

## 어류 병원성 세균 *Edwardsiella tarda*에 대한 뱀장어의 면역 반응

박수일, 최윤정, 이주석

부산수산대학교 어병학과

뱀장어의 복강내에 *Edwardsiella tarda*의 FKC, HKC 및 crude LPS를 주사한 후 경시적으로 순환혈액 중 면역세포 수의 변화와 식작용, 항체가를 비교하여 항원 종류별 뱀장어의 면역 반응을 검토하였다.

백신 투여 뱀장어의 순환혈액 중 림프구 수는 백신 투여 후 6시간까지 감소하였으나 이후 증가하기 시작하여 24시간 후에는 정상치로 회복되었다. 이후 모든 면역 실험구에서는 실험기간 동안 대조구에 비하여 림프구 수가 증가된 상태로 지속되는 경향을 보였다. 한편, 호중구의 출현수를 대조구와 비교하면 백신 투여 후 12시간 이내에 최고치를 나타낸 후 서서히 정상 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다.

모든 백신 투여 실험구의 혈청중 항체가는 백신 투여 3주째에 128에 이르러 높은 항체가가 지속되었으나, HKC 면역구의 경우에는 6주후 4로 떨어졌다.

호중구의 식작용에 있어서는 LPS 면역구의 항원 주사 6시간 후와 1주후의 반응 6시간째의 식균지수가 각각 28.3과 3.9로 가장 높았다. 항원 주사 후 12시간째의 식균지수가 반응 6시간째 FKC 면역구 18.8, HKC 면역구 10.7, LPS 면역구 28.3 및 대조구 1.2로서, 1 주 후 각 면역구의 식균지수보다 높게 나타났다.

신선 항혈청의 항균작용은 FKC와 LPS 투여구에서만 나타나고, HKC 투여구에서는 세균 수의 감소를 볼 수 없었다. 그리고, 공격시험에서는 HKC, FKC 및 LPS 면역구의 RPS가 각각 10%, 20% 및 30%이었으므로, 본 세균은 항원의 처리 방법에 따라 숙주의 방어력 증강에 미치는 효과가 다른 것을 알 수 있었다.

**Key Words :** *Edwardsiella tarda*, eel, FKC, HKC, LPS, immunocytes, phagocytosis, complement, antibacterial activity

어류 병원성 세균인 *E. tarda*는 많은 경골어류에 감염하여 질병을 일으키고 있으며, 특히 뱀장어에 대한 감염이 지속적으로 일어나는 반면 치료 효과는 잘 나타나지 않아서 피해도 많이 난다는 것은 오래 전부터 잘 알려진 사실이다.

그 원인으로서 양만장의 환경 조건에 따라서 *E. tarda*의 균수가 계절적인 변동을 보이기도 하지만(Minagawa *et al.*, 1983), 비닐 하우스 등 가온식 양만시설에서는 연중 다수의 *E. tarda*가 분리되므로(渡邊 等, 1981,

1982; 박, 1989) 뱀장어에 대한 감염의 기회도 항상 존재하기 때문이라고 볼 수 있다. 이러한 현상은 *E. tarda*의 감염을 예방하기 위한 백신의 연구에 관심을 불러 일으키게 되어, *E. tarda*의 항원성에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(Song and Kou, 1981; Salati *et al.*, 1983; Salati and Kusuda, 1985). 그러나, *E. tarda*에 대한 뱀장어의 면역반응에 관한 연구는 많지 않으며, 뱀장어의 생산량이 많고 피해율도 높은 우리 나라에서는 아직 보고된 바가 없다.

이 논문은 1991년도 교육부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

본 실험에서는 *E. tarda*의 항원 투여에 대한 뱀장어의 면역 반응을 알아보기 위하여 균체 성분을 중심으로 한 각종 항원을 제작하여 투여하고, 백신 투여 어체에 있어서 혈액내 면역세포의 변화를 수주간에 걸쳐 조사하였으며, 아울러 항체와 면역세포의 시간적 변화, 식균능력을 중심으로 한 면역 반응을 관찰 검토하였다.

## 재료 및 방법

실험어는 양만인자로 부터 병력을 확인한 후 구입한 10~50g의 뱀장어로서 구입 직후 응집반응을 조사하고 항체가 형성되지 않음을 확인하였다. 실험용 뱀장어는 부산수산대학교 수산과학대학 어병예방학 실험실의 반순환여과식 사육조에서 사육하면서 2주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 사육수온은 28~29°C를 유지하였으며 면역시키기 전후 3일간씩 절식시켰으나 그 이외의 실험기간 중에는 사료를 공급하였다.

각종 항원의 제작 및 실험에 사용된 균주는 액체 질소에 보존하고 있는 *E. tarda* T1123을 어체통과후 사용하였으며, 실험용 항원은 FKC(Formalin Killed Cells), HKC(Heat Killed Cells) 및 crude LPS(Lipopolysaccharide)의 3가지 항원이었다.

FKC 항원 준비는 실험균주를 TSB에 접종하여 28°C, 48시간 진탕배양기에서 배양한 후 포르마린을 0.5% 되도록 첨가하여 24시간 동안 실온에 방치하여 사균화 하였다. 이 포르마린 처리 사균을 4°C에서 5,000rpm으로 15분간 원심분리하여 집균하고 멸균생리식염수로 3회 세척한 후 실험용 FKC 항원으로 사용하였다.

HKC의 경우에는 실험균주를 TSB에서 28°C, 48시간 동안 진탕 배양한 후 이 배양균액을 100°C에서 30분간 증탕함으로써 사균화 하였다. 이 가열사균은 5,000rpm, 15분간 원심분리하여 집균하였으며 이후의 과정은 FKC와 같다. crude LPS는 *E. tarda*를 10ℓ의 TSB에 접종하여 증균시킨 후 원심분리하여 침전물을 분리한 다음, warm phenol water method(Westphal and Jann, 1965)로 제조하였으며, 4°C, 3일간 투석한 후 PEG로 10ml가 되도록

농축시켰다.

항원의 투여는 각각 어체 1마리당 FKC와 HKC 항원을 각각 2mg씩, 그리고 crude LPS는 1마리당 0.1mg을 복강주사하였으며, 대조구에는 멸균생리식염수를 1마리당 0.1mg씩 복강주사하였다.

항원 투여 뱀장어 체내의 시간 경과별 각종 혈액세포의 계수는 각각의 항원을 어체에 접종한 후 3, 6, 12, 24시간, 3, 5, 7일 및 2, 4, 6주 경과시에 미부정맥에서 채혈하여 혈액도말표본을 제작하였다. 표본은 시험어당 각각 2개씩 만들었으며 1회 조사시 5마리를 사용하였다. 혈액세포 관찰은 May-Giemsa 염색을 이용하였고, 적혈구 5,000cells당 호중구와 림프구 수를 관찰하였다.

식세포의 식작용은 항원 접종 후 12시간과 1주째에 채취한 헤파린 처리 혈액 0.5ml와 *E. tarda* 생균 2.5mg을 25°C, 실리콘 피복 시험관 내에서 진탕하며 반응시켜 조사하였다. 반응의 정도는 반응 시작 후 15, 30분 및 1, 3, 6시간 별로 슬라이드 도말표본을 만들고, May-Giemsa 염색 후 검경하여 조사하였다.

응집항체가 항원 투여 후 1주마다 각 실험구 별로 무작위로 채포하여 실험어의 미부정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였으며, 그 혈청에 대한 항체가 microtiter법에 의해 측정하였다.

보체의 활성화를 알기 위한 혈청의 분리는 미부정맥에서 채취한 혈액을 실온에 2시간 정치한 후 4°C, 2시간 작용시킨 다음 2500rpm, 10분간 원심분리하는 과정을 거쳤다. 정상 혈청은 혈청의 분리 직후에 사용하였으며, 가온 불활성화 혈청은 Sakai(1981)에 따라 48°C, 30분간 가온 처리하여 실험에 사용하였다. 각 혈청의 희석에는 GVB(gelatin veronal buffer, pH 7.4)를 사용하였으며, 모든 실험 혈청은 4:1로 희석한 후 일정 시간별로 항균작용을 비교 관찰하였다. 각 단계별 세균 수의 변화는 Miles and Misra(1938)에 따라 평판 배지에 형성된 집락수로써 산정하였다.

백신 투여 어체의 방어력 변화를 알기 위한 공격 시험에는 TSB, 28°C, 48시간 배양한 *E. tarda*를 4°C, 5000rpm으로 15분간 원심분리하여 집균하여 각종 항원으로

면역 처리한 8주후 면역어의 복강에  $2.0 \times 10^6$  CFU/fish 되도록 주사하여 10일간의 상대생존율(relative percentage of survival)을 구하였다.

각각의 항원과 멸균생리식염수를 투여한 후 시간 경과별 림프구의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 대조구의 경우 주사 6시간 후 감소하여  $10.75 \pm 5.07$  cells 이었으나 이후 시간이 지남에 따라 정상치로 돌아가는 경향을 보여 12시간 째에  $26.33 \pm 3.68$  cells이었다. 1주째에는  $30.25 \pm 7.5$  cells이었으며 이후 비슷한 수치를 나타내어 6주째에는  $39 \pm 11.22$  cells이었다. FKC 실험구에서는 6시간째

## 결 과

### 1. 순환혈액에서의 면역세포수 변화

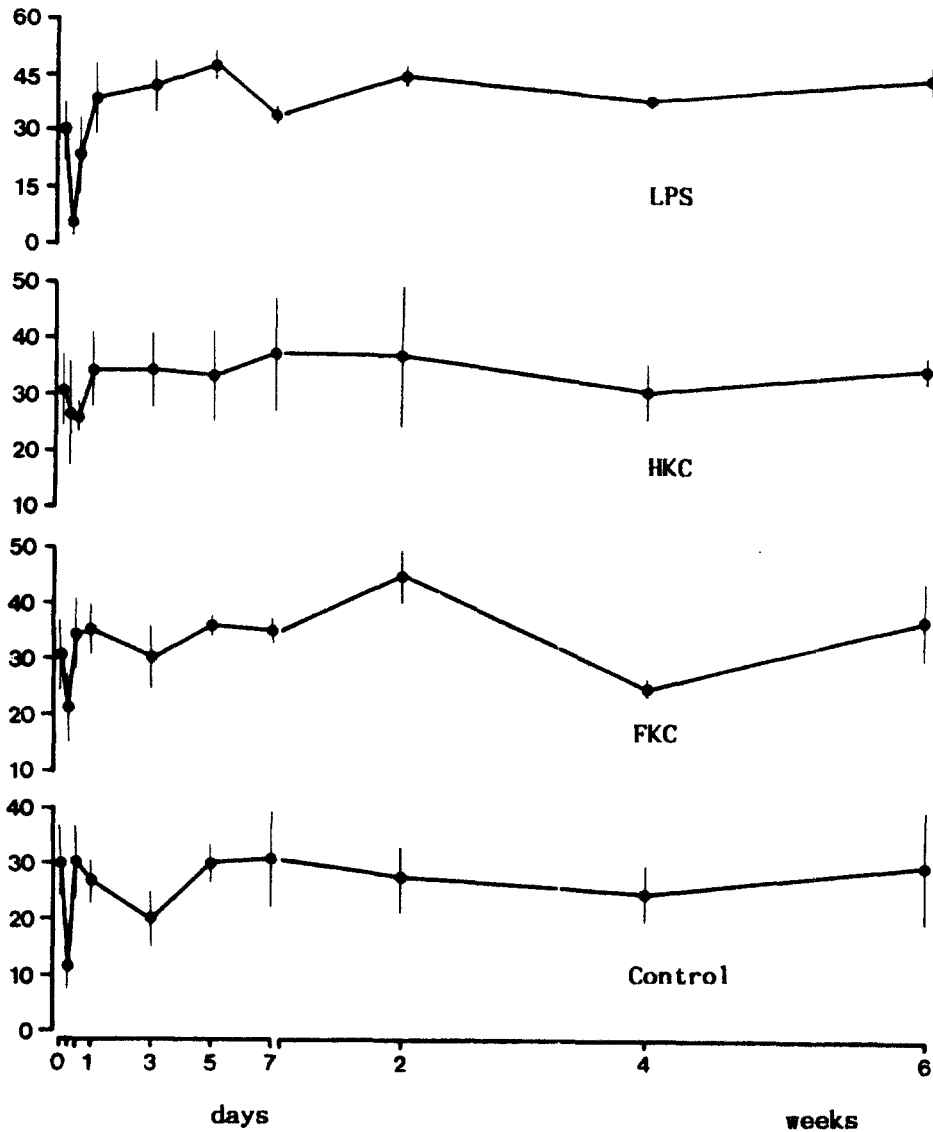


Fig. 1. Changes of the number of lymphocytes per 5000 red blood cells in the peripheral blood from the intraperitoneally FKC, HKC and LPS injected eel.

에  $21.5 \pm 6.80$  cells로 감소하였으나 12시간째에는  $34.33 \pm 10.87$  cells로 증가하였다. 이후 4주째에 감소 현상이 있었지만, 대조구에 비하여 약간의 증가 경향이 나타났으며 6주째에는  $43.6 \pm 10.13$  cells 이었다. HKC 실험구에서는 항원 주사 후 감소하기 시작하여 6시간째에는  $26.5 \pm 9.81$  cells 이었으나, 12시간째에는  $28.33 \pm 2.89$  cells로 증가되었다. 이후 실험기간 동안 적혈구 5,000 cells 당 약 20~40 cells의 범위의 수치를 나타내었다. LPS 실험구에서는 6시간째에는  $2 \pm 1$  cells로 현저한 감소를 나타냈다.

이후 증가하기 시작하여 24시간째에는  $39 \pm 9.72$  cells, 3일째에는  $48 \pm 4$  cells을 나타내었으며 이후에는 대조구에 비해 약간 높은 수의 출현수를 보였다. 그리고, 6주째에는  $45 \pm 3.7$  cells을 나타내었다. 시간경과별 호중구 수의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 대조구의 경우 별다른 증가 현상은 나타나지 않았으며 12시간과 24시간째에 3~4 cells 정도로 나타났을 뿐 이후의 실험기간 동안 약 1~4 cells 정도의 범위를 나타내었다. FKC 실험구의 경우, 주사 후 3시간째에  $8 \pm 1.67$  cells로 증가를 나타내었으며,

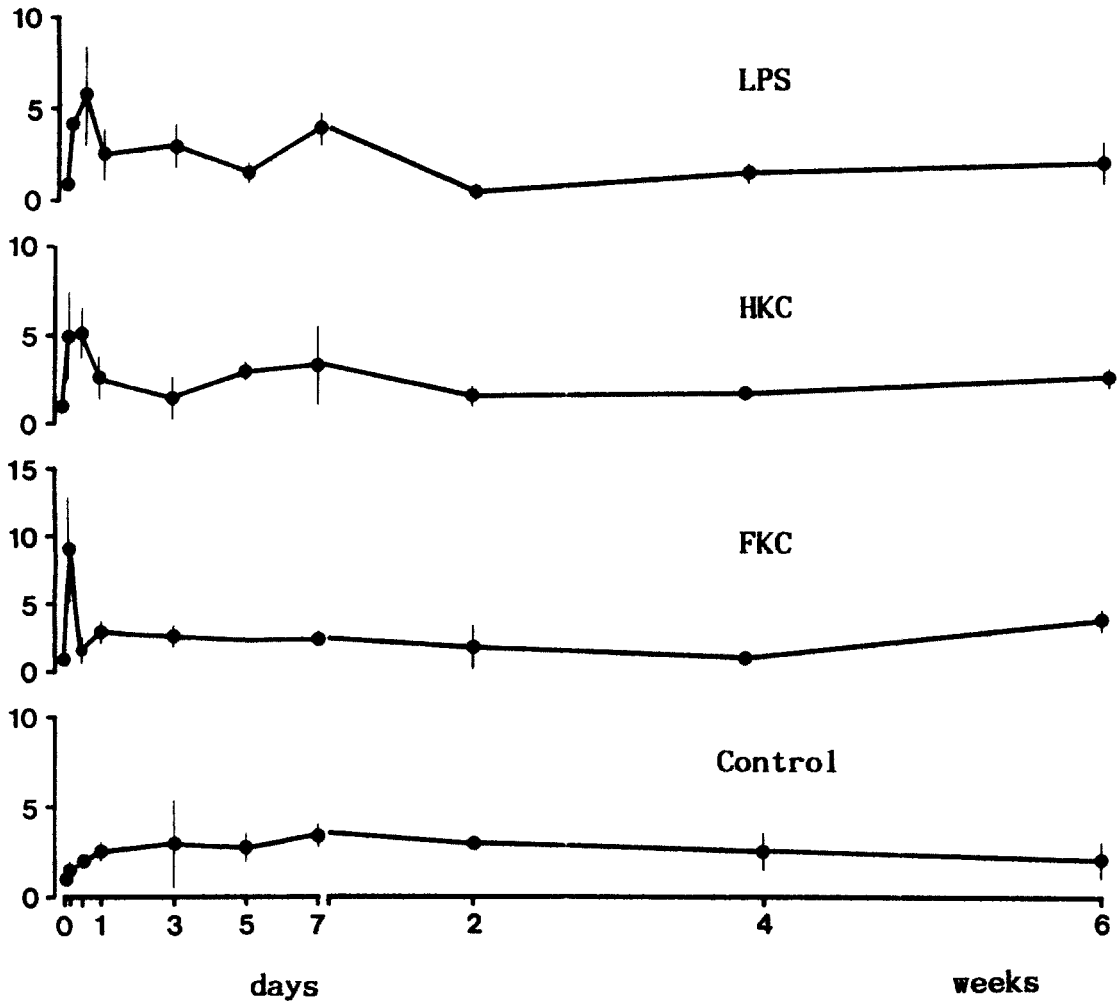


Fig. 2. Changes of the number of neutrophils per 5000 red blood cells in the peripheral blood from the intraperitoneally FKC, HKC and LPS injected eel.

12시간째에는  $1.67 \pm 0.94$  cells로 정상치로 돌아왔다. 이후 실험 종료시까지 적혈구 5,000 cells 당 2~3 cells의 비율로 출현하였다. HKC 실험구에서는 3시간째에  $5 \pm 2.24$  cells을, 12시간째에는  $5.17 \pm 1.77$  cells을 나타내었으며 이후 감소하여 정상치를 나타내었으며 6주째에는  $2.5 \pm 0.5$  cells 이었다. LPS 실험구의 경우, 항원 주사 후 3시간째  $4 \pm 1.41$  cells로 증가하였으며 12시간째에도 증가한 수치인  $5.75 \pm 2.86$  cells을 나타내었다. 이후 정상치로 돌아가려는 경향을 보였으며 6주째에  $2 \pm 1.23$  cells을 나타내었다.

**2. 응집항체의 변화**

각종 항원을 투여한 뱀장어에서 조사된 응집항체는 Table 1과 같이 백신 투여 1주일 후부터 대조구와 비교하여 높은 수치의 항체가 검출되기 시작하였으며 HKC는 5주부터 항체가 낮아지기 시작하였으나 FKC와 LPS는 이후 조사 기간 동안 높은 항체가 지속되었다.

Table 1. Agglutination titer of FKC, HKC, LPS and control group

immunogen	Agglutination titer(1 : )					
	Weeks after immunization					
	1	2	3	4	5	6
FKC	128	128	128	128	128	128
HKC	64	64	128	128	32	4
LPS	128	128	128	128	64	64
Control	<2	<2	<2	<2	<2	<2

**3. 혈청성분(보체)의 항균작용**

뱀장어 정상혈청의 성분에 의한 *E. tarda*의 살균작용 시험결과는 Fig. 3과 같이 신선혈청 및 가열불활성화 혈청 모두에서 세균의 증식현상을 나타내어 살균 효과를 볼 수 없었다. 면역 뱀장어의 혈청을 사용한 *E. tarda*의 살균작용 시험에서는 Fig. 4와 같이 FKC와 LPS 투여군에서 *E. tarda*의 증식이 억제되고 있는 것을 볼 수 있었

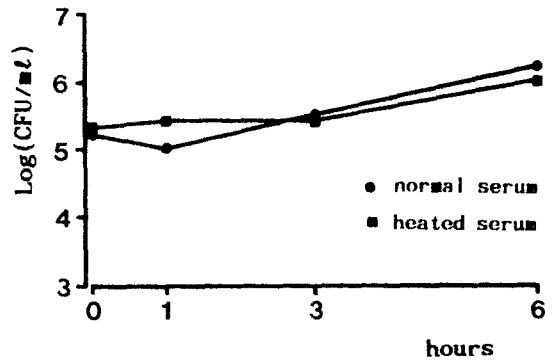


Fig. 3. Antibacterial activities against *E. tarda* of the control serum.

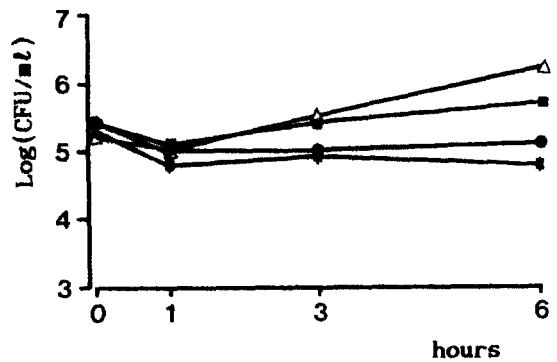


Fig. 4. Antibacterial activities against *E. tarda* in the serum of FKC, HKC and LPS injected eels : ●, FKC ; ■, HKC ; ★, LPS ; △, control.

다. 그러나, HKC 투여군에서는 정균작용이 나타나지 않았다.

**4. 순환혈액 중의 호중구의 식작용**

백신 투여 후 12시간째와 1주째의 식세포 활성을 조사한 결과는 각각 Table 2, 3과 같다.

Table 2에 나타난 바와 같이 식균지수는 세 면역 실험구 모두 대조구에 비해 높게 나타났으며 그중 LPS 실험구의 식균지수가, 또한 항원 주사 1주째보다 12시간째의 식균지수가 높게 나타났다.

Table 3에 나타난 식균율을 보면 항원 주사 1주째보다

Table 2. Phagocytic index of phagocytes in peripheral blood of eel vaccinated with FKC, HKC and LPS

Immunogen	Time after immunization									
	12 hrs					1 weeks				
	Incubation time(hrs)									
	1/4	1/2	1	3	6	1/4	1/2	1	3	6
control	1.2	1.9	0.8	2.7	1.2	1	1.9	0.8	3.2	0.7
FKC	2	4	4.5	10.1	18.8	2.1	2.5	2.4	2.4	3.3
HKC	1.4	2.4	3.8	12.9	10.7	1.8	1.8	1.6	2.4	1.3
LPS	9.3	11.6	16.2	21.1	28.3	2.0	1.8	2.4	2.7	3.9

오히려 12시간째의 식균율이 높았다. 또한 LPS 실험구의 식균율이 가장 높았다.

세 항원 중 *E. tarda* 생균에 대한 식작용은 LPS 항원

으로 면역시킨 실험구에서 가장 높게 나타났으며, 면역 1주후가 12시간째보다 오히려 낮게 나타났다.

Table 3. Phagocytic rate of phagocytes in peripheral blood of eel vaccinated with FKC, HKC and LPS

Immunogen	Time after immunization									
	12 hrs					1 weeks				
	Incubation time(hrs)									
	1/4	1/2	1	3	6	1/4	1/2	1	3	6
control	86	83	92	97	100	83.3	70.6	46	82	32
FKC	84	84	82	100	100	68	82	76	76	82
HKC	66	70	88	100	89	66.7	72.1	61.3	80	62
LPS	98	100	100	100	100	64	76	86	87.5	94

## 5. 공격실험

백신 투여 어체의 방어력 증강 정도를 파악하기 위하여 *E. tarda* T1123을 뱀장어 복강내에 주사한 실험결과 는 Table 4와 같다.

즉, 백신투여 어체가 대조구에 비하여 생존기간이 연장될 뿐만 아니라 LPS, FKC 및 HKC 투여군에서 RPS가 각각 30, 20 및 10을 나타내어 *E. tarda*는 균체 성분 중에 방어력을 증강시킬 수 있는 항원이 존재하고 있는 것으로 나타났다.

## 고 찰

어류의 면역에 관계하는 세포 중 항체를 형성하는 림프구와 식작용을 하는 호중구가 면역기능에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각할 수 있다. 이러한 관점에서 본 *Edwardsiella tarda* FKC, HKC 및 crude LPS에 대한 순환혈액내의 호중구 및 림프구의 숫적 변화와 식세포의 기능 변화를 알아보았다. 본 실험에서 투여한 항원의 종류에 따라 혈액 중의 호중구가 숫자나

Table 4. Challenge with  $2.0 \times 10^6$  CFU/fish of *E. tarda* T1123 against eel vaccinated FK, HK and crude LPS

Vaccinated group	Number of survived fish at day						RPS*(%)
	1	3	5	7	9	10	
FK	20	14	12	5	4	4	20
HK	20	11	7	2	2	2	10
LPS	20	15	11	6	6	6	30
Control	20	12	4	0	0	0	0

$$RPS = \left(1 - \frac{\% \text{ mortality of vaccinated}}{\% \text{ mortality of control}}\right) \times 100$$

시간별로 출현 정도에 차이는 있지만, 모두가 주사 후 12시간 이내에 최고치에 달한 후 정상치로 회복하거나 대조구에 비하여 다소 출현율이 높은 경향을 보였다. Suzuki and Hibiya(1988)는 염증을 유발시키기 위하여 이물질을 어체에 투여하였을 때 12시간째에 가장 높은 수치의 호중구가 나타났으며, MacArthur *et al.*(1985)은 넙치 백혈구의 유주에 관한 연구에서 주사 2시간 후에 순환혈액 중의 백혈구가 50% 이상 증가되었으며 6시간 후에는 30%로 감소한 결과를 얻었다고 한다. 본 연구에서도 대조구를 제외한 세 항원의 실험구에서 비슷한 현상의 호중구 증가 현상을 나타내었으며, 이 현상은 체내에 침입한 이물질의 제거를 위한 비특이적 면역반응 현상이라 생각된다. 항원을 투여한 후 호중구의 출현 양상을 대조구와 비교해 보면, FK 항원에 대해 가장 빠르게 출현하였으나 24시간 이내의 출현량은 HK 항원이 많았다. 그러나 항체 생산 정도는 HK 실험구가 전반적으로 낮게 나타나 HK 항원이 호중구에 의해 쉽게 식균되어 분해되므로서 면역기구에 대한 자극에서 다른 항원에 비하여 차이가 날 수 있는 가능성이 시사되었다. 림프구에 있어서는 항원을 접종한 직후에 혈중 출현수가 줄어들고 있는데 이러한 현상은 Ellsaesser and Clem(1986)이나 Angelidis *et al.*(1987)의 보고와 같이 스트레스에 의한 순환혈액 중의 일시적인 림프구의 감소라 생각된다. 그리고, 6시간 이후부터 림프구 수가

증가하는 현상이 나타나 항원을 투여한 세 실험구에서는 24시간이 경과하였을 때 대조구보다 높은 수치를 나타내었다. 이후의 실험기간에도, 대조구가 주사하기 전의  $30.19 \pm 7.95$  cells의 범위와 비슷하거나 낮은 경향을 보인 반면, 세 실험구는 약간의 증감변동이 있기는 하나, 출현 범위가 30~50 cells 이었다 이러한 림프구의 증가 현상이 실험기간 중 측정된 항체가 1주째부터 높게 나타나는 것과 어떤 상관성이 있을 것으로 생각된다.

정상혈청의 *E. tarda*에 대한 항균작용 시험에서는 오히려 세균 수가 증가되는 것으로 나타났으나 FK 또는 LPS의 면역 항혈청에 있어서 *E. tarda* 균수가 일시적으로 감소한 이후 지속적으로 정균상태에 있는 것으로 보아서 FK 또는 LPS에 대한 항체의 생성이 백장어의 방어력 증강에 관여하는 것으로 생각된다. 한편, HK 면역혈청에서는 대조구와 비슷한 균수의 증가현상이 나타났으므로 HK 항원에서는 면역원성은 있으나 어체의 방어 항원은 부족한 것을 알 수 있었다.

포유류의 경우 식세포의 식작용에 있어 항체와 보체는 옅소년 작용을 가진다고 알려져 있다. Matsuyama *et al.*(1992)은 보체 C3는 식작용에 있어서 중요한 필요조건이며, 잉어의 호중구는 그 세포 표면에 C3 receptor를 가진다고 하였다. 순환혈액 중 호중구의 식작용에 관한 결과를 보면 대조구를 제외하고 세 실험구에서 항원 주사 12시간 후보다 1주일 이후의 식작용이 오히려 저하되는 것을 볼 수 있다. 항원 주사 1주 후에는 항체가 형성됨에도 불구하고 12시간째보다 낮은 식균능을 보이는 것은 Rose and Levine(1992)이 주장한 것처럼 면역처리 초기에 투여된 항원을 처리하기 위한 옅소년 작용에 보체가 소비되고 1주째에는 아직 충분한 보체의 양이 회복되지 않았기 때문일 가능성이 시사되었다. Nagamura and Wakabayashi(1985)의 순환혈액 호중구의 식작용 조사를 보면 전혈과 세균과의 반응시간이 30분인 경우 식균율은 16~17%로 Kusuda and Taira(1990)의 연구 보고와 일치했으나 본 실험에서는 배양시간 15분부터 이미 80% 이상의 식균율을 나타냈다. 이러한 식균율의 차이는 실험에 사용한 식세포의 종류 및 세균의 농도를

비슷한 실험방법이 달랐기 때문에 생각되지만, Nagamura and Wakabayashi(1985)의 반응시간 4시간째의 식균율이 96~97%에 이르러 본 실험의 결과와 비슷한 것을 볼 때 항체는 다소 지속적인 정균작용을 일으키므로서 식작용이 장시간에 걸쳐 촉진될 수 있는 것으로 생각되었다.

공격실험에서는 방어율이 LPS, FKC 및 HKC의 순으로 낮아졌으나, 이들 중에는 방어 항원 결정기가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로, 이후 FKC, LPS 및 HKC의 항원 분석 및 방어 인자의 확인 과정을 거쳐 방어력을 보다 높일 수 있는 연구가 필요하다고 생각한다.

## 참 고 문 헌

- Angelidis, P., F. Baudin-Laurencin and P. Youinou : Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri* : effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol., 31(suppl. A) : 113~122, 1987.
- Ellsaesser C. F. and L. W. Clem : Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. J. Fish Biol., 28 : 511~521, 1986.
- Kusuda, R. and T. Taira : Change of biological activities of phagocytes from the eel immunized with *Edwardsiella tarda*. Fish pathol., 25 : 53~58, 1990.
- MacArthur, J. I., A. W. Thomson and T. C. Fletcher : Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. J. Fish Biol., 27 : 667~676, 1985.
- Matsuyama, H., T. Yano, T. Yamakawa and M. Nakao : Opsonic effect of the third complement component(C3) of carp *Cyprinus carpio* on phagocytosis by neutrophils. Fish and Shellfish Immunol. 2 : 69~78, 1992.
- Miles, A. A. and S. S. Misra : The estimate of bactericidal power of blood. J. Hygiene, 38 : 732~749, 1983.
- Minagawa, T., T. Nakai and K. Muroga : *Edwardsiella tarda* in eel culture environment. Fish Pathol., 17 : 243~250, 1983.
- Nagamura, Y. and H. Wakabayashi : Changes in glycogen of neutrophils in eel, *Anguilla japonica* by bacterial infection. Fish pathol., 20 : 389~394, 1985.
- 朴守一 : 뱀장어의 면역 응답에 관한 연구 - I. 에드워드병 원인균의 혈청형에 관한 연구. 한국어병학회지, 2(2) : 83~90, 1989.
- Rose, A. S. and R. P. Levine : Complement-mediated opsonisation and phagocytosis of *Renibacterium salmoninarum*. Fish and Shellfish Immunol., 2 : 22~240, 1992.
- Sakai, P. K. : Heat inactivation of complement and immunohemolysis reaction in rainbow trout, masou salmon, coho salmon, goldfish and tilapia. Bull. J. Soc. Sci. Fish., 47(2) : 565~571, 1981.
- Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda : Immune-response of eel against *E. tarda* antigens. Fish Pathol., 18 : 135~141, 1983.
- Salati, F. and R. Kusuda : Chemical composition of the lipopolysaccharide. Fish pathol., 19 : 187~192, 1985.
- Song, Y. L. and G. H. Kou : Immune response of eels against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguillimortiferum*(*E. tarda*) infection. Proceedings of Republic of China/U.S. Cooperative Science Seminar on fish Diseases, National Science Council Series. 3 : 107~115, 1981.
- Suzuki, Y. and T. Hibiya : Dynamics of leucocytic inflammatory response in carp. Fish pathol., 23 : 179~184, 1988.
- Westphal, O. and K. Jann : Extraction with phe-



nol-water and further applications of the procedure.  
 Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 5, 83~91,  
 1965.  
 渡邊佳一郎・若林久嗣・古橋宏基：温水性魚類(ウナギ)  
 の防疫についての研究. 静岡水試浜名湖分場, No. 223.

1981.  
 渡邊佳一郎・若林久嗣・山本敏：温水性魚類(ウナギ)の  
 防疫についての研究. 静岡水試浜名湖分場, No. 232.  
 1982.

## Immune response of eel against fish pathogen, *Edwardsiella tarda*

Soo-Il Park, Yoon-Jeong Choi and Joo-Seok Lee  
 Department of Fish Pathology, National Fisheries University of Pusan,  
 Pusan 608-737, Korea

To study the immune responses of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, fish were injected intraperitoneally with several types of *Edwardsiella tarda* antigen, i. e., FKC (formalin killed cells), HKC (heat killed cells) or LPS (lipopolysaccharide), and the changes of immunocytes numbers, phagocytosis and agglutination titre in the peripheral blood of the fish were investigated.

The number of lymphocytes in the peripheral blood of eels were decreased until 6 hours after injection, and then were turned to normal levels after 24 hours of injection. However, the level were slightly increased and were remained after 24 hours.

The number of neutrophils of FKC, HKC or LPS injected fish were the highest at 12 hours after injection and were decreased slowly after that.

Three weeks after the injections, the agglutination of antibody titre of all immunized groups were reached at 128 and were remained this level thereafter. However 6 weeks after the injections, that in HKC injected fish were dropped the level up to 4.

Fish were injected with LPS and the blood from the fish were bled after 12 hours. Then the blood were incubated with *E. tarda*. Six hours after incubation, the phagocytic index was reached the highest level, 28.3. One week after the LPS injection, the blood were again bled and incubated with *E. tarda*. The phagocytic index at this time was 3.9. The phagocytic indexes of the fish injected with FKC and HKC, treated as same LPS injected fish as above, were 18.8 and 10.7, respectively. The phagocytic index of the control fish was 1.2.

The antibacterial activities of normal antiserum against *E. tarda* were shown for both FKC and LPS injected fish, but not for HKC injected fish. The RPS (relative percentage of survival) of HKC, FKC

and LPS injected fish in the challenge test were 10%, 20% and 30%, respectively. These results suggest that the effect of protection of the eel which were injected with antigen were varied with the method of preparation of the antigen.