항원 25 μ l를 각 시험관에 첨가하여 18℃의 shaking incubator (75 rpm) 에서 배양하였다. 배양 후 0.5, 1 및 3시간째에 혈액 시료를 slide glass에 도말하고 May-Grünwald Giemsa stain 하였다. 말초혈액 내 식세포의 식균능은 아래의 식과 같이 식균율 (phagocytic rate)와 식균지수 (phagocytic index)로써 평가하였다.

$$\text{phagocytic rate(\%)} = [\text{number of phagocytes which phagocyted bacteria} \\ / \text{number of observed phagocytes}] \times 100$$

$$\text{phagocytic index} = \text{number of phagocytised bacteria} \\ / \text{number of phagocytes which phagocyted bacteria}$$

6. Chemiluminescence (CL) response

신장 식세포의 ECPs 각 농도에 대한 CL response 측정은 Baier-Anderson and Anderson (2000)의 방법에 따라 이루어졌다.

1) 신장 식세포의 준비

무균적으로 적출한 넙치의 두신을 10 units ml⁻¹ heparin, 100 μ g ml⁻¹ penicillin/100 μ l ml⁻¹ streptomycin이 첨가된 phenol red-free Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, Sigma) 5ml가 주입된 1회용 소형 petridish 내의 nylon mash에 넣어 마쇄하여 신장 세포를 유리시켰다. 유리된 신장 세포를 34-51% percoll gradient (Sigma)에 중층시키고 500 $\times$ g, 30min, 4℃에서 원심 분리하여 percoll gradient 중앙부의 세포층을 분리하였다. 분리한 세포는 1% FBS가 첨가된 phenol red-free HBSS (pH 7.4)으로 2회 세척

하고 0.1% FBS가 첨가된 RPMI-1640 (pH 7.4)을 첨가하여 세포를 재현탁하였다. 이 세포 현탁액을 trypan blue exclusion 방법 (Hudson and Hay, 1989)으로 계수하여 세포의 생존율이 95% 이상임을 확인하고 1.5×10^6 cells ml^{-1} 의 농도로 조정하여 실험에 사용하였다.

2) 감작 zymosan의 준비

zymosan 0.02g을 넙치의 신선 혈청 1ml에 첨가한 다음 20℃에서 25분간 배양하였다. 이것을 2,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 혈청을 제거한 후 HBSS를 첨가하여 희석시켰다. 이를 다시 원심 분리하여 상청액을 제거한 다음, HBSS 용액으로 총량을 10ml로 조정해 두고 사용할 때까지 얼음에 보관하면서 실험에 사용하였다 (Metcalf *et al.*, 1986).

3) CL response

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, Sigma) 용액은 멸균 생리식염수를 이용하여 10mg ml^{-1} stock solution으로 제작한 다음 aluminium foil로 광성을 차단하여 4℃에 보관하였으며, 1mg ml^{-1} 의 농도로 working solution을 희석하여 사용하였다 (Scott and Klesius, 1981).

CL assay는 white-adapted 96-well plate (Packard)를 사용하였으며, well 당 식세포 현탁 $100\mu\text{l}$, luminol 용액 $20\mu\text{l}$ 및 자극 zymosan 용액 $80\mu\text{l}$ 을 첨가하고 luminometer (LumiCount™, Packard Bioscience Co.)로 0.5 초의 노출 시간으로 측정하였다.

7. 신장 식세포의 세균 살해능

ECPs 농도에 따른 신장 식세포의 세균살해능 측정은 Secombes (1990)의 방법에 따라 시험하였다.

1) 신장 식세포 monolayer의 준비

신장 식세포의 monolayer는 CL response 측정에서와 같은 방법으로 준비하였으며, 96-well plate (Packard)에 분주된 신장 식세포 시험액의 최종 농도는 3.45×10^4 cells well⁻¹ 이었다. 각 plate는 18℃, 1시간 동안 배양하고 *E. tarda* ECPs를 각 농도 별로 첨가하여 다시 18℃, 1시간 동안 배양한 후 상정액을 제거하였다.

2) 시험 균액 제작

Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)에서 27℃, 24시간 동안 배양한 *E. tarda* 균을 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 접종하여 27℃, 18시간 동안 배양한 균을 실험에 사용하였다. 대수증식기의 배양균을 spectrophotometer에 의한 표준 곡선을 이용하여 균을 계수하여 5.7×10^6 cfu ml⁻¹로 조정하여 시험 균액으로 준비하였다.

3) Bactericidal activity

준비된 신장 식세포 monolayer를 antibiotics free-RPMI-1640 배지 (0.1% FBS)로 2회 세척하고, antibiotics free-RPMI-1640 배지 (5% FBS) 100μl를 각 well에 분주하였다. 여기에 시험 균액 20μl를 식세포 monolayer에 3반복 시험구로 첨가하고 plate를 가볍게 흔들어 세균을 일정하게 퍼지게 하였다. 이를macrophage와 세균이 잘 접촉할 수 있도록 150×g, 5분간 원심 분리하고 5% CO₂, 18℃, 5시간 동안 배양하였다. 배양 후 상정액을 제거하고 0.2% Tween-20 용액 50μl를 각 well에 분주하여 식세포를 용해시켰다. 각 well에 100μl의 TSB를 분주하고 18℃, 16시간 배양하고 5mg ml⁻¹ 농도로 제작된 MTT (Sigma) 용액 10μl를 각 well에 첨가하였다. 잘 흔들어서 15분간 실온에서 반응시키고 multiscan spectrophotometer (Packard Bioscience Co.)를 이용하여 592nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Nitric oxide (NO) assay

각 농도의 ECPs 첨가에 따른 NO 생성에 대한 시험은 Tafalla and Novoa (2000)의 방법에 따랐다. 신장 식세포 현탁액은 CL response에서 신장 식세포의 준비에서와 같이 제조하고, 이 현탁액을 96-well plate (Packard)의 각 well에 100 μ l 씩 분주하였다. plate는 18 $^{\circ}$ C, 2시간 동안 배양하고 RPMI-1640 배지 (1% FBS)로 2회 세척하였다. ECPs를 10% FBS (GibcoBRL)와 1% antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)가 첨가된 RPMI-1640 (pH7.4, Sigma)을 사용하여 0, 0.18, 0.73, 2.94, 11.74, 40.17, 187.88 및 375.76 μ g ml $^{-1}$ 로 제조하고 이를 plate의 각 well에 첨가하였다. 이 plate를 18 $^{\circ}$ C, 2시간 및 72시간 동안 배양한 후 각 well의 배양 상정액 50 μ l를 새로운 96-well plate에 옮기고 2.5% phosphoric acid으로 조제된 1% sulphanilamide (Fluka) 용액 100 μ l를 첨가한 후 2.5% phosphoric acid으로 조제된 0.1% N-naphthyl-ethylenediamine (Sigma) 용액 100 μ l를 첨가하였다. 이 plate는 multiscan spectrophotometer (Packard Bioscience Co.)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 well 내의 nitrite molar 농도는 sodium nitrate로 표준 곡선을 만들고 이 표준 곡선에 준하여 값을 구하였다.

9. 두신 macrophage의 생존 상태 측정

두신 macrophage의 ECPs에 대한 생존 상태는 Villamil *et al.* (2003)의 방법에 따라 측정하였다. 96-well plate (Packard)에 5 $\times$ 10 6 cells ml $^{-1}$ 로 조정된 macrophage 용액 (viability, $\geq$ 99%) 100 μ l씩을 분주하고 ECPs 용액을 10% FBS (GibcoBRL)와 1% antibiotic-antimycotic agent (GibcoBRL)가 첨가된 RPMI-1640 (pH7.4, Sigma)을 사용하여 0, 0.73, 2.94, 11.74, 46.97, 187.88 및 375.96 μ g ml $^{-1}$ 의 농도가 되도록 제조하여 각 well에 2반복으로 첨가하였다. ECPs 첨가 후 6, 18 및 48 시간째에 배양 plate를 얼음 위에서 10분간 방치하고 trypan blue exclusion으로 macrophage의 viability를 측정하였다. macrophage viability는 광학현미경 (BX41TF, Olympus)으로 300-500 cell 당 살아있는 cell의 비율로 나타내었다.

10. 림프구 증식

1) 림프구의 분리

넙치의 림프구 분리는 Kemenade *et al.* (1995)의 방법으로 분리하였다. 넙치두신을 적출한 후 5% FBS, $100\mu\text{g ml}^{-1}$ penicillin/ $100\mu\text{l ml}^{-1}$ streptomycin 및 10 units ml^{-1} heparin이 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 nylon mesh에 통과하여 세포 현탁액을 만들었다. 이 세포 현탁액을 34 및 51% percoll gradient에 중층하여 $500\times\text{g}$, 4°C , 30분간 원심 분리하여 백혈구층을 분리하였다. nylon mesh를 충진하여 멸균 주사기 column을 만들고 여기에 백혈구 분리액을 넣어 18°C , 2시간 동안 정지 배양하였다. 주사기 column의 cock를 열고 비부착 세포를 멸균된 새로운 plastic tube (Corning Inc.) 취하여 림프구를 얻었다. 이 세포 현탁액을 trypan blue exclusion 방법 (Hudson and Hay, 1989)으로 계수하여 $1.2\times 10^6\text{ cell ml}^{-1}$ 의 농도로 조정하였다.

2) costimulation 용액의 준비

실험에 사용한 costimulation 용액은 *E. tarda* ECPs 용액을 10% FBS, 2% 넙치 신선 혈청, 100 units ml^{-1} penicillin/ $100\mu\text{l ml}^{-1}$ streptomycin 및 10 units ml^{-1} heparin이 첨가된 L-15 medium을 이용하여 0, 1.46, 5.88, 23.48, 93.94, 375.76 및 $751.92\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 농도가 되도록 하였다. 이 ECPs 용액을 96-well plate의 각 well에 3반복으로 첨가하였다. 양성 대조구로는 T lymphocyte 활성화를 유도한다고 알려진 lectin 중 Concanavalin A (Con A), phytohaemagglutinin (PHA) 및 Chart *et al.* (1994)의 방법으로 제작된 *E. tarda* KE-1 crude LPS를 상기와 동일한 농도로 제작하여 사용하였으며, 음성 대조구로서 L-15 medium을 사용하였다.

3) 림프구 증식 시험

림프구 증식시험은 cell proliferating reagent WST-1 kit (Roche Diagnostics, Germany)와 BrdU incorporation (Roche Diagnostics, Germany)의 측정법을 사용하였

다.

① Cell proliferating reagent WST-1에 의한 측정

10% FBS, 2% 넘치 신선 혈청, 100 units mL^{-1} penicillin/100 μL mL^{-1} streptomycin 및 10 units mL^{-1} heparin이 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 미리 1.2×10^6 cell mL^{-1} 로 조정된 림프구 현탁액을 96-well plate (Packard)의 각 well에 100 μL 씩 분주하고 18°C, 96시간 동안 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 각 well에 10 μL 의 cell proliferating reagent WST-1을 첨가하여 2시간 동안 반응시킨 후 흡광도 650nm를 대조로 하여 450nm에서 값을 측정하였다 (Köllner and Kotterba, 2002).

② BrdU incorporation의 측정법에 의한 측정

미리 준비한 림프구 현탁액을 10% FBS, 2% 넘치 신선 혈청, 100 units mL^{-1} penicillin/100 μL mL^{-1} streptomycin 및 10 units mL^{-1} heparin이 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 1.2×10^2 - 1.2×10^5 cells mL^{-1} 의 농도로 조제하고 이 세포 현탁액을 96-well plate (flat, clear bottom)의 각 well에 100 μL 씩을 분주하였다. 각 well에 다양한 농도로 조정된 costimulation 용액을 100 μL 씩 첨가하여 각 well 내 ECPs의 최종 농도가 0, 0.73, 2.94, 11.74, 46.97, 187.88 및 375.96 μg mL^{-1} 의 농도가 되도록 하였다. 반응시킨 plate를 20°C, 72 시간 배양하였다 (5% CO_2 and humidified atmosphere). 배양 후 각 well 당 10 μL BrdU labelling solution을 첨가하고 12시간 동안 배양하였으며 300×g, 10분간 원심 분리하여 상정액을 조심스럽게 제거하였다. plate는 60°C, 1시간 동안 건조하고, 200 μL well $^{-1}$ FixDenat solution (Roche Diagnostics, Germany)을 첨가하여 20°C, 30분간 배양하였다. FixDenat solution을 제거하고 100 μL well $^{-1}$ anti-BrdU-POD working solution (Roche Diagnostics, Germany)을 첨가하고 20°C에서 약 90분간 반응한 후 antibody conjugate를 제거하였다. microtiter plate는 200 μL well $^{-1}$ washing solution으로 3회 세척하고 각 well 당 100 μL 의 기질 용액을 첨가하여

약 3분간 진탕한 다음 microplate luminometer (LumiCount™, Packard Bioscience Company)를 이용하여 발광 정도를 측정하였다 (Gauthiera *et al.*, 2003).

11. Statistical analysis

유의성 검증은 Student's *t*-test를 이용하였으며, 모든 결과에 대하여 $P < 0.05$ 일 때 유의차가 있는 것으로 판정하였다. Bactericidal activity의 유의성 검증은 $P < 0.05$ 및 $P < 0.01$ 일 때 유의차를 판정하여 통계 처리를 하였다.

III. 결과

1. Bacterial invasion assay

E. tarda ECPs를 투여한 후 신장 macrophage의 invasion activity를 측정한 결과는 Fig. 16에 나타내었다. Fig. 16의 A는 다양한 농도의 ECPs와 반응시킨 넙치 macrophage에 대한 invasion bacterial cell number를 TSA plate에서 측정한 결과로서, 반응 1시간째에 ECPs가 포함된 well에서 macrophage 내로 유입된 세균수가 급격히 증가하며, 0.73 및 2.94 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 에서 macrophage 내로의 침입이 가장 높게 나타났다. 반응 3시간째에서 ECPs의 농도가 증가할수록 세균의 macrophage 내 침입 세균수도 증가하는 경향을 나타내었다.

다양한 농도의 *E. tarda* ECPs 첨가에 따른 신장 macrophage에 대한 세균 침입능을 흡광도로 측정한 것은 Fig. 16의 B에 나타내었다. ECPs의 첨가량이 증가할수록 세균 침입능이 증가하였으나 ECPs 농도 0.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 를 정점으로 감소하기 시작하여 40.17 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상의 양에서부터 급격히 감소하였다. 그 결과 ECPs 무첨가구인 대조구에 비하여 저농도 첨가구 (0.18 $\mu\text{g ml}^{-1}$)에서는 invasion activity의 유의적으로 증가하며, ECPs 고농도 첨가구 (375.76 $\mu\text{g ml}^{-1}$)에서는 유의적으로 감소하는 결과를 확인할 수 있었다 ($P < 0.05$).

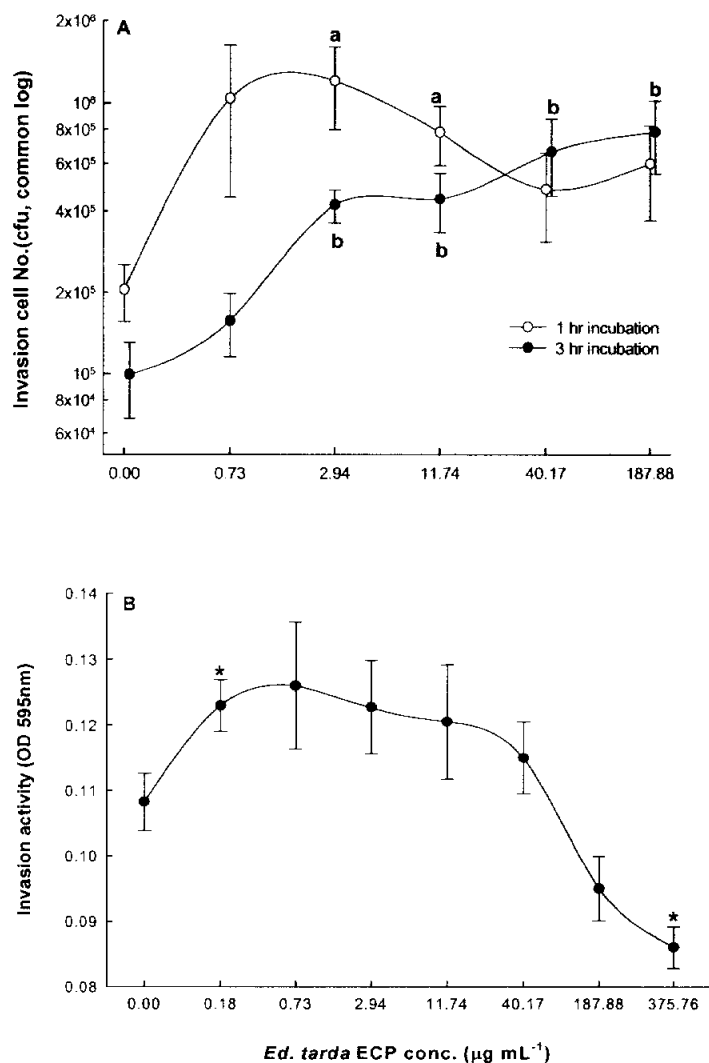


Fig. 16. Bacterial invasion assay in the kidney macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. A, bacterial cell counting depend on colony count method. The 'a' and 'b' indicates significant difference of the invasion cell number for *Edwardsiella tarda* ECPs treatment groups compared to untreated group at 1hr and 3hrs incubation. B, bacterial cell counting depend on MTT assay. The * indicates significant difference of the optical density for ECPs treatment group compared to untreated group.

2. 신장 식세포의 식작용능

신장 식세포의 식작용능을 조사한 결과는 Fig. 17에 나타내었으며, 식균지수로 판정하였다. *E. tarda* ECPs가 $0.73\mu\text{g well}^{-1}$ 의 농도로 첨가한 시험구의 측정값이 3.2456 ± 0.30 으로 다른 시험구에 비하여 높게 나타났으나, 유의적 차이는 확인할 수 없었다 ($P=0.0926$). 또한 ECPs를 $0.73\mu\text{g well}^{-1}$ 이상으로 첨가하였을 때의 시험 결과에서도, ECPs 첨가량이 증가하여도 식균 지수의 유의적 차이는 관찰되지 않았다.

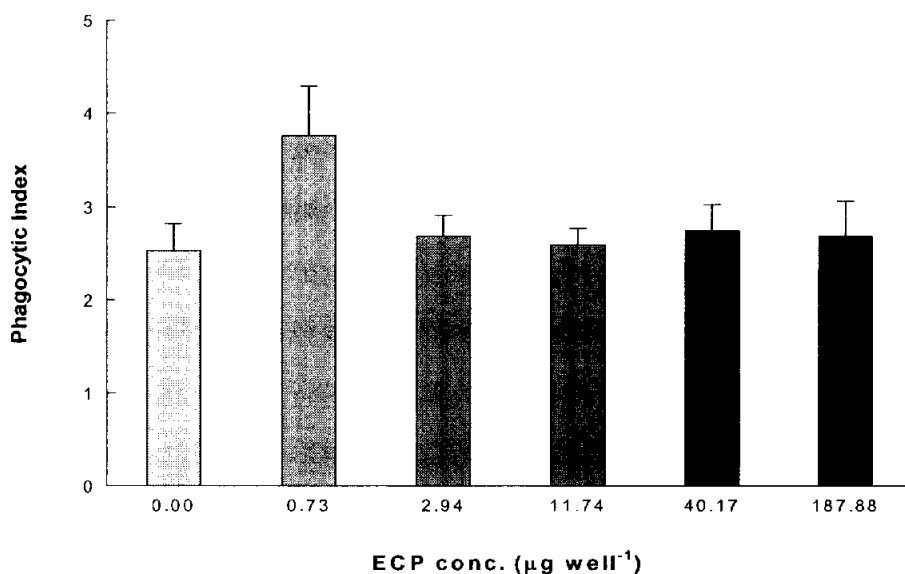


Fig. 17. Phagocytic index of kidney macrophages of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* inoculated with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs.

3. 말초 혈액 식세포의 식작용능

E. tarda 생균과 formalin 사균을 항원으로 사용하여 혈액 whole cell의 phagocytic activity를 측정한 결과는 Fig. 18에 나타내었다.

넙치의 whole blood에 *E. tarda* 생균을 항원으로 반응시킨 시험구 중 혈액 ml 당 12.5 μ g의 ECPs를 첨가한 시험구의 phagocytic rate는 82.16 ± 2.69 %로서 높게 나타났으나 ECPs 첨가량이 증가할수록 phagocytic rate가 감소하는 경향을 보였다. 그러나 대조구에 대한 각 시험구의 유의적 차이는 나타나지 않았다 ($P < 0.05$). 또한 혈액 ml 당 0.75 μ g의 ECPs를 첨가한 시험구에서 phagocytic index가 4.726 ± 0.39 로서 높게 나타났으며 ECPs의 농도가 증가할수록 phagocytic index가 감소하는 경향을 보였다. 그리고 혈액 ml 당 ECPs를 400 μ g 첨가한 시험구에서는 phagocytic index가 2.29 ± 0.22 ($P = 0.094$)로 나타났으나 대조구와의 유의적 차이는 확인할 수 없었다 ($P < 0.05$).

넙치의 whole blood에 *E. tarda* FKC를 항원으로 반응시켜 phagocytic rate를 측정하였을 때 생균과 반응시킨 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 ECPs 첨가에 따른 phagocytic index를 확인한 결과도 생균 첨가 시험에서와 유사한 값을 나타내었으나 혈액 ml 당 ECPs를 375.76 μ g을 첨가한 시험구에서는 phagocytic index가 대조구와의 유의적 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$).

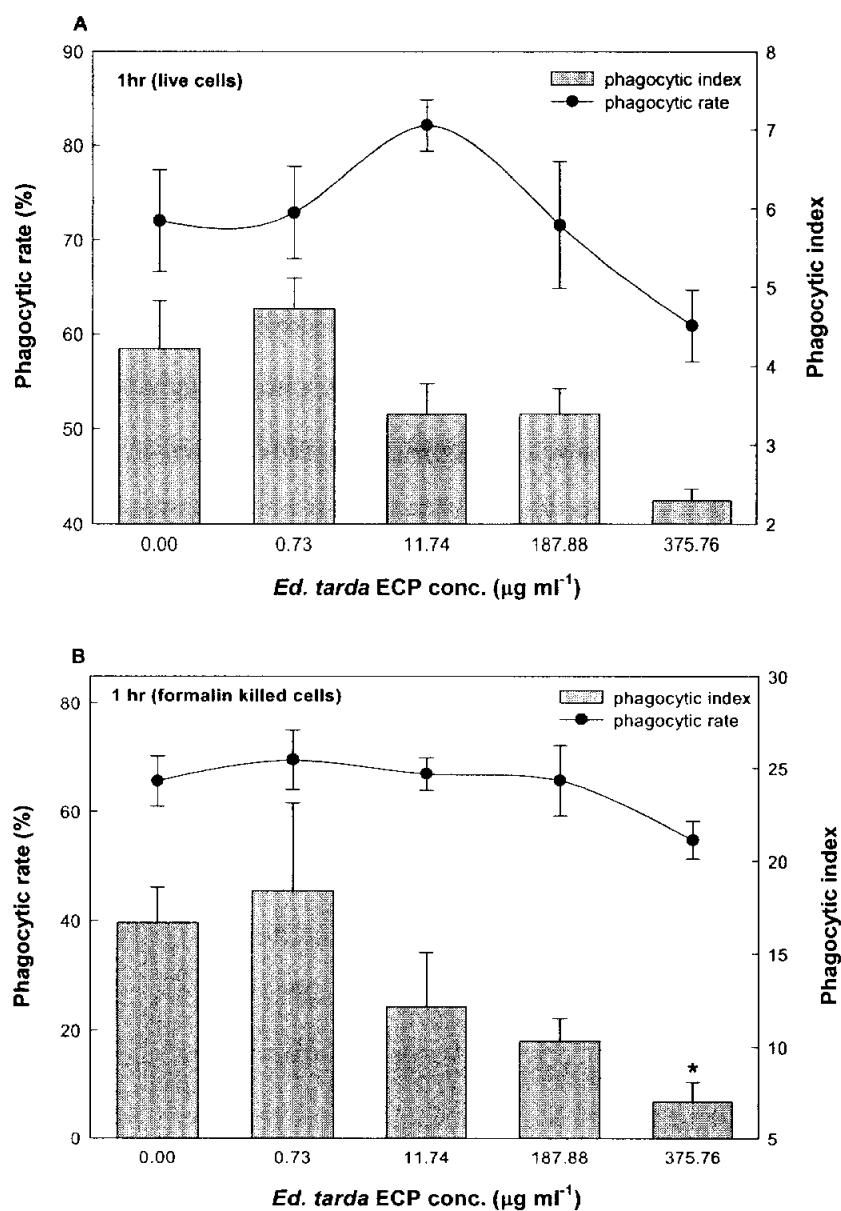


Fig. 18. Phagocytic activity of whole blood leucocytes from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* stimulated by *Edwardsiella tarda* KE-1 ECPs. An asterisk is significantly different from the untreated control.

4. CL response

E. tarda ECPs에 대한 신장 macrophage의 phagocytic activity를 CL response로 측정한 결과는 Fig. 19와 같다.

ECPs를 저농도인 $0.73\mu\text{g mL}^{-1}$ 로 첨가한 시험구의 CL 측정치가 대조구보다 높게 나타났으나 $2.94\text{--}11.74\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도 시험구에서는 대조구와 유사한 측정치를 보였으며, $46.97\mu\text{g mL}^{-1}$ 이상의 시험구에서는 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 측정치를 나타내었다 ($P<0.05$). 특히, $187.88\mu\text{g mL}^{-1}$ 이상의 농도에서는 CL response가 거의 나타나지 않을 정도로 반응이 미약하였다.

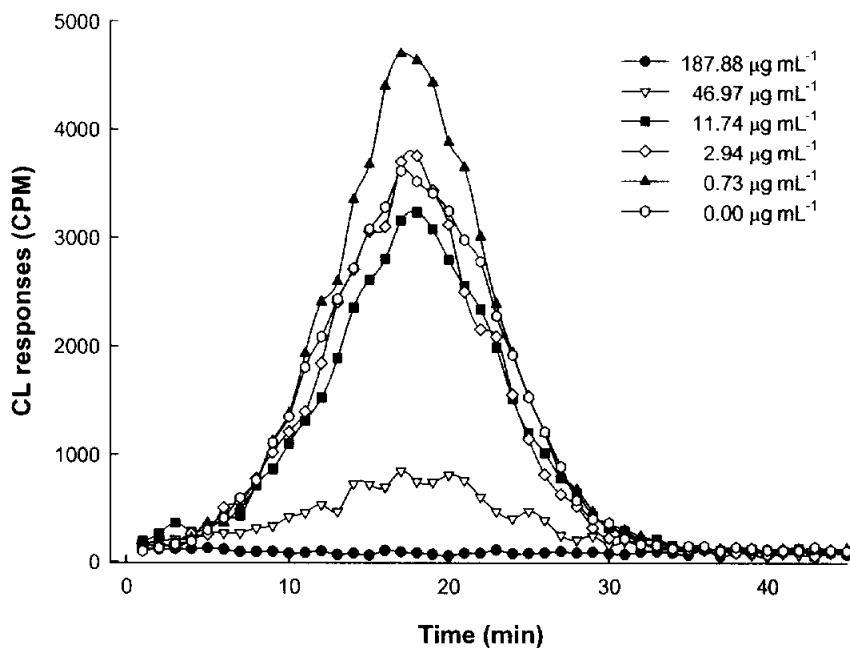


Fig. 19. Chemiluminescence responses of head kidney macrophage from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* inoculated with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs. Relative luminescence units (rlu).

5. 세균 살해능

넙치의 신장 대식세포에 식작용된 *E. tarda* 균의 살해능을 조사하기 위하여 각 농도별로 ECPs를 첨가하여 세균 살해능을 측정한 결과는 Fig. 20에 나타내었다. 시험 결과, 저농도인 0.18 및 $0.73\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 ECPs가 첨가되었을 때 bactericidal activity가 대조구에 비하여 증가하는 것으로 관찰되었으나 유의적 차이는 나타나지 않았다 ($p<0.05$). 그러나 $0.73\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 농도 보다 많은 양의 ECPs 첨가될수록 신장 대식세포의 세균 살해능이 저하되었으며, $11.74\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 ECPs가 첨가되었을 때 대조구에 비하여 유의적 차이를 나타내었으며 ($p<0.05$), 40.17 및 $375.76\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 ECPs가 첨가되었을 때는 $p<0.01$ 에서 대조구에 대하여 유의적 저하가 관찰되었다.

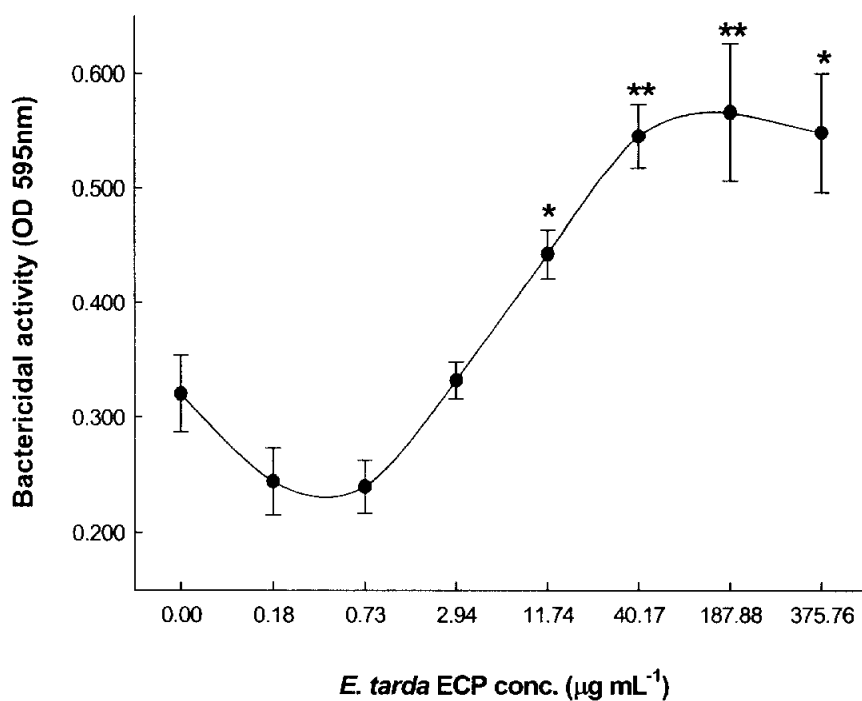


Fig. 20. Bactericidal activity of head-kidney macrophages from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* inoculated with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs. The activity assessed by allowing the bacteria surviving after a 1hr incubation with the macrophages before determining the amount of MTT reduced. The * and ** indicates significant difference of the optical density for *Ed. tarda* ECPs treatment groups compared to untreated group, $P < 0.05$ and $P < 0.01$.

6. Nitric oxide assay

E. tarda ECPs 첨가량에 대한 신장 대식세포의 NO 생성량을 배양 2시간째와 72시간째에 확인한 결과는 Fig. 21에 나타내었다.

신장 대식세포에 ECPs를 반응 시킨 2시간째의 결과는 Fig. 21의 A에서와 같다. ECPs를 첨가하지 않은 대조구의 nitrite 생성량은 $3.50 \pm 0.87 \mu\text{M}$ 이었으며, ECPs의 첨가 농도가 $0.18\text{--}40.17 \mu\text{g ml}^{-1}$ 일 때, 대조구에 비하여 유의적 감소가 나타났다 ($p < 0.05$). 그러나 ECPs의 첨가 농도가 $375.76 \mu\text{g ml}^{-1}$ 일 때, 대조구에 비하여 유의적 증가가 확인되었다 ($p < 0.01$).

신장 대식세포와 ECPs를 반응 시킨 72시간째의 결과는 Fig. 21의 B에서와 같다. NO 생성에서 72시간째의 결과는 2시간째의 결과와 경향이 유사하였다. 다만 ECPs의 첨가량이 $11.74 \mu\text{g ml}^{-1}$ 일 때, 유의적 감소가 확인되었으며 ($p < 0.05$), ECPs의 첨가량이 $375.76 \mu\text{g ml}^{-1}$ 일 때, 대조구에 비하여 유의적 증가가 확인되었다 ($p < 0.01$).

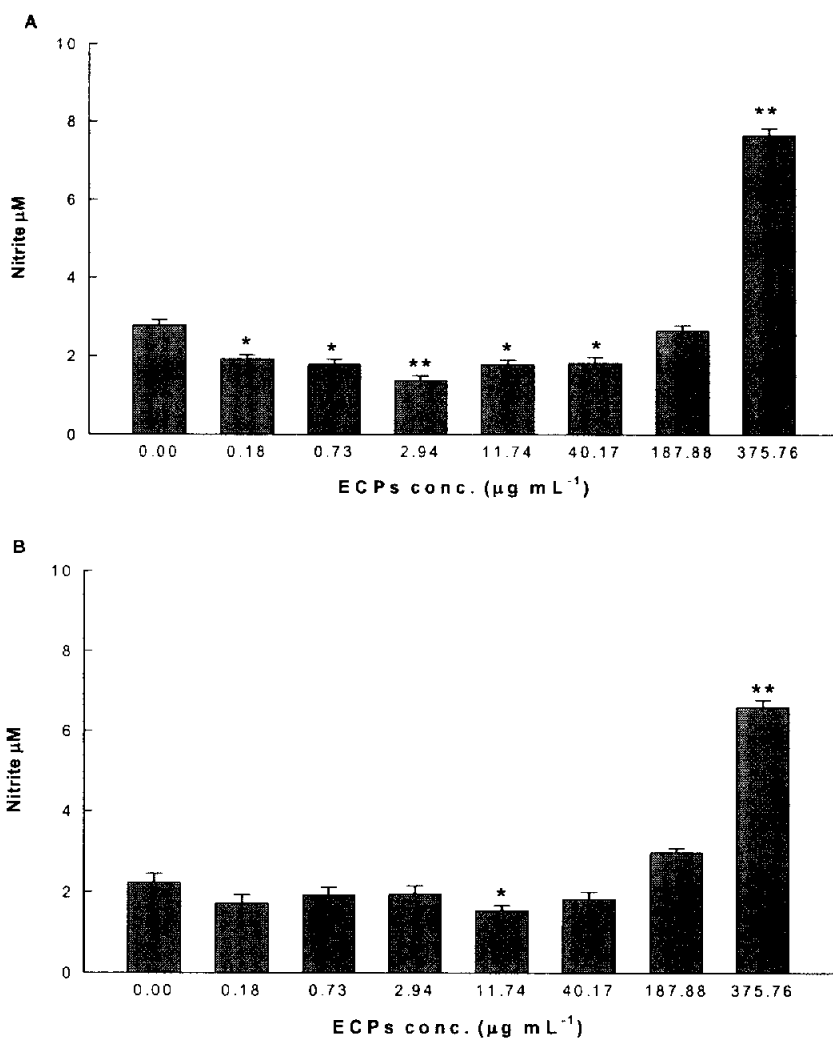


Fig. 21. Dose-response activity of Nitric oxide production in the head kidney macrophage from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* stimulated by various concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs. Olive flounder macrophage (5×10^5 cells per well) were treated with varying dose of *Edwardsiella tarda* ECPs. Each bar represents the mean $\pm$ SEM of pentaplicate cultures. A, 2hrs and B, 72hrs.

7. ECPs에 대한 두신 대식세포의 생존능

ECPs 첨가량과 반응 시간에 따른 두신 대식세포의 생존율에 대한 조사 결과는 Table 9에 나타난 것과 같다. ECPs의 첨가 농도별 대식세포의 생존율에는 유의차가 나타나지 않았다 ($p<0.05$). 즉, $187.88\mu\text{g ml}^{-1}$ 이하의 농도에서는 *E. tarda* ECPs가 넙치의 대식세포에 독성을 나타내지 못하는 것으로 확인되었다.

Table 8. Viability of head kidney macrophage from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* stimulated by *Edwardsiella tarda* ECPs

Viability of head kidney macrophage (%)							
Incubation time (hr)	ECPs conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)						
	375.96	187.88	46.97	11.74	2.94	0.73	0
6	99.3	99.00	99.00	98.99	99.50	99.50	99.00
18	97.4	98.00	100.00	98.40	99.39	98.00	98.68
48	95.0	97.50	98.50	98.50	98.00	97.50	98.00

8. 림프구 증식

시험 균주인 *E. tarda* KE-1 균주의 ECPs 첨가가 림프구의 증식에 미치는 영향을 결과는 Fig. 22 및 23에 나타내었다.

Fig. 22은 cell proliferating reagent WST-1 kit를 사용하여 *E. tarda* ECPs의 농도와 림프구 분화와의 관계를 조사한 것으로, ECPs의 양이 증가할수록 림프구 증식 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다.

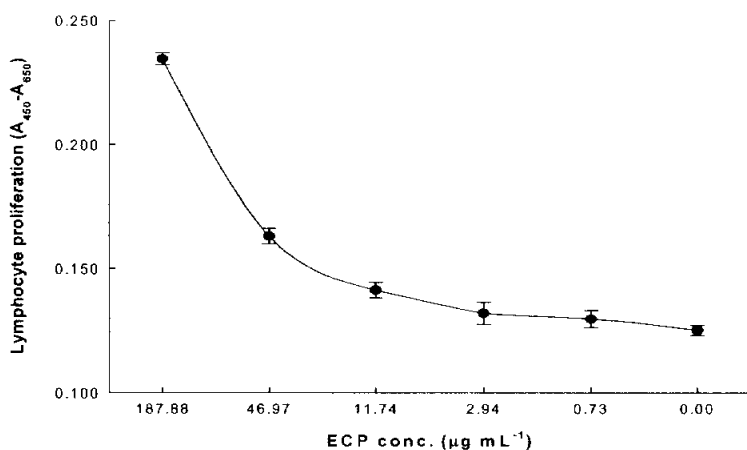


Fig. 22. Measurement of the activation of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* kidney lymphocytes after treated with each concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs by cell proliferation agent WST-1.

ECPs와 3종의 mitogen을 사용하여 *E. tarda* ECPs의 림프구 증식에 대한 영향을 조사한 결과는 Fig. 23에 나타내었다. *E. tarda* crude LPS는 $0.78\text{-}25\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도에서 높은 proliferation activity를 보였으며, Con A는 $25\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도에서 높은 활성을 보였다. 그러나 PHA-P와 ECPs는 crude LPS와 Con A에 비하여 대체적으로 낮은 활성을 보였으며, $50\text{-}200\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도에서 proliferation activity가 증가하였다.

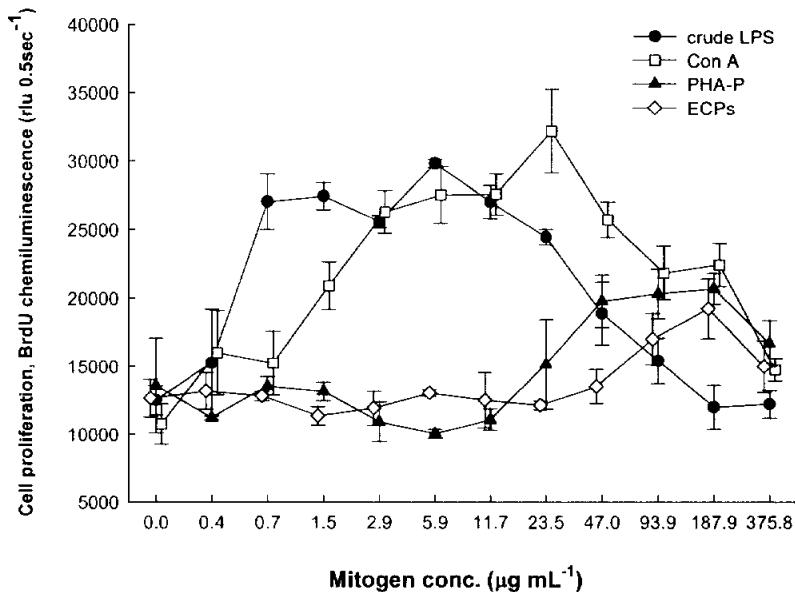


Fig. 23. Measurement of the activation of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* kidney lymphocytes after treated with each concentration and mitogen of *Edwardsiella tarda* ECPs by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay.

IV. 고 찰

본 장에서는 *E. tarda*의 ECPs가 넙치의 면역 기능에 미치는 영향을 밝혀서 에드워드병의 발생 기구를 구명하고자 하였다. 이를 위하여 1장에서 선정된 *E. tarda* KE-1 균주로부터 얻어낸 ECPs가 넙치의 신장 대식세포와 말초 혈액의 식세포에 미치는 영향을 조사하였으며, 또한 림프구의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

넙치의 신장 대식세포에 대한 *E. tarda* 생균의 침입능을 확인하기 위하여 여러 농도의 *E. tarda* ECPs와 시험균을 macrophage monolayer에 첨가하였을 때 ECPs의 첨가량에 따라 *E. tarda*의 침입능이 변화하였다. 즉, ECPs와 *E. tarda* 생균을 첨가하고 1시간 배양한 후 넙치의 신장 대식세포에 포식되는 *E. tarda* 균수를 조사하였을 때 저농도의 ECPs가 첨가된 시험구에서 증가한 후 그 이상의 농도 첨가 시험구에서는 감소하는 경향을 보여서 *E. tarda* ECPs는 어체 내 생성량에 따라서 macrophage의 식작용능 활성화에 미치는 역할이 달라지는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 *R. salmoninarum* ECPs 첨가가 phagocytosis에 영향을 미치지 않는다는 Densmore *et al.* (1998)의 보고와 상반되는 결과가 있으나 이러한 현상이 *R. salmoninarum* ECPs에 대한 실험 조건이나 균주의 특성이 다른데 기인하였을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 또한 식세포와 *E. tarda* 균을 혼합하여 3시간 동안 배양한 후 균수의 변화를 조사한 결과 1시간째와는 다르게 ECPs 농도의 증가에 따라 균수가 증가하는 경향을 보였는데, 이것은 저농도의 ECPs가 첨가되었을 때 세균 살해능이 높았으며 고농도가 첨가되었을 때 오히려 그 기능이 저하된 것과 상관관계가 있을 것으로 생각된다.

Esteban *et al.* (1998)에 의하면 gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) 두신 백혈구의 *L. anguillarum*에 대한 식작용능은 반응 후 대략 20분까지 급격하게 증가하며 이후에는 일정한 수준을 나타내고 이러한 상태가 3시간 이후까지 유지된다고 하였다. 본 연구에서 항원 첨가 1시간 후에 신장 대식세포와 말초 혈액 백혈구를 이용하여 phagocytic activity를 측정하였다. 신장 대식세포의 식작용능을 측정한 결과 저농도인

0.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 *E. tarda* ECPs가 첨가된 시험구에서 높게 나타났으나 대조구인 무첨가구에 대한 유의적 차이는 나타나지 않았으며 ($P=0.0926$), 0.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상의 ECPs 첨가에 대한 결과에서, 농도 증가에 따른 phagocytic index의 유의차는 관찰되지 않았다. 또한 넙치 말초 혈액에 항원 (live cells 및 FKC)을 반응시킨 후 1시간째에 phagocytic rate와 phagocytic index를 측정한 결과, 저농도의 ECPs를 첨가하면 phagocytic rate와 phagocytic index 값이 증가하나 고농도가 첨가되면 그 값이 낮아지며, 특히 고농도인 375.76 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 을 첨가한 시험구에 FKC 항원을 반응시켰을 때 phagocytic index의 관찰에서 유의적 감소가 관찰되었다. 이것은 *R. salmoninarum* ECPs 0.1~1.0 mg ml^{-1} 을 brook trout (*Salvelinus fontinalis*)에 주사하였을 때 splenic leucocyte의 phagocytic activity에 영향을 미치지 않는다는 보고 (Bandin *et al.*, 1991)와 *A. salmonicida* ECPs 300 μg 을 FCA에 emulsify하여 근육 주사하였을 때 white-spotted char (*Salvelinus leucomaenis*) blood cells의 phagocytosis activity와 phagocytic index가 FCA 단독 처리구에 비하여 유의적 차이를 나타내지 않았다는 보고 (Kawahara *et al.*, 1991)에 비추어 이들의 반응과 유사하다고 판단되며, 이러한 결과로 부터 저농도의 *E. tarda* ECPs는 넙치 식세포의 phagocytic activity를 증가시키며, peripheral leucocyte 중 phagocytosis에 관여하는 특정 세포의 활성을 강화시키는 것으로 사료되나 고농도에서는 phagocytic activity를 억제시키는 것으로 판단된다.

넙치 macrophage의 CL response 시험 결과, 저농도인 0.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 ECPs 첨가구가 대조구보다 높은 활성을 나타내었으나 고농도인 46.97 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상 첨가구에서는 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 측정값을 나타내었다 ($P<0.05$). 특히, 187.88 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상 첨가 시험구에서는 CL response 값이 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 0.1 mg ml^{-1} 이상의 농도로 *R. salmoninarum* ECPs를 brook trout으로부터 분리된 splenic leucocyte에 첨가하면 respiratory burst가 감소하게 되며 (Densmore *et al.*, 1998), *Mycobacterium* sp.로부터 분리한 ECPs를 rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*)의 두신 macrophage에 여러 농도로 반응시켰을 때 저농도 시험구에서 NBT 환원량이 증가하

며 고농도 시험구에서 감소하는 경향을 나타낸 것 (Chen *et al.*, 2001)과 유사한 현상이다. 이것은 *R. salmoninarum* ECPs에는 hemolytic 및 cytolytic activity가 결여되어 있는 점 (Bandin *et al.*, 1991), protease 및 hemolysin의 활성이 관찰되지 않은 점 (Sakai *et al.*, 1989; Grayson *et al.*, 1995) 등을 고려한다면, *R. salmoninarum* ECPs가 macrophage에 대한 respiratory burst의 억제와 관련하여 hemolytic, cytolytic 및 proteolytic activity와 관련한 factor 외의 다른 요인에 의하여 영향을 받을 수 있으며, 본 연구 제 1장의 효소 활성과 관련한 다양한 결과에 비추어 본 연구의 실험 대상 균주인 *E. tarda*에서도 상기의 효소 요인 이외의 다른 요소에 의하여 식세포의 CL response가 저해되었을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 또한 *R. salmoninarum*은 *in vivo*에서 renal 또는 splenic haemopoietic tissue 등에도 침입할 수 있고 (Flaño *et al.*, 1996), host의 phagocytic cell에서 증식할 수 있으므로 (Buruno, 1986a; Gutenberger *et al.*, 1997), 숙주 세포 내에서 비독성의 exoenzyme을 생성하는 것은 free-radical oxygen의 생성을 줄여 숙주 세포 내에서 생존하기 위한 방식의 하나로 생각된다. 그러므로 *R. salmoninarum*과 유사한 세포 내 기생체적 특징을 가진 *E. tarda*의 ECPs도 강한 독성을 가지지 않을 가능성이 있을 것으로 사료된다.

식세포는 이물질의 식작용 후 bactericidal activity를 나타내는 중요한 물질은 superoxide anion (Secombes and Fletcher, 1992), hydrogen peroxide (Itou *et al.*, 1997) 그리고/또는 myeloperoxidase-H₂O₂-halide system (Metcalf *et al.*, 1986) 등에 의하여 생성되는 oxygen free-radicals이며, 이들은 respiratory burst 반응이 일어나는 동안 다량 형성된다. 넵치 macrophage의 bactericidal activity에서 *E. tarda* ECPs가 미치는 영향을 조사한 결과, 저농도인 0.18 및 0.73 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 의 ECPs 첨가 시험구에서 세균 살해능이 가장 높게 나타났으며, ECPs의 농도가 증가할수록 신장 macrophage의 세균 살해능은 낮아지는 것으로 관찰되었다. 다만, 저농도에서는 대조구에 비하여 유의적 차이를 나타내지 않았으나 11.74 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상의 농도로 ECPs가 첨가되었을 때 세균 살해능이 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 *A. salmonicida*의 outer membrane

proteins (OMPs)를 연어, *Salmo salar*의 신장 macrophages에 10-100 μg OMPs mL^{-1} 의 농도로 첨가하여 NBT 환원량을 측정하였을 때 OMPs 첨가량이 많을수록 macrophage의 활성이 높게 나타났으나, 10 μg OMPs mL^{-1} 이하의 농도에서는 NBT 환원량의 증가 현상을 관찰할 수 없었다 (Frnacis and Ellis, 1994)는 결과와 배치되는데, 이는 *E. tarda* ECPs가 *A. salmonicida*의 OMP와 성분의 차이에서 유래된 현상일 것으로 생각된다.

E. tarda ECPs의 농도에 따른 식세포의 생존율을 trypan blue 색소를 이용하여 측정한 결과, 187.88 μg mL^{-1} 의 ECPs가 첨가되었을 경우에도 macrophage의 생존에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 제 1장의 macrophage monolayer에 대한 cytotoxic effect의 결과와 일치하므로 *E. tarda*가 생성하는 ECPs는 넙치의 macrophage 생존에 직접적인 영향을 미치지 않지만 신장 macrophage의 활성은 억제하는 것으로 생각된다.

NO와 같은 reactive nitrogen intermediates (RNI)의 병원성 미생물에 대한 방어기작에 대해서는 아직 완전히 구명된 것은 아니지만, 암세포에 대한 세포독성과 미생물의 제거에 작용하며 (Hibbs *et al.*, 1988; Liew *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1996), 감염증에 대한 방어력을 나타내는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 감염증이나 다양한 stress가 발생하는 기간 동안 지속적으로 분비된다 (Baik, 1998). 또한 *Vibrio pelagius* ECPs를 1-32 μg mL^{-1} 의 농도로 turbot macrophage에 첨가하였을 때, 고농도에서 NO의 생성이 감소하였다 (Villamil *et al.*, 2003). 본 연구 결과, *E. tarda* ECPs 첨가 2시간 후 넙치의 신장 macrophage에 의한 NO의 생성은 0.16-40.17 μg mL^{-1} 첨가 시험구에서 대조구에 비하여 유의적인 감소가 확인되었고, 고농도인 375.76 μg mL^{-1} 첨가 시험구에서는 오히려 급격하게 증가되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 *E. tarda* ECPs가 독성 인자로서 macrophage에 특이적으로 또는 간접적으로 작용하여 상처를 입히고 이에 대한 숙주 반응으로 과량의 NO를 분비하는 것일 가능성을 생각해 볼 수 있다. 이러한 현상은 고농도의 LPS를 첨가한 turbot macrophage의 NO 생성량이 높

게 나타난 것 (Tafalla and Novoa, 2000)과 유사한 경향이며, ECPs 첨가 72시간의 경우에도 2시간째의 결과에 비슷한 경향을 나타내었다.

림프구 증식을 측정하는 방법에는 water-soluble tetrazolium salt WST-1을 이용하여 살아있는 세포 내에 존재하는 dehydrogenase 관련 효소의 양을 흡광도로 측정하는 방법 (Sarker *et al.*, 2001), 세포 DNA 복제 과정에 thymidine 대신 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)을 첨가하고 이를 항원으로 하여 ELISA-based technique을 이용하여 측정하는 방법 (Gauthiera *et al.*, 2003) 및 $[H^3]$ - thymidine를 첨가하여 liquid scintillation counter로 측정하는 방법 (Marsden *et al.*, 1994) 등이 있으나, 본 연구에서는 전자의 두 가지 방법을 사용하였다. ECPs의 농도가 증가할수록 림프구 증식이 증가하여 $187.88 \mu\text{g ml}^{-1}$ 에서 최대값을 나타내었다. 또한 *E. tarda* ECPs는 crude LPS나 Con A 등에 비하여 낮은 증식 활성을 나타내었다. 이러한 반응에서 crude LPS와 Con A 및 PHA-P 등의 림프구 증식 활성은 무지개송어의 비장 유래 monocyte/macrophage cell-line (Ganassin and Bols, 1998)와 말초 혈액 (Lin *et al.*, 1999) 및 sea bass 두신 백혈구 (Galeotti *et al.*, 1999)에서의 보고와 비슷한 농도 범위를 나타내었으며, ECPs의 활성은 동일한 농도의 PHA와 비슷한 수준을 나타내어 mitogen으로서의 가능성을 가지는 것으로 사료된다. 이러한 mitogen으로서의 가능성에 비추어 ECPs 단독 면역원 또는 면역 첨가제로 사용하였을 때 림프구의 증식을 유도함으로서 특이적 면역계를 자극하여 방어력을 높일 수 있을 것으로 생각되며, 이러한 가능성은 *E. tarda* (Salati *et al.*, 1983)와 *V. harveyi* ECPs (Zorrilla *et al.*, 2003) 등에서 확인되었다.

이상의 연구 결과를 보면 *E. tarda* ECPs가 넙치의 세포성 면역계 중 macrophage의 기능에 미치는 영향을 보면 소량의 ECPs가 작용하면 세균의 macrophage에 대한 침입을 쉽게 하며 포식된 세균을 살해하는 능력 또한 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 살해능의 증가에도 불구하고 Enterobacteriaceae에 속하는 이 균의 특성이 superoxide dismutase (SOD)를 생성하므로 식세포 내에서 생존이 가능할 것으로 생

각된다. 그러므로 많은 수의 세균을 macrophage가 포식하게 되면 식세포 내에서의 생존 확률도 높아질 것이 예상된다. 이러한 예는 *E. tarda*와 같은 속에 속하는 *E. ictaluri* 균의 식세포 내 감염수에 따른 신장 macrophage 세균 살해능을 조사한 Shoemaker *et al.* (1997)의 보고에 나타나며 macrophage에 대한 세균 수가 증가할수록 세균 살해능이 급격히 감소된다고 하였다. 본 연구에서 대식세포에 대한 세균 수와 관련한 살해능의 실험은 하지 않았으나 *E. tarda* ECPs를 높은 농도로 첨가하면 살해능이 저하되는 현상이 관찰되었다. 그러므로 넙치의 세균 살해능에도 Shoemaker *et al.* (1997)의 결과를 적용할 수 있을 것으로 보이며, *E. tarda*에서 분리되는 각종 ECPs는 넙치의 방어력을 저하시켜 식세포 내에서 균체가 쉽게 증식할 수 있는 환경을 형성함으로써 *E. tarda* 균의 질병 발생에 관여하는 것으로 사료된다.

V. 요 약

본 장에서는 균체의 독성이 가장 강한 것으로 확인된 *E. tarda* KE-1 균주의 ECPs를 넙치의 면역 식세포, 특히 신장 대식세포, 말초 혈액 식세포 및 림프구에 작용시켰을 때 나타나는 기능의 변화를 밝히고자 하였다.

농도를 달리한 ECPs와 시험 균액을 macrophage monolayer에 첨가하였을 때 macrophage에서 *E. tarda*의 invasion activity가 증가하였다. 특히 신장 대식세포에 포식되는 *E. tarda* 균수가 저농도의 ECPs에서 급격히 증가한 후 ECPs의 농도가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 보여서 *E. tarda* ECPs는 대식세포의 식작용 활성을 증가시키는 역할을 하는 것으로 생각된다. 넙치의 whole blood에 *E. tarda* 생균 및 사균을 반응시킨 후 식작용능을 측정한 결과, ECPs 고농도 시험구에서 유의적인 감소를 나타내었다.

넙치 대식세포의 CL response 시험 결과, ECPs 저농도 시험구에서 대조구보다 높은 활성을 나타내었으나 고농도 시험구에서 대조구에 비하여 활성 정도가 급격히 감소하였다 ($P < 0.05$). 그 중에서도 $187.88 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 고농도 시험구에서는 CL response가 거의 나타나지 않았으며, 고농도의 ECPs는 대식세포의 세균살해능을 억제시키는 것으로 조사되었다.

림프구에 대한 ECPs의 영향을 조사한 결과, 고농도 일수록 증식 능력이 증가하여 mitogen으로서의 가능성이 있는 것으로 나타났다.

이러한 결과들로부터 저농도의 ECPs는 phagocytic activity를 증가시키고 bactericidal activity를 강화시키는 효과를 나타내었으나, 고농도의 ECPs가 첨가되었을 때에는 오히려 이러한 활성들이 유의적으로 저하되어 생체 내의 ECPs 농도가 증가할수록 면역계의 기능이 저하되는 것으로 확인되었다. 그러므로 *E. tarda* ECPs는 *E. tarda* 균의 포식 증가에 의한 macrophage의 세균 살해능을 약화시켜, edwardsiellosis로의 진행을 증강시키는 역할을 하는 것으로 사료된다.

총 합 고 찰

어류 병원성 세균의 세포외생성물 (extracellular products, ECPs)에 대한 특성과 병원성에 관한 보고는 많다 (Muroga *et al.*, 1976; Cipriano *et al.*, 1981; Santos *et al.*, 1987; Sakai *et al.*, 1989; Bandin *et al.*, 1991; Romalde *et al.*, 1992; Tornazo and Barja, 1993; Grayson *et al.*, 1995; Gunnlaundsdóttir and Gunnlaundsdóttir, 1997; Khalil and Mansour, 1997; Uddin and Wakabayashi, 1997). 어류 병원성 세균이 생성하는 ECPs는 독소와 다양한 효소를 함유하고 있어 숙주의 염증반응을 유도하며 (Ventura *et al.*, 1988), 병원성에서 중요한 역할을 한다 (Rockey *et al.*, 1988; Austin *et al.*, 1998; Lee and Ellis, 1990; Ellis, 1997; Gunnlaugsdóttir and Gudmundsdóttir, 1997; Høie *et al.*, 1999). 그러나 *R. salmoninarum* (Bandin *et al.*, 1991), *P. anguilliceptica* (Wakabayashi and Egusa, 1972) 및 *V. ordalii*(Kodama *et al.*, 1983)와 같은 일부 병원성 세균이 생성하는 ECPs는 병원성을 나타내지 않거나 아주 약한 것으로 알려져 있다.

병원성 세균이 생성하는 ECPs에 대한 연구는 세균의 독성과 감염 기작을 밝히는 데 중요하며, 본 연구에서는 우리 나라의 주요 양식 대상 어종인 넙치의 병원성 세균인 *E. tarda* ECPs에 대하여 연구하였다. 즉, *E. tarda*가 생성하는 ECPs의 특성을 파악하고, 이 균의 주요 감염 대상 어종인 넙치에 ECPs를 직접 투여하였을 때 숙주의 생리학 및 면역학적 반응을 관찰하였으며, 특히 식세포를 중심으로 한 세포성 면역계의 기능에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

참조 균주로 사용된 FSW910410 균주와 KE-1 균주를 포함한 실험 균주 대부분은 28℃, 48시간 배양하였을 때, 그리고 염분 농도가 0.5-1% (w/v) 정도 첨가되었을 때 균의 성장이 좋았으며 ECPs 생성량도 많은 것으로 확인되었다. 그러나 배지 종류에 따른 균의 성장과 ECPs 생성량에 대한 시험 결과, BHIA에서 우수하게 나타났으나 다른 배지와 비교하여 유의적 차이는 관찰되지 않았다. 일본에서 양식 뱀장어로부터 분

리된 *E. tarda* 균주의 배양 온도는 10~45℃ 이었으며, 적정 온도는 37℃ 이었고 이 온도 보다 높을 때 생존율이 급격히 감소하였다 (Ishihara and Kusuda, 1982). 이것은 뱀장어 사육지의 수온이 넙치의 사육 수온보다 일반적으로 높으므로 분리 수온 영역에 따라 성장 온도가 다를 수 있다는 결과와 일치되는 견해로 판단되며, 이러한 결과들을 종합하면 사육 온도에 따라 병원균의 적정 배양 온도가 다를 수 있음을 의미하며, 지역적으로 분포하는 균의 생리·화학적 특성이 다를 수 있을 것으로 판단된다.

각 참조 균주와 시험 균주 ECPs에 대한 enzymatic activity를 측정한 결과, 시험균주 모두 esterase와 naphthol AS-BI phosphohydrolase에서 약간의 차이가 있으나 다른 enzymatic activity에서는 거의 동일한 결과를 나타내었다. 또한 proteolytic activity를 실험한 결과, 실험에 사용한 모든 *E. tarda* ECPs는 음성으로 나타났으며, 면양적혈구를 이용한 hemolytic activity 측정에서는 시험균주 모두 72시간째에 약한 양성을 나타내었다. 그리고 BF-2 및 CHSE-214에서 ECPs 접종 약 72시간 후에 약한 cytotoxic activity를 보였다. *L. anguillarum* (Wang et al., 1998)이나 *A. salmonicida* (Madetoja et al., 2003)가 생성하는 ECPs가 어류 유래 cell-line을 40분 또는 2시간 이내에 lysis하는 것에 비하여, *E. tarda* ECPs는 enzyme activity가 거의 없거나 아주 약하며 장기적으로 서서히 넙치의 생체에 영향을 미치는 특성을 가진 것으로 판단된다. 또한, rabbit anti-KE-1 ECPs를 이용한 double diffusion assay와 SDS-PAGE의 결과, *E. tarda* 각 균주가 생성하는 ECPs는 항원적으로 차이가 나타나지 않았다.

생균의 독성이 가장 강한 *E. tarda* KE-1 균주를 선택하여 ECPs를 분리하고 넙치에 근육주사 하였을 때의 생리학적 그리고 면역학적 영향을 조사하였는데, *E. tarda* KE-1 균주의 ECPs를 평균 체중이 5.6g인 넙치에 근육 주사하였을 때의 96hr-LD₅₀은 약 0.714 μ g g⁻¹ fish (40 μ g fish⁻¹) 이었으며, 폐사는 시험 기간 동안 고농도뿐만 아니라 저농도에서도 지속적으로 발생하였다. 이것은 *E. tarda* ECPs 내의 성분이 넙치에 직접 영향을 미치는 것이 아니라 장기적으로 생체 내의 세포나 조직 또는 기관에 영향을 미치기 때문으로 판단된다.

평균 체중 59.1g 크기의 넙치에 0, 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 농도가 되도록 넙치의 근육에 주사하였을 때 나타나는 혈액 내 성분과 면역 기구의 반응을 조사하였다. 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 실험구의 hematocrit 치는 주사 1일 후부터 감소하여 1주일째까지 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구와의 유의적 차이는 나타나지 않았다 (7일째, $P=0.0654$). 넙치에 *E. tarda* ECP를 투여한 후 혈중 glucose 량을 측정한 결과, 고농도 (40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도)로 주사한 시험구에서 3일째부터 급격히 증가하여 7일째까지 유의적으로 높은 상태로 유지되었으며 ($P<0.05$), total protein 량 또한, 주사 5일째에 4 및 40 $\mu\text{g fish}^{-1}$ 의 농도로 주사한 시험구의 total protein 농도가 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ($P<0.05$). 이러한 결과는 *E. tarda* ECPs의 넙치 적혈구에 대한 hemolytic activity가 72시간째에 서서히 나타나는 것과 연관하여 생각하면, *E. tarda* ECPs가 넙치의 적혈구 또는 적혈구막에 영향을 미쳐 장기적으로는 적혈구 파괴가 일어나며 이로 인하여 hematocrit 치가 감소하고 적혈구 파괴에 의한 세포 내 단백질의 유출이 일어날 것이며, 적혈구의 energy source로 흡수되지 않은 glucose가 혈청 내에서 축적되어 농도가 증가되는 것으로 사료된다.

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후의 반응에서 면역 factor 중 혈청 lysozyme activity와 혈청의 세균 살해능은 시험 기간 동안 대조구에 대하여 유의적 차이를 나타내지 않았다 ($P<0.05$). 어류의 혈청 보체에 의한 세균 살해능은 비특이적 방어 기작에 중요한 역할을 하지만 (Iida and Wakabayashi, 1983; Nakai, 1985; Kanemori *et al.*, 1987), 넙치에 대한 *E. tarda* ECPs의 투여가 어류 혈청 보체 성분의 활성화에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 그러나 고농도 (40 $\mu\text{g fish}^{-1}$)로 ECPs가 근육 주사한 시험구에서 주사 후 1, 3 및 7일째에 대조구에 비하여 CL response가 낮게 나타났으며 시간이 경과함에 따라 CL response가 대조구와 유사한 형태의 반응성을 나타내어 *E. tarda* ECPs가 넙치 신장 식세포의 방어기작을 억제하는 것을 확인하였다. Densemore *et al.* (1998)에 따르면, *R. salmoninarum* ECPs는 brook trout splenic phagocytes의 respiratory burst와 phagocytic activity를 저하시키며, *A. hydrophilla*

exotoxin을 주사한 후 6시간째에 생균을 주사한 증상과 유사한 병증이 관찰되었으며 (Kanai and Takagi, 1986), 이러한 독성은 hemolysins라고 추정하였다 (Thune *et al.*, 1986; Paniagua *et al.*, 1990). 또한 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 이상의 *V. pelagius* ECPs가 첨가된 turbot macrophage의 CL response가 유의적으로 감소한다고 하였다 (Villamil *et al.*, 2003).

외부이물질이 생체에 침입하게 되면 혈액 내의 granulocyte나 신장 macrophage 그리고/또는 다양한 종류의 식세포 작용에 의하여 제거된다 (Secombes, 1996). 병원성 세균의 ECPs는 respiratory burst와 phagocytic activity를 억제 (Densemores *et al.*, 1998; Villamil *et al.*, 2003) 하지만 식작용된 이후 식세포가 세균을 제거하는 과정에서 병원성 세균이 생성하는 ECPs의 영향에 대한 정보는 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 넙치의 세포성 면역계가 식작용과 식작용된 세균을 살해하는 과정에 *E. tarda* ECPs가 식세포의 기능에 미치는 영향을 조사하였다. 넙치의 말초 혈액 식세포와 두신 대식세포에 대한 *E. tarda* ECPs의 영향을 조사한 결과, 저농도의 ECPs는 세균 포식, 식작용능, CL response 및 세균 살해능을 활성화 시키지만 고농도에서는 강하게 억제시키는 것으로 확인되었다.

E. tarda 균에 의한 감염 초기에 저농도의 ECPs는 식세포의 활성을 증가시켜 식작용능과 세균 살해능을 증가시키지만, 고농도의 ECPs는 식세포의 식작용과 이후의 세균 살해능에 대한 활성을 강하게 억제시킨다. 또한 식작용된 세균수가 식세포 내에 누적되어 증가하면 식세포의 세균 살해능은 급격히 감소하게 된다 (Shoemaker *et al.*, 1997). 뿐만 아니라 *E. tarda* 균은 세포내 효소로서 superoxide dismutase (SOD)와 catalase를 분비하며 (Yamada *et al.*, 1998; Yamada and Wakabayashi, 1999), 이러한 효소는 식세포 내의 oxygen radicals의 활성을 저해하므로 식세포의 살해능을 회피할 수 있다 (Totora, 2002).

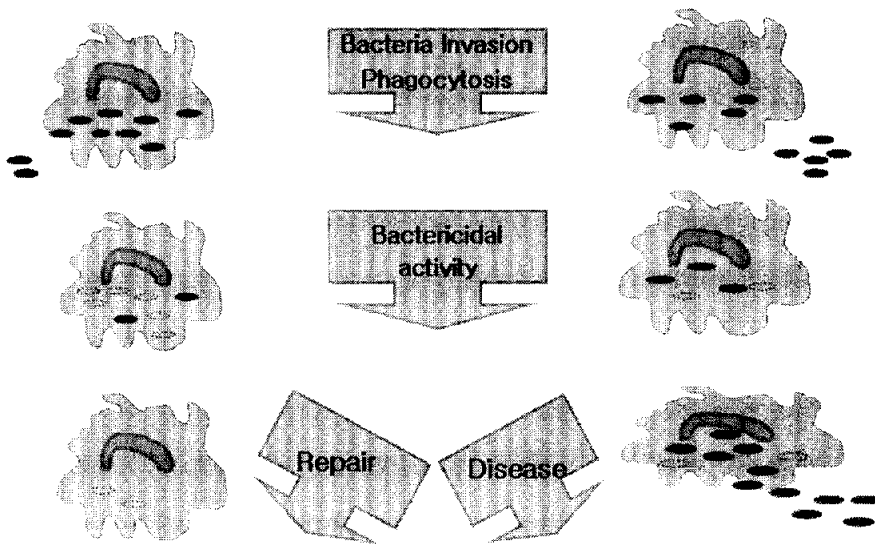


Fig. 24. Effects of *Edwardsiella tarda* ECPs in the phagocytes.

그러므로 *E. tarda*에 의한 장기간의 감염으로 넙치의 생체 내 ECPs 농도가 증가하며, 이로 인하여 식세포의 활성이 급격하게 저하되는 과정이 반복되어 결국 전신 감염으로 확산되는 것으로 생각된다 (Fig. 24).

NO와 같은 reactive nitrogen intermediates (RNI)의 병원성 미생물에 대한 방어 기작에 대한 완전히 구명은 되지 않았으나, tumor cell에 대한 세포 독성을 가지며 미생물의 제거에 작용한다 (Hibbs *et al.*, 1988; Liew *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1996). 본 연구에서 *E. tarda* ECPs 첨가 2시간 후 넙치의 신장 macrophage에 의한 NO 생성은 저농도 ($0.16\text{--}40.17\mu\text{g ml}^{-1}$)에서 대조구에 비하여 유의적 감소가 확인되었으나 고농도 ($375.76\mu\text{g ml}^{-1}$)에서는 오히려 급격한 증가가 확인되었다. 이러한 결과는 turbot 두신 macrophage에 *V. pelagius* ECPs ($1\text{--}32\mu\text{g ml}^{-1}$)를 첨가하였을 때, NO 생성이 감소된다는 보고 (Villamil *et al.*, 2003)와 일치한다. 감염증이나 다양한 stress에 의하여 분비되는 endotoxin과 액성 면역계의 영향으로 NO가 지속적으로 분비되므로 (Baik, 1998),

본 연구에서의 결과는 과량의 *E. tarda* ECPs에 의한 식세포의 자극과 이로 인한 식세포의 상처에 대한 방어 기작으로서 NO가 다량 생성되는 것으로 사료된다.

림프구 증식에 대한 ECPs의 영향을 조사한 결과, 고농도 ($187.88\mu\text{g ml}^{-1}$)에서 mitogen 효과가 나타났으나 다른 mitogens, 즉 *E. tarda* crude LPS와 Con A 등에 비하여 그 효과는 낮았으나 PHA의 림프구 자극 정도와 비슷하였다. Mitogen인 PHA와 Con-A의 첨가에 의한 농어 (*Dicentrarchus labrax* L.) 백혈구의 자극 활성 (stimulation index)은 적정 농도까지는 증가하지만 이후 감소하는 경향을 보이며, Con-A의 경우 혈액 백혈구를, LPS와 PHA는 신장 leucocyte를 더욱 자극한다고 보고하였다 (Galeotti *et al.*, 1999). 그러므로 *E. tarda* ECPs는 신장 림프구에 대한 증식 자극 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 이러한 *E. tarda* ECPs의 림프구 자극 효과는 넙치에 대한 백신 사용에서 ECPs 단독 또는 혼합하여 사용할 때 특이적 면역 반응을 강화시킬 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 넙치의 주요 병원성 세균인 *E. tarda* 감염 과정에서 생성되는 ECPs는 만성적으로 작용하여 적혈구를 파괴하며 숙주 세포에 대하여 세포 독성을 나타낸다. 또한 혈청 glucose와 total protein량을 증가시키며, 식세포의 식작용을 저하시킨다. 특히 말초 혈액 중의 백혈구의 식작용을 억제시키며 신장 대식세포의 식작용과 세균 살해능을 급격히 감소시킨다. 그러므로 *E. tarda* ECPs는 숙주의 주요 방어 기작의 기능을 저하시킴으로서 edwardsiellosis의 형성 과정에서 중요한 병원성 인자로 작용하는 것으로 사료된다.

요 약

담수 및 해산어 양식에 많은 피해를 입히는 edwardsiellosis는 심한 감염과 폐사를 나타내는 심각한 세균성 질병이다. Edwardsiellosis의 원인체인 *Edwardsiella tarda*가 가지는 병원성 기작에 대해서는 잘 밝혀져 있지 않다. *E. tarda*의 병원성 기작에는 slime layer, lipopolysaccharide, siderophore 및 세포외생성물 (extracellular products, ECPs) 등 여러 가지가 있으나 이들 요소 중 ECPs에 대한 보고는 거의 없다.

본 연구에서는 *E. tarda*가 생성하는 ECPs의 특성에 대하여 알아보고 이를 낚치, *Paralichthys olivaceus*에 주사하였을 때 미치는 생리학적 및 면역학적 영향을 조사하고자 하였다. 또한 이 ECPs가 *in vitro*에서 면역계, 특히 peripheral leucocyte, head kidney macrophage 및 lymphocyte에 투여 되었을 때 낚치 면역 반응에 대한 영향을 확인하고자 하였다.

1. *E. tarda* ECPs의 특성

본 실험에는 여러 지역으로부터 분리된 *E. tarda* 균주 중 5개의 균주를 선택하여 사용하였다.

ECPs 생성을 위한 *E. tarda* 균의 적정 배양 온도와 염분 농도는 각각 27℃와 0.5-1%(w/v)이었으며, 배지의 종류에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다.

ECPs의 특성을 알아보기 위하여 효소 활성, 면역 및 낚치 적혈구에 대한 hemolytic activity, 3가지 세포주 (cell line)와 macrophage monolayer에 대한 세포 독성 및 독성 시험을 하였다. 각 균주로부터 분리된 *E. tarda* ECPs는 APIzym kit를 이용한 enzymatic activity에서 동일한 결과를 나타내었지만 protease 및 phospholipase 등의 효소 활성은 관찰되지 않았다. ECPs의 낚치 적혈구와 면역 적혈구에 대한 hemolytic activity는 매우 느리고 약하게 나타났으며, 어류 유래의 주화세포에 대한 ECPs의 cytotoxicity는 접종 72시간 후에 BF-2와 CHSE-214에서 약한 세포변성 효과가 관찰되

었다. *E. tarda* 균주가 생성하는 ECPs의 96시간-LD₅₀은 6.8-12.5 μ g protein g⁻¹ fish 이었다.

2. 넙치에 대한 *E. tarda* ECPs의 영향

본 실험에서는 실험 균주 중 가장 강한 독성을 나타내는 KE-1 균주의 ECPs를 사용하였다.

평균 체중 59.1g 크기의 넙치에 0.4 및 40 μ g protein g⁻¹ fish로 근육 주사하여 7일간 생리학적 및 면역학적 변화를 조사하였다.

고농도 (40 μ g protein fish⁻¹)의 ECPs가 주사된 넙치 혈청의 glucose 및 total protein량은 대조구 (0 μ g protein fish⁻¹)에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나 CL response에서는 오히려 유의적 감소가 관찰되었다.

이러한 결과는 *E. tarda* ECPs가 넙치에 생리학적 장애 및 면역 억제 작용이 있는 것으로 사료된다.

3. 넙치의 면역 기능에 미치는 *E. tarda* ECPs의 영향

본 실험에서는 *E. tarda* ECPs가 세포성 면역 반응에 미치는 영향을 조사하였다. Bacterial invasion assay를 위하여 macrophage 배양 세포에 다양한 농도의 ECPs를 첨가하여 반응시키고 *E. tarda* 균을 첨가하여 세포 내 균수를 집락 계수와 MTT assay로 측정하였다. 식작용은 넙치 말초 혈액을 취하고 균액을 반응시킨 후 도말·염색하여 식균율과 식균지수로 측정하였다. 또한 분리된 신장 macrophage를 이용하여 ECPs의 각 농도에 따른 CL response에 대한 실험과 식작용된 *E. tarda* 균의 살해능 및 Nitric oxide (NO) 생성능을 측정하였다. 그리고 림프구 증식 시험은 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)을 이용한 cell proliferation ELISA 방법으로 CL response를 측정하였다.

넙치의 macrophage에 의한 세균 포식과 세균 살해능 및 말초 혈액 백혈구의 식작

용은 ECPs의 농도에 영향을 받는 것으로 관찰되었다. 저농도 ($0.18\text{--}11.74\mu\text{g protein ml}^{-1}$)의 ECPs는 macrophage에 의한 세균 포식, CL response 및 세균 살해능을 증가시키지만, 고농도(약 $40.17\mu\text{g protein ml}^{-1}$ 이상)의 ECPs 농도는 macrophage 활성을 급격하게 감소시키는 것으로 관찰되었다.

NO의 생성은 저농도의 ECPs 첨가구에서 낮게 생성되었으나 고농도 첨가구에서는 급격하게 증가되었다.

림프구 증식은 고농도의 ECPs ($187.88\mu\text{g protein ml}^{-1}$)를 투여하였을 때 증가하였으나, 그 정도는 Con A나 PHA-P 및 *E. tarda* crude LPS 등의 다른 mitogen 첨가구에 비하여 낮게 나타났다.

이러한 결과, 고농도의 *E. tarda* ECPs는 넵치의 주요 면역계인 두신 macrophage와 말초 혈액 백혈구의 세균 포식과 식작용을 억제하는 것으로 생각되며, 이로 인하여 macrophage의 세균 살해능이 급격히 감소되어 *E. tarda* 균주의 macrophage 내 분열·증식이 쉽게 일어날 수 있게 하는 것으로 판단된다. 또한 NO의 급격한 증가는 숙주에 상처 발생하면 증가하는 것으로 ECPs에 의한 macrophage의 상처에 의하여 유리된 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면, *E. tarda* ECPs는 hemolytic 및 cytotoxic activity를 가지며, 혈청 glucose와 total protein 농도 변화에 의한 생리적 장애를 유발하고 phagocytosis와 bactericidal activity 억제한다. 이러한 복합적인 작용에 의하여 숙주의 방어 기작을 저하시키므로, 질병 발생에 중요한 인자라고 사료된다.

감사의 글

연구실에 첫 발을 들이던 1994년 2월 22일부터 많은 인연을 쌓으며 지내왔던 10년의 시간, 그 순간순간의 어렴풋한 사소한 기억까지 그리워지는 건 내 청춘의 한 때를 묻은 이 작은 공간에 대한 애뜻한 정과 인연들에 대한 감사의 마음 때문이라 여깁니다.

박수일 교수님께 사사하였음이 자랑스롭습니다. 늘 한결같은 믿음으로 지도해주시고 관심으로 이끌어 주신 동해연구소 방종득 박사님, 국립수산물과학원 김진우 박사님, 정준기 교수님, 이명숙 교수님께 감사드립니다. 정성과 관심으로 가르쳐주신 정현도 교수님, 허민도 교수님, 김기홍 교수님 그리고 강주찬 교수님께 감사드립니다.

애정어린 편달을 마다않으신 국립수산물과학원 김이청 연구관님, 지보영 박사님, 최혜승 박사님, 이주석 선배님, 조미영 선배님 감사드립니다.

너무나 큰 도움이었죠. 이재일 선배님과 형수님과 청해수산 모든 가족에게 감사드리며, 이진석 선배님, 한규식 선배님에게 감사드리며, 박상래 실장님께도 감사드립니다.

항상 관심과 도움을 아끼지 않은 박영수, 최성재, 이무근에게 감사함을 전합니다. 그리고 문기범, 이남실 외 90학번 동기들에게 감사드립니다.

박헌식 선배님, 강명석-최인숙 선배님 내외, 황미혜, 권문경-조병렬 내외께 감사드리며, 성원해 준 박찬일, 이상윤, 손영찬, 고석형, 성명희, 김도형에게 감사함을 전합니다. 그리고 연구실 곳은 일 마다 않고 많은 배려와 도움을 준 김수미 박사에게 감사하며, 이화 선생님, 원경미, 김은전, 최광진, 최정현, 손새봄, 김윤희, 정영은, 김유정, 김상헌, 문정현, 김수현, 김승훈 후배들에게 감사함을 전합니다. 아울러 최현숙, 홍미주, 김현정, 오영은, 정혜은 후배들의 앞날에도 영광이 있기를 바랍니다.

수년의 동고동락하며 늘 배려를 아끼지 않은 민진, 승호에게 감사하며, 든든한 미래

와 깊고 학문을 이루기를 바랍니다. 또한 실험에 기꺼이 많은 도움을 준 약리학 실험실의 서정수, 이상환 후배에게 감사합니다. 김명석, 구자근 후배의 박사 학위 취득을 진심으로 축하합니다.

모자라는 지식에 많은 것을 배려해주신 신문대학교 권혁추 교수님, 권준영 교수님께 감사드립니다. 또한 바쁜 중에도 정성으로 도와준 손성옥 조교께 감사드리며, 제대로 가르치지 못한 것 같아 미안하기만 한 신문대학교 해양생명과학과 학생들에게도 감사함을 전합니다.

글로써 다 표현할 수 있겠습니까 만든 큰누나와 자형께 감사드립니다. 그리고 인생 최고의 축복일에 축하도 제대로 하지 못한 소영이 부부에게 이 공간을 빌어 늦게나마 축하를 드리며, 명중이의 사업이 번창하기 기원합니다. 작은 누나와 자형께 감사드립니다. 존경받는 의사 기훈이가 되기를 바라며, 멋진 예술 작품의 작가인 선영이가 되었으면 합니다. 부모님의 든든한 기둥으로 또한 동생들의 든든한 버팀목이신 큰형님 형수님께 감사드리며, 세상보다 넓은 꿈과 진취적인 마음이 신우·신혁의 가슴에 늘 자리하기를 기원합니다. 작은형님 형수님께 감사드리며, 늘 건강하고 푸르른 신희·신영이기를 기원합니다. 막내 누나에게 감사드립니다.

가장 작은 아버지·어머니 건강하시면 좋겠습니다. 가덕 작은 아버지·어머니와 동생들 감사하며 늘 행복하면 좋겠습니다. 늘 격려해주신 외삼촌을 비롯한 동네 여러 어르신, 그리고 가족과 친지께 감사드립니다.

자식 걱정으로 생긴 주름, 무엇으로 갚을 수 있을까요? 그저 이 막내 이 자리에까지 올 수 있었음은 부모님께서 만드신 이마의 그 주름 주름을 밟고 올라왔을 따름입니다. 이 논문 부모님께 바칩니다.

참고문헌

- Alcorn, S. W., A. L. Murray and R. J. Pascho (2002). Effects of rearing temperature on immune function in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Fish Shellfish Immunol., 12, 303-334.
- Amaro, C., E. G. Biosca, C. Esteve, B. Fouz and A. E. Toranzo (1992). Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from an European eel farm experiencing mortalities. Dis. Aquat. Org., 13, 29-35.
- Aoki, T. and T. Kitao (1981). Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. Fish Pathol., 15, 277-281.
- Aoki, T., T. Sakaguchi and T. Kitao (1987). Multiple drug-resistant plasmids from *Edwardsiella tarda* in eel culture ponds. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 1821-1825.
- Asada, M. (1958). Transaminase activity in liver damage. 1. Study on experimental liver damage. Med. J. Osaka Univ., 9, 45-55.
- Austin, B. and D. A. Austin (1999). Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish(3th ed.). Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK.
- Austin, B., D. A. Austin, I. Dalsgaard, B. K. Gudmundsdóttir, S. Høie, Thornton, J. L. Larsen, B. O'Hici and R. Powell (1998). Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Sys. Appl. Microbiol., 21, 50-64.
- Baier-Anderson, C. and R. S. Anderson (2000). Suppression of superoxide production by chlorothalonil in striped bass (*Morone saxatilis*) macrophages: the role of cellular sulfhydryls and oxidative stress. Aquat. Toxicol., 50, 85-96.
- Bandin, I., Y. Santos, D. W. Bruno, R. S. Raynard, A. E. Toranzo and J. L. Barja

- (1991). Lack of biological activities in the extracellular products of *Renibacterium salmoninarum*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48, 421-425.
- Boensen, H. T., K. Pedersen, C. Koch and J. L. Larsen (1997). Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarum* serogroup O1. Fish Shellfish Immunol., 7, 543-553.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Buruno, D. W. (1986a). Histopathology of bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon *Salmo salar* L. with reference to naturally infected fish. J. Fish Dis., 9, 523-537.
- Catty, D. and C. Raykundaria (1988). Production and quality control of polyclonal antibodies. In Antibodies, vol. 1 (Ed. by Catty, D.), pp. 19-79, IRL press, Oxford, Washington DC.
- Chandran, M. R., B. V. Aruna, S. M. Logambal and R. D. Michael (2002). Immunization of major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. Fish Shellfish Immunol., 13, 1-9.
- Chart, H. (1994). Lipopolysaccharide: isolation and characterization. In Methods in practical laboratory bacteriology (ed. by Chart, H.). pp. 11-20, CRC press, Florida, US.
- Chen, S. C., K. D. Thomson, A. Adams and R. H. Richards (2001). The production of a lymphokine (macrophage activating factor) by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), leucocytes stimulated with the extracellular products of *Mycobacterium* sp. J. Fish Dis., 24, 217-223.
- Cipriano, R. C.B. R. Griffin and B. C. Lidgerding (1981). *Aeromonas salmonicida*:

- relationship between extracellular growth products and isolate virulence. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 38, 1322-1326.
- Densmore, C. L., S. A. Smith and S. D. Holladay (1998). In vitro effects of the extracellular protein of *Renibacterium salmoninarum* on phagocyte function in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Vet. Immunol. Immunopathol., 62, 349-357.
- Ellis, A. E. (1986). The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. Int. J. Tiss. React., 8, 263-270.
- Ellis, A. E. (1999). Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol., 9, 291-308.
- Esteban, M. A., V. Mulero, J. Munoz and J. Meseguer (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. Cell Tissue Res., 293, 133-141.
- Evelyn, T. P. T. (1997). A historical review of fish vaccinology. In Fish vaccinology (eds. by Gudding, R., A. Lillehaug, P. J. Midtlyng and F. Brown). pp. 3-12, Karger, Basel, Switzerland.
- Flaño, E., S. L. Kaattari, B. Razquin and A. J. Villena (1996). Histopathology of the thymus of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. Dis. Aquat. Org., 26, 11-18.
- Fouz, B., J. L. Barja, C. Amaro, C. Rivas and A. E. Toranzo (1993). Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. Curr. Microbiol., 27, 341-347.
- Francis, C. H. and A. E. Ellis (1994). Production of a lymphokine (macrophage activating factor) by salmon (*Salmo salar*) leucocytes stimulated with outer membrane protein antigens of *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol., 4, 489-497.

- Fyfe, L., A. Finley, G. Coleman and A. L. S. Munro (1986). A study of the pathological effect of isolated *Aeromonas salmonicida* extracellular protease on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis., 9, 403-409.
- Galeotti, M., D. Volpatti and M. Rusvai (1999). Mitogen induced in vitro stimulation of lymphoid cells from organs of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Fish Shellfish Immunol., 9, 227-232.
- Ganssin, R. C. and N. C. Bols (1998). Development of a monocyte/macrophage-like cell-line, RTS11, from rainbow trout spleen. Fish Shellfish Immunol., 8, 457-476.
- Gauthier, D. T., D. D. Cartwright, C. L. Densmore, V. S. Blazer and C. A. Ottinger (2003). Measurement of *in vitro* leucocyte mitogenesis in fish: ELISA based detection of the thymidine analogue 5'-bromo-2'-deoxyuridine. Fish Shellfish Immunol., 14, 279-288.
- Gordon, R. B. (1968). Distribution of transaminase (aminotransferase) in the tissue of the pacific salmon (*Oncorhynchus*), with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetic transaminase. J. Fish. Res. Bd. Can., 25, 1247-1268.
- Grayson, T. H., A. J. Evenden, M. L. Gilpin and C. B. Munn (1995). Production of a *Renibacterium salmoninarum* hemolysin fusion protein in *Escherichia coli* K12. Dis. Aquat. Org., 22, 153-156.
- Gunnlaundsdóttir, B. K., T. S. Hastings and A. E. Ellis (1990). Isolation of a new toxic protease from a strain of *Aeromonas salmonicida* subspecies *acromogenes*. Dis. Aquat. Org., 9, 199-208.
- Gunnlaundsdóttir, S., B. Magnadóttir and B. K. Gunnlaundsdóttir (1995). Effects of antigens from *Aeromonas salmonicida* spp. *acromogenes* on leucocytes from

- primed and unprimed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Shellfish Immunol., 5, 493-504.
- Gunnlaundsdóttir, B. and B. K. Gunnlaundsdóttir (1997). Pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon compared with protease production. J. Appl. Microbiol., 83, 542-551.
- Gutenberger, S. K., J. R. Duimstra, J. S. Rohovec and J. C. Fryer (1997). Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. Dis. Aquat. Org., 28, 93-10.
- Hackett, J. L., W. H. Lynch, W. D. Paterson and D. H. Coombs (1984). Extracellular protease, extracellular haemolysin and virulence in *Aeromonas salmonicida*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41, 1354-1360.
- Haeney, M. (1990). Allergy. In Immunology. pp. 221-250, Oxford Univ. Press, Oxford, England.
- Hibbs jr, J. B., R. R. Taintor, Z. Vavrin and E. M. Rochlin (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 87-94.
- Hirono, I., S. J. Lee and T. Aoki (1998). An accessory protein of the iron-regulated hemolysin of *Edwardsiella tarda* is necessary for hemolytic activity. Fish. Sci., 64, 924-928.
- Hudson, L. and F. C. Hay (1989). Practical immunology. Blackwell, London, p. 507.
- Huntly, P. J., G. Coleman and A. L. S. Munro (1992). The nature of the lethal effect on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., of a lipopolysaccharide-free phospholipase activity isolated from the extracellular products of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis., 15, 99-102.
- Iida, T. and H. Wakabayashi (1983). Bactericidal reaction by the alternative

- pathway of fish complement. *Fish Pathol.*, 18, 77-83.
- Iida, T. and H. Wakabayashi (1990). Relationship between iron acquisition ability and virulence of *Edwardsiella tarda*, the etiological agent of Paracolo disease in Japanese eel *Anguilla japonica*. In, *The second Asian Fisheries Forum*(eds. by Hirano, R. and I. Hanyu), Manila, Asian Fisheries Society, pp. 667-670.
- Inamura, H., K. Muroga and T. Nakai (1984). Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.*, 19, 89-96.
- Ishihara, S. and R. Kusuda (1982). Growth and survival of *Edwardsiella tarda* bacteria in environmental water. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48, 483-488.
- Ito, T., T. Iida and H. Kawatsu (1997). The importance of hydrogen peroxide in phagocytic bactericidal activity of Japanese eel neutrophils. *Fish Pathol.*, 32, 121-125.
- Janda, J. M. and S. L. Abbott (1993). Expression of iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 111, 275-280.
- Kanai, K. and Y. Takagi (1986). Alpha-hemolytic toxin of *Aeromonas hydrophilla* produced *in vivo*. *Fish Pathol.*, 21, 245-250.
- Kanemori, Y., T. Nakai and K. Muroga (1987). The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathol.*, 22, 153-158.
- Kano, T., T. Nakai and K. Muroga (1989). Mode of transmission of vibriosis among Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *J. Aquat. Anim. Health*. 1, 2-6.
- Kaplan, S. S., J. R. Lancaster Jr, R. E. Basford and R. L. Simmons (1996). Effect of nitric oxide on Staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Inf. Immun.*, 69-76.
- Katagiri, T., I. Hirono and T. Aoki (1997). Identification of a cDNA for medaka cytoskeletal β -actin and construction for the reverse transcriptase-polymerase

- chain reaction (RT-PCR) primers. Fish. Sci., 63, 73-76.
- Kawahara, E., T. Ueda and S. Nomura (1991). *In vitro* phagocytic activity of white-spotted char blood cells after injection with *Aeromonas salmonicida* extracellular products. Fish Pathol., 26, 213-214.
- Kemenade, B. M. L. V., F. A. A. Weyts, R. Debets and G. Flik (1995). Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin-1-like factor. Dev. Comp. Immunol., 19, 59-70.
- Khalil, A. H. and E. H. Mansour (1997). Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilotica*. Lett. Appl. Microbiol., 25, 269-273.
- Kodama, H., M. Moustafa, S. Ishiguro, T. Mikami and H. Izawa (1984). Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*. Relationship between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. Am. J. Vet. Res., 45, 2203-2207.
- Kokubo, T., T. Iida and H. Wakabayashi (1990). Production of siderophore by *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 25, 237-241.
- Köllner, B. and G. Kotterba (2002). Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellfish Immunol., 12, 35-48.
- Kou, G. H. and H. Y. Chung (1980). Drug resistant R⁺ bacteria in eel-cultured pond. Reports on fish diseases research (III). CAPD Fisheries Series, 3, 1-8.
- Kusuda, R. and F. Salati (1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. In Ann. Rev. Fish Dis. (eds by Faisal, M. and F. M. Hetrick). pp. 69-85, Pergamon Press, England.
- Kusuda, R. and K. Kawai (1998). Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathol., 33, 221-227.

- Kusuda, R. and N. Kitadai (1993). Hemolysin production by *Edwardsiella tarda* isolated from eel, *Anguilla japonica*. *Suisanzoshoku*, 41, 251-255.
- Kusuda, R., T. Itami, M. Munekiyo and H. Nakajima (1977). Characteristics of a *Edwardsiella* sp. from an epizootic of culture Crimson sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43, 129-134.
- Kusuda, R. and T. Taira (1990). Change of biological activities of phagocytes from the eel immunized with *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 25, 53-58.
- Kusuda, R., T. Toyoshima and Y. Iwamura (1976). *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullet in Okitru bay. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 42, 271-275.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 222, 680-685.
- Lamas, J., Y. Santos, D. W. Bruno, A. E. Toranzo and R. Anadón (1994). Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J. Fish Biol.*, 45, 839-854.
- Lange, S., B-K Gudmundsdottir and B Magnadottir (2001). Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 11, 523-535.
- Lee, K. K., K. C. Yui, T. I. Yang, H. I. Hong and P. C. Liu (1999). Protease and virulence of the extracellular products produced by *Vibrio carchariae* after growth on various media. *Z. Naturforsch.*, 54c, 383-389.
- Lee, K. K., P. C. Liu and S. N. Chen (1996). Studies on the virulence factors of *Vibrio* for tiger prawn, *Penaeus monodon* and immunization trials. *Reports Fish Dis. Res.*, 17, 1-13.
- Lee, K. K., P. C. Liu, G. H. Kou and S. N. Chen (1997). Investigation on the major exotoxin of *Vibrio harveyi* 770527 isolated from diseased *Penaeus*

- monodon*. Reports Fish Dis. Res., 18, 33-42.
- Liew, F. Y., S. Millott, C. Parkinson, R. M. J. Palmer and S. Moncata (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. J. Immunol., 144, 4794-4797.
- Lillehaug, A. (1989). A coat-effectiveness study of three different methods of vaccination against vibriosis in salmonids. Aquaculture, 83, 227-236.
- Lin, S. H., A. E. Ellis, G. A. Davidson and C. J. Secombes (1999). Migratory, respiratory burst and mitogenic responses of leucocytes isolated from the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol., 9, 211-226.
- Liu, P. C., K. K. Lee and S. N. Chen (1996). Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawns, *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol., 22, 413-416.
- Liu, P. C., K. K. Lee, C. C. Tu and S. N. Chen (1997). Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Cur. Microbiol., 35, 32-39.
- Liewelyn, M. and J. Cohen (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. The Lancet Inf. Dis., 2, 156-162.
- Loghothetis, P. N. and B. Austin (1996). Antibody responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to live *Aeromonas hydrophila* as assessed by various antigen preparations. Fish Shellfish Immunol., 6, 455-464.
- Madetoja, J., P. Pylkkö, T. Pohjanviyta, L. Schildt and S. Pelkonen (2003). Putative virulence factors of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), and European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). J. Fish Dis., 26, 349-359.
- Marsden, M. J., D. Cox and Secombes (1994). Antigen-induced release of

- macrophage activating factor from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocytes. Vet. Immunol. Immunopathol., 42, 199-208.
- Mekuchi, T., T. Kiyokawa, K. Honda, T. Nakai and K. Muroga (1995). Vaccination trials in the Japanese flounder against Edwardsiellosis. Fish Pathol., 30, 251-256.
- Metcalf, J. A., J. I. Gallin, W. M. Nauseef and R. K. Root (1986). Laboratory manual of neutrophil function. pp. 103-105, Raven press, New York.
- Molamder, D. W., F. Wroblewski and J. S. Ladue (1955). Serum glutamic oxaloacetic transaminase as an index of hepatocellular integrity. J. Lab. Clin. Med., 46, 831-839.
- Muroga, K., M. Nishibichi and Y. Jo (1976). Pathogenic *Vibrio* isolated from cultured eels. II. Physiological characteristics and pathogenicity. Fish Pathol., 11, 147-151.
- Nakai, T. (1985). Resistance of *Pseudomonas anguilliseptica* to bactericidal action of fish serum. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51, 1431-1436.
- Nakatsugawa, T. (1983). *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol., 18, 99-101.
- Nakatsugawa, Y. (1983). *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol., 18, 99-101.
- Nathan, C. F. and J. Gabay (1992). Antimicrobial mechanisms of macrophages. In, Mononuclear phagocytes: Biology of monocytes and macrophages (ed. by R. van Furth). Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 259-267.
- Paniagua, C., O. Rivero, J. Anguita and G. Naharro (1990). Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp.

- isolated from a river. J. Clin. Microbiol., 28, 350-355.
- Park, S. I., H. Wakabayashi and Y. Watanabe (1983). serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. Fish Pathol., 18, 85-89.
- Pérez, M. J., L. A. Rodríguez and T. P. Nieto (1998). The acetylcholinesterase ichthyotoxin is a common component of the extracellular products of Vibrionaceae strains. J. Appl. Microbiol., 84, 47-52.
- Rashid, M. M., T. Mekuchi, T. Nakai and K. Muroga (1994). A serological study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathol., 29, 277.
- Rockey, D. D., J. L. Fryer and J. S. Rohovec (1988). Separation and in vivo analysis two extracellular proteases and the T-hemolysin from *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aquat. Org., 5, 197-204.
- Romalde, J. L., Y. Santos and A. E. Toranzo (1992). Presence of dermonecrotic factors in the extracellular products of *Yersinia ruckeri*. Curr. Microbiol., 24, 263-267.
- Rudolph, K. W. E., M. Gross, F. Ebrahim-Nesbat, M. Nollenburg, A. Zomorodian, K. Wydra, M. Neugerauer, U. Hettwer, Wagihel-Shouny, B. Sonnenberg and Z. Klement (1994). The role of extracellular polysaccharides as virulence factors for phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads. In, Molecular mechanisms of bacterial virulence(eds. by Kado, C. I. and j. H. Crosa). pp. 357-378, Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands.
- Sakai, D. K. (1985). Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. Infect. Immun., 48, 146-152.
- Sakai, M., S. Atsuta and M. Kobayashi (1989). Bacterial kidney disease in Masu

- salmon, *Oncorhynchus masou*. *Physiol. Ecol., Japan*, Special vol. 1, 577-586.
- Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda (1983). Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.*, 18, 135-141.
- Salati, F., M. Hamaguchi and R. Kusuda (1987a). Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigen. *Fish Pathol.*, 22, 93-98.
- Salati, F., Y. Ikeda and R. Kusuda (1987b). Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 201-204.
- Santos, Y., I. Bandín, S. Nuñez, K. Gravningen and A. E. Tornazo (1991). Protection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Richardson), against vibriosis using two different vaccines. *J. Fish Dis.*, 14, 407-411.
- Sarath, G., M. G. Zeece and A. R. Penheiter (2001). Protease assay methods. In "Proteolytic enzymes: Practical approach (2nd ed.)" (edited by Beynon, R. and J. S. Bond). pp. 45-76, Oxford University press, NY.
- Sarker, A. K., H. Ukeda, D. Kawana and M. Sawamura (2001). Enzymatic assay of dehydrogenase substrate based on the detection of superoxide anion. *Food Res. Int.*, 34, 393-399.
- Scott, A. L. and P. H. Klesius (1981). Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. *Dev. Biol. Standard.*, 49, 243-254.
- Secombes, C. J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In *Techniques in Fish Immunology - Fish Immunology Technical Communications No. 1* (eds. by Stolen, J. S., T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. van Muiswinkel). SOS publications, pp. 137-154.

- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. *In* The fish immune system (eds. by Iwama, G. and T. Nakanishi). Academic press, pp. 63-103.
- Secombes, C. J. and T. C. Fletcher (1992). The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1, 53-71.
- Shoemaker, C. A., P. H. Klesius and J. A. Plumb (1997). Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 58, 181-190.
- Song, Y. L. and G. H. Kou (1981). Immune response of eels (*Anguilla japonica*) against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguillimorritiferum* (*E. tarda*) infection. *Proceeding of the Republic of China/U.S. cooperative science seminar on fish diseases*, National Science Council Series, 3, 107-115.
- Suprpto, H., T. Hara, T. Nakai and K. Muroga (1996). Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 31, 203-207.
- Suzuki, Y. and T. Iida (1992). Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 149-160.
- Tafalla, C. and B. Novoa (2000). Requirement for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Dev. Com. Immunol.*, 24, 623-631.
- Tang, P., V. Foubister, M. G. Pucciarelli and B. B. Finlay (1993). Methods to study bacterial invasion. *J. Microbiol. Meth.*, 18, 227-240.
- Thune, R. L., M. C. Johnson, T. E. Graham and Amborski (1986). *Aeromonas hydrophilla* β -hemolysin: purification and examination of its role in virulence in O-group channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish dis.*, 9, 55-61.

- Toranzo, A. E. and J. L. Barja (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3, 5-36.
- Toranzo, A. E., Y. Santos, M. L. Lemos, A. Ledo and J. Bolinches (1987). Homology of *Vibrio anguillarum* strains causing epizootics in turbot, salmon, and trout reared on the Atlantic coast of Spain. *Aquaculture*, 67, 41-52.
- Totland, G. K., A. Nylund and K. O. Holm (1988). An ultrastructural study of morphological changes in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during the development of coldwater vibriosis. *J. Fish Dis.*, 11, 1-13.
- Totoro, G. J., B. R. Funke and C. L. Case (2002). Microbial growth. In *Microbiology*. pp.156-183, Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Uddin, N. and H. Wakabayashi (1997). Effects of temperature on growth and protease production of *Cytophaga psychrophila*. *Fish Pathol.*, 32, 225-226.
- Ullah, M. A. and T. Arai (1983a). Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 18, 65-70.
- Ullah, M. A. and T. Arai (1983b). Exotoxins produced by *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 18, 71-75.
- Villamil, L., A. Figueras, R. Aranguren and B. Novoa (2003). Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio pelagius*. *J. Fish Dis.*, 26, 321-329.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1972). Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38, 577-587.
- Wang, X. H., H. L. Oon, G. W. P. Ho, W. S. F. Wong, T. M. Lim and K. Y. Leung (1998). Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiol.*, 144,

2987-3002.

- Watson, J. J. and F. H. White (1979). Hemolysins of *Edwardsiella tarda*. Can. J. Comp. Med., 43, 78-83.
- Wedemeyer, G. A. and N. C. Nelson (1975). Statistical methods for estimating normal blood chemistry ranges and variance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Shasta strain. J. Fish. Res. Board Can., 32, 551-554.
- Wedemeyer, G. A., R. W. Gould and W. T. Yasutake (1983). Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. J. Fish Biol., 23, 711-716.
- Yasunaga, N., S. Ogawa and K. Hatai (1982). Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured marine fishes. Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish., 8, 57-65.
- Zhang, X. H. and B. Austin (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonides. J. Fish Dis., 23, 93-102.
- Zorrila, I., S. Arijó, M. Chabrillon, P. Diaz, E. Martinez-Manzanares, M. C. Balebona and M. A. Moriñigo (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of the extracellular products. J. Fish Dis., 26, 103-108.
- 권현영, 김영주, 노명희 문홍만, 송재, 오현숙, 정희웅, 조경진 (1993). 혈액학 실습. pp. 61-80, 도서출판 고려의학.
- 김용호, 신흥대, 강신원 (1988). *Vibrio vulnificus* lipopolysaccharide의 생물활성과 그에 미치는 cell wall protein-A의 영향. 한국생화학학회지, 21, 285-295.
- 김하원 (1996). T 임파구 활성화와 신호전달. In 면역조절물질 탐색의 실험적 접근(김길현, 김영일 편, 면역조절의약품연구회). pp. 59-83, 도서출판 한림원.
- 명정인, 박승렬, 장영진 (1997). 사육수온과 먹이공급량이 조피볼락의 성장 및 사료효

- 울에 미치는 영향. 한국양식학회지, 10, 311-320.
- 명정인, 백혜자, 박민우, 김우진, 김 윤 (1996). 해산어류 육상수조 사육기술 개발시험, III-1. 조피볼락 치어의 성장에 미치는 먹이공급율의 영향. 수진사업보고서, 1995, 329-333.
- 박병하, 전임기, 정성부, 민광식, 이종문, 김광수, 손맹현, 심두생, 정승희 (1990). 넙치 해상양식기술에 관한 연구. 과기처, pp.141.
- 방종득, 박수일 (1994). 넙치의 면역반응에 수온이 미치는 영향. 한국어병학회지, 7, 119-125.
- 방종득, 전세규, 박수일, 최윤정 (1992). 양식 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생 화학적 및 생리학적 특성에 관한 연구. 한국어병학회지, 5, 29-35.
- 유병화, 박수일, 전세규 (1992). 어류혈청의 보체에 의한 살균작용. 한국어병학회지, 5, 9-18.
- 이관녕, 김진규 (1988). 임상화학. 의학문화사, pp. 812.
- 장선일, 김강주 (1996). 세포학 및 면역학 실험 노트. 원광대학교 출판국, pp. 173-195.
- 전중균, 김형배 (1998). 주요 양식어류의 하절기 혈액성분 비교. 한국양식학회지, 11, 547-556.
- 해양수산부 (2003). 해양수산통계연보 (<http://www.momaf.go.kr/>).