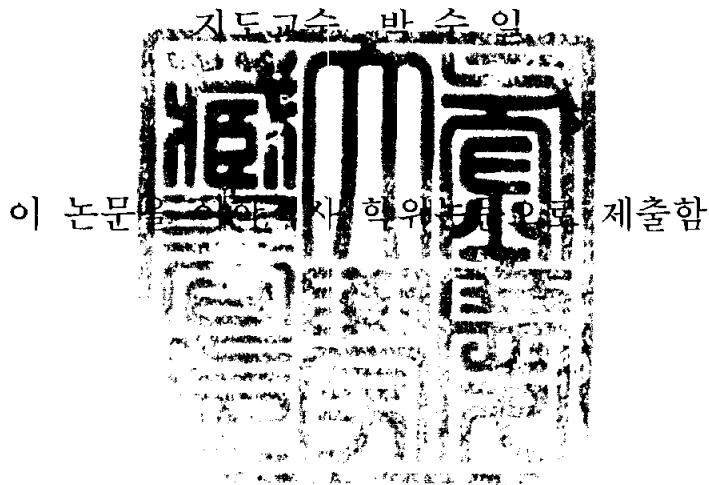


이학석사 학위논문

철 결핍 조건에서 배양한 *Edwardsiella*
*tarda*의 면역학적 특성



2004년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

최 현 숙

최현숙의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월 26일

주 심 이 학 박 사 정 현 도



위 원 이 학 박 사 강 주 찬



위 원 농 학 박 사 박 수 일



목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험어	5
2. 실험 균주	5
3. 배양 조건에 따른 <i>Edwardsiella tarda</i> 의 병원성 조사	5
4. 항원의 제작	6
4-1. vaccine 투여를 위한 항원의 제작	6
4-2. ELISPOT을 위한 항원의 제작	7
5. vaccine 투여	7
6. ELISPOT을 위한 토끼 항혈청의 제조	7
7. Bacteria outer membrane proteins의 분리와 전기영동	8
8. 백신 처리 후 면역 반응 측정	9
8-1. 응집 항체가의 측정	9
8-2. 특이 항체 생성 세포의 검출	9
8-2-1. 단일 세포 현탁액의 준비	9
8-2-2. 특이 항체 생성 세포의 검출	10
9. 공격실험	11
III. 결과	12
1. 배양 조건에 따른 <i>Edwardsiella tarda</i> 의 병원성 조사	12
2. Outer membrane proteins의 SDS-PAGE profile의 비교	12
3. vaccine 투여 후의 면역 반응	15

3-1. 혈청 내의 특이 항체의 변화	15
3-2. 특이 항체 생성 세포 수의 변화	15
4. 공격 실험에 대한 생존율의 변화	18
IV. 고찰	24
V. 요약	30
VI. 감사의 글	32
VII. 참고문헌	34

Immunological characteristics of *Edwardsiella tarda* grown under
iron-restricted condition

Hyun-Suk Choi

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

Abstract

Edwardsiellosis is one of the most serious diseases in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Korea. On these days, the epizootic becomes widespread in olive flounder and sometimes brings about high mortality. Because of the commercial importance of edwardsiellosis to olive flounder cultivation, there have been many studies aimed at controlling the disease. The development of vaccines for edwardsiellosis should be one of the most important and prompt controlling measures.

The immunogenicity of *E. tarda* was surveyed under two different culture conditions. In SDS-PAGE patterns of the outer membrane proteins (OMPs) extracts of *E. tarda*, grown under Tryptic soy broth (TSB) and TSB supplemented iron chelator 2,2-dipyridyl iron-restricted condition, were examined. The results showed that the iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) with molecular masses of 68, 73 kDa were expressed by bacteria grown in iron-chelated TSB.

The pathogenicity was examined by intraperitoneal injection with live *E. tarda* grown under TSB, iron-chelated TSB and iron-supplemented TSB. The result of pathogenicity test showed significantly high mortality in the group of live *E. tarda* grown under iron-chelated TSB.

The effect of formalin killed cell (FKC) of TSB cultured bacteria and 2,2-dipyridyl FKC of cultured bacteria on the iron-chelated TSB on the development of protective immunity in olive flounder was studied. The level of immune response was evaluated with immunized fish at 1, 2, 3 weeks and 4 weeks after immunization. The numbers of specific antibody secreting cells (SASCs) showed significantly increased level at 2 weeks after immunization in each group. The agglutination titre of immunized fish was significantly high level at 3 weeks after immunization.

The level of protection in olive flounder at 1, 2, 3weeks and 4 weeks after vaccination was examined by intraperitoneal challenge test with live *E. tarda*. The result of challenge test showed significantly high survival rate at 3 weeks in the 2,2-dipyridyl FKC than FKC.

These results suggested that 2,2-dipyridyl FKC could be effective to produce enhanced protection ability against edwardsiellosis.

I. 서 론

오늘날 양식 산업이 발달함에 따라 대규모 양식 시설 투자와 대량 생산을 위한 고밀도 사육 기술 개발로 연안 어장의 오염이 심각해지면서 어류 양식장 환경도 악화되어 다양한 질병의 감염률이 높아지고 있다. 질병의 발생으로 인한 양식 어류의 생산성과 품질 저하 등의 원인으로 막대한 경제적 손실을 가져오고 있다. 이러한 질병들 중에서도 세균성 질병이 발생률이나 피해량의 대부분을 차지하고 있어서 세균성 질병에 대한 대책의 마련이 절실히 요구되고 있는 실정이다(최, 1989).

Edwardsiella tarda 균은 해마다 해수 및 담수 양식에 있어 많은 피해를 나타내는 중요한 세균성 질병 원인체이다 (Thune et al., 1993). 감염 대상에 있어서는 뱀장어, *Anguilla japonica* (Egusa, 1976), 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus* (Aoki and Kitao, 1981), 넙치, *Paralichthys olivaceus* (Nakatsugawa, 1983; 방, 1992), 차벌메기, *Ictalurus punctatus* (Meyer and Bullock, 1973), 잉어, *Cyprinus carpio* (Sae-Oui et al., 1984) 등 여러 어종에서 감염 보고가 있다. 감염시 일반적인 임상 증상으로는 복수의 저류에 의한 복부 팽만, 체색 흑화, 탈장 등의 주요 병변을 나타내면서 폐사하는 것으로 알려져 있고 (Nakatsugawa, 1983), 특히 우리 나라의 해수 양식에서 가장 높은 비중을 차지하는 어종인 넙치에 대해서 매년 큰 피해를 주고 있다(최, 1989).

현재까지 보고된 *E. tarda*의 병원성 factor로는 숙주에 대한 부착을 돕고, 숙주 방어기작으로부터 균체를 보호하는 slime layer like materials와 exotoxins인 dermatotoxins이 관련될 것이라는 연구 결과가 있다 (Ullah and Arai, 1983a,b). 이외에도 *E. tarda*의 extracellular products (ECPs)가 lethal toxin으로 작용하며 (Suprpto et al., 1995; 1996) 또한 cell associated hemolysin의 생성이 알려져

있다 (Janda and Abbott, 1993; Hirono et al., 1997). 그리고 숙주의 체액 속에서 iron을 획득하기 위한 siderophore의 iron-uptake mechanism 또한 병원성의 중요한 요소가 된다 (Igarashi et al., 2002; Schmidtke et al., 2003).

철은 생물체의 성장과 증식에 필수적인 영양분이다 (Lin et al., 2002). *E. tarda*의 경우, in vitro의 iron-restricted condition에서도 증식하고 성장할 수 있으며 high affinity iron uptake mechanism을 가진다는 것을 확인하였고, iron-regulated outer membrane proteins를 발현시킨다 (Igarashi et al., 2002). 세균이 숙주의 iron restricted condition에서 iron을 획득하는 기작은 specific outer membrane receptor와 host transferrin, lactoferrin, hemoferin과 직접적으로 결합하여 host의 high affinity iron-binding proteins와 결합하고 있는 iron이 세균의 세포 내로 이동하는 경우와 iron-siderophore complex를 인식하는 outer membrane protein이 iron-siderophore를 촉진시켜 세포막 내로 iron을 직접 이동시켜 주는 경우가 있다 (Lin et al., 2002).

양식 넙치의 질병 대책으로 1980년대 초부터 에드워드병의 예방에 대한 적극적인 대책의 하나인 백신 개발에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔는데, 그 중 뱀장어 (Song and Kou, 1981; Salati et al., 1983; Salati and Kusuda, 1985; 1991)와 틸라피아 (Gilda and Wakabayashi, 1986), 참돔 (Salati et al., 1987)과 넙치 (Mekuchi et al., 1995; 최, 1995; 이, 1998)에 관한 연구가 있다. 이들의 실험에 사용된 vaccine의 항원은 균체나 초음파에 의하여 추출된 항원, 세균 세포 벽으로부터 분리된 lipopolysaccharide (LPS)와 세포외 생성물 (ECPs) 등이 사용되었다 (Salati et al., 1983; Gutierrez and Miyazaki, 1994). Song and Kou (1981)는 *E. tarda*의 formalin killed cells과 heat killed cells의 침지법, Salati et al. (1983)은 *E. tarda*의 lipopolysaccharide, culture filtrate, formalin killed whole cell로 근육 주사법을 이용하여 방어력의 증강을 확인하였고 이어서

vaccine 투여 효과에 관한 연구를 계속적으로 진행하였다 (Salati and Kusuda, 1985, 1991). 그리고 박 등(1993)은 *E. tarda*의 FKC, LPS, HKC를 제작하여 뱀장어에 투여하였을 때 FKC나 LPS 투여구에서만 신선 혈청의 살균 작용이 나타났으며 공격 시험에서 HKC에서보다 FKC와 LPS 면역구의 RPS가 더 높게 나타나 FKC가 숙주의 방어력 증강에 미치는 효과가 더 크다는 것을 확인하였다.

세균의 세포 표면은 일정치가 않으며 이것은 세균이 숙주 체내에서 살아남기 위한 in vivo 조건의 변화에 따라 달라진다 (Brown et al., 1988). 많은 포유류 (Davies et al., 1994a)와 어류 (Garduno et al., 1993a, b)에서 in vivo 배양 조건에 따른 병원성 요인과 항원성에 대한 연구가 있었는데 iron-regulated condition에서 분리한 iron-regulated outer membrane proteins의 독성을 확인하였고 항원으로 사용하였을 때 방어적인 면역 반응을 나타내었다 (Duncan et al., 1998). 이미 세균의 major outer membrane proteins에 대한 병원성과 방어적 항원성에 대한 연구는 많이 보고되어 왔다. Tu and Kawai (1998; 1999)의 연구에서 *E. tarda*의 37 kDa major outer membrane protein을 항원으로 뱀장어에 투여한 실험에서 방어적 항원성을 확인하였고, Rahman et al. (2002)의 연구에서 *Flavobacterium psychrophilum*의 FKC 항원과 outer membrane fraction을 항원으로 하여 rainbow trout에 투여하고 4주 후에 공격 실험한 결과에서도 동일한 결과를 나타내었다. 그리고 Hirst et al. (1994)은 *Aeromonas salmonicida*의 outer membrane proteins (OMPs)과 iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs)를 Atlantic salmon에 투여하여 공격 실험으로 그 면역원성을 입증하였다.

본 연구에서는 iron-regulated condition에서 배양한 *E. tarda*의 iron-regulated outer membrane proteins에 대한 방어적 항원성을 이용하여, 매년 어류 양식장에서 문제가 되는 *Edwardsiella tarda* 병원체에 대한 효율적이고 경제적인

vaccine을 찾아보고자 하였다.

먼저 *Edwardsiella tarda*를 iron-regulated condition에서 배양하여 넙치에 대한 독성 조사를 실시하였다. 그리고 어류에 있어서 높은 면역원성을 가지는 outer membrane proteins (OMPs)의 발현 특성을 조사하였다. 즉, iron-chelator (2,2'-dipyridyl)를 첨가 배양하여 OMPs (IROMPs)를 분리하였고, 이러한 조건에서 주요한 방어적 항원이 되는 새로운 단백질의 생성을 조사하였다. 그리고 FKC 항원과 2,2'-dipyridyl 첨가 FKC 항원 (DP-FKC)에 대한 각각의 면역 반응의 변화를 조사하였고, 아울러 생균 공격에 의한 상대 생존율 및 생존율을 파악하여 에드워드병 예방을 위한 효과적인 vaccine 개발의 기초 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

제주도 소재의 넙치 양성장으로부터 분양받은 15-17cm, 30-32g의 넙치를 6개의 FRP 사육조에 30마리씩 수용하였다.

수온은 실험 기간 동안 $20\pm1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며, 실험 전 2주일간 순치하였으며 먹이는 상업용 넙치 사료를 실험구 당 일정량씩 매일 공급하였다.

2. 시험 균주

포항 인근의 양어장에서 에드워드병에 감염된 넙치로부터 2000년 7월에 분리한 *Edwardsiella tarda*로서 예비 실험 결과 독성이 가장 높은 균주를 사용하였다.

분리 후, -80°C 에서 보존해 온 것으로서 1.5% NaCl이 첨가된 TSA에 계대 배양하고 3회에 걸쳐 이체를 통과시킨 다음 실험에 사용하였다.

3. 배양 조건에 따른 *Edwardsiella tarda*의 병원성 조사

*E. tarda*를 iron-regulated condition으로 배양하여 병원성의 변화를 시험하였다. 배양 배지로는 Tryptic soy broth (TSB), 2,2'-dipyridyl을 $100\mu\text{M}$ 되게 첨가한 TSB 및 Fe의 농도가 $10\mu\text{M}$ 농도로 FeCl_3 를 첨가한 TSB에 *E. tarda*를 접종하여 27°C 에서 24시간 배양하였다. 이렇게 각각 다른 조건에서 배양한 *E. tarda* 생균을 원심 분리 (8,000rpm, 10min)하여 멸균 생리식염수로 3회 세척한 후 동일 용액에 현탁하여 파장 540nm에서 흡광도가 0.8일 때 균수가 약 1×10^9 cfu/ml인

싯을 감안하여 1×10^4 cfu/ml로 조절한 후 넙치 한 마리당 0.1ml씩 복강 주사하였다. 수온은 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지시켰으며 10일 동안의 누적 폐사율을 기록하였다. 대조구는 동일한 조건하에서 멸균 생리 식염수를 0.1ml씩 복강 주사하였다.

각 실험구 당 5마리의 넙치를 사용하였으며, 실험 중 폐사어에 대해서는 원인균의 재분리 검사를 실시하여 폐사 원인을 확인하였다.

4. 항원의 제작

4-1. vaccine 투여를 위한 항원의 제작

실험에 사용된 항원은 두 가지의 formalin killed cells (FKCs)를 사용하였다. 즉, 2,2'-dipyridyl (Sigma Chem. Co.) 첨가 TSA에서 배양한 시험균 (DP-FKC)과 2,2'-dipyridyl 무첨가 TSA에서 배양한 시험균 (FKC)을 사용하였다.

FKC는 *E. tarda* 균주를 1.5% NaCl 첨가 TSA 배지에 접종하여 27°C , 24시간 동안 전배양한 후 1.5% NaCl 첨가 TSB 배지에 접종하여 27°C , 48시간 동안 shaking하여 대량 배양하였다.

그리고 2,2'-dipyridyl 첨가 FKC (DP-FKC)는 1.5% NaCl과 $100\mu\text{M}$ 2,2'-dipyridyl 첨가 TSA 배지에 *E. tarda* 균주를 접종하여 27°C , 24시간 동안 전배양하고, 동일 조건에서 3번 이상 계대 배양한 후 1.5% NaCl과 $100\mu\text{M}$ 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB 배지에 *E. tarda* 균주를 접종하여 27°C , 48시간 동안 shaking하여 대량 배양하였다.

TSB 배양액과 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB 배양액에 각각 0.5% 농도로 formalin을 처리하여 실온에서 48시간 정치시켜 불활화하였다. 불활화 균액을 4°C 에서 $10,000 \times g$, 30분간 원심 분리하여 집균한 다음 FKC 항원과 2,2'-dipyridyl 첨가

FKC (DP-FKC)항원으로 사용하였다. 원심 분리된 FKC 항원은 멸균 생리 식염수(0.85% NaCl 용액)로 3회 세척하여 formalin 성분을 제거하였으며 세척된 불활화 균은 멸균 생리 식염수에 10mg/ml의 농도로 현탁하여 냉장 보관하며 시험에 사용하였다.

4-2. ELISPOT을 위한 항원의 제작

특이 항체 생성 세포의 검출을 위한 EDTA 추출 항원을 제작하였다.

EDTA 추출 항원은 *Edwardsiella tarda* FKC를 Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)으로 3회 세척한 후 50mg/ml의 농도로 20mM EDTA (Ethylenediamine tetraacetate, pH 7.2) 용액에 현탁하여 45℃에서 30분간 반응시켰다. 이 반응 용액을 다시 초음파 분쇄기로 10% power level에서 1분간 초음파 처리 후에 원심 분리 (10,000×g, 5min)한 후 상정액을 취하여 0.15M PBS (pH 8.0)에서 48시간 동안 투석하여 조제하였다. 이렇게 조제된 항원의 단백질 농도는 Bovine Serum Albumin (BSA)를 표준 단백질로 사용하여 Spectrophotometer, 280nm에서 흡광도로 측정하였다.

5. vaccine 투여

FKC 항원과 DP-FKC 항원은 각각 멸균 생리식염수에 현탁하여 파장 540nm에서 흡광도가 0.8일 때 균수가 약 1×10^9 cfu/ml인 것을 감안하여 넓치 한 마리당 0.1ml씩 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수를 같은 방법으로 복강 내 주사하였다.

6. ELISPOT을 위한 토끼 항혈청의 제조

넙치의 면역 글로불린을 정제하기 위하여 DEAE-5PW column (HPLC, Pharmacia)을 이용해서 분리하였고 elution된 fraction 중에서 ELISA를 이용하여 항체를 조사한 후, 항체 역가와 단백질 농도가 가장 높은 것으로 SDS-PAGE를 실시하고 Coomassie brilliant blue 염색으로서 순도를 확인한 다음 사용하였다. HPLC를 이용하여 분리 정제된 넙치의 면역 글로불린을 동량의 Freund's complete adjuvant (FCA)와 혼합하여 개체 당 10mg/kg 의 농도로 병력이 없고 건강한 평균 체중 1.5kg의 토끼 피하에 소량으로 최소 5군데 이상 주사하였으며 2주 후 동량의 넙치 면역 글로불린을 Freund's incomplete adjuvant (FIA)와 혼합하여 동일한 방법으로 boost하였다. 이와 같은 방법을 사용하여 2주 간격으로 3회 주사한 후 토끼 심장으로부터 전채혈을 실시하여 토끼 항혈청을 분리하였다. rabbit anti-flounder immunoglobulin는 다시 DEAE-5PW column을 이용하여 분리하였고 -80℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

7. Bacteria outer membrane proteins (OMPs)의 분리와 전기 영동

E. tarda 의 배양 조건에 따른 OMPs와 iron-regulated OMPs (IROMPs)를 비교하기 위하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 전기영동을 실시하였다.

먼저 *E. tarda*를 TSB 및 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB를 사용하여 25℃에서 24시간 배양한 다음 세균을 8000rpm, 10분간 원심 분리한 후 20mM Tris/HCl (pH 8.0)으로 3회 세척하여 얻은 pellet을 다시 같은 용액에 현탁시킨 다음 초음파 분쇄기에 30초간 3반복하여 초음파 처리를 하였다. 이 현탁액을 4,000×g, 10분간 원심 분리한 후 cell membrane이 있는 상정액을 분리하여 다시 43,000×g,

30분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 pellet을 detergent Sarkosyl (protein/detergent ratio of 1:6, mg/ml)로 현탁하여 32℃, 30분간 반응시켰다. 이 현탁액은 다시 43,000×g, 30분간 원심 분리하여 얻은 pellet을 20mM Tris/HCl (pH 7.4)로 3회 세척하고 동일한 용액에 재현탁하여 OMPs를 제작하였다.

제작된 OMPs와 iron-regulated OMPs는 5×SDS sample buffer (10% SDS, Tris, 20% glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol)와 혼합하여 100℃, 10분간 boiling 하고 10,000×g, 10초간 원심 분리한 후 12% SDS-Polyacrylamide gel에 loading 하여 60mA에서 1시간 전기 영동하였다. 그리고 Molecular weight marker로 low range SDS-PAGE standards (Bio-Rad)를 사용하였다. loading이 완료된 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 Coomassie destain 용액으로 탈색하여 band를 확인하였다.

8. 백신 처리 후 면역 반응 측정

8-1. 응집 항체가의 측정

vaccine 처리 후 1, 2, 3주 및 4주 쯤에 어류 피부 정맥을 통하여 채혈된 혈액을 4℃에서 overnight하여 정치시킨 후 원심 분리(8,000rpm, 5min)하여 항혈청을 분리하였다.

응집 항체가는 96 well round bottom plate를 사용하여 microtiter법으로 측정하였으며, 각 well당 항혈청은 50 μ l, 항원 농도는 약 1×10^9 cfu/ml 이었다.

8-2. 특이 항체 생성 세포의 검출

8-2-1. 단일 세포 현탁액의 준비

실험어에서 적출한 두신 조직을 2% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Chem. Co.), 100 unit/ml의 penicillin/streptomycin액 (Sigma Chem. Co.)과 heparin 10 units/ml가 첨가된 Leibovitz 15 (L-15) culture medium 1ml을 분주해 둔 1 회용 소형 petridish에 넣고 멸균된 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34%와 51% percoll density gradient에 중층하여 4℃, 300×g, 30분간 원심 분리하여 백혈구 층을 분리하였다. 분리한 두신의 백혈구 층을 0.1% FBS가 첨가된 L-15 medium으로 3회 세척한 후 0.1% tryphan blue 용액으로 염색하여 viability를 관찰한 다음 haematocytometer를 사용하여 계수 하였고 세포의 생존율이 95% 이상임을 확인한 후 실험에 사용하였다.

8-2-2. 특이 항체 생성 세포의 검출

Nitrocellulose membranes 이 들어있는 96 well polystyrene microtiter plate의 각 well에 EDTA 추출 항원을 50μg/well로 분주한 후 4℃에서 overnight 하여 coating 시켰다. 이후 모든 단계의 반응이 끝날 때마다 Tween 20 0.1% 첨가 PBS (T-PBS)를 washing buffer로 3번씩 세척하였다. 각 well에 3% BSA를 200 μl씩 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켜 coating 되지 않은 부분을 blocking하였다. L-15 medium에서 현탁하여 준비된 두신 세포를 각 well에 10⁶, 10⁵, 10⁴ cell의 농도로 첨가하여 항체 생성을 유도하기 위해 CO₂ incubator (CO₂ 5%)에서 25℃, 6시간 배양하였다. 세척 후 rabbit anti-flounder Ig를 25μg/ml의 농도로 75μl씩 첨가하여 반응시키고 alkaline phosphatase peroxidase (Sigma Chem.

Co.)를 1:1000으로 희석하여 75 μ l씩 첨가하여 반응시킨 후 기질로 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma Chem. Co.)을 100 μ l씩 well에 첨가하여 10분간 발색이 되도록 반응시켰다. T-PBS로 세척한 후에 증류수를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 형성된 spot을 해부 현미경으로 계수 하였다.

9. 공격실험

백신 투여 후 1주, 2주, 3주 및 4주 쯤에 각 실험구 별로 10마리씩 어류의 복강에 *E. tarda*의 생균을 주사한 다음 2주일간 생존율 및 상대 생존율의 변화를 조사하였다.

공격 시험에 사용한 균액은 미리 어체를 3회 통과시킨 후 분리해 둔 *E. tarda*를 TSB 배지에서 25℃, 24시간 배양한 다음 멸균 생리식염수에 현탁하여 파장 540nm에서 흡광도가 0.8일 때 균수가 약 1×10^9 cfu/ml인 것을 감안하여 1×10^6 cfu/ml로 조절한 후 넙치 한 마리당 0.1ml씩 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수를 0.1ml씩 복강 주사하였다. 각 실험구 당 10마리씩 어류의 복강에 주사하여 2주간 관찰하였고 결과는 생존율 및 상대 생존율로 나타내었다.

실험 중 폐사어에 대해서는 원인균의 재분리 검사를 실시하여 폐사 원인을 확인하였다.

10. 통계학적 분석

각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값을 측정하였고, $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 평가하였다.

III. 결 과

1. 배양 조건에 따른 *Edwardsiella tarda*의 병원성 조사

Iron-regulated conditions에 따라 배양한 *E. tarda*의 병원성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다.

TSB, 2,2'-dipyridyl을 100 μ M 농도로 첨가한 TSB 및 Fe의 농도가 10 μ M 농도로 FeCl₃를 첨가한 TSB에서 배양한 *E. tarda* 생균을 1 $\times$ 10³ cfu/fish의 농도로 넙치의 복강에 주사하였다.

2,2'-dipyridyl 첨가 TSB에 배양한 *E. tarda*를 주사한 넙치는 주사한지 10일만에 100% 폐사하여 독성이 가장 높은 것으로 확인되었으며, Fe 첨가 TSB에 배양한 *E. tarda*는 같은 기간에 40%의 폐사율을 나타내어 독성이 가장 낮은 것으로 나타났다 (Table 1).

2. Outer membrane proteins (OMPs)의 SDS-PAGE profile의 비교

TSB에 배양한 균체로부터 분리된 outer membrane proteins (OMPs)과 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB에 배양한 균체로부터 분리된 iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs)를 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 두 가지 시료 모두 *E. tarda*의 major outer membrane proteins인 약 37 kDa와 40 kDa 크기의 주요 항원을 공통적으로 나타내었으며, 68, 73 kDa protein profiles은 OMPs에서보다 IROMPs에서 더 많이 발현되었다 (Fig. 1).

Table 1. Pathogenicity test of live *Edwardsiella tarda* grown under iron-regulated conditions

Treatment (1×10^3 cfu)	No. of Tested fish	Days after post injection							% Mortality
		5	6	7	8	9	10	11	
Control ¹	5	0	1	0	0	0	0	0	20
TSB- <i>E.tarda</i> ²	5	0	1	0	1	1	0	0	60
DP- <i>E.tarda</i> ³	5	0	1	0	1	2	1	0	100
Fe- <i>E.tarda</i> ⁴	5	0	1	0	0	1	0	0	40

¹, injected PBS only.

², *Edwardsiella tarda* cultured in the TSB.

³, *Edwardsiella tarda* cultured in the TSB supplemented iron chelator 2,2-dipyridyl.

⁴, *Edwardsiella tarda* cultured in the TSB supplemented FeCl₃.

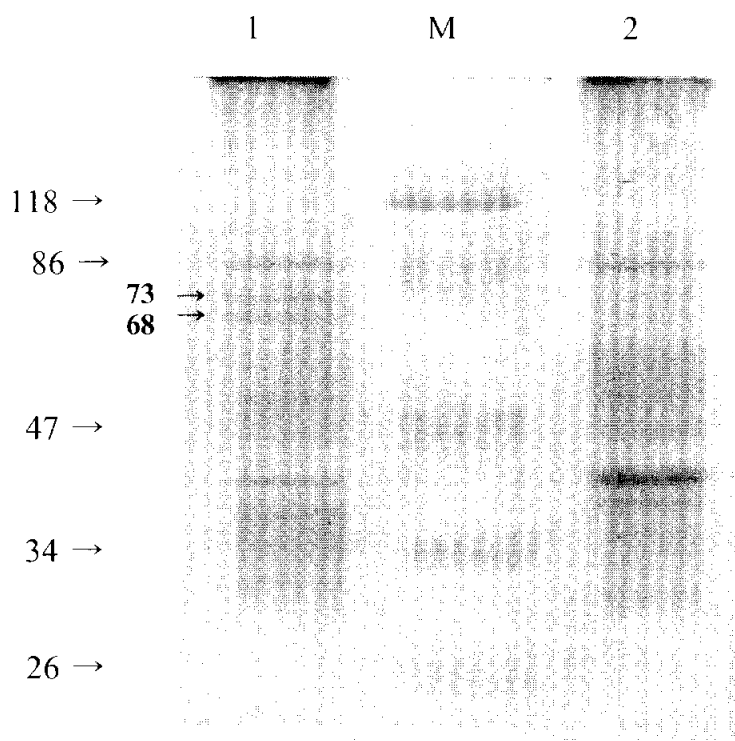


Fig. 1. SDS-PAGE profiles of outer membrane proteins (OMPs) on 10% acrylamide gel. The proteins were stained with coomassie brilliant blue R-250. M, molecular weight marker proteins; 1, iron-restricted outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* (IROMPs); 2, outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* (OMPs).

3. vaccine 투여 후의 면역 반응

3-1. 혈청 내 특이 항체의 변화

FKC 항원과 DP-FKC 항원 투여 후 1, 2, 3주 및 4주 째에 응집 항체가를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 두 가지 실험구 모두 응집 항체가가 점차 증가하다가 3주 째에 최고 수준에 도달하였다. 이 때 FKC 항원 투여구의 응집 항체가는 64이었으며 DP-FKC 항원 투여구의 응집 항체가는 256~512로 2,2'-dipyridyl 첨가 FKC 항원 투여구의 응집 항체가가 유의적으로 더 높게 나타났다.

3-2. 특이 항체 생성 세포 수의 변화

항원 투여 후 특이 항체 생성 세포 수의 변화는 Fig. 3에 나타내었다. 특이 항체 생성 세포 수의 검출은 두 실험구 모두 1주 째부터 spot이 관찰되기 시작하여 2주 째에 최고 수준에 도달한 후 감소하기 시작하였고, 이는 혈청 내 특이 항체량의 변화 곡선과 유사한 pattern을 나타내었다. 이 결과에서도 FKC 항원 투여구보다 2,2'-dipyridyl 첨가 FKC 항원 투여구에서 특이 항체 생성 세포의 수가 2주 째에서부터 4주 째까지 유의적으로 더 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

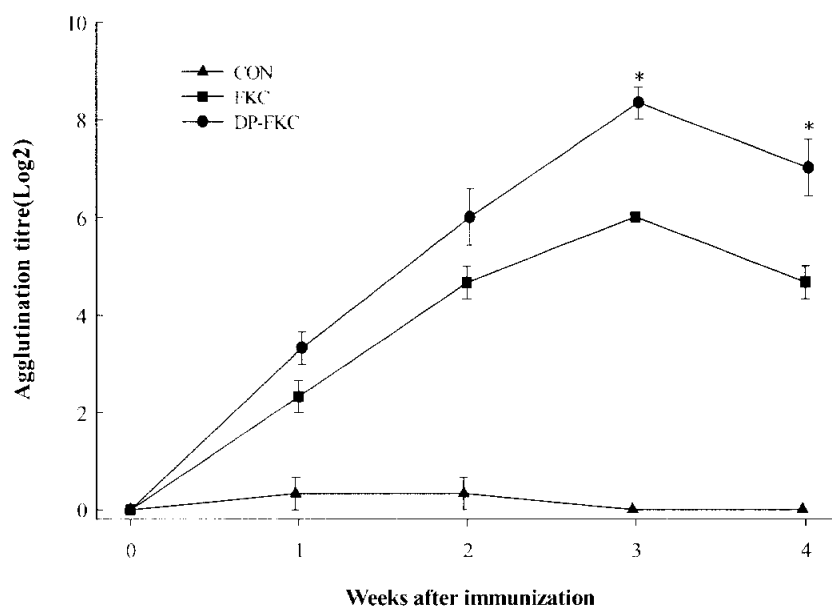


Fig. 2. Agglutination titer in the sera of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, at 1, 2, 3, 4 weeks post immunization with FK (■) and 100μM 2,2'-dipyridyl-FK (DP-FK, ●), respectively.

* significant difference between FK and DP-FK : $P < 0.05$.

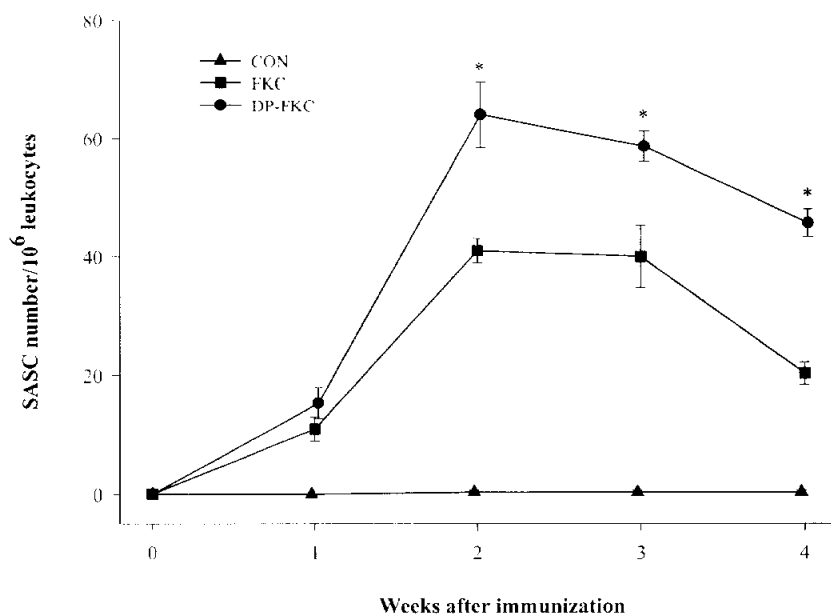


Fig. 3. Mean number of specific antibody secreting cells (SASCs) against *Edwardsiella tarda* in the head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following 1, 2, 3, 4 weeks immunization with FKC (■) and 100μM 2,2'-dipyridyl-FKC (DP-FKC, ●), respectively.

* significant difference between FKC and DP-FKC : $P < 0.05$.

4. 공격 실험에 대한 생존율의 변화

FKC 항원과 DP-FKC 항원 투여 후 그 효과를 비교하기 위하여 어체 통과를 3회 시켜 독성을 회복시킨 *E. tarda* 생균을 1×10^5 cfu/fish로 복강 주사하여 13일간 생존율을 조사하였다. 항원 투여 후 1, 2, 3주 및 4주 쯤마다 각각 복강 주사하여 시간별 생존율과 상대 생존율을 조사하였다 (Fig. 5, 6, 7, 8 and Table 2).

대조구에 비하여 항원을 투여한 두 실험구 모두에서 더 높은 생존율을 나타내었다. 항원 투여 후 1주 쯤 공격 주사한 결과 대조구보다 높은 상대 생존율인 22%를 나타내었으나, 항원의 종류에 따른 실험구 사이의 생존율에는 차이를 볼 수 없었다. 2주 쯤에 공격 주사한 결과는 FKC 항원을 처리한 실험구에서 30%의 생존율을 나타낸 것에 비하여, DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서는 50%의 생존율을 나타내면서 두 실험구 사이의 생존율의 차이가 나타나기 시작하였다. 항원 투여 후 3주 쯤에 공격 시험한 결과는 FKC 항원을 처리한 실험구에서 50%의 생존율을 나타내었고 DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서는 80%의 생존율을 나타내어 상당히 높은 생존율을 나타내었다. 마지막으로 4주 쯤에 FKC 항원을 처리한 실험구에서는 40%, DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서는 70%의 생존율을 나타내었다. vaccine 처리 후 4주 동안에 어체 방어력 조사 결과는 공격 주사 후의 생존율에서 3주 쯤에 DP-FKC 항원을 투여한 실험구가 가장 높았다.

상대 생존율 조사 결과도 DP-FKC 항원 투여구가 FKC 항원 투여구보다 더 높게 나타났고 항원 투여 후 3주 쯤에 최고 수준에 도달하였다.

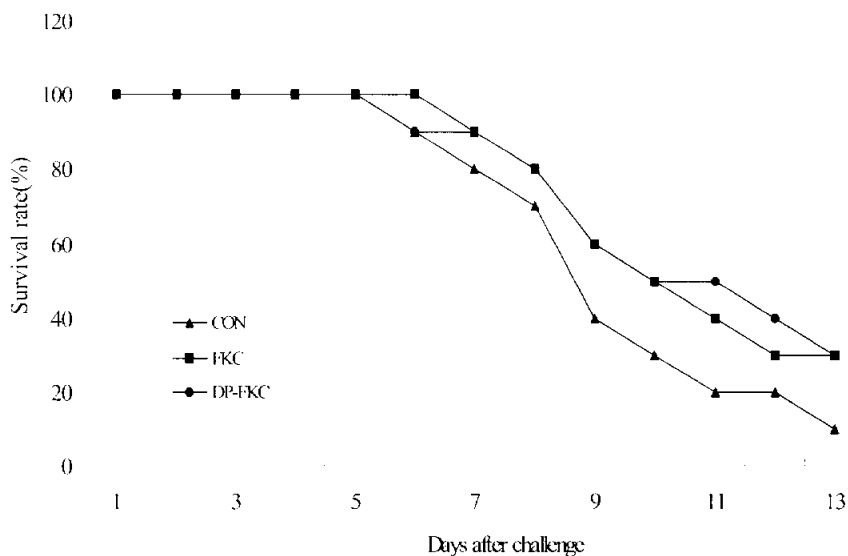


Fig. 5. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100uM 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●).

The fish was challenged by intraperitoneal injection with 1×10^5 cells/fish of *Edwardsiella tarda* at 1 week after vaccination.

Control fish was injected with physiological saline.

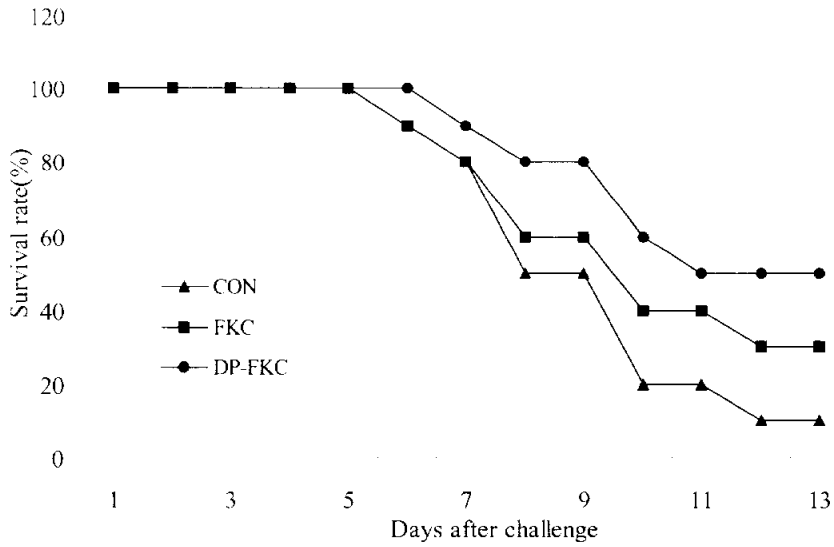


Fig. 6. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100uM 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●).

The fish was challenged by intraperitoneal injection with 1×10^5 cells/fish of *Edwardsiella tarda* at 2 week after vaccination.

Control fish was injected with physiological saline.

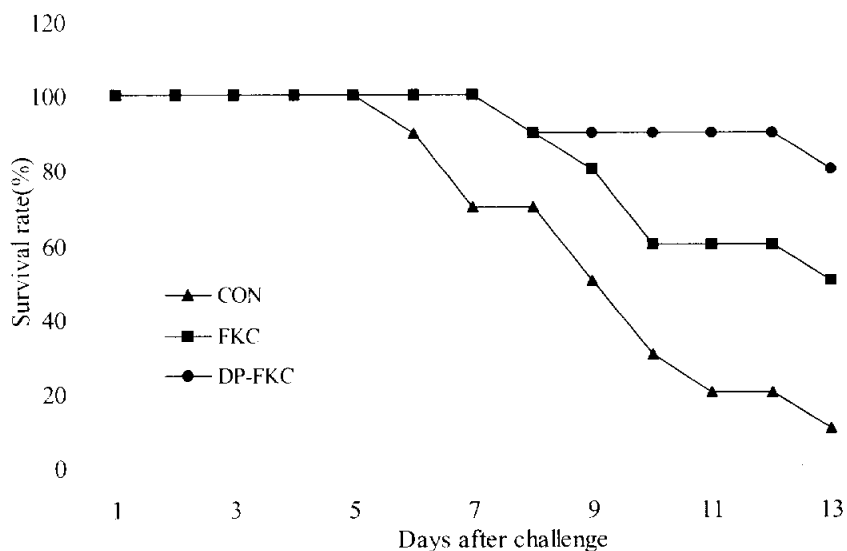


Fig. 7. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100uM 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●).

The fish was challenged by intraperitoneal injection with 1×10^5 cells/fish of *Edwardsiella tarda* at 3 week after vaccination.

Control fish was injected with physiological saline.

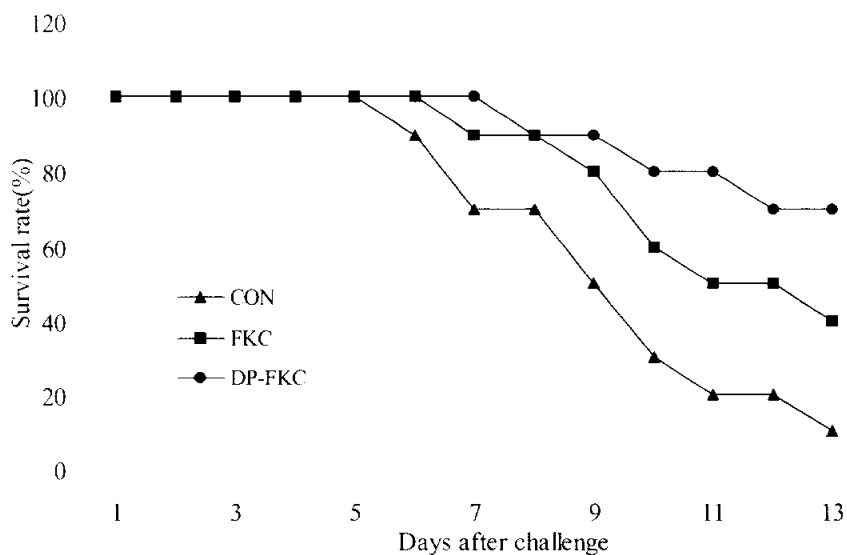


Fig. 8. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, vaccinated with formalin killed cells of *Edwardsiella tarda* grown in TSB (FKC, ■) or in 100uM 2,2'-dipyridyl supplemented TSB (DP-FKC, ●).

The fish was challenged by intraperitoneal injection with 1×10^5 cells/fish of *Ewardsiella tarda* at 4 week after vaccination.

Control fish was injected with physiological saline.

Table 2. Mortality and relative percentage survival (RPS) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged with 1×10^5 cells/fish of viable *Ewardsiella tarda* at 1, 2, 3 and 4 weeks after vaccination

Treatment	Mortality(%)				RPS ^a (%)			
	Weeks				Weeks			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Control	90	90	90	90	-	-	-	-
FKC	70	70	50	60	22	22	44.4	33
DP-FKC	70	50	20	30	22	44.4	77.7	66.6

$$^a, \text{RPS}(\%) = \left[1 - \frac{\% \text{ mortality of vaccinated}}{\% \text{ mortality of control}} \right] \times 100.$$

IV. 고 찰

우리 나라 양식장에서 해마다 증가하는 질병으로 인하여 양식 어류의 생산성 하락과 품질 저하 등으로 양식장 경영에 막대한 경제적 손실을 가져오고 있다. 특히 해수어 양식에서 가장 높은 비중을 차지하는 어종인 넙치에 대해서 매년 큰 피해를 주고 있는 (Nakatsugawa, 1983; 최, 1989) 에드워드병은 조건성 병원체인 *Edwardsiella tarda*의 감염에 의한 것이며, 고밀도 양식으로 인한 환경 악화와 함께 피해가 심각한 질병이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 다양한 화학 요법제가 사용되고 있으나 이들 제재에 대한 내성 형성으로 인하여 사용량에 대한 뚜렷한 효과가 나타나고 있지 않다 (Aoki et al., 1981, 1989; Sugita et al., 1989; Grave et al., 1990; 최와 김, 1994; 최 등, 1996). 그러므로 근본적인 대책 수립의 일환으로서, 경제적이고 효율적인 vaccine의 개발에 필요한 요인을 찾아보고자 하였다.

본 연구에서는 현재까지 면역원으로 사용하였을 때 이에 따른 방어 효과가 널리 입증된 formalin killed cells을 사용하였고 (Gutierrez et al., 1994; Mekuchi et al., 1995; 박 등, 1993), 이것과 관련하여 iron chelator를 첨가 배양하여 제작한 vaccine의 효과를 평가하고자 하였다. iron chelator로서 2,2'-dipyridyl을 첨가한 배지에 *E. tarda*를 배양하여 FKC (DP-FKC)를 제작하였고 이 기존의 사용된 FKC vaccine과의 면역원성에 대한 효과를 비교하고자 하였으며, 각 항원의 투여 후 어체 내의 면역 반응과 *E. tarda* 생균 주사 후의 생존율을 관찰하여 방어력을 비교 검토하였다.

배양 조건에 따른 *E. tarda*의 독성을 알아보기 위해, 넙치에 생균을 주사하였다. 이 때 사용된 *E. tarda*는 TSB, 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB 및 Fe 첨가 TSB에 각각 배양한 생균이었으며, 공격 시험 결과 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB에서 배양한

*E. tarda*의 독성이 가장 높았으며, Fe 첨가 TSB에서 배양한 *E. tarda*의 독성이 낮은 것으로 확인되었다.

SDS-PAGE를 이용하여 outer membrane proteins (OMPs)의 profile을 조사하였는데, 배양 조건을 서로 달리한 OMPs와 IROMPs사이에는 다른 pattern의 단백질 profiles이 나타났다. 즉 major outer membrane proteins인 약 37과 40 kDa 크기의 주요항원은 공통적으로 나타났으나, 동일 농도임에도 불구하고 iron-restricted condition에서 배양한 후 분리한 IROMPs에서 68, 73 kDa protein profiles이 더 진하게 관찰되었다.

이전에 Choi-Kim et al. (1991)은 iron-restricted condition에서 배양한 *Pasteurella multocida*의 iron-restricted outer membrane proteins에서 76, 85와 94 kDa의 새로운 band가 나타났다고 보고한 바 있었으며, Fouz et al. (1997)의 연구에서는 *Vibrio damsela*를 Fe 첨가 배양한 조건에서 분리한 OMPs에서 나타나지 않았던 82와 85 kDa의 고분자 크기의 새로운 band를 iron-restricted condition에서 확인한 바 있었다.

OMPs을 비롯한 cell surface protein은 Gram-negative bacteria에서 중요한 독성 요소로 작용한다 (Zierler and Galan, 1995; Ahmed and Newton, 2001). Suzuki et al. (1994)과 Suzuki et al. (1996)은 *Vibrio anguillarum*에서 major outer membrane proteins의 병원성과 항원성을 보고하였고, Lutwyche et al. (1995)은 부지개송어에서 분리된 *Aeromonas salmonicida*의 28 kDa MOMP에 방어적 항원성이 있다고 보고하였다. 또한 *E. tarda*의 독성 연구에서 OMPs의 역할이 확인되지는 않았으나, 37 kDa OMP를 정제하여 면역시킨 뱀장어에 생균 공격하였을 때 방어능이 확인되었다 (Tu and Kawai, 1999). Duncan and Sorum (1998)는 iron-restricted condition과 같은 in vivo 배양 환경에 따라 독성과 관련한 OMPs 유사 항원이 다양하게 형성되며, 이것은 일반적인 배양 환

경에서보다 효과적인 면역 반응을 일으킨다고 보고하였다. 독성 요인으로 온도, 삼투압, inorganic ion(무기물의 이온) 농도, specific nutrient limitation, pH 등이 있는데 이들에 의해 독성과 관련된 유사 항원이 다양하게 발현된다.

독성 요인의 변화에 따라 형성되는 것 중에서 외막에 존재하는 pore-forming proteins (porins)과 siderophore receptor proteins이 있다. porins은 periplasm 내에 작은 hydrophobic molecule의 수동적 섭취를 위한 large water-filled channel을 형성하고 outer membrane을 가로지르는 특이적 영양소의 이동과 세균의 특이적 영양 상태에서 생성된다 (Davey et al., 1998). 그리고 iron은 regulator signal 중의 하나로서 세균의 항원 발현과 siderophore 생성에 영향을 주게 된다. Gram-negative bacteria는 iron-restricted condition에서 배양되었을 때 숙주로부터 iron을 획득하기 위하여 사용되는 high affinity iron-transport system를 가진다. 이것은 저분자량의 iron-chelators agents인 siderophore나 세포 외막과 세포질 막을 통과하는 siderophore-iron 복합체의 uptake와 transport에 관여하는 receptor proteins으로 구성된다 (Brown & Williams, 1985; Jacques et al., 1994). 그러므로 본 연구에서 iron-chelator에 의한 외막의 profile 성분의 변화와 독성 차이가 siderophore receptor proteins의 생성에 의한 것으로 생각된다. Igarashi and Lida (2002)은 본 연구와 유사한 결과를 가지는데, 병원체의 독성이 iron-uptake mechanism에 의해 작용하고 숙주로부터 iron을 획득하기 위하여 siderophore가 생성되며, iron-limited condition에서 siderophore의 생성이 더 컸음을 보고하였다. Schmidtke and Carson (2003)은 bacterial pathogens을 iron-deficient media, iron-limited media와 iron-enriched media에서 배양하여 bacterial protein의 다양한 profiles을 확인하였고, iron-restricted condition에서 세균이 iron-regulated proteins을 발현시킨다는 것을 시사하였다. 철의 이용능과 세균 성장율과는 별개로 세균 배양 조건이 siderophore의 생성과 단백질

발현에 영향을 주는 것이다 (Meiwees et al., 1990; Courcol et al., 1991; Drechsel et al., 1993; Domingue et al., 1996; Colquhoun and Sorum, 2001).

이와 관련하여 본 실험에서 iron-restricted condition의 배양 조건에서 더 진하게 나타난 68과 73 kDa outer membrane proteins는 세균이 iron을 얻기 위한 receptor로써 사용하는 것이라고 여겨진다. 다시 말해 iron이 충분히 존재하는 조건에서는 약하게 존재하던 68, 73 kDa의 iron-regulated outer membrane proteins이 철 결핍 조건에서는 siderophore receptor로서 작용하여 숙주의 high affinity iron-binding protein과 경쟁적 관계에서 iron-uptake mechanism이 개시되고 이것이 독성 factor로 작용하게 되는 것으로 사료되며, 본 연구의 독성 실험의 결과와 연관하여 추정하면 TSB나 Fe를 첨가한 TSB에서 배양한 *E. tarda*보다 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB에서 배양한 *E. tarda*가 iron-regulated membrane proteins을 발현시킴으로 높은 독성을 나타내는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 vaccine을 투여하고 그 효과를 측정하기 위하여 특이적 면역인자 중에서 혈청의 응집 항체가를 측정하였으며, 체액성 면역 반응의 분석을 보다 명확하게 확인하기 위하여 Enzyme Linked Immuno Spot (ELISPOT)을 실시하여 항체 생성 세포의 수를 계수 하였다.

본 연구에서 FKC와 DP-FKC 항원을 면역원으로 사용하여 각각 vaccine 처리한 후 응집 항체가를 측정한 결과, 1주 때에는 두 실험구가 유사한 수치를 나타내다가 2주 때부터 서서히 증가하여 3주 때에는 DP-FKC항원으로 vaccine한 실험구에서 훨씬 높은 항체가를 나타내었다. 이러한 결과는 Hirst et al. (1994)과 Durbin et al. (1999)의 연구에서 iron-chelator인 2,2'-dipyridyl을 첨가하여 배양한 세균의 IROMPs를 분리하여 이것을 면역원으로 주사하였을 때 나타난 응집 항체가의 결과와 유사하게 나타났다.

항체 생성 세포를 검출하는 기법으로는 haemolytic plaque assay와 ELISPOT

을 이용한 방법이 있는데 이중 ELISPOT은 항체와 항원, 효소와 기질의 특이적 결합을 이용한 방법으로 기존의 haemolytic plaque assay 보다 감도가 훨씬 뛰어나며 2차 항체를 이용하므로 haemolytic plaque assay에서 발생하는 background의 문제점을 해소할 수 있어 현재 많이 이용되고 있는 측정 방법이다. ELISPOT 법은 Dad, *Limanda limanda* L. (Secombes et al., 1991; Davidson et al., 1997), Roach, *Rutilus rutilus* (Aaltonen et al., 1994), Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Boesen et al., 1997), Carp, *Cyprinus carpio* L. (Bandin et al., 1997), Flounder, *Paralichthys olivaceus* (하 등, 1999) 등에서 적용된 예가 있다.

본 연구에서 항체 생성 세포 수를 확인한 결과, 두 실험구에서 2주 짜에 최고 수준에 달하는 결과를 보여주었으며, FKC 항원보다 DP-FKC 항원을 투여한 실험구에서 더 높은 수치를 나타내었다. ELISPOT 법을 이용한 항체 생성 세포 수의 검출 pattern과 혈청 내 응집 항체가의 수치를 나타내는 결과의 pattern이 유사하였지만, 항체 생성 세포 수는 2주 짜에 최고 수준을 보인 것에 비하여 응집 항체가는 3주 짜에 최고 수치를 나타내었다. 이것은 외부 항원이 어체 내로 유입되게 되면 lymphoid organ 내의 lymphocyte가 자극되어 항체를 생성하는 세포로 되어 분화와 증식의 과정을 거치게 되고 혈청 내 순환 항체는 lymphoid organ 내의 이러한 항체 생성 세포가 분비한 항체가 혈액에서 출현하는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서의 실험 결과 FKC (or DP-FKC) 항원을 넙치에 투여하였을 때 항체 생성 세포와 혈청 내 특이 항체량의 변화 관계를 추정할 수 있었으며, 특히 DP-FKC의 사용은 일반적인 제작법에 따른 FKC에 비하여 유의적 효과가 나타나는 것으로 판단된다. 이는 iron-restricted condition에서 발현되는 DP-FKC 항원 내의 IROMP를 자극하여 면역원성 효과를 증가시켜 주는 것으로 여겨진다.

공격 실험에 의한 vaccine의 투여 효과 시험에서 FKC 항원 투여구에 비하여 DP-FKC 항원 투여구가 더 높은 방어 효과가 있는 것으로 나타났다. 항원 투여 후 1주 쯤에는 두 실험구 사이의 방어력에 차이는 없었지만 2주 쯤부터 서서히 DP-FKC 항원 투여구의 방어 효과가 더 크게 나타나면서 3주 쯤에는 FKC 항원 투여구의 생존율이 50%로 나타난 것에 비하여 DP-FKC 항원 투여구의 생존율은 80%로 나타났다. 이러한 결과로 FKC 항원이 어체 방어력을 증강시켜 준다는 것을 확인하였고 이 중에서 2,2'-dipyridyl 첨가 배지에 배양하여 제작한 FKC 항원의 방어력이 더 높다는 것을 확인하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 동일한 양의 항원을 사용한 경우 FKC 항원을 사용하였을 때보다 2,2'-dipyridyl을 첨가하여 제작한 DP-FKC 항원을 사용한 경우 protein profile 변화가 나타나며 넓치에 vaccine으로 처리한 경우 면역원성에서도 차이가 나타났다. 이러한 결과는 iron chelator가 siderophore receptor로 작용하는 iron-regulated outer membrane proteins의 발현을 더 강하게 자극하기 때문인 것으로 사료된다.

그러므로 앞으로의 연구에서는 본 실험에서 나타난 iron-regulated outer membrane proteins 각각의 역할과 기능에 대한 보다 다양하고 깊이 있는 연구가 이루어져야 할 것이다.

V. 요약

우리 나라의 해수어 양식에서 가장 높은 비중을 차지하는 어종인 넙치는 해마다 늘어나는 질병으로 그 손실이 막대하다. *Edwardsiella tarda* 는 이러한 질병의 대표적인 원인균이며 조건성 병원체로서 수중이나 정상어의 장내에 상재하고 있어서, 양식어류에 대한 감염의 기회도 항상 존재한다고 볼 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 근본적인 대책으로서 vaccine 사용을 들 수 있으며, 이를 위하여 본 연구는 더 경제적이고 *E. tarda*에 대한 효율적인 방어 기능을 가지는 vaccine 개발의 기초 자료를 얻는데 그 목적을 두었다.

본 연구에서는 *E. tarda*의 독성 비교를 위하여 일반 TSB, iron-chelator인 2,2'-dipyridyl 첨가 TSB 및 Fe 첨가 TSB의 세 가지 배지를 준비하고 여기에 *E. tarda*를 세가지 조건으로 배양하였다. 각 조건에서 배양한 균에 대하여 outer membrane proteins와 iron-restricted outer membrane proteins을 분리하여 SDS-PAGE로 항원성을 비교하였다. 그리고 각각의 배양된 *E. tarda*에 대한 면역원성을 알아보기 위해 formalin-killed cells (FKC) 항원을 제작하여 넙치에 투여하였다. 투여 후 1, 2, 3주 및 4 주 째에 여러 가지 면역 반응의 조사와 공격 실험을 통한 생존율로서 항원의 효능을 비교하였다.

독성 시험의 결과는 iron-chelator 첨가 시험구의 *E. tarda*에서 독성이 가장 높았으며, Fe 첨가 시험구의 *E. tarda*가 가장 낮은 독성을 나타내었다. 그리고 SDS-PAGE를 이용한 항원 분석 실험에서 iron-chelator 첨가 시험구의 *E. tarda* outer membrane proteins (IROMPs)에서 68, 73 kDa 크기의 분자들이 더 많이 발현된다는 것을 확인할 수 있었다.

두 가지 vaccine 투여구 중에서 2,2'-dipyridyl 첨가 배지로 배양한 균체로 제

작한 DP-FKC 항원 투여구가 응집 항체가가 더 높게 나타났다. 면역 반응의 변화를 알기 위한 응집 항체가 조사에서는 FKC 항원과 DP-FKC 항원 투여구에서 모두 대조구보다 높은 응집 항체가를 나타내었고, 3주 째에 최고치를 나타내었다. ELISPOT을 이용한 항체 생성 세포 수의 검출에서도 응집 항체가와 유사한 pattern을 나타내었는데, 두 가지 vaccine 투여구에서 2주 째에 가장 많은 항체 생성 세포 수를 나타내었다.

공격 실험에서는 3주 째에 FKC 항원이 50%, DP-FKC 항원 투여구에서는 80%의 생존율을 나타내었다. 전체적으로 DP-FKC 항원 투여구의 생존율이 높게 나타났다.

이상의 결과로부터 넙치에 대한 *Edwardsiella tarda*의 vaccine으로는 현재 연구되고 있는 FKC vaccine 보다 칠 곁핍 조건에서 배양된 균체의 항원인 DP-FKC vaccine이 동일한 조건으로 사용하였을 때 더 나은 방어력을 가진다는 것을 알 수 있었다.

VI. 감사의 글

이 한편의 논문을 완성할 수 있도록 격려해 주시고 도움주신 많은 분들께 진심으로 감사드립니다.

따스한 웃음만큼 항상 너그러우신 마음과 깊은 이해심으로 지켜봐주시고 큰 가르침 주신 박수일 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 중에도 저의 논문에 지도와 조언을 해주신 정현도 교수님과 강주찬 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 관심주시고 배움을 일러주신 정준기 교수님, 허민도 교수님, 김기홍 교수님께 감사드립니다.

저에게 가장 큰 힘이 되고 위로가 되었던 어병예방학 실험실원들에게도 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 학부 졸업 후 공백이 많았던 제게 대학원 생활 시작부터 도움과 많은 조언을 주시고 또한 이 논문을 시작할 수 있게 큰 도움을 주신 이덕찬 선배님께 깊은 감사를 드리며, 실험하는 동안 많은 관심과 조언을 주신 김수미 박사님과 묵묵히 지켜보시고 힘들 때마다 잊지 않고 따뜻한 위로의 말을 건네주시던 우승호 선배님께 감사드립니다. 같이 실험하고 졸업을 준비해 온, 후배이지만 내 동기인 홍미주, 김현정 후배님께도 감사의 말을 전하며 그 동안의 수고에 박수를 보냅니다. 그리고 제가 논문을 쓸 수 있도록 실험실을 탄탄히 지켜준 김은전, 최광진, 오영은 후배님께도 감사드리며, 실험하는 동안 힘들지만 함께 해 준 최정현, 손새봄, 김윤희, 정영은, 김유정 후배님께 감사의 말을 드립니다.

대학원 생활동안 항상 친구처럼 위로해주고 선배처럼 조언해 준 한현자 후배님에게 깊이 감사드리며, 항상 든든한 힘이 되어주시는 이재일, 조미영, 이상운, 강민진, 원경미, 손영찬, 황미혜, 권문경, 최성재, 고석형 선배님께도 감사드립니다. 그리고 실험 과정에서 많은 도움 주신 서정수 선배님께 감사드립니다. 언제나 관심을 주시고 조언을 주시는 동해 수산 연구소의 방종득 과장님과 국립수산물과학원의 김진우 과장님, 김이청 연구관님, 최혜승 연구사님, 이주석 연구사님, 지보영 연구사님께 감사드립니다.

실험어를 구하지 못해 걱정할 때 많은 도움을 주었던 제주도의 동기생들 강진영, 박명한, 오세현 학우님과 박영수 선배님께 감사드리며, 실험어 때문에 항상 고생시켜드린 박현식 선배님과 대현 양식의 정경일님께 진심으로 감사드립니다.

내 친구들 연정, 동현, 영미와 1학년9반 12인에게도 진심으로 감사하다는 말을 전하고, 대학교 신입생일 때부터 지금까지 선배의 사랑을 가르쳐 준 자원 생물학과의 장묘인 언니 고맙습니다. 정말 힘들고 어려울 때 함께 있어준 문선, 진선 언니 고맙습니다.

마지막으로 둘째 딸 때문에 마음 고생 많으신 부모님과 항상 내 편이었던 언니, 동생 현정에게 진심으로 감사의 말을 올립니다. 그리고 항상 고맙고 미안한 마음으로 앞으로 더 열심히 노력할 것을 다짐합니다.

VII. 참 고 문 헌

- Aaltonen, T. M., E. I. Jokinen and E. T. Valtonen (1994). Antibody synthesis in roach (*Rutilus rutilus*); analysis of antibody secreting cells in lymphoid organs with ELISPOT-assays. *Fish & Shellfish Immunol.*, 4, 129-140.
- Ahmed, M. D. and C. N. Joseph (2001). Effect of incubation temperature and salinity on expression of outer membrane protein profile of *Edwardsiella tarda*. *J. Aquat. Anim. Health*, 13, 269-275.
- Aoki, T. and T. Kitao (1981). Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish Pathol.*, 15, 277-307.
- Aoki, T., T. Kitao and M. Fukudome (1989). Chemotherapy against infection with multiple drug resistant plasmid strain of *Edwardsiella tarda* in cultured eel. *Fish Pathol.* 34(3), 161-168.
- Aoki, T., T. Sakaguchi and T. Kitao (1989). Multiple drug resistant plasmid from *Edwardsiella tarda* in culture ponds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1821-1825.
- Bandin, I., C. P. Dopazo, W. B. van Muiswinkel and G. F. Wiegertjes (1997). Quantitation of antibody secreting cells in high and low antibody responder inbred carp (*Cyprinus carpio* L.) strains. *Fish & Shellfish Immunol.*, 7, 487-501.
- Boesen, 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.

- Brown, M. R. W. and P. Williams (1985). The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Annu. Rev. Microbiol.*, 39, 527-556.
- Brown, M. R., A. Hosmin and J. W. Costerton (1988). Surface antigens in vivo: a mirror for vaccine development. *Canadian J. Microbiol.*, 34, 494-498.
- Choi-Kim, K., S. K. Maheswaran, L. J. Felice and T. W. Molitor (1991). Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.*, 28, 75-92.
- Colquhoun, D. J. and H. Sorum (2001). Temperature dependent siderophore production in *Vibrio salmonicida*. *Microb. Pathog.*, 31, 213-219.
- Courcol, R. J., P. A., Lambert, P. Fournier, G. R. Martin and M. R. W. Brown (1991). Effects of iron depletion and sub-inhibitory concentrations of antibiotics on siderophore production by *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 28, 663-668.
- Davey, M. L., R. E. W. Hancock and L. M. Mutharia (1998). Influence of culture conditions of expression of the 40-kilodalton porin protein of *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Appl. Environmental Microbiol.*, 138-146.
- Davidson, G. A., S. H. Lin, C. J. Secombes and A. E. Ellis (1997). Detection of specific and 'constitutive' antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 58, 363-374.
- Davies, R. L., Gibbs, H. A., McLuskey, J., Coote, J. G., Freer, J. H. and

- R. Parton (1994a). Development of an intraperitoneal implant chamber for the study of in-vivo grown *Pasteurella haemolytica* in cattle. *Microbial Pathogenesis.*, 16, 423-433.
- Domingue, G., J. W. Costerton and M. R. W. Brown (1996). Bacterial doubling time modulates the effects of opsonisation and available iron upon interactions between *Staphylococcus aureus* and human neutrophils. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 16, 223-228.
- Drechsel, H., S. Freund, G. Nicholson, H. Hang, O. Jung and H. Zahner (1993). Purification and chemical characterisation of Staphloferrin B, a hydrophilic siderophore from Staphilococci. *Biol. Met.*, 6, 185-192.
- Duncan, J. C. and H. Sorum (1998). Outer membrane protein expression during in vivo cultivation of *Vibrio salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 8, 367-377.
- Durbin, M. and D. McIntosh (1999). Immunization against furunculosis in rainbow trout with iron-regulated membrane protein vaccines: relative efficacy of immersion, oral, and injection delivery. *J. Aqua. Animal Health*, 11, 68-75.
- Egusa, S. (1976). Some bacterial diseases of freshwater fishes in Japan. *Fish Pathol.*, 10, 103-114.
- Gardun, R. A., J. C. Thornton and W. W. Kay (1993a). Fate of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* in the peritoneal cavity of rainbow trout. *Can. J. Microbiol.*, 39, 1051-1058.
- Gardun, R. A., J. C. Thornton and W. W. Kay (1993b). *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. *Infection and Immunity.*, 61(9), 3854-3862.

- Gilda, L. P. and H. Wakabayashi, (1986). Immuno-response in tilapia *Sarotherodon niloticus* vaccinated with *Edwardsiella tarda* by hyperosmotic infiltration method. Vet. Immunol. Immunopathol., 12, 351-357.
- Grave, K., M. Engelstad, N. E. Soli and T. Hastein (1990). Utilization of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway drug 1980-1988. Aquaculture, 86, 347-358.
- Gutierrez, M. A. and T. Miyazaki (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.
- Hirono, I., N. Tange and T. Aoki (1997). Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. Mol. Microbiol., 24, 851-856.
- Hirst, I. D. and A. E. Ellis (1994). Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. Fish & Shellfish Immunol., 4, 29-45.
- Igarashi, A., T. Iida and J. H. Crosa (2002). Iron-acquisition ability of *Edwardsiella tarda* with involvement in its virulence. Fish Pathol., 37(2), 53-57.
- Jacques, M., M. Belanger, M. S. Diarra, M. Dargis and F. Malouin (1994). Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted condition and in vivo. Microbiol., 140, 263-270.
- Jann, B. and K. Jann (1990). Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. Curr Top Microbiol. Immunol., 150, 19-42.
- Janda, J. M. and S. L. Abbott (1993). Expression of an iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*. FEMS Microbiol. Lett., 111, 275-280.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lin, J., S. Huang and Q. Zhang (2002). Review, Outer membrane proteins: Key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection*, 4, 325-331.
- Lutwyche, P., M. M. Exner, R. E. W. Hancock and T. J. Trust (1995). A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infect. Immun.*, 63, 3137-3142.
- Meiwees, J., H. P. Fiedler, H. Hang, H. Konetschny-Rapp and S. Jung (1990). Isolation and characterisation of Staphloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS Microbiol. LETT.*, 67, 201-206.
- Mekuchi, T., T. Kiyokawa, K. Honda, T. Nakai and K. Muroga (1995). Vaccination trials in the Japanese flounder against *Edwardsiella*. *Fish Pathol.*, 30(4), 251-256.
- Meyer, F. P. and G. L. Bullock (1973). *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish(*Ictalurus punctatus*). *Appl. Microbiol.* 25, 155-156.
- Nakatsugawa, T. (1983). *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounders. *Fish Pathol.*, 18, 99-101.
- Rahman, M. H., S. Suzuki, R. Kusuda. and K. Kawai (1988). Changed of outer membrane and S-layer protein profiles of *Aeromonas hydrophila* by starvation. *Fish Pathol.*, 33(4), 275-279.
- Ranman, M. H., A. Kuroda, J. M. Dijkstra, I. Kiryu, T. Nakanishi and M. Ototake (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium*

- psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. Fish & Shellfish Immunol., 12, 169-179.
- Sac-Oui, D., K. Muroga and T. Nakai (1984). A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*. Fish Pathol., 19, 197-199.
- Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda (1983). Immune response of eel against *Edwardsiella tarda* antigen. Fish Pathol., 18(3), 135-141.
- Salati, F. and R. Kusuda (1985). Chemical composition of lipopolysaccharide. Fish Pathol., 19, 187-192.
- Salati, F., M. Hamaguchi and R. Kusuda (1987). Immune response of red seabream to *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathol. 22(2), 93-98.
- Schmidtke, L. M. and J. Carson (2003). Antigen recognition by rainbow trout of whole cell proteins expression by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. Vet. Microbiol., 93, 63-71.
- Secombes, C. J., A. White, T. C. Fletcher and D. F. Houlihan (1991). The development of an ELISPOT assay to quantify total and specific antibody-secreting cells in eel *Limanda limanda*(L.). Fish & Shellfish Immunol., 1, 87-97.
- Song, Y. L. and C. H. Kou (1981). The immuno-response of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studies by the immersion methods. Fish pathol., 15, 249-255.
- Suprpto, H., T. Nakai and K. Muroga (1995). Toxicity of extracellular products and intracellular components of *Edwardsiella tarda* in the Japanese eel and flounder. J. Aquat. Anim. Health, 7, 299- 307.

- Suprpto, H., T. Nakai and K. Muroga (1996). Purification of lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 31(4), 203-207.
- Suzuki, S., K. Kuroe and R. Kusuda (1994). Characteristics of porin-like major outer membrane proteins of *Listonella anguillara* serotypes J-O-1, -2 and -3. Biochem. Molecul. Biol. Internat. 32, 605-613.
- Suzuki, S., K. Kuroe, K. Yasue and R. Kusuda (1996). Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35kDa porin-like protein of *Listonella (Vibrio) anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species. Lett. Appl. Microbiol., 23, 257-260.
- Thune, R. L., L. A. Stanley and R. K. Cooper (1993). Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warm water fish. Annu. Rev. Fish Dis., 3, 37-68.
- Tu, X. and K. Kawai (1998). Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 33(5), 481-487.
- Tu, X. and K. Kawai (1999). Antigenic profile and protective role of a 37kDa major outer membrane protein of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 34, 59-64.
- Ullah, M. A. and T. Arai (1983a). Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 18(2), 65-70.
- Ullah, M. A. and T. Arai (1983b). Exotoxic substances produced by *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 18(2), 71-75.
- Waterstrat, P. R. J. Brazil and A. J. Ainsworth (1991). Use of an ELISA-based assay for the detection of antibody-secreting cells in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J. Fish Dis., 14, 669-675.

- Zierler, M. K. and J. E. Galan (1995). Paradigms in bacterial entry into host cells. J. Roth, C. Bolin, p21-45, K. Brogden, F. Chris Minion, and M. Wannemuehler, editors, 2nd edition. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 박수일, 최윤정, 이주석 (1993). 어류 병원성 세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 뱀장어 면역 반응. J. Fish Pathol., 11-20.
- 방종득 (1992). 양식 넙치 *Paralichthys olivaceus*에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 면역 특성에 관한 연구. 박사학위논문, 부산수산대학교.
- 이덕찬 (1998). 양식 넙치 치어의 *Edwardsiella tarda* vaccine에 대한 침지 투여 효과. 부경대학교 석사 학위 논문.
- 최민순, 김영길 (1994). 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성과 R plasmid. J. Fish Pathol., 7(1), 37-46.
- 최민순, 최상훈, 박관하, 장선일, 윤창용, 조정권, 송희종 (1996). 뱀장어 병어로 부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성. J. Fish Pathol., 9(2), 195-201.
- 최인숙 (1995). 넙치의 *Edwardsiella tarda*에 대한 면역반응. 부경대학교 석사 학위 논문.
- 최혜승 (1989). 양식 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 병원성. 수진연보, 45, 197-205.
- 하재이, 박준효, 강명석, 정준기, 정현도 (1999). 수산생물의 생산과 관리에 관한 기초연구: ELISPOT 기법을 이용한 넙치의 항체 생성 세포 분석. J. Korean Fish Soc., 32(4), 420-426.