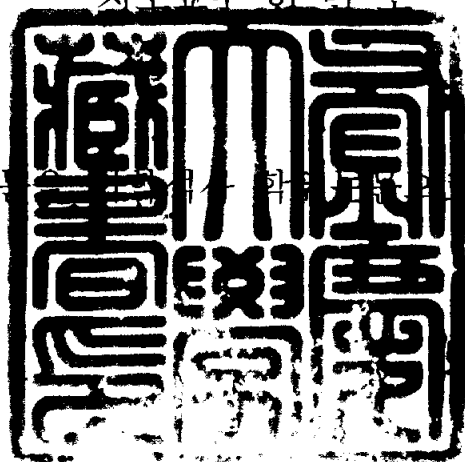


이학석사 학위논문

에드워드병 농양성 병변의
특성에 관한 연구

지도교수 허 민 도

이 논문은 이학석사 학위논문으로 제출함



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

강 형 길

강형길의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월

주 심 농학박사 박 수 일



위 원 약학박사 정 준 기



위 원 농학박사 허 민 도



목 차

Abstract.....	i
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
1. 시험어의 관리.....	4
2. 시험균과 dexamethasone의 투여.....	4
(1) 시험균의 배양.....	4
(2) 공격 시험.....	4
(3) dexamethasone의 투여.....	5
3. 혈액학적 표본의 제작.....	5
(1) 광학 현미경적 표본 제작.....	5
(2) 전자 현미경적 표본 제작.....	5
4. 조직학적 검사.....	6
(1) 조직학적 표본 제작.....	6
(2) 효소 조직 화학적 표본 제작.....	8
(3) 전자 현미경적 표본 제작.....	8
III. 결과.....	10
1. <i>E. tarda</i> 생균 주사 결과.....	10
2. 혈액학적 소견.....	11
3. 병리 조직학적 소견.....	11
(1) 일반 및 조직 화학 염색 병리 조직학적 소견.....	11

(2) 효소 조직 화학적 소견.....	13
(3) 전자 현미경적 소견.....	13
4. Dexamethasone 처치 결과.....	13
IV. 고찰.....	15
V. 요약.....	20
VI. 그림 및 그림 설명.....	21
VII. 감사의 글.....	32
VIII. 참고 문헌.....	33

Pathological characteristics of suppurative lesion in edwardsiellosis

Hyung-Gil Kang

*Department of Fish Pathology, Graduate School
Pukyong National University*

Abstract

To know the characteristics of abscess and its formation in edwardsiellosis, cellular components composing abscess were histologically identified. Edwardsiellosis in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, was artificially induced with or without the simultaneous oral dexamethasone. Without dexamethasone, most of infected fish had a number of abscess lesions in liver and hemopoietic tissues with the ascitic fluid and occasional rectal hernia. Main cellular components within abscess turned out to be histologically macrophages with a few lymphocytes and occasional neutrophils. With dexamethasone, no infected fish had abscesses in any tissues but mortality rates were markedly higher than in non-dexamethasone group. Typical ascite and rectal hernia were not manifested from these fish. These results suggest that abscess in edwardsiellosis is mainly consisted of macrophages and also responsible for the characteristic clinical manifestation. Additionally it is very interesting that abscess could be manipulated with dexamethasone treatment in association with the development of effective chemotherapy for this fastidious disease.

Key Words: *Edwardsiella tarda*, *Paralichthys olivaceus*, abscess, macrophage, dexamethasone

I. 서 론

어류의 세균성 질병은 각종 감염성 질병 발생의 반 이상을 차지하므로 그 피해가 매우 심각하다고 할 수 있다. 세균성 질병에 대하여 양식 현장에서는 주로 경구용 항균제가 치료 또는 예방의 목적으로 사용되고 있다. 육상동물 임상에서는 항균 화학요법제의 적용 경로가 경구 외에 비경구적인 여러 경로가 사용되고, 보조요법제로 대증적인 치료가 이루어지고 있다. 게다가 알려진 질병의 대부분이 그 발병, 진행 및 치유 또는 폐사에 이르는 자세한 병리학적 과정이 밝혀져 있어 좋은 치료 효과를 기대할 수 있다.

그러나 어류 질병의 경우에는, 항균 화학요법제의 적용경로가 경구에 한정되고, 특정 질병의 진단을 위한 연구는 이루어져 오고 있는 반면, 질병의 발생, 그 진행 및 회복 과정에 대한 병리학적 연구가 매우 미흡하기 때문에 대증적 치료나 보조요법제의 적용을 통한 대처가 어렵다. 게다가 대부분의 세균성 질병은 아직 사료를 먹을 수 있는 상태라면 치료 효과를 기대할 수 있으나, 섭이활동을 할 수 없는 상황에서는 경구 요법제의 적용효과를 기대할 수 없다.

약물을 제대로 섭취하였더라도 적정 농도로 작용표적인 원인 세균에 직접 노출되지 않는다면 만족스런 치료효과를 기대할 수 없다. 세균성 질병 중 만성 육아종성 질병의 경우에는 육아종 내에까지 약물이 이르기 어렵기 때문에 그 치료효과가 잘 나타나지 않는 것으로 되어 있다.

어류에서 세균에 의한 육아종성 질병에는 BKD, 유결절증, 노카르디아증, *Latococcus garviae* 감염증, *Mycobacterium marinum* 감염증 등이 알려져 있다. 육아종이란 만성 염증에서 출현하는 특이한 병변으로 큰포식세포의 역할이 주를

이루며, 이 세포의 유래인 유상피세포(epithleoid cell)와 거대세포(giant cell)가 출현하게 된다. 비록, 체내로 약물이 흡수된다 하더라도 육아종(granuloma) 내에 포위된 세균에 약물이 효과적으로 이르지 못하기 때문에 기대한 치료 효과를 거둘 수 없는 것으로 알려져 있다 (Cotran et al., 1999; Tomason, 1978).

그런데, 세균성 질병 중 에드워드병은 그 숙주의 범위가 매우 넓고 우리나라의 경우 넙치에 큰 피해를 입히는 질병으로 되어 있다. 에드워드병은 뱀장어, *Anguilla japonica* (Wakabayashi and Egusa, 1973), 차넬메기, *Ictalurus punctatus* (Nakatsugawa, 1983), 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus* (Kaige et al., 1986), 잉어, *Cyprinus carpio*의 담수산 어류 뿐만아니라, 숭어, *Mugil cephalus* (Kusuda et al., 1976), 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Nakatsugawa, 1983) 등의 해산어에도 발병하는 것으로 보고되고 있다. 특히, 본 질병은 우리나라 해면 양식 어업 중 그 생산량이 48.6% (해양수산부, 2003)를 차지하는 넙치에서 발생하는 주요 세균성 질병일 뿐 아니라 그 누적 폐사율은 60-80%에 까지 이르러 반드시 해결되어야 할 질병으로 사료된다. 에드워드병은 육아종성 질병으로 분류되고 있지는 않으나, 주로 간 및 조혈 조직에 농양소(abscess)를 형성함으로써 화학요법제가 세균에 까지 이르지 못함으로써 그 치료 효과가 의심되고 있는 질병이다(Heo and Kim 1996; Kim and Heo, 2001). 농양소가 본 질병의 치료과정에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 연구는 지금까지 없는 것으로 보인다.

고등 척추동물에서의 농양(pus)은 호중구의 조직 용해 작용에 의하여 형성되는 액화괴사의 한 형태이며, 화농소는 주로 괴사 혹은 괴사 중인 호중구와 괴사 조직세포 로 구성된다고 알려져 있다 (Cotran et al., 1999; Tomason, 1978). 어류에서의 *E. tarda* 감염증과 관련하여 임파 조혈 장기의 큰포식세포의 특징적인

분포 변화 (Lee et al., 1995) 와 이러한 화농성 염증소 내의 염증세포의 구성에 관한 보고가 소수 있지만 (Darwish et al., 2000; Lee et al., 1995; Miyazaki and Kaige 1985), 농양 구성세포의 성격이나 종류에 관하여 명확하게 언급하거나 연구된 보고가 없다. 그러나 농양소의 형태적 특징과 Lee et al. (1995)의 본 질병에 대한 보고를 토대로 농양 병소의 구성 세포를 검토해 볼 때 큰포식세포의 분포 특징인 MMC와 유사한 식세포군임을 시사하고 있다.

에드워드병은 감염 초기의 조직반응 단계에서부터 국소적인 소 농양소를 형성하기 시작하며, 감염후기에는 내부장기 및 근육으로 농양소(abscess) 발생이 확장된다 (Nakatsugawa, 1983; Herman and Bullock, 1986; Kaige et al., 1986). 본 질병특이의 모든 증상, 즉 간 위축, 울혈, 복수, 탈장 등은 이들 농양 병소와 관련되는 것으로 생각되며, 본 병변의 발생을 억제할 수 있다면, 에드워드균에 대한 약물의 접근이 용이하게 하여, 치료효과의 상승 내지 극대화를 도모할 수 있는 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 에드워드병 원인균 중의 하나인 *Edwardsiella tarda*를 넓치에 인위 감염시킨 후, 형성된 농양소에 대하여 그 구성 세포의 종류를 조직학적으로 동정하는 한편, 소염제 중의 하나인 dexamethasone을 세균과 함께 동시 경구투여하여 인위 감염을 유도한 후, 농양소의 형성에 미치는 영향과 발현 임상증상을 대조 감염군과 비교하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어의 관리

실험어는 경북 경주시 감포 소재의 「동경 수산」에서 체장 10~12cm의 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를 공급받아 실험실내 순환 여과식 수조에 수용하고 평균 수온 20~22℃에서 air pump로 지속적으로 포기하면서 일주일간 순치 과정을 두었다. 실험 기간 동안에는 실험어를 지속적으로 포기중인 정치식 수조에 다시 수용하였고 실험이 완료될 때까지 사료는 일체 공급하지 않았다.

2. 실험균과 dexamethasone의 투여

(1) 실험균의 배양

실험균으로 *Edwardsiella tarda*를 사용하였으며, 균주는 본 대학 수산생명의학과 어병예방학 실험실에서 감염어로부터 분리·보존된 *E. tarda* FSW 910410 균주를 사용하였다. 동결보존(-80℃)되어 있던 이 균주를 TSB배지에 28℃에서 전배양(preculture)하여 활성화시킨 다음 다시 같은 온도에서 24시간 본배양하였다.

(2) 공격시험

실험균의 농도는 1.5×10^4 CFU로 어체 당 주사한 균액의 양은 0.1ml로 하고 멸균 tuberculin syringe를 사용하여 복강 내 장기가 손상되지 않도록 주의를

기울이며 복강주사 하였다.

(3) Dexamethasone의 투여

Dexamethasone 투여는 생균 주사와 동시에 실시하였고 어체중 kg 당 5mg 농도로 PBS에 현탁시킨 후 0.2ml씩 존대를 이용하여 경구 투여하였다.

각 실험구별 실험어는 50마리로 하고 대조군으로 멸균 PBS 주사군을 두었으며 실험어는 15마리로 하였다. 각 실험어는 매일 관찰하면서 어체의 상태 및 폐사율을 조사하였으며, 주사 후 7일째의 실험어의 장기를 채취하여 병리 조직학적으로 관찰하였다.

3. 혈액학적 표본의 제작

(1) 광학 현미경 표본 제작

혈관 내의 식균 세포 관찰 및 분별 계수를 위해 주사 후 7일째 미부 정맥에서 혈액을 채취하여 도말한 후 Diff-Quik 염색과 PAS 염색을 실시하여 반응이 현저한 군과 대조군에 대해 각각 호중구 및 단구의 세포 성분에 대한 분별 계수를 조사하였다.

(2) 전자현미경적 표본 제작

0.5ml의 헤파린(Johansson, 1995)을 채운 멸균 주사기를 사용하여 미부 정맥에서 채혈하여 4℃에서 원심 분리(500xg, 10분) 한 후 4℃에서 2.5% glutaraldehyde에 3시간 전고정한 다음 1% Agar를 첨가하여 굳힌 후 세절하였다. 0.1M phosphatic buffer solution (pH 7.0-7.4)에 세차해 20분씩 수세하여 4

℃에서 1% Osmium tetroxide고정액에 1시간 후고정한 후 0.1M phosphatic buffer solution (pH 7.0-7.4) 에 세차례 20분씩 수세하여 50%에서 100%까지 순차 농도 에틸알콜에서 탈수하였다. propylene oxide를 적용하여 Epon친화시킨 후 Epon혼합물에서 포매 후 열중합 holder에 넣어 건조기내에서 열중합시켰다. 준초박 절편을 1% toluidine blue용액에 단염색하여 농양 병소를 확인하였고 초미세 박절한 후 Uranyl acetate & lead citrate 중염색을 적용하여 투과전자현미경(JEM 2010, JEOL LTD.) 으로 관찰하였다.

4. 조직학적 검사

(1) 조직학적 표본 제작

1) 일반 조직학적 표본 제작

E. tarda 생균 주사균에 대해서 주사후 7일째에 각 군당 3마리씩 무작위로 선별하여 부검하였다. Ethyl aminobenzoate 100ppm으로 마취한 후 마취 해부를 실시하여 각 개체로부터 간, 비장, 신장을 절취하고 H & E염색 표본제작을 위해 각 장기의 일부를 5mm이내의 두께로 잘라 Bouin's solution에 고정하였다. 24시간 후에 다시 동 고정액에 2차고정을 하였다. 2차고정이 완료된 후 수세하고 70%에서 100%까지 순차 농도의 알코올에 탈수하였다. Xylene에 의한 투명화, 파라핀 친화 및 포매 후 Rotary형 microtome (Reichert-Jung 820, Leica) 으로 약 5 μ m두께의 박편을 얻어 Harris's hematoxylin-eosin 염색 표본을 제작하고 광학 현미경으로 검경하였다.

2) 특수 염색 조직학적 표본 제작

빈사 개체의 간장에서 형성된 농양소의 윤곽 및 구성 세포를 동정하기 위하여 파라핀 절편을 사용하여 PAS, Modified Heidenhain's azan 및 Sudan black B 염색법을 적용하였다. 각 염색의 순서는 다음과 같다.

a. PAS(Periodic acid schiff) 염색

탈파라핀, 함수 및 수세 이후 1% periodic acid로 10분간 처리하고, schiff's reagent 용액에서 발색될 때까지 처리하였다. NaHSO₃ 용액에 2분간 3회 처리한 뒤 수세 후 harris's hematoxylin으로 10초 간 대조 염색을 실시한 후 수세, 탈수, 투명화 및 봉입과정을 거쳐 관찰하였다.

b. Modified Heidenhain's azan 염색

탈파라핀, 함수 및 수세 이후 azocarmine 수용액으로 50℃에서 1시간 반응 후 0.1% aniline alcohol로 10분간 분별하였다. 1% acetic acid alcohol로 1분간 탈색 정지하고 5% phosphothungstic acid 용액으로 15분간 처리 한 뒤 aniline blue-orange G 수용액으로 15분간 대조 염색하여 수세, 탈수, 투명화 및 봉입 과정을 거쳐 관찰하였다.

c. Sudan Black B 염색

반응이 현저한 동결 절편 조직편을 제작하여 2-6℃ glutaraldehyde solution에 1분간 고정한 후 증류수로 수세하고 Sudan black B staining reagent (Sigma kit 380-B) 5분간 반응시켰다. 반응 후 70% 에탄올로 세 번 이상 수세하고

Gill's hematoxylin으로 대조염색하여 수용성 봉입제로 봉입후 관찰하였다.

(2) 효소조직화학적 표본 제작

과라핀 조직보다 정확한 세포 동정을 위해 빈사 개체중 간의 농양 형성이 현저한 조직을 대상으로 cryostat microtome을 사용해 6-8 μ m의 두께로 동결절편을 제작하여 효소 조직화학적염색을 실시하였다. 비교적 호중구 및 큰포식세포의 구분이 용이한 염색법으로 α -naphthyl acetate esterase를 선택하였고 그 염색 순서는 다음과 같다.

상기 동결조직편을 대상으로 citrate-acetone-formaldehyde solution에 실온에서 30초간 고정한 후 증류수로 수세하였다. 수세 후 α -naphthyl acetate esterase solution (Sigma kit 91-A) 에 37℃에서 30분간 반응 후 증류수로 수세하였다. 대조염색으로 hematoxylin으로 2분간 염색한 후 수용성 봉입제로 봉입하여 관찰하였다.

(3) 전자 현미경적 표본 제작

광학 현미경하에서 조직 반응이 현저한 개체의 간 및 신장에 대해서 전자현미경적 검사를 실시하였다. 장기를 절취하여 1mm로 세절하고 2.5% glutaraldehyde solution에 4℃, over night 전 고정하여, 0.1M phosphatic buffer solution(pH 7.0-7.4)에 10분씩 세 차례 수세하였다. 4℃에서 1% Osmium tetroxide solution에 2시간 후 고정하고 0.1M phosphatic buffer solution (pH 7.0-7.4) 에 세 차례 10분씩 수세하여 50%에서 100%까지 순차 농도 에틸알콜에서 탈수하였다. propylene oxide(PO)에서 치환 후 PO : Epon혼합물에서 포매하

여 Epon 혼합물과 함께 열중합 holder에 넣어 oven내에서 열중합 시켰다. 1 μ m 두께의 초박 절편을 1% toluidine blue 단염색하여 필요한 부위를 선별·삭정하고, 초박절하여 얻은 절편을 uranyl-acetate와 lead citrate 이중 염색 후 투과 전자 현미경 (JEM 1200, JEOL LTD., Japan) 으로 관찰하였다.

III. 결 과

1. *E. tarda* 생균주사 결과

생균 주사 후 일주일만에 걸쳐 빈사 및 폐사가 나타났으며 이 기간 내에 누적 폐사율은 약 50%에 이르렀다. 에드워드균이 간, 비장 및 혈액에서 재분리 됨으로써 본 감염에 의한 폐사로 인정되었다. 빈사상태의 시험어는 체색 흑화, 복부 팽만 및 탈장 소견을 보였으며 힘없이 유명하였다(Fig 1). 부검 시, 복강 내에 복수(ascitic fluid)를 동반하는 경우가 많았으며 장내에는 황색 또는 무색의 장액성 물질이 차 있었다. 두신과 비장은 종대되어 있었고, 간 표면의 충, 출혈 소견을 보인 개체도 관찰되었다(Fig 2).

2. 혈액학적 소견

(1) 광학 현미경적 소견

7일 짜의 빈사 개체 및 대조군을 대상으로 도말 표본을 제작하여 호중구 및 단구의 분별 계수를 실시하였다(Fig. 2). 빈사 개체의 혈액 표본에 대한 광학 현미경적 관찰 결과 단구 증가증(monocytosis) 및 호중구 증가증(neutrophilia) 소견을 나타냈으며(Fig. 4), 단구 세포질 내에는 다수의 세균이 관찰되었다(Fig 5).

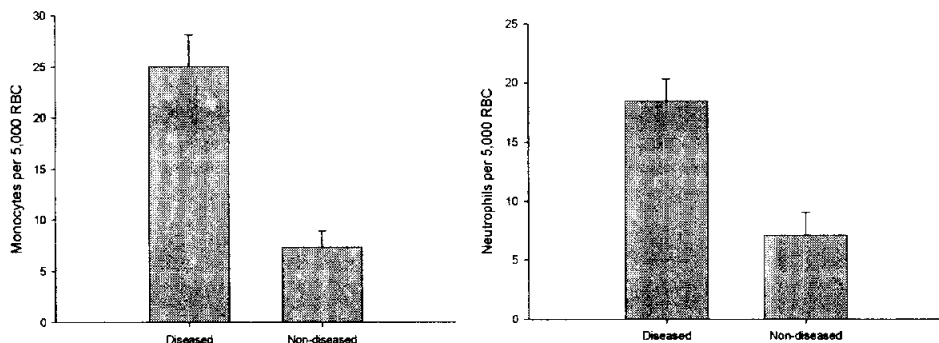


Fig. 1. Number of diseased monocytes and neutrophils which were compared to non-diseased olive flounder.

(2) 전자 현미경적 소견

세균을 포식하고 있는 식세포의 표면은 불규칙한 모양으로 그 직경은 대략 $8.0 \times 9.7 \mu\text{m}$ 이었다. 핵은 편재되어 있었으며 핵 내막을 따라 일정한 이질 염색질이 분포하고 핵질 (neucleoplasm) 은 전자 밀도가 낮았다. 세포질 내에는 mitochondria, Golgi apparatus, rough endoplasmic reticulum (rER), lysosome 및 불규칙한 다수의 공포가 산재해 있으며 포식 용해소체 내에는 많은 세균이 포식되어 있었다(Fig. 6, 7).

3. 병리 조직학적 소견

(1) 일반 및 조직 화학 염색 표본의 병리조직학적 소견

1) 간의 병리조직학적 소견

생균 주사 후 7일째 빈사 개체의 간에서 실질 영역을 중심으로 농양성 병소가 관찰되었다(Fig 8). 농양성 병소는 괴사된 간세포, 호산성의 조직 파편과 공

포화된 큰포식세포로 구성되어 있었다(Fig. 9).

간장의 농양성 병소에서의 구성 세포 동정을 위한 몇몇 특수 염색을 실시한 결과 PAS 염색시에는 농양소내의 대부분의 세포가 약한 양성 반응을 나타냈으며(Fig. 17), Modified Heidenhain's azan 염색 결과 농양소 주위의 경계 부위가 청색의 양성 반응을 보였다(Fig. 16). 동결 조직편 중 농양이 현저한 조직 표본에 대한 Sudan black B 염색 결과 농양소 내에 일부 검은 색으로 양성을 보이는 세포가 관찰되었지만 대부분의 세포는 음성 반응을 나타내었다(Fig. 18).

2) 신장의 병리 조직학적 소견

빈사 개체의 신장에서는 혈구, 세망세포, 큰포식세포 등으로 이루어진 실질부를 중심으로 병변이 인정되었다(Fig. 10). 정상적인 망상 구조의 배열이 심하게 붕괴되었으며, 조혈 세포 등의 실질 세포의 괴사와 함께 때때로 큰포식세포 집단들은 세포질의 심한 공포상을 나타내었다(Fig. 11).

3) 비장의 병리 조직학적 소견

대조군의 비장에서는 고등척추동물의 적색수 (red pulp) 및 백색수 (white pulp) 의 명확한 구분이 되지 않았지만 적혈구를 함유한 적색수와 백색수로 여겨지는 림프구, 큰포식 세포 및 세망 세포로 구성되는 부분이 비장 전반으로 관찰되었다. 비수를 제외한 부분은 단층의 세포층으로 이루어진 협조직 (ellipsoid) 으로 절단 방향에 따라 불규칙한 형태로 나타났지만 비장 조직 전체에 골고루 분포하고 있었으며 섬유성 결합조직으로 둘러싸인 밝은 부위로 인정되었다.

빈사 개체는 협조직의 현저한 비후 소견과 함께 협조직 및 비수내 큰포식세

포의 비대 및 세포질의 공포화 현상이 나타났다(Fig. 12). 비대 및 공포화된 큰 포식세포의 세포질 내에는 균질한 호염성 물질이 차 있었다(Fig. 13).

(2) 효소 조직 화학적 소견

동결 절편 중 간장의 농양 병소가 현저한 조직 표본에 대한 효소조직화학적 검사를 실시하였다. 농양소 내의 대부분의 세포는 α -naphthyl acetate esterase 양성 반응을 나타내었으며 양성 과립 성분들로 충만해 있었다(Fig 19).

(3) 전자 현미경적 소견

Semithin 절편 중 간의 농양 병소가 현저한 조직 표본(Fig. 20)에 대해 투과 전자현미경으로 관찰한 결과 농양소의 식세포의 phagosome내에 다수의 *E. tarda*가 생존 및 증식하고 있는 것이 확인되었다(Fig. 21). 식세포의 핵은 편심 핵으로 염색질은 균질하였다. 식세포의 세포질 내에는 다량의 공포 및 변성 성분이 확인되었으며(Fig. 22), 과립은 인정되지 않았고 용해소체가 관찰되기도 하였다(Fig. 23).

4. Dexamethasone 투여 결과

Dexamethasone 처치 유무에 따라 인위 감염군의 임상적 및 조직학적 소견은 유의할만한 차이를 나타내었다(table 1). Dexamethasone 투여군에서는 일주만에 누적 폐사율이 50%에 달했으나 복수 및 탈장의 소견이 현저히 감소한 반면, dexamethasone 비투여군의 경우 폐사는 없었고 복부 팽만 및 복수의 저류, 탈장 및 간 울혈 등의 내, 외부소견이 뚜렷하게 관찰되었다.

간장에서의 농양 병소 유무를 병리 조직학적으로 관찰한 결과, dexamethasone 비투여군에서 주사 후 7일째 50마리의 검사개체 중에서 28마리에서 간과 신장의 공포화된 식세포 침윤 및 전형적인 농양 형성을 확인할 수 있었으며, dexamethasone 투여군에서는 조직 절편상에서의 농양 형성은 관찰할 수 없었다.

Table 1. Comparison of clinical parameters between artificially infected flounder treated with and without oral dexamethasone (7 days after infection).

Clinical Parameters	With Dexa. (n=50)	Without Dexa. (n=50)	Control (n=15)
Mortality	25 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
Abdominal distension	4 (8%)	30 (60%)	0 (0%)
Ascites	4 (8%)	27 (54%)	0 (0%)
Hernia	1 (2%)	17 (34%)	0 (0%)
Abscess	0 (0%)	28 (56%)	0 (0%)

Dexa: dexamethasone.

IV. 고 찰

Edwardsiella tarda 감염에 의한 에드워드병의 병리 조직학적 소견은 간과 신장의 조혈 영역을 중심으로 한 다수의 농양소 형성을 특징적으로 하고 있다. Darwish et al. (2000) 은 실험 감염 시킨 channel catfish (*Ictalurus punctatus*) 의 간, 신장 및 비장의 농양소 구성세포를 광학 현미경적 형태로 미루어 큰포식세포인 것으로 보고하였다. 반면 다른 연구자들은 Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) 및 Japanese eel (*Anguilla japonica*) 에서 간과 신장의 농양소 구성 세포를 호중구라고 보고하고 있다 (Rashid et al., 1997; Miyazaki and Kaige 1985; Gutierrez and Miyazaki, 1994). 이와 같이 농양소 구성 세포의 종류에 대한 보고가 일치하지 않고 있다. 게다가 이들 보고가 광학 현미경적 관찰에 머물러 있고 경골어류에서 호중구와 큰포식세포간 차이가 혈액 도말 표본에서조차 구별이 용이하지 않을 뿐 아니라 조직 표본상에서는 더욱 불분명하다. 이는 고등척추동물과 같은 핵분열 현상이 대부분의 경골어류의 호중구에서는 없기 때문이다. 게다가 일반적으로 농양은 고등동물에서 액화 괴사의 한 형태로 호중구로 구성된다고 알려져 있다 (Cotran et al., 1999; Tomason, 1978).

본 연구에 들어가기 전 *E. tarda*를 주사하여 인위적 감염을 유도한 개체 중 일부에서 복부 팽만, 복수 및 탈장을 특징으로 하는 전형적 에드워드병 소견을 보이는 개체가 7일째에 출현하였다. 이들 개체를 부검한 결과 간, 비장, 또는 조혈조직에서는 육안 및 광학 현미경적으로 농양소 형성을 확인할 수 있었다. Kaige et al. (1980) 도 *E. tarda*를 인위 감염시켜 이와 유사한 반응을 보고하였다. 비장의 협조직과 신장의 조혈조직에서는 다수의 비대화된 식세포가 침착되

어 있었으며 세포질 공포화와 세포질 내에는 과립성의 물질이 충만해 있었다. 광학 현미경적으로 이들 세포가 호중구인지 큰포식세포인지 식별이 어려웠다.

따라서 본 연구에서는 우선 특수 염색, 효소 조직 화학적 방법 및 전자 현미경적인 방법을 동원하여 에드워드병의 농양 병소의 우점 세포가 호중구인지 큰포식세포인지를 동정하고자 하였다.

일반적으로 광학 현미경용 조직 절편 상에서 식세포는 포식 활성 및 이동 활성 등에 기인하여 다양한 형태변화를 일으키기 때문에 식세포간 또는 인접 기타 조직 세포와의 구별이 쉽지 않다. 식세포에는 큰포식세포와 호중구를 포함한 과립구가 있으며 큰포식세포계에는 혈액내 단구, 조직내 유주 또는 고정 큰포식세포가 있다. 이들 식세포간을 분별, 동정하기 위한 방법으로 조직 화학적 방법, 효소학적 방법 또는 전자 현미경적인 접근이 흔히 사용되고 있다 (Hébert et al., 2002; Bodammer and Robohm, 1996).

광학 현미경하에서 경골어류의 식세포로 중요한 큰포식세포와 호중구를 분별, 동정하기 위한 염색으로 α -naphthyl acetate esterase와 Sudan black B 염색법이 알려져 있다(Hébert et al., 2002). 즉, 큰포식세포는 α -naphthyl acetate esterase에 양성, 호중구는 Sudan black B에 양성반응 나타낸다. 또한, PAS 염색에서 큰포식세포는 약한 양성, 호중구는 강한 양성 과립이 관찰되는데, 도말 표본에서 더욱 분명히 구분된다.

전자 현미경적으로 경골어류의 큰포식세포와 호중구의 특징적인 차이점은 호중구에 비해 큰포식세포가 핵질 및 세포질의 전자 밀도가 낮고 세포질 내에는 많은 vacuole과 보다 현저한 세포 소기관으로 구성되며 많은 lysosome like body를 포함하고 있다. 또한 세포막의 일부는 pseudopodial extensions을 형성

하기도 한다(Bodammer and Robohm, 1996; Meseguer et al., 1994).

인위적으로 유도한 에드워드병에서 간내 농양 병소를 관찰한 결과 농양성 병소의 가장자리는 Modified Heidenhain's azan 염색에 강한 양성 반응을 나타내는 섬유소층으로 둘러싸여 있었다. 농양소내 대부분의 세포는 α -naphthyl acetate esterase 양성, PAS에 약한 양성을 나타내어 대부분 큰포식세포인 것으로 사료되었다. Sudan black B에는 극소수의 세포가 양성 반응을 보여 호중구도 일부 포함되어 있는 것으로 생각되었다. 또한 농양소를 투과 전자 현미경으로 관찰한 결과 식세포의 핵은 편심핵이며 염색질은 균질하였다. 식세포의 세포질내에는 다량의 공포 및 변성 성분이 확인되었으며, 과립은 인정되지 않았고 많은 mitochondria, Golgi complex, rER 및 용해소체가 관찰되었다. 이러한 세포의 크기와 세포 소기관의 구성, 핵의 형태 및 염색질의 특성으로 미루어 큰포식세포인 것으로 동정되었다. 이러한 세포의 세포질 내에 *E. tarda*가 phagosome 내에서 형태적 손상 없이 확인되었다.

농양소 형성에 대한 보고는 많은 반면 그 형성 과정에 대하여 연구하거나 또 언급한 예는 찾을 수 없다. 어류의 큰포식세포는 서로 응집하여 집단을 형성하는 특성이 있음이 알려져 있다 (Herraez and Zapata, 1986; Lee et al., 1995; Han et al., 1995). 소위 melano-macrophage center 또는 MMC라 불리는 것으로 이와 같은 속성에 따른 것이다. 또한 *E. tarda*는 식세포내에서의 식균 작용에 대한 회피가 가능한데 이는 숙주 혈액 속의 iron을 획득할 수 있는 능력, 즉 siderophore때문이라고 하였다 (Janda et al., 1991b). 뿐만 아니라 *E. tarda*의 cell-associated hemolysins(CAH) 생산과 siderophores의 생성은 혈액과 식세포내에서의 생존 및 증식을 가능하게 할 수 있다 (Kokubo et al., 1990; Janda et al.,

1991a, b).

따라서 에드워드균을 포식한 큰포식세포는 집단을 이루게 되고 포식된 균이 살멸이 되지 않음에 따라 (Janda et al., 1991b) 큰포식세포는 결국 괴사되게 되고 또 다른 큰포식세포가 포식하는 반복된 과정이 이루어짐으로써 농양성 병변으로 이어지게 되는 것으로 짐작된다.

이상의 결과를 미루어 농양소는 큰포식세포집단인 것으로 사료되었다. 이러한 농양 병소이 육아종성 질병에서와 같이 항생제의 접근이 어려운 환경을 만들게 한다고 알려져 있다(Heo and Kim, 1996; Kim and Heo, 2001). 만약 농양소 형성을 억제할 수 있다면 항생제의 세균에 대한 접근이 용이하여 치료 효과의 개선을 기대할 수 있을 것이다.

따라서 그 가능성을 추적하기 위한 방법의 일환으로 항염증제로서 소염 효과 뿐 아니라 식세포의 유주를 억제하는 것으로 알려진(Poon, 2001; Walsh, 2002) dexamethasone을 세균과 함께 적용함으로써 그 증상의 발현 내용을 조사하고자 하였다.

Dexamethasone과 같은 부신 피질 호르몬인 glucocorticosteroid는 고등척추동물에서 면역계 세포의 광범위한 항염증 작용을 나타낸다고 알려져 있다(Poon, 2001; Walsh, 2002). 경골어류에서도 이와 유사한 반응이 나타나는데, 혈중의 백혈구 및 임파구의 수가 감소할 뿐만 아니라, 임파성 기관의 임파구 수를 감소시키며 (Anderson et al, 1982), 비특이적 면역반응인 식세포 기능에도 영향을 미친다고 보고하고 있다 (Stave and Roberson, 1985). Park and Huh (1994)는 인위적인 에드워드 감염증에서의 dexamethasone 의 처치 효과와 MMC(melano-macrophage center)의 출현빈도나 식균활동을 현저히 떨어뜨린

다고 하였다.

본 연구에서 dexamethasone을 세균과 함께 투여한 군에서 폐사는 있었으나 임상적으로 에드워드병의 전형적인 증상인 복부 팽만, 복수 및 탈장 등의 소견을 나타내지 않았을 뿐 아니라 간과 조혈 조직에서 농양 형성을 관찰할 수 없었다. 이와 같은 소견은 농양 형성이 세균 또는 세균 독소의 영향을 차단하는 효과는 있으나 복부 팽만, 복수 및 탈장의 특징적인 임상소견의 발현에 농양소 형성이 깊이 관련하고 있는 것으로 사료되었다.

이상의 연구의 결과를 종합하면 에드워드병의 농양소는 *E. tarda*를 포식한 괴사 또는 침윤 중의 큰포식세포 집단으로 구성되며, 이 농양소는 본 질병의 전형적인 임상소견의 발현과 직접 관련이 있는 것으로 생각된다. 또한 dexamethasone에 의하여 전형적인 농양소 형성이 억제된 결과는 본 질병에 대한 치료법 개선과 관련하여 매우 흥미로운 현상으로 사료되었다.

V. 요 약

에드워드병의 농양 병소와 그 형성 과정의 특성을 이해하기 위해 농양을 구성하고 있는 세포 성분을 조직학적으로 동정하였다. 인위적으로 본 질병을 유도한 넙치를 대상으로 dexamethasone을 경구 투여 또는 비투여 하여 그 결과를 관찰하였다. 비투여구에서는 대부분의 개체가 복수와 탈장 소견을 동반하였으며 간과 조혈조직에서 많은 농양소를 형성하고 있었다. 농양을 구성하는 대부분의 세포성분은 큰포식세포로 사료되었으며 극소수의 임파구와 일부 호중구로 구성되어 있었다. dexamethasone 투여구에서는 조직내에 농양의 형성을 관찰 할 수 없었지만 비투여구에 비해 현저히 높은 폐사율을 나타내었다. 이들 개체에서는 또한 복수 및 탈장 소견을 관찰할 수 없었다.

이상의 연구의 결과를 종합하면 에드워드병의 농양소는 *E. tarda*를 포식한 괴사 또는 침윤 중의 큰포식세포 집단으로 구성되며, 이 농양소는 본 질병의 전형적인 임상소견의 발현과 직접 관련이 있는 것으로 생각된다. 또한 dexamethasone에 의하여 전형적인 농양소 형성이 억제된 결과는 본 질병에 대한 치료법 개선과 관련하여 매우 흥미로운 현상으로 사료되었다.

표제어 : *Edwardsiella tarda*, *Paralichthys olivaceus*, abscess, macrophage, dexamethasone

VI. 결과그림 및 그림설명

Fig. 2. External findings of infected olive flounder. Note abdominal swelling and rectal hernia.

Fig. 3. Internal findings of infected olive flounder. Note ascite and nodular congestive liver.

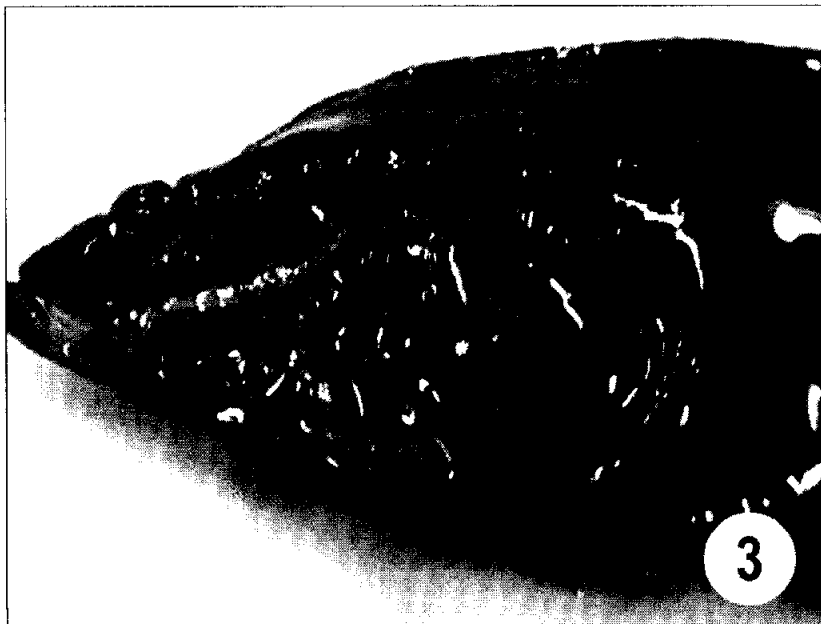
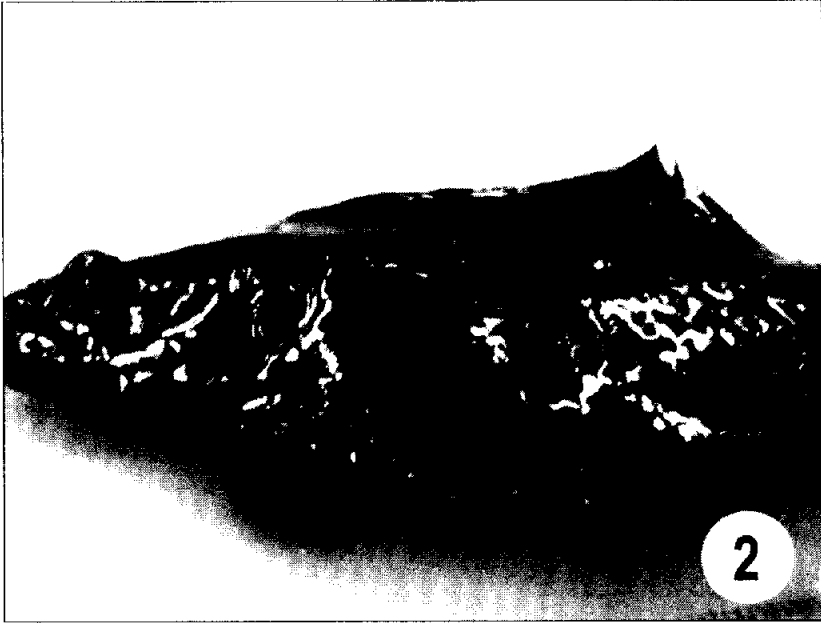


Fig. 4. Smear of blood. 7 days after *E. tarda* injection. A number of weak PAS-positive cells (arrow heads) are found. PAS & Giemsa, $\times 400$.

Fig. 5. Smear of blood. 7 days after *E. tarda* injection. Note the bacteria within phagocyte (circle) Diff-Quik, $\times 1,000$.

Fig. 6. Electron micrograph of multiplying *E. tarda* cells (arrows) within a phagocyte in the peripheral blood. $\times 6,000$.

Fig. 7. Electron micrograph of multiplying *E. tarda* cells within a phagocyte in the peripheral blood. $\times 6,000$. B, Bacteria; RER; Rough endoplasmic reticulum; N, Nucleus; V, Vacuole

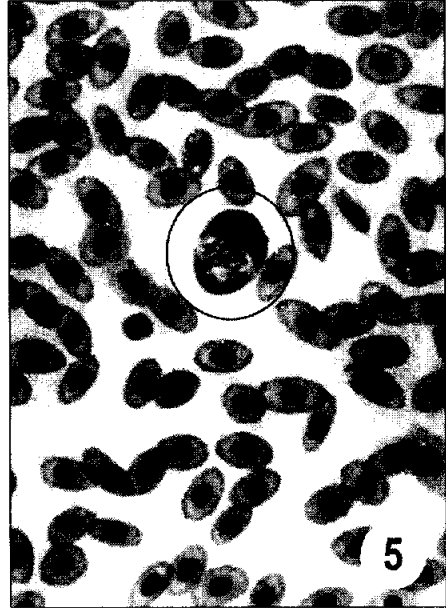
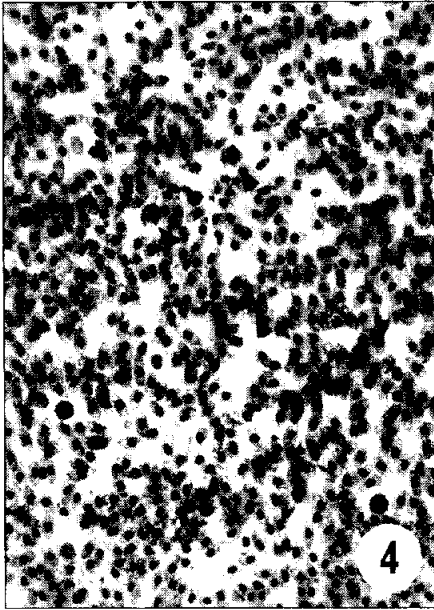


Fig. 8. Liver. 7 days after injection of live *E. tarda*. Note abscess (circle). HE, $\times 400$.

Fig. 9. Magnification of circle on Fig. 8. Vacuolated phagocytes and cellular debris within abscess. HE, $\times 1,000$.

Fig. 10. Body kidney. Note the vacuolated phagocytes in the hemopoietic tissue (circle). HE, $\times 400$.

Fig. 11. Magnification of circle part in Fig. 10. HE, $\times 1,000$.

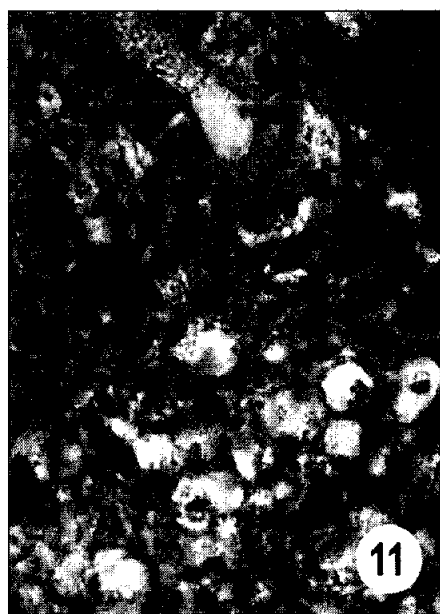
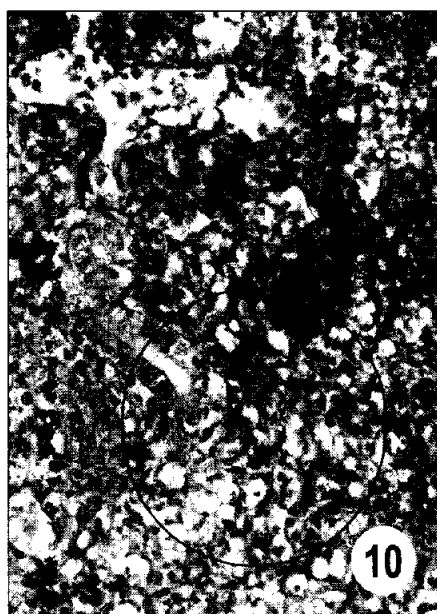
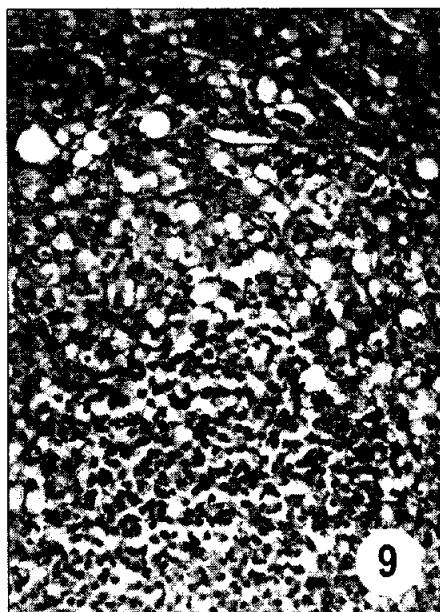
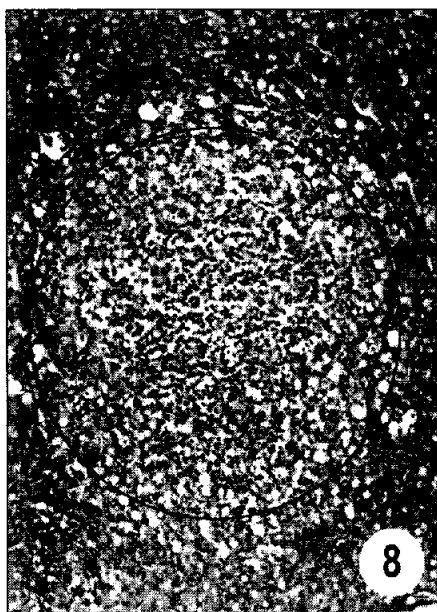


Fig. 12. Spleen. Ellipsoidal walls (circle) are composed of a number of vacuolated macrophages. HE, $\times 400$.

Fig. 13. Magnification of circle part in Fig. 12. HE, $\times 1,000$.

Fig. 14. Head kidney. A vacuolated macrophage aggregate (circle). HE, $\times 200$.

Fig. 15. Magnification of circle part in Fig. 14. HE, $\times 400$.

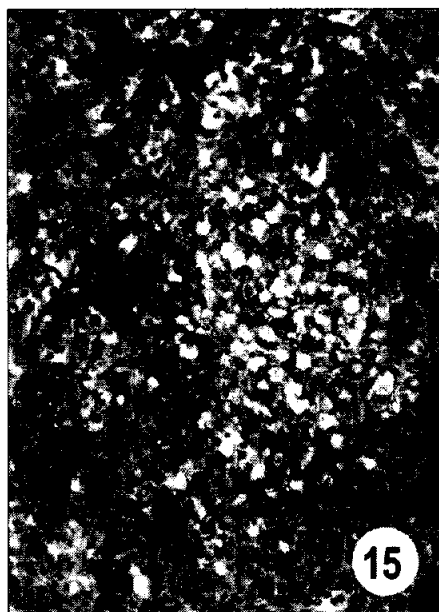
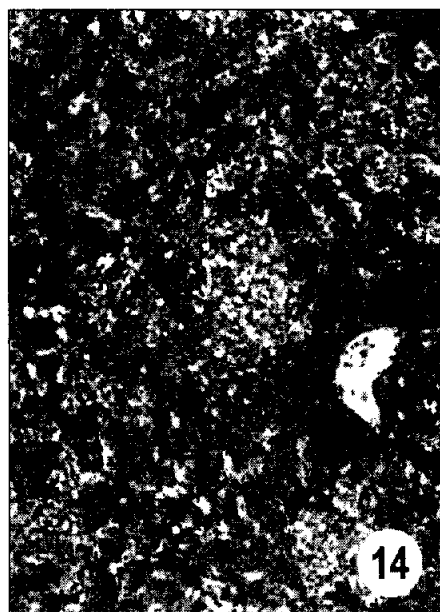
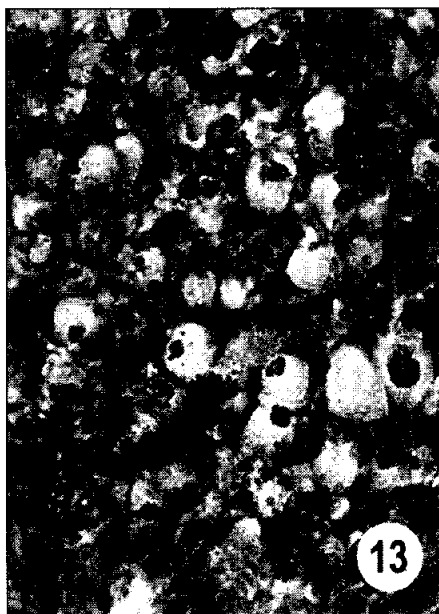
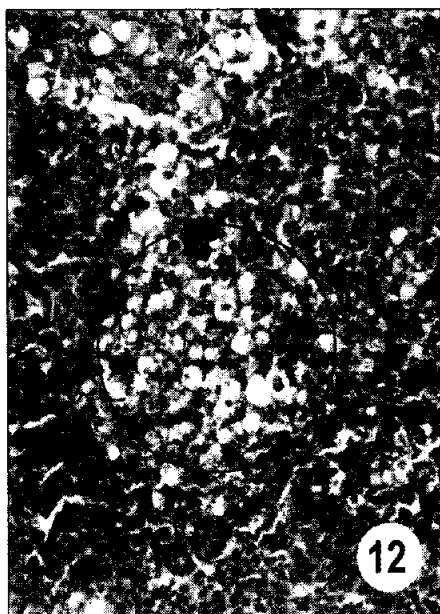


Fig. 16. Liver. Periphery of abscess are positive with Modified Heidenhain's azan. $\times 400$.

Fig. 17. Liver. A number of week PAS-positive cells within abscess. PAS, $\times 1,000$.

Fig. 18. Sudan black B-negative abscess of liver. $\times 1,000$.

Fig. 19. A number of positive cells and debris with α -naphthyl acetate esterase in abscess of liver. $\times 1,000$.

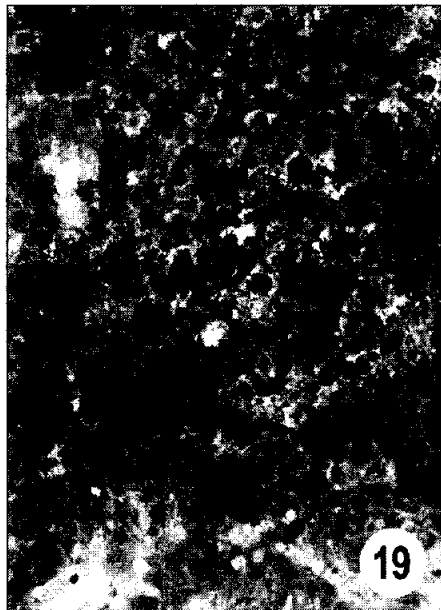
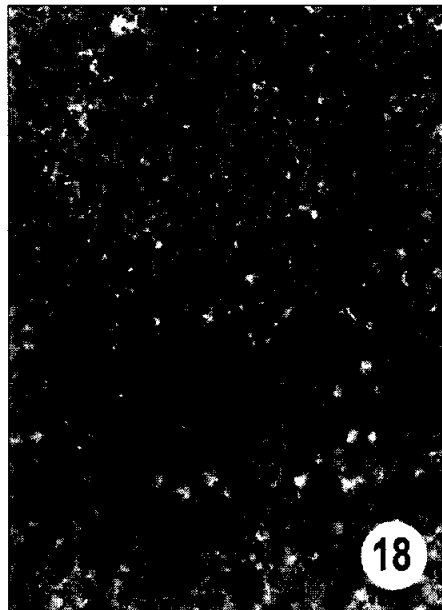
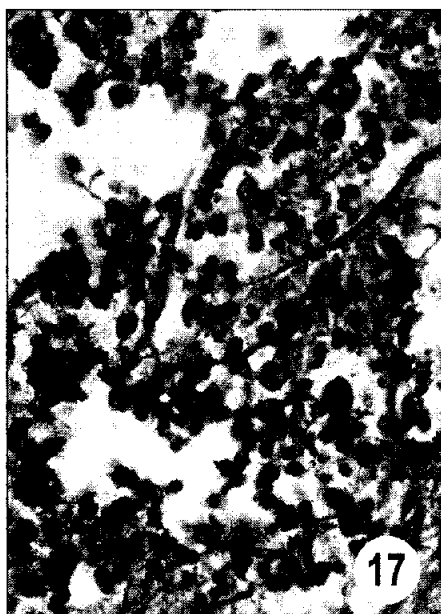
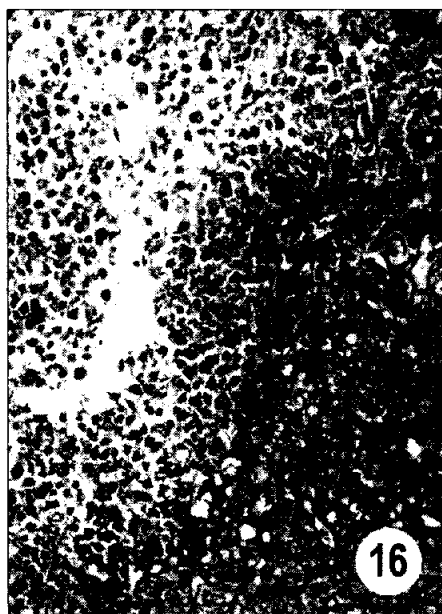
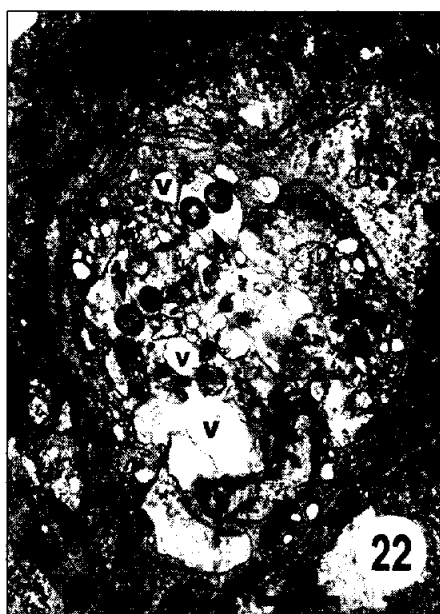
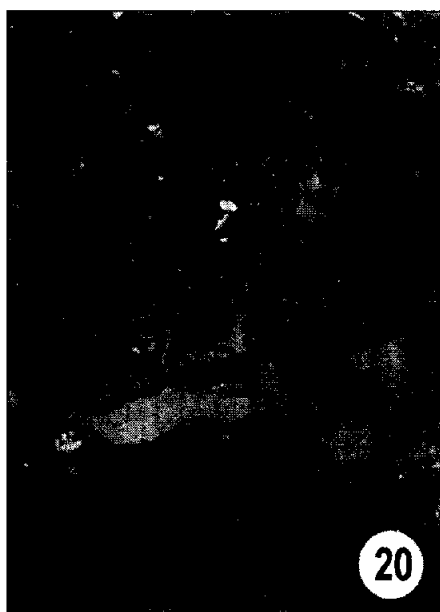


Fig. 20. Liver. Many bacterial cells are phagocytosed by phagocytes in abscess. Toluidine blue, $\times 1,000$. N, Normal area.

Fig. 21. Electron micrograph of Fig. 20. A macrophage engulfing several bacteria (arrow) and this cell has a number of vacuole within cytoplasm. $\times 5,000$. V, vacuole

Fig. 22. A number of macrophage aggregation in abscess of liver. $\times 4,000$

Fig. 23. A macrophage within abscess of liver. B, bacteria; N, nucleus; SE, secondary lysosomes.



VII. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 결코 짧지 않은 시간 동안 열과 성의를 다해 지도해주신 허민도 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 중에도 부족한 논문에 꼼꼼한 관심을 보여 주신 박수일 교수님과 정준기 교수님께 감사드리며, 많은 지도와 가르침을 주신 정현도 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께도 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

학부와 석사 과정 동안 많은 조언과 관심을 보여주신 이무근 선배님, 조병열 선배님께 감사드립니다. 힘든 실험실 생활을 언제나 함께 해준 갑민이, 효주에게 감사드리며, 부족한 선배 밑에서 고생이 많았던 이재영, 최혜정, 송나영, 김현지, 서지연, 정숙진 학형들에게도 감사의 말씀을 전합니다. 항상 곁에서 힘이 되어 준 정수, 승호, 석우, 진희, 수미 외에 모든 93학번 동기들에게도 감사드립니다.

끝으로 오랜 시간 저를 믿고 기다려 주신 부모님 그리고 멀리서 고생하고 있는 누나 동생에게 이 논문을 바칩니다.

Ⅶ. 참고문헌

- Afonso, A., Ellis, A. E. and Silva, M. T. (1997) The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol., 7, 335-338.
- Afonso, A., Silva, J., Lousada, S., Ellis, A. E. and Silva, M. T. (1998) Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol., 8, 319-338.
- Bakke-McKellep, A. M., Press, C. McL. Baeverfjord, G., Krogdahl, Å. and Landsverk, T. (2000) Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. J. Fish Dis., 23, 115-127.
- Baldwin, T. J. and Newton, J. C. (1993) Pathogenesis of enteric septicemia of channel catfish, caused by *Edwardsiella ictaluri*: Bacteriologic and light and electron microscopic findings. J. Aquat. Anim. Health, 5, 189-198.
- Bodammer, J. E. and Robohm, R. A. (1996) Ultrastructural observations on the phagocytic behavior of winter flounder *Pleuronectes americanus* peritoneal neutrophils and macrophages in vivo. Dis. Aquat. Org., 25, 197-208.
- Chen, J. D. and Huang, S. L. (1996) Hemolysin from *Edwardsiella tarda*

- strain ET16 isolated from eel *Anguilla japonica* as a hole-formin toxin. Fish. Sci., 62(4), 538-542.
- Chen, S. C., Adams, A., Thompson, K. D. and Richards, R. H. (1998) Electron microscope studies of the in vitro phagocytosis of *Mycobacterium* spp. by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* head kidney macrophages. Dis. Aquat.
- Cruz, M. C. D. and Muroga, K. (1989) The effects of *Vibrio anguillarum* extracellular products on japanese eels. Aquaculture, 80, 201-210.
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K. and Bøgvold, J. (1997) Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system(RES). J. Fish Dis., 20, 241-273.
- Ellis, A. E. (1999) Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol.. 9, 291-308.
- Ferguson, H. W., Morales, J. A. and Ostland, V. E. (1994) Streptococcosis in aquarium fish. Dis. Aquat. Org., 19, 1-6.
- Gutenberger, S. K., Duimstra, J. R., Rohovec, J. S. and Fryer, J. L. (1997) Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. Dis. Aquat. Org., 28, 93-106.
- Gutierrez, M. A. and Miyazaki, T. (1994) Responses of japanese eels to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formalin-killed cells or lipopolysaccharide of the bacterium. J. Aquat. Anim. Health, 6, 110-117.

- Han, G. S., Kim, J. Y., Jeong, H. D. and Huh, M. D. (1995) Pathological studies on morphological and functional changes of lymphomyeloid tissues overpopulated with melano-macrophage behavior in tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Fish Pathol., 8(2), 119-134.
- Hébert P., Anisworth, A. J. and Boyd B.(2002). Histological enzyme and flow cytometric analysis of channel catfish intestinal tract immune cells., Develop. Comp. Immunol. 26, 53-52
- Heo, G. J. and Kim, J. H. (1996) Efficacy of norfloxacin for the control of *Edwardsiella tarda* infection in the flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Aquat. Anim. Health, 8, 255-259.
- Hine, P. M. and Wain, J. M. (1988) Characterization of inflammatory neutrophils induced by bacterial endotoxin in the blood of eels, *Anguilla australis*. J. Fish Biol., 32, 579-592.
- Heo, G. J. (1996) Efficacy of norfloxacin for the control of *Edwardsiella tarda* infection in the flounder *paralichthys olivaceus*. J. Aquat. Anim. Health, 8, 255-259.
- Ishihara, S. and Kusuda, R. (1981) Experimental infection of elvers and anguillettes with *Edwardsiella tarda* bacteria. Nippon Suisan Gakkai Shi, 47(8), 999-1002.
- Jeney, G. and Anderson, D. P. (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defence mechanisms in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*).

- Aquaculture, 116, 315-329.
- Kaige, N., Miyazaki, T. and Kubota, S. S. (1986) A Histopathology study of edwardsiellosis in tilapia experimental infection. *Fish Pathology*, 21(2), 95-99.
- Kawahara, E. Salati, F. Nomura, S. and Kusuda, R. (1990) Location of *Edwardsiella tarda* antigens in tissues of eel(*Anguilla japonica*) after intramuscular injection. *Fish Pathology*, 25(4), 213-216.
- Kim, J. S., Rho, S. and Heo, M. S. (2001) Spatial and Temporal occurrence of *Edwardsiella tarda* at flounder farm in Jeju. *Korean J. Environ. Biol.*, 19(2), 173-181.
- Köllner, B., Blohm, U., Kotterba, G. and Fischer, U. (2001) A monoclonal antibody recognizing a surface marker on rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 11, 127-142.
- Lee, N. S., Kim, J. Y., Jeong, H. D. and Huh, M. D. (1995) Histopathological studies on the macrophage behavior in lymphomyeloid tissues of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Pathol.*, 8(2), 135-148.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A. and García-Ayala, A. (1995) Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream(*Sparus aurata* L.): An ultrastructural and cytochemical study. *The Anat. Rec.*, 241, 303-309.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A. and Esteban M. A. (1994) Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead

- seabream(*Sparus aurata* L.). Histochemistry, 102, 37-44.
- Micale, V. and Perdichizzi, F. (1990) A quantitative and histochemical study on melano-macrophage centers in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. J. Fish Biol., 37, 191-197.
- Miyazaki, T and Kaige, N. (1985) Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. Fish Pathol., 20(2/3), 219-227.
- Miyazaki, T. (1980) Histopathological study on bacterial infections in fishes. Bulletin Faculty of Fisheries, Mie University, 7, 63-149.
- Miwa, S. and Mano, N. (2000) Infection with *Edwardsiella tarda* causes hypertrophy of liver cells in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis. Aquat. Org., 42, 227-231.
- Neumann, N. F., Barreda, D. R. and Belosevic, M. (2000) Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish(*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures. Fish Shellfish Immunol., 10, 1-20.
- Oh, M. J and Chun, S. K (1988) Characteristics and antigenicity of *Edwardsiella tarda* isolated from tilapia(*Oreochromis niloticus*). J. Fish Pathol., 1(2), 77-85.
- Park, J. H. and Huh, M. D. (1994) Histopathological studies on melano-macrophage centers(MMCs) in spleen and head kidney of immuno-modified tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Fish Pathol., 7(2), 127-149.

- Park, K. H. and Jeong, H. D. (1996) Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. *Aquaculture*. 143, 135-143.
- Press, C. McL and Evensen, Ø. (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9, 308-318.
- Rashid, M. M., Nakai, T., Muroga, K. and Miyazaki T. (1997) Pathogenesis of experimental edwardsiellosis in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.*, 63(3), 384-387.
- Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th Ed. (1999) Cotran, S. R., Kumar, V., Collins, T.
- Steinhagen, D. and Jendrysek, S. (1994) Phagocytosis by carp granulocytes; in vivo and in vitro observation. *Fish Shellfish Immunol.*, 4, 521-525.
- Suprpto, H., Hara, T., Nakai, T. and Muroga, K. (1996) Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. 31(4), 203-207.
- Suzuki, U. and Hibiya, T. (1988) Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. *Fish Pathol.*, 23(3), 179-184.
- Miyamoto, T., Matsumori, A., Hwang, M. U., Nishio, R and Sasayama, S (2001) therapeutic effects of FTY720, a new immunosuppressive agent, in a murine model of acute viral myocarditis. *J. Ameri. Col. Cardiol.* 37(6), 1713-1718.
- Thomson, R. G. (1978) General veterinary pathology. Library of Congress

Cataloging in Publication Data. 152-176

Suprpto, H., Nakai, T. and Muroga, K. (1995) Toxicity of Extracellular products and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in the japanese eel and flounder. J. Aquat. Anim. Health, 7, 292-297.

Verburg-van Kemenade, B. M. L., Groeneveld, A. Van Rens, B. T. T. M. and Rombout, J. H. W. M. (1994) Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp(*Cyprinus carpio*). J. Exp. Biol., 187, 143-158.

2002 해양수산 주요 통계. (2003). 해양수산부.