한국어병학회지 제 18 권 제 3 호 (2005)
J. Fish Pathol., 18(3) : 215 ~ 225 (2005)

Edwardsiella tarda extracellular products (ECPs)의 인위 투여에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 생체 반응

이덕찬† · 김이청 · 김진우 · 박수일*
국립수산과학원 병리연구팀, *부경대학교 수산생명의학과

Effect of extracellular products (ECPs) of *Edwardsiella tarda* on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Deok-Chan Lee†, Yi-Cheong Kim, Jin-Woo Kim and Soo-Il Park*
Pathology Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

The effect of extracellular products (ECPs) prepared from highly virulent *Edwardsiella tarda* PoKF-000623 on the physiological and the immunological function in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* was evaluated. The virulence of ECPs on the fish, 5.6 g of average body weight was detected 0.714 ㎍ g fish^{-1} as 96 h-LD$_{50}$ by intraperitonial injection. After intramuscularly injected with 0, 4 and 40 ㎍ ECPs fish^{-1} to fish average sized 59.1 g of body weight, the fish were measured the glucose and total protein concentration in sera, and immune activity of kidney macrophage. The fish injected with 40 ㎍ protein fish^{-1} showed a significant increase in the glucose and total protein concentration in sera. But, the fish were changed in cellular immune response as lowed chemiluminescence response and bactericidal activity of head kidney macrophage. These results were suggested that ECPs of *E. tarda* could be effect on the physiological and the immunological factors, especially in the function of kidney macrophage concerning to edwardsiellosis infection.

Key words: *Edwardsiella tarda*, Extracellular products, ECPs, *Paralichthys olivaceus*, Glucose, Total protein, Chemiluminescence response, Bactericidal activity

감염성 병원체의 발병 기구를 밝히는 것은 어의학적으로 매우 중요한 일이다. 우리나라에서 넙치 양식에 있어서 큰 피해를 입히고 있는 어류 병원체 중의 하나인 *Edwardsiella tarda*의 발병 기구에 대해서는 분명하지 않은 점이 많다. 그 중에서도 이 병원균이 생성하는 toxins에 대한 연구 보고는 토끼에 대한 dermatotoxin (Ullah and Arai, 1983a, b)과 hemolysin (Kusuda and Kitadai, 1993; Watson and White, 1979) 등에 대한 것이 단편적으로 알려져 있을 뿐이다. 정제된 *E. tarda* ECPs는 토끼에 dermatotoxin으로 작용하며, 이 성분은 80℃이상, acid 및 alkaline에서 불활화가 된다 (Ullah and Arai, 1983a). 그리고 *E. tarda*의 ECPs에는 hemolysin (Watson and White, 1979; Janda and Abbot, 1993; Hirono *et al*., 1998)과 약 37 kDa의 물질이 독성과 관련이 있는 것으로 보고되었으며 (Suprapto *et al*., 1996), 이 물질이 gycolytic pathway에 관계하는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)로 추정하는 정도 (Kawai *et al*., 2004)에 불과하다.

†Corresponding Author : Deok Chan Lee, Tel : 051-720-2487, Fax : 051-720-2498, E-mail : chanii-lee@hanmail.net

본 연구에서는 *E. tarda*가 생성하는 ECPs를 넙치에 투여하였을 때 넙치가 반응하는 다양한 생체지표들과 면역계의 동태를 조사하여 *E. tarda*의 감염에서 ECPs의 역할과 영향을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

시험어

시험에 사용한 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 제주도의 양식장에서 구입하여 수온 약 18℃에서 일주일 이상 순치하였다. *E. tarda* 균주가 생성하는 ECPs의 독성 시험을 위한 넙치 (평균 체중: 5.6±1.4 g)는 50 ℓ plastic tank에 각각 8마리씩 5개의 시험구에 수용하였으며, ECPs에 대한 생체 반응을 시험하기 위하여 사용된 넙치 (평균 체중: 59.1±3.1 g)는 3개의 200 ℓ fiberglass tank에 25마리씩 수용하여 실험하였다.

균주 및 배양 조건

시험 균주인 *E. tarda* (strain #PoKF-000623)는 2000년 6월에 경북 포항 소재 넙치 양식장의 자연 감염 개체로부터 분리하여 부경대학교 어병예방학실험실에서 -70℃에 보관하였던 것이다. Tryptic soy agar (TSA, Difco; 최종 염분 농도 1.5%)에 배양한 후 순수 배양 상태, 생화학적 성상 및 혈청학적 성상을 재확인하였으며, 넙치에 어체 통과 과정을 2회 실시한 후 실험에 사용하였다. 예비 시험에서 이 균주의 96 hr-LD_{50}이 $10^{2.50}$ cfu $fish^{-1}$로 매우 강한 독성을 가진 균주임을 확인하였다.

ECPs의 분리 및 정제

시험균의 ECPs 추출은 Austin *et al*. (1998)의 cellophane overlay 방법을 사용하였다. 멸균 (121℃, 15 lb, 15 min)된 cellophane membrane을 TSA 평판배지 위에 깔고, Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)에 24시간 동안 전배양된 세균 배양액 200 ㎕를 멸균된 유리삼각봉으로 도말하였다. 도말한 TSA 배지를 27℃에서 48시간 배양한 후 cellophane overlay를 새로운 petridish에 옮기고 평판배지 1장 당 0.1M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2) 1 ㎖로 세척하여 세균 부유액으로 모았다. 이를 12,000×g (4℃)에서 15분간 원심분리한 후, 상징액은 0.45 및 0.2 ㎛ pore size의 syringe filter (Corning Inc., Germany)에 차례로 여과하였다. 준비된 ECPs의 단백질 농도는 bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co., USA)을 standard로 하여 Bradford 법 (1976)으로 측정하고, -20℃에서 보관하면서 필요에 따라 해동하여 사용하였다.

ECPs virulence assay

넙치에 대한 정제 *E. tarda* ECPs의 독성은 Amaro *et al*. (1992)의 방법으로 확인하였다. 단백질 농도는 BSA를 표준으로 하여 0, 0.4, 4, 40 및 400 ㎍ $㎖^{-1}$인 crude ECPs solution을 제조하였다. 각 농도로 준비된 ECPs solution을 평균 체중이 5.6 g인 각 시험구별 8마리의 시험어에 100 ㎕ $fish^{-1}$를 근육 주사하여 최종 주사 농도가 0, 0.00714, 0.0714, 0.714 및 7.14 ㎍ g $fish^{-1}$가 되게 하였고, 주사 후 14일간 폐사를 관찰하였다. 폐사한 어류는 아가미와 표피에서의 기생충 검사와 간, 비장 및 신장으로부터 세균 배양 검사를 통하여 폐사에 따른 원인을 확인하였다.

ECPs가 넙치의 혈액 성상에 미치는 영향

넙치의 *E. tarda* ECP에 의한 영향을 조사하기 위하여 ECPs 투여 후 경과 시간에 따른 혈액 성상을 조사하였다. 즉, ECPs의 농도는 BSA (Sigma Chemical Co., USA)를 standard로 하여 400 ㎍ $㎖^{-1}$인 crude ECPs를 희석하여 넙치의 복강에 100 ㎕ $fish^{-1}$로 주사하고 0, 1, 3, 5 및 7일째에 아미노안식향산 에틸 50 ppm으로 마취시킨 후 넙치의 미부 정맥으로부터 채혈하여 각종 factors의 측정에 사용하였다.

1) Hematocrit 치

넙치의 hematocrit value는 Wedemeyer and Nelson (1975)의 방법에 따랐다. 미부 정맥으로부터 채혈하여 hematocrit 치 측정용 유리 tube에 혈액을 삼투시키고 12,000×g에서 5분간 원심 분리하였다. hematocrit value는 전체 혈액량에 대한 적혈구의 %로 환산하였다.

2) 혈청 내 성분의 변화

① 혈청의 분리와 보존

실험에 사용한 혈청은 각 농도별 ECPs를 주사한 넙치 4마리로부터 얻었다. 아미노안식향산 에틸 50 ppm으로 마취시킨 후 미부 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취 후 혈액은 1시간 동안 실온에서 방치하고, 4℃에서 2시간 동안 혈병을 수축시킨 후 10,000×g에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 이렇게 분리된 혈청은 -70℃에 보관하며 필요에 따라 해동하여 실험에 사용하였다.

② 혈청 내 성분 조사

혈청 내 glucose 농도, AST (aspatate aminotransferase, GOT)와 ALT (alanine aminotransferase, GPT) 농도 및 total protein 농도의 변화를 조사하였다. 혈청 중 glucose 량은 효소법을, ALT와 AST는 Reitman-Frankel 법을, 그리고 total protein은 Biuret 법으로 혈액성분 검사용 kit (아산제약)을 사용하여 측정하였다.

ECPs가 넙치의 면역반응에 미치는 영향

1) Lysozyme activity

혈청의 lysozyme activity 측정은 Lange *et al*. (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 넙치 혈청 100 ㎕를 phosphate buffer solution (PBS, pH 6.2)를 이용하여 96 well plate (flat form)에서 2-fold로 8회 단계 희석하였다. 여기에 PBS (pH 6.2)로 희석한 0.4 ㎎ ㎖$^{-1}$ *Micrococcus lysodeikticus* 균액 100 ㎕를 각 well에 첨가하고, 22℃에서 배양한 후 0, 15, 30 및 60분에 흡광도 590 nm에서 측정하였다. 양성 대조구로는 hen egg lysozyme (Sigma Chemical Co., USA)을, 음성 대조구로는 PBS를 사용하였으며, 라이소자임 활성의 1unit는 흡광도 0.001/min을 감소시키는 시료의 양으로 환산하였다.

2) 혈청의 세균 살해능 측정

혈청 내 보체에 의한 세균 살해능의 조사는 유 등 (1992)의 방법에 따라 실험하였다. 각 시료로부터 분리한 신선 혈청은 혈청 분리 후 6시간 이내에 분석하였으며, 불활성화 혈청은 Sakai (1981)의 방법에 따라 45℃에서 30분간 가온 처리하여 4℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 각 혈청의 희석은 GVB^{2+} (Gelatin veronal buffer: VB 200 ㎖, 0.03M $CaCl_2$-$2H_2O$ 5 ㎖, $MgCl_2$-$6H_2O$ 5 ㎖, 2% gelatin 50 ㎖, DW 740 ㎖, pH 7.4)를 사용하였다. 모든 시료는 GVB^{2+}로 5배 희석한 후 8×10^6 cfu ㎖$^{-1}$로 조정된 *E. tarda* PoKF-000623와 동량 혼합하여 27℃에서 배양하며 0, 1, 3 및 6시간째에 Miles and Misra (1938)의 방법에 의하여 세균 집락수를 계수하였다.

3) Chemiluminescence (CL) assay

식세포의 CL assay는 Secombes *et al*. (1990)의 방법에 따라 시행하였다.

① Kidney phagocyte의 준비

넙치의 전신을 적출하여 phenol red-free Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 10 units ㎖$^{-1}$ heparin, 100 ㎍ ㎖$^{-1}$ penicillin/100 units ㎖$^{-1}$ streptomycin 첨가)이 첨가된 소형 petridish 내에서 nylon mash로 마쇄하여 현탁액으로 제조하였다. 이 현탁액을 27-49.5% percoll gradient (Sigma Chemical Co., USA)를 이용하여 원심 분리 (500×g, 30min, 4℃)하여 중앙부의 세포층을 분리하였다. 분리한 세포는 phenol red-free HBSS로 3회 세척 (500×g, 5min, 4℃)하고 trypan blue exclusion method (Hudson and Hay, 1989)를 이용하여 1.5×10^6 cells ㎖$^{-1}$의 농도로 조정하여 실험에 사용하였다 (생존율≥95%).

② Opsonised zymosan

Zymosan 0.02 g을 측정하여 넙치의 신선 혈청 1 ㎖와 20℃에서 25분간 배양하였다. 이것을 2,000×g로 5분간 원심분리하여 혈청을 제거한 후 HBSS를 첨가하여 희석액을 만들었다. 이 희석액을 다시 원심 분리하여 상층을 제거하고, HBSS 용액을 첨가하여 총량을 10 ㎖로 하여 얼음 안에 보관하면서 실험에 사용하였다.

③ Chemiluminescence assay

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione)은 10 ㎎ $㎖^{-1}$ stock solution으로 제작하여 aluminum foil로 wrapping하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였으며, working solution은 0.1 ㎎ $㎖^{-1}$의 농도로 사용하였다. white-adapted 96-well plate (Packard)에 well 당 1.0×10^5 cell suspension 100 ㎕, luminol 20 ㎕, opsonised zymosan 80 ㎕를 첨가하고 0.5 초의 노출 시간으로 LuminoCounter (Packard)를 이용하여 CL response를 측정하였다.

4) 식세포의 bactericidal activity

식세포의 식작용에 의한 세균 살해능의 조사는 Secombes *et al*. (1990)의 방법에 따라 시행하였다. 신장 식세포의 분리와 macrophage monolayer의 준비는 위의 CL activity 측정에서와 동일한 방법으로 하였다. *E. tarda* 균주를 TSB에 배양하여 1×10^8 bacteria $㎖^{-1}$가 되도록 준비하고, TSB 배지를 이용하여 96-well plate에서 10-fold로 희석하여 준비하였다. 이것을 다른 96-well plate에 준비된 macrophage monolayer의 각 well에 20 ㎕ 씩 3반복으로 첨가하여 가볍게 흔든 후 150×g에서 5분간 원심 분리하여 세균을 식세포에 부착시켰다. 이 well plate는 18℃에서 2시간 동안 배양하고 각 well 내의 상징액을 제거한 후 0.2% Tween 20 (Sigma Chemical Co.) 50㎕를 첨가하여 macrophage를 파괴하였다. 여기에 TSB 100 ㎕를 첨가하여 18℃에서 16 시간 동안 배양하고 MTT solution (5㎎ $㎖^{-1}$ distilled water) 10 ㎕를 첨가하여 15분간 진탕 배양한 후 LuminoCounter (Packard)로 흡광도 600 nm에서 측정하였다 .

Statistical analysis

각 실험 결과는 Student's *t*-test로 분석하였으며, $P<0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

ECP virulence assay

넙치에 대한 *E. tarda* ECPs의 독성을 확인한 결과는 Table 1에 나타내었다. 고농도 (40 ㎍ $fish^{-1}$) 시험구에서는 주사 3일째에 폐사가 발생하기 시

Table 1. Virulence assay of *Edwardsiella tarda* ECPs to the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Injection conc. (㎍ $fish^{-1}$)	No. of tested fish	Mortality (No. of dead fish)														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
Physical Saline	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

The average weight of tested fish was 5.6 g.

작하여 1주일 만에 시험어 전 개체가 폐사하였다. 4 ㎍ fish^{-1} 시험구에서는 주사 1주일 째에 폐사가 시작되어 13일째까지 폐사가 지속되었으며, 0.4 ㎍ fish^{-1} 에서는 13일째에 1 마리가 폐사하였다. 그리고 0.04 ㎍ fish^{-1} 주사구 및 대조구에서는 폐사가 발생하지 않았다.

Hematocrit 치의 측정

E. tarda ECPs의 투여 시험어에 대한 hematocrit 치 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 4 ㎍ fish^{-1} 의 농도로 주사한 시험구에서의 hematocrit 치는 대조구와 유사한 값을 나타내었으나 40 ㎍ fish^{-1} 의 농도로 주사한 시험구는 주사 후부터 시험 기간 동안 감소하는 상태가 지속되었다.

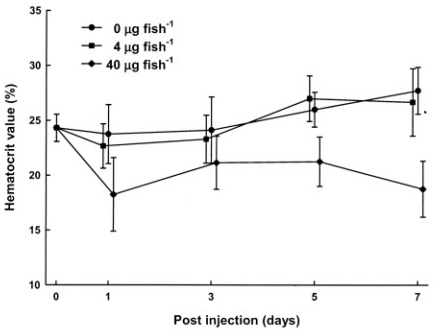

Fig. 1. Hematocrit value of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitonially with different concentrations of *Edwardsiella tarda* extracellular products.

혈청 내 성분의 검사

1) Glucose 농도의 측정

넙치에 *E. tarda* ECPs를 투여한 후 혈중 glucose 량을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Glucose 농도는 대조구 및 저농도 (4 ㎍ fish^{-1}) 시험구에서는 1주일간 glucose 농도의 변화가 거의 나타나지 않았으나 고농도 (40 ㎍ fish^{-1}) 시험구에서 3일째부터 급격히 증가하여 7일째까지 유의적으로 높은 상태가 유지되었다 (P<0.05).

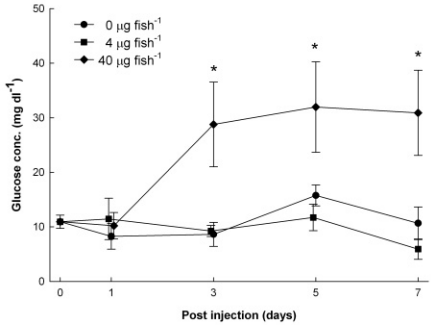

Fig. 2. Glucose concentration of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* serum injected intraperitonially with different concentrations of *Edwardsiella tarda* extracellular products. The asterisks are significantly different from the control.

2) Total protein 농도의 측정

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후 혈청 내 total protein 량을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. ECPs를 주사하였을 때 주사 5일째에 4 및 40 ㎍ fish^{-1}의 농도로 주사한 시험구에서의 total protein 농도가 같은 시기의 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며 (P<0.05), 40 ㎍ fish^{-1} 시험구에서는 시험 기간 동안 지속적으로 높게 나타났으며 1주일째에도 대조구에 대하여 유의성을 나타내었다 (P<0.05).

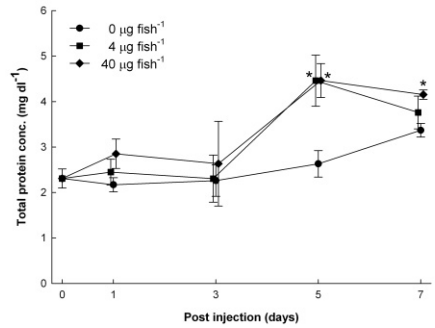

Fig. 3. Total protein concentration of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* serum injected intraperitonially with different concentrations of *Edwardsiella tarda* extracellular products. The asterisks are significantly different from the control.

3) AST와 ALT의 측정

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 주사한 후 혈청 내 AST와 ALT를 조사한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 모든 시험구에서 실험 기간 동안 유의적 변화는 관찰되지 않았다 (P<0.05).

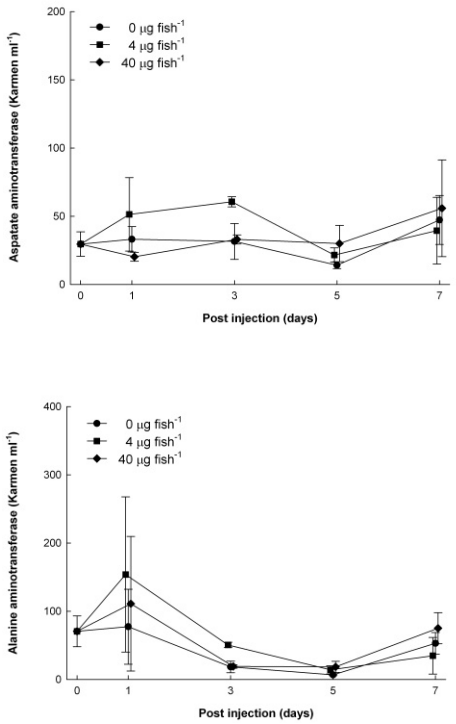

Fig. 4. Aspatate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) value of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* serum injected intraperitonially with different concentrations of *Edwardsiella tarda* extracellular products.

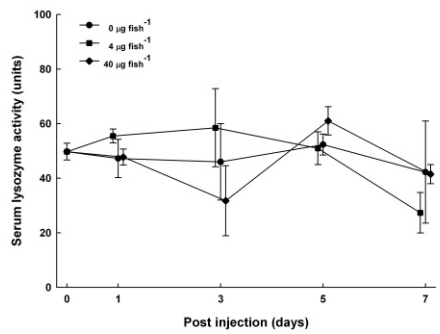

Fig. 5. Lysozyme activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* serum injected intraperitonially with different concentrations of *Edwardsiella tarda* extracellular products.

ECPs 투여에 따른 면역 반응의 변화

1) Serum lysozyme activity

E. tarda ECPs를 주사한 넙치의 혈청 내 lysozyme activity를 조사한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 모든 시험구에서 실험 기간 동안 대조구에 비하여 lysozyme 활성의 유의적 차이를 나타나지 않았다.

2) 넙치 혈청의 bactericidal activity

E. tarda ECPs를 주사한 넙치 혈청의 bactericidal activity를 조사한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 고농도 및 저농도로 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 불활화한 혈청에 대해서는 유의적인 차이를 나타내었으나 ($p<0.05$), 대조구 넙치의 신선 혈청에 대해서는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

3) CL activity

E. tarda ECPs를 주사한 넙치의 CL activity는 Fig. 7에 나타내었다. ECPs가 고농도 (40 μg fish^{-1})로 주사된 시험구에서는 주사 후 1, 3 및 7일째에 대조구에 비하여 CL response가 낮게 나타났으며 시간이 경과함에 따라 대조구와 유사한 형태의 반응성을 나타내었다. 또한 저농도로 주사된 시험구에서는 주사 3일 후 대조구에 비하여 낮게 나타났으나 7일째에는 대조구와 유사한 수준으로 회복되었다.

4) 식세포의 bactericidal activity

E. tarda ECPs를 다양한 농도로 주사한 넙치로부터 1, 3 및 7일째에 신장 macrophage를 분리하여 세균 살해능을 알아본 결과는 Fig. 8에 나타내었다. ECPs를 근육 주사한 후 3일째의 고농도 시험구에서, 그리고 주사 후 7일째의 고농도 및 저농도 시험구에서 대조구에 비하여 세균 살해능이 저하되는 것을 알 수 있다 ($p<0.05$).

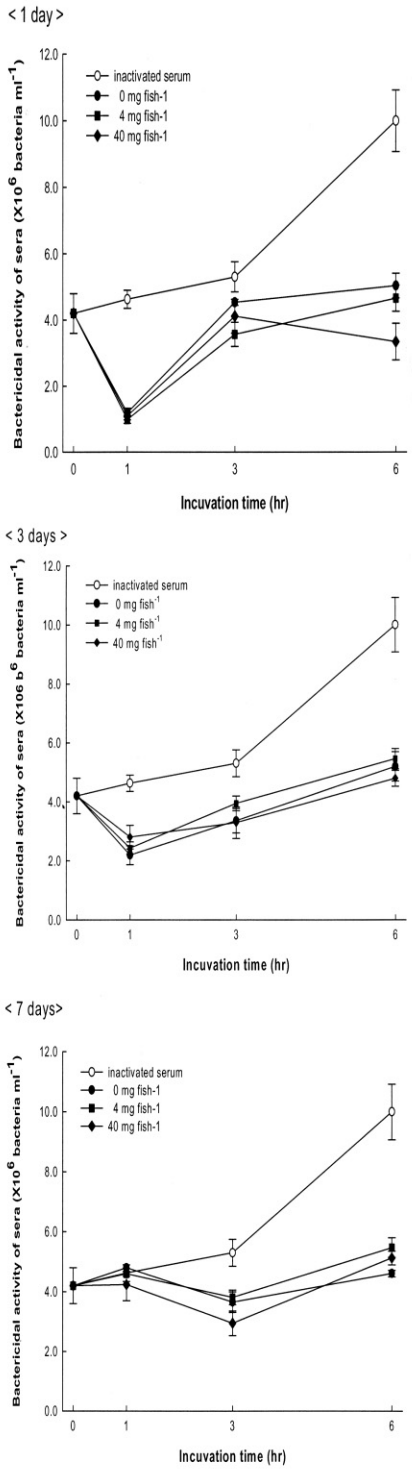

Fig. 6. Bactericidal activity of serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* with *Edwardsiella tarda* ECPs. The response assessed on the 1, 3 and 7days post-injection of ECPs.

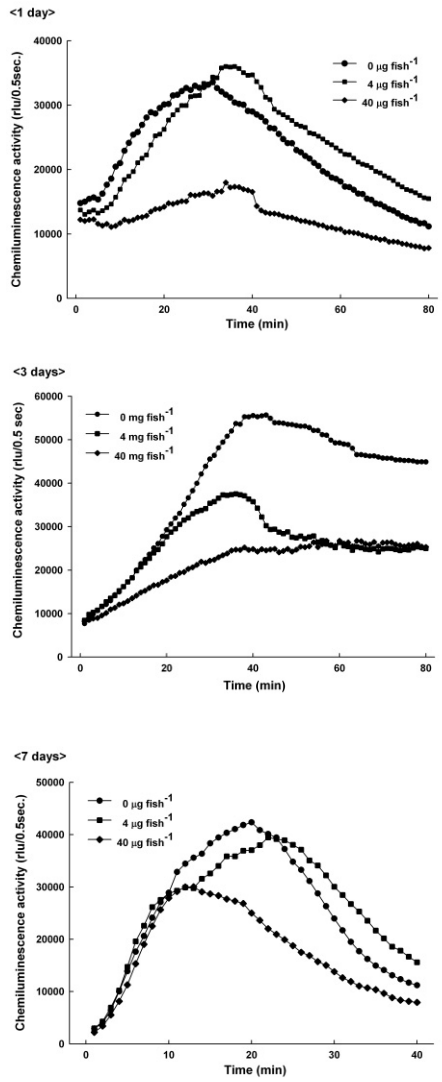

Fig. 7. Chemiluminescence response of head kidney macrophages from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitonially with different concentrations of *Edwardsiella tarda* ECPs. The response assessed on the 1, 3 and 7days after injection of ECPs.

고 찰

본 연구에서는 *E. tarda* 균이 생성하는 ECPs를 넙치에 인위적으로 투여하였을 때의 생리학적 그리고 면역학적 영향을 조사함으로써 ECPs가 이 균의 감염에 미치는 역할을 알고자 하였다.

E. tarda ECPs의 최종 주사 농도가 0, 0.00714,

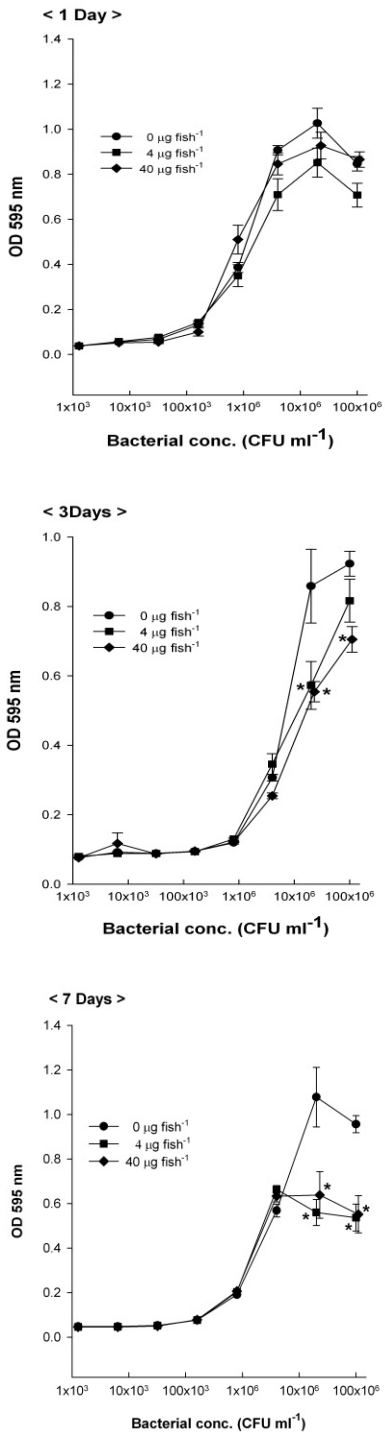

Fig. 8. Bactericidal activity of head kidney macrophages from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* i.m injected intraperitonially with different concentration of *Edwardsiella tarda* ECPs. The response assessed on the 1, 3 and 7days after injection of ECPs.

0.0714, 0.714 및 7.14 μg g fish^{-1} 가 되게 평균 체중 5.6 g 인 넙치에 근육 주사하여 14일간 폐사를 관찰한 결과 시험어에 대한 ECPs의 96 hr-LD_{50} 이 약 0.714 μg g fish^{-1}가 되는 것으로 확인되었다. 또한 ECPs의 주사에 의한 폐사의 형태가 고농도뿐만 아니라 저농도에서도 지속적으로 나타나 실험 14일째까지 폐사가 발생하였다. 이러한 결과는 *E. tarda* ECPs 성분이 넙치에 대하여 급성적 독성 작용을 하는 것 보다는 장기적으로 생체 내의 세포나 조직 또는 기관에 영향을 미치며, 이로 인한 만성적 독성 작용에 의하여 폐사가 나타나는 것으로 사료된다.

평균 체중 59.1 g 크기의 넙치에 0, 4 및 40 μg fish^{-1} 농도가 되도록 넙치의 복강에 ECPs를 주사하였을 때 나타나는 혈액 내 성분과 면역학적 반응을 조사하였다. 이러한 농도의 설정은 ECPs 투여 후 농도에 따른 폐사량을 측정한 결과 약 4 μg fish^{-1} 농도로 넙치의 근육에 주사하였을 때 1주일 후부터 폐사가 시작하였으므로 폐사 전 1주일 동안 *E. tarda* ECPs 투여에 의한 생리학적 또는 면역학적 반응이 나타날 것으로 예상하였기 때문이다.

4 μg fish^{-1}의 농도로 주사한 시험구에서의 hematocrit 치는 대조구와 차이가 없었으나 40 μg fish^{-1} 의 농도로 주사한 시험구는 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서, ECPs가 넙치의 적혈구에 대해서는 그다지 강한 용혈능을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

넙치에 *E. tarda* ECPs를 투여한 후 혈중 glucose 량을 측정하였을 때, glucose 농도는 대조구 및 저농도 주사 시험구에서는 glucose 농도의 변화가 거의 나타나지 않았으나 고농도로 주사한 시험구에서는 3일째부터 급격히 증가하여 7일째까지 유의적으로 높은 상태로 유지되었다 ($P<0.05$). *E. tarda* FKC와 LPS를 red sea bream에 투여하였을 때 total protein 농도와 glucose 농도가 대조구와 차이가 나지 않은 현상 (Salati *et al*., 1987)과 비교하면, ECPs의 기능이 FKC와 LPS와는 다른 것으로 사료된다.

혈청 내 total protein 농도를 조사한 결과, 주사 5일째에 4 및 40 ㎍ fish^{-1} 의 농도로 주사한 시험구에서 유의적으로 높게 나타났으며 ($P<0.05$), 40 ㎍ fish^{-1} 의 농도로 주사한 시험구에서는 1 주일째에도 대조구에 대하여 유의성을 나타내어 total protein 농도의 변화에 *E. tarda* ECPs가 관여하는 것으로 판단된다. 또한, ALT와 AST는 혈액 중에 유출되는 대표적인 효소로 세포 손상과 관련이 있는데 (Molamder *et al*., 1955; Asada, 1958; 이와 김, 1988), 본 연구에서의 ALT 및 AST의 변화를 조사하였을 때, 실험 기간 동안 유의적 변화는 관찰되지 않았으므로 넙치의 간 손상에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 따라서 혈청 내의 total protein 농도의 증가는 간 손상 이외의 요인과 관계가 있을 것으로 생각되며, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

넙치에 *E. tarda* ECPs를 다양한 농도로 투여한 후 혈청 내 lysozyme activity와 혈청의 세균 살해능을 조사한 결과, 실험 기간 동안 대조구에 대하여 유의적 차이를 나타내지 않았다. 그리고 어류의 혈청 내 보체가 병원체에 대한 어류의 생체 방어에서 중요한 역할을 하지만 (Iida and Wakabayashi, 1983; Nakai, 1985; Kanemori *et al*., 1987), 본 연구의 결과 *E. tarda* ECPs의 투여는 넙치 혈청 내의 보체 성분 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

신장 macrophage를 분리하여 활성산소 생성 능력 (CL activity)과 세균 살해능을 조사한 결과, *E. tarda* ECPs의 투여가 넙치 식세포의 반응에 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 즉 고농도로 주사된 시험구에서는 주사 후 3일 및 7일째에 신장 식세포의 세균 살해능이 감소하며 저농도 주사 시험구에서도 주사 7일째에 세균 살해능이 감소하였다. 또한 *E. tarda* ECPs를 고농도로 주사 후 1일 및 3일째에 CL response가 낮게 나타났으며, 저농도로 주사된 시험구에서는 주사 3일 후 대조구에 비하여 낮게 나타났으나 7일째에는 대조구와 유사한 수준으로 회복되었다. 이러한 현상은 *Renibacterium salmoninarum* (Densemore *et al*., 1998), *Aeromonas hydrophilla* (Kanai and Takagi, 1986) 및 *Vibrio pelagius* (Villamil *et al*., 2003) 등이 생성하는 ECPs에 의하여 나타나는 반응과 유사한데, *E. tarda* ECPs도 넙치 macrophage의 식작용과 이물질 제거 능력을 약화시키는데 관여하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 강독성 균주인 *E. tarda* PoKF-000623가 생산하는 세포외생성물 (ECPs)을 넙치에 투여되었을 때 나타나는 생리학적 및 면역학적 영향을 조사하고자 하였다.

E. tarda PoKF-000623 균주가 생성하는 ECPs의 넙치 (평균체중: 5.6 g)에 대한 96 hr-LD_{50} 은 약 0.714 ㎍ g fish^{-1} 이었으며, ECPs의 주사에 의한 폐사는 고농도 (40 ㎍ fish^{-1}) 뿐만 아니라 저농도 (4 ㎍ fish^{-1})에서도 지속적으로 발생하였다.

평균 체중 59.1 g 크기의 넙치에 각각 0, 4 and 40 ㎍ ECPs fish^{-1} 의 농도로 근육 주사한 후, 혈청 중 glucose 농도와 total protein 농도 및 신장 식세포의 활성을 조사하였다. 그 결과 고농도의 ECPs 주사 시험구의 넙치에서 혈중 glucose 농도와 total protein 농도가 대조구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. 그러나 세포성 면역 기구인 신장 식세포의 CL 반응과 세균 살해능은 대조구에 비하여 유의적으로 저하되었다.

따라서 넙치에 고농도의 *E. tarda* ECPs를 투여하면 생체 지표의 일부에 영향을 미치는 것으로 확인되었고 면역 활성, 특히 신장 식세포 활성의 억제가 edwardsielosis의 발병에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 국립수산과학원의 연구지원사업에 의해 수행되었음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

Amaro, C., Biosca, E. G., Esteve, C., Fouz, B. and Toranzo, A. E.: 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, 1992.

Asada, M.: Transaminase activity in liver damage. 1. Study on experimental liver damage. Med. J. Osaka Univ., 9: 45-55, 1958.

Austin, B., Austin, D. A., Dalsgaar, I., Gudmundsdottir, B. K., Thornton, S. H., Larsen, J. L., O'Hici, B. and Powell, R.: Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Sys. Appl. Microbiol., 21: 50-64, 1998.

Bradford, M. M.: 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, 1976.

Densmore, C. L., Smith, S. A. and Holladay, S. D.: *In vitro*effects of the extracellular protein of *Renibacterium salmoninarum* on phagocyte function in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Vet. Immunol. Immunopathol., 62: 349-357, 1998.

Hirono, I., Lee, S. J. and Aoki, T.: An accessory protein of the iron-regulated hemolysin of *Edwardsiella tarda* is necessary for hemolytic activity. Fish. Sci., 64: 924-928, 1998.

Iida, T. and Wakabayashi, H.: Bactericidal reaction by the alternative pathway of fish complement. Fish Pathol., 18: 77-83, 1983.

Janda, J. M. and Abbott, S. L.: Expression of iron-regulated hemolysin by *Edwardsiella tarda*. FEMS Microbiol. Lett., 111: 275-280, 1993.

Kanai, K. and Takagi, Y.: Alpha-hemolytic toxin of *Aeromonas hydrophilla* produced *in vivo*. Fish Pathol., 21: 245-250, 1986.

Kanemori, Y., Nakai, N. and Muroga, K.: The role of extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. Fish Pathol., 22: 153-158, 1987.

Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K. and Oshima, S.: A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. Vaccine, 22: 3411-3418, 2004.

Kusuda, R. and Kitadai, N.: Hemolysin production by *Edwardsiella tarda* isolated from eel, *Anguilla japonica*. Suisanzoshoku, 41: 251-255, 1993.

Lange, S., Gudmundsdottir, B. K. and Magnadottir, B.: Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish Shellfish Immunol., 11: 523-535, 2001.

Molamder, D. W., Wroblewski, F. and Ladue, J. S.: Serum glutamic oxaloacetic transaminase as an index of hepatocellular integrity. J. Lab. Clin. Med., 46: 831-839, 1955.

Nakai, T.: Resistance of *Pseudomonas anguilliceptica* to bactericidal action of fish serum. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51: 1431-1436, 1985.

Salati, F., Hamaguchi, M. and Kusuda, R.: Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigen. Fish Pathol., 22: 93-98, 1987.

Sakai, D. K.: Spontaneous and antibody-dependent hemolysis activities of fish sera and inapplicability of mammalian complements to the immune hemolysis reaction of fishes. Nippon Suisan Gakkaishi, 47: 979-991, 1981.

Secombes, C. J.: Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *In* Techniques in Fish Immunology - Fish Immunology Technical Communications No. 1. SOS publications, pp. 137-154, 1990.

Suprapto, H., Hara, T., Nakai, T. and Muroga, K.: Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella*

tarda. Fiah Pathol., 31: 203-207, 1996.

Ullah, M. A. and Arai, T.: Pathological activities of the naturally occurring strains of *Edwardsiella tarda*. Fiah Pathol., 18: 65-70, 1983a.

Ullah, M. A. and Arai, T.: Exotoxic substances produced by *Edwardsiella tarda*. Fiah Pathol., 18: 71-75, 1983b.

Villamil, L., Figueras, A., Aranguren, R. and Novoa, B.: Non-specific immune response of turbot, *Scophtalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio pelagius*. J. Fish Dis., 26: 321-329, 2003.

Watson, J. J. and White, F. H.: Hemolysins of *Edwardsiella tarda*. Can. J. Comp. Med., 43: 78-83, 1979.

Wedemeyer, G. A. and Nelson, N. C.: 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, 1975.

유병화, 박수일, 전세규: 어류혈청의 보체에 의한 살균작용. 한국어병학회지, 5: 9-18, 1992.

이관녕, 김진규: 임상화학. 의학문화사, p. 812, 1988.

Manuscript Received : August 12, 2005
Revision Accepted : December 07, 2005
Responsible Editorial Member : Myung-Joo Oh (Yosu Univ.)