

어류혈청의 보체에 의한 살균작용

유병화, 박수일, 전세규

부산수산대학교 어병학과

어류의 방어기구를 밝히기 위하여, 잉어, 틸라피아 및 넙치의 혈청 중에 존재하는 보체의 살균작용에 대하여 실험하였다. 실험어의 모든 정상혈청으로 *E. coli*는 살균되었고 가열하여 보체를 불활성화시킨 혈청에서는 살균되지 않았다. zymosan으로 처리한 실험어의 정상혈청에서는 살균작용이 나타나지 않았으므로 정상혈청 중의 살균작용에도 보체의 대체경로가 중요한 것으로 생각되었다. EGTA로 처리한 틸라피아와 넙치의 정상혈청에서는 살균작용이 지속되고 있었으나, 잉어의 살균작용은 소실되는 점으로 봐서 잉어의 대체경로에는 Ca^{2+} 이 요구되는 것으로 나타났다. 실험어의 정상혈청이 병원성이 있는 *E. tarda*에 대해서는 살균작용을 나타내지 않았고 병원성이 없는 *E. coli*에 대해서는 살균작용을 나타냈다. *E. coli*와 *E. tarda*는 면역혈청 중에서 모두 살균되었고 그 살균속도는 정상혈청에 비하여 빠른 것으로 나타났다.

Key Words : Bacteriocidal activity, Complement, Bacteriostatic reaction, Defence mechanism

어류의 생체방어기구 중에는 포유류와 유사한 고전 경로와 대체경로를 갖춘 체계가 존재한다고 한다 (Day *et al.*, 1970 ; Ourth and Wilson, 1982a ; Ourth and Wilson, 1982b ; Sakai, 1983a). 일반적으로 보체계의 고전경로는 항원과 항체의 결합을 필요로 하며 활성화에는 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 이 요구된다(Sakai, 1981b ; Yano *et al.*, 1985)고 하며 대체경로는 항체의 관여없이 코브라독인자(Day *et al.*, 1970), Lipopolysaccharide(LPS) (Day *et al.*, 1970 ; Sakai, 1983a), zymosan(Sakai, 1983a), inulin(Giclas *et al.*, 1981) 등에 의해서 활성화되는 경로로서 Mg^{2+} 만을 필요로 한다고 하지만, 어류에 있어서는 Ni^{2+} 등 다른 이온의 존재하에서 활성화 되기도 한다 (Yano *et al.*, 1988). 이와같이 어류의 보체계가 포유류의 경우와는 다른 활성화과정을 거치는 등 생체 방어기능에 있어서 서로 차이가 있을 것으로 예상되지만 어류 보체의 성분별 특성과 역할에 대해서는 아직까지 명료하게 보고되어 있지 않다. 뿐만 아니라,

지금까지 실시된 어류 보체의 활성화에 관한 실험은 용혈보체가로서 측정되어진 것이 대부분이었고 세균에 대한 살균작용에 관해서는 Iida와 Wakabayashi (1983)의 대체경로에 따른 살균작용, Sakai(1983b)의 연어과 어류혈청의 용해와 살균특성 및 Munn등 (1982)의 병원성 *Aeromonas salmonicida*의 혈청저항능에 관한 것 등이 있을 뿐이다.

그리고 각 세균이나 어종별 보체의 살균작용의 차이에 대해서는 아직까지 명확하게 밝혀지지 않아서 어류의 비특이적인 방어메카니즘을 이해하기 곤란한 점이 있다.

본 실험은 어류에게 병원성을 나타내지 않는 *Escherichia coli*와 어병세균인 *Edwardsiella tarda*의 두 균주를 사용하여 어류의 정상혈청과 면역혈청 사이에 나타나는 살균작용에 대하여 조사하였으며 아울러 이 실험을 통하여 어류의 보체가 어종간에 또는 균종간에 따라 차이가 나는 지에 관해서도 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 잉어 *Cyprinus carpio* (120g)와 틸라피아 *Oreochromis niloticus* (80~120g)는 당년생으로서 국립부산수산대학교 양어장으로부터 분양받았고 넙치 *Paralichthys olivaceus* (80~100g)는 국립수산진흥원 어류종묘실로부터 당년생을 입수하였다.

각 실험어들은 외관상 질병의 증세가 나타나지 않은 건강한 개체들로서 어병학과의 어병예방학실험실에 설치된 반순환어과식 사육조에 5일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 사육수온은 잉어와 틸라피아가 27°C였고, 넙치는 20°C의 자연해수였다.

실험에 사용한 세균은 *Escherichia coli* ATCC25922와 *Edwardsiella tarda* T1123의 두 균주이며 yeast extract를 0.2% 첨가한 NA에서 27°C, 48시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 항원의 제작시에는 이 세균을 nutrient broth로 옮겨 27°C, 48시간 진탕배양한 균액에 포르마린을 최종농도가 0.4% 되도록 첨가하고 실온에서 24시간 사균처리 하였다. 이 포르마린 사균을 4°C에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리하여 채균하고 PBS(NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.2g, D. W. 1,000 ml, pH 7.4)로 3회 세척한 다음 10mg/ml 농도가 되도록 PBS에 현탁시켰다. 이것을 실험백신으로 사용하고 남은 백신은 NaN₃를 0.1% 첨가하여 4°C에 보존하면서 사용하였다.

실험어로부터의 채혈은 실험어를 50ppm의 Benzocaine으로 10분간 마취시킨 후 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 2시간 정도 실온에 놓아두고 4°C에서 2시간에 걸쳐 혈병을 수축시킨 다음 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 정상혈청은 혈청을 분리 직후 실험에 바로 사용하거나 4°C에 보관하여 6시간 이내에 사용하였으며 실험항원에 대해 슬라이드응집반응을 실시하여 응집형성여부를 조사한 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 혈청은 정상혈청 이외에 목적에 따라서 물리·화학적으로 처리하여 사용하였다.

Zymosan처리 시에는 zymosan 25mg을 2시간 동안 100°C에서 끓인 다음 2,500rpm, 10분간 원심분리 후 PBS로 3회 세척하고 원심분리하여 얻어진 상등액을 정상혈청 1 ml와 혼합시켜 27°C에서 60분간 진탕배양하였다. 반응종료후 2,500rpm, 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 취해 실험에 사용하였다.

EGTA처리 시에는 생리식염수(PS)에 EGTA를 넣고 60°C에서 5N NaOH를 한방울씩 떨어뜨려 EGTA를 녹인 후 1N HCl로 pH를 7.4로 맞추고 100mM EGTA를 만들기 위해 나머지 양을 PS로 조절하였다. 이렇게 만들어진 100mM EGTA를 혈청중에 최종농도가 10mM/ml가 되도록 첨가하였다.

실험어의 면역은 잉어와 넙치에게 10mg/ml로 조절된 백신을 0.1 ml씩 7일간격으로 2회 복강내 주사하는 방법을 사용하였다. 그리고 마지막 주사후 2주일째 꼬리정맥으로부터 채혈하여 원심분리에 의해 혈청을 얻었으며 항혈청의 항체가는 마이크로타이터법으로 조사하였다.

실험혈청의 불활성화는 Sakai(1981)에 따라 48°C, 30분간 가온처리 하였으며 불활성화된 혈청은 4°C 냉장고에 넣어두고 실험에 사용하였다.

각 실험혈청의 희석에는 Mg²⁺와 Ca²⁺가 포함된 GVB(gelatin veronal buffer : VB 200 ml, 0.03 M CaCl₂ · 2H₂O 5 ml, MgCl₂ · 6H₂O 5 ml, 2% gelatin 50 ml, D. W. 740 ml, pH 7.4)를 사용하였고 항원과 반응시키기 전에 모든 혈청을 4:1로 희석하였다.

혈청의 살균작용은 상기한 바와 같이 물리·화학적으로 처리한 여러 가지 혈청에 실험균을 반응시켜 시간별로 나타나는 생존수를 지표로 하였으며 실험시에는 10⁷ mg/ml의 세균부유액을 1:1로 혼합해서 반응시켰다. 생존수는 세균과 혈청의 혼합액을 27°C의 진탕배양기로 반응시키면서 일정 시간별로 단계희석하여 Miles와 Misra(1938)에 따라 집락수로서 계수하였다.

그리고 실험균의 병원성실험을 위해서 *E. coli*와 *E. tarda*를 4°C에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리하

여 채균한 다음 PBS로 3회 세척하고 10mg/ml 농도가 되도록 PBS에 현탁시켜 잉어, 틸라피아 그리고 넙치에게 각각 0.1 ml씩 복강주사 하였다. 10일만에 걸쳐 폐사어를 관찰했고 죽은 어류들은 곧 세균분리하여 원인균을 확인하였다.

결 과

잉어 정상혈청의 살균작용

잉어 정상혈청의 살균작용에 대한 실험결과는 Fig. 1과 같다. *E. coli*는 잉어의 정상혈청에서 초기의 세균수가 5.6×10^5 CFU/ml였으나 12시간이 경과후 4.4×10^5 CFU/ml로 감소되어 살균작용이 확인되었다.

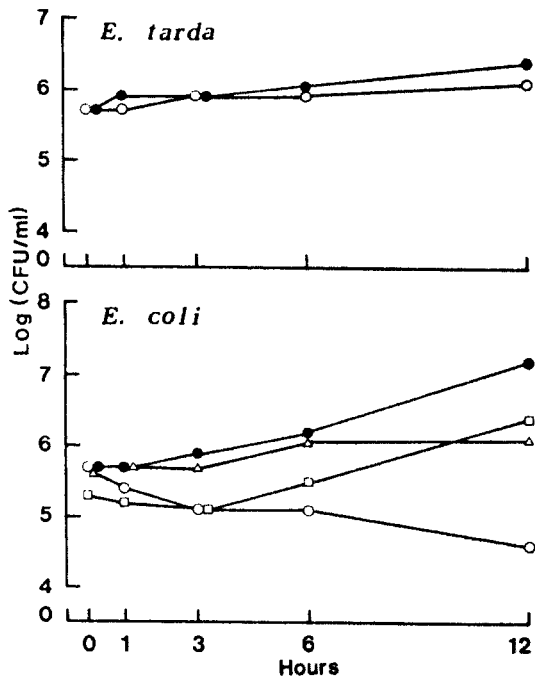


Fig. 1. Bactericidal activity against *E. coli* and *E. tarda* in the normal serum and each treated serum of carp

- : Normal serum,
- : EGTA treated serum,
- : Heat inactivated serum,
- △- : Zymosan treated serum.

그러나 이 정상혈청에 대한 대조구로서 정상혈청을 가열하여 보체를 불활성화시킨 혈청에서는 초기반응의 5.8×10^5 CFU/ml가 12시간에 1.0×10^7 CFU/ml 이상으로 증가되었다. zymosan 처리혈청에서는 *E. coli*가 초기의 5.2×10^5 CFU/ml에서 6시간에 1.1×10^6 CFU/ml로 증가되었고 12시간 때는 6시간 때와 비슷한 1.2×10^6 CFU/ml로 나타났다. 대체경로의 C3 단계에서 필요한 Mg^{2+} 은 킬레이트시키지 않고 Ca^{2+} 만을 킬레이트시키는 EGTA를 혈청에 첨가했을 때 *E. coli*는 초기의 1.8×10^5 CFU/ml에서 6시간 경과 후부터 증가되기 시작하였고 12시간에 2.7×10^6 CFU/ml로 증가되었다.

*E. tarda*는 잉어의 정상혈청에서 초기의 5.0×10^5 CFU/ml가 12시간에 1.4×10^6 CFU/ml로 증가되었다. 뿐만 아니라 대조구로서 가열하여 보체를 불활성화시킨 혈청에서도 역시 균수는 증가하여 살균작용은 확인되지 않았다. 그래서 정상혈청에서의 살균작용 외에 각각 처리한 혈청에서의 살균작용은 실시하지 않았다.

틸라피아 정상혈청의 살균작용

틸라피아 정상혈청의 살균작용에 대한 실험결과는 Fig. 2와 같다. *E. coli*는 틸라피아의 정상혈청에서 초기의 세균수가 8.0×10^5 CFU/ml였으나 12시간에 7.4×10^5 CFU/ml로 감소되었다. 대조구로서 가열하여 보체를 불활성화시킨 혈청에서는 초기의 8.0×10^5 CFU/ml에서 6시간에 4.6×10^6 CFU/ml로 균수가 증가되었고 12시간에는 3.8×10^7 CFU/ml로 증가되었다. zymosan 처리한 혈청에서는 초기반응의 8.0×10^5 CFU/ml가 12시간에 6.4×10^6 CFU/ml로 증가되었다. EGTA로 처리한 혈청에서는 초기의 8.0×10^5 CFU/ml가 6시간에 8.0×10^6 CFU/ml로 감소됐다가 12시간에 8.0×10^5 CFU/ml로 초기의 반응시킬 때와 비슷한 균수를 나타내었다.

*E. tarda*는 틸라피아의 정상혈청에서 초기의 2.0×10^5 CFU/ml가 6시간에 3.2×10^6 CFU/ml로 감소되었다가 12시간이 경과 후에는 4.8×10^6 CFU/ml로 현저하게 증가되었다. 보체를 불활성화시킨 혈청에서

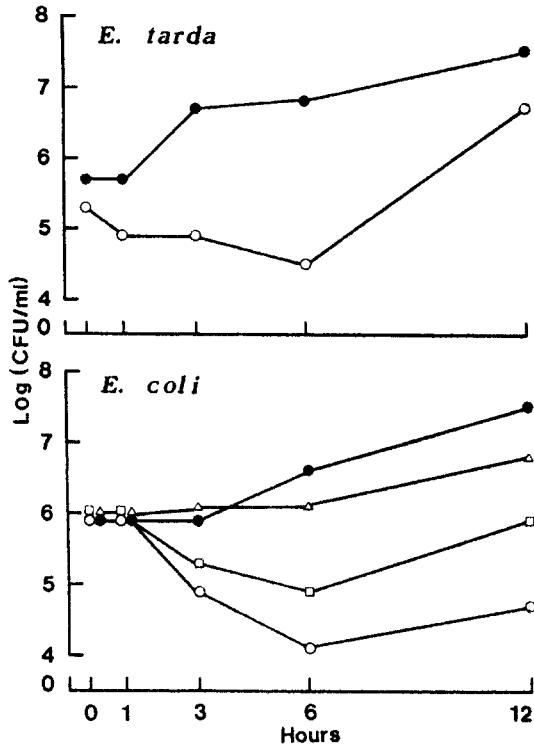


Fig. 2. Bactericidal activity against *E. coli* and *E. tarda* in the normal serum and each treated serum of tilapia

- : Normal serum,
- : EGTA treated serum,
- : Heat inactivated serum,
- △- : Zymosan treated serum.

는 초기의 5.1×10^5 CFU/ml가 3시간에 5.8×10^6 CFU/ml로 증가되었고 12시간이 경과 후에는 1.6×10^7 CFU/ml로 증가되었다.

넙치 정상혈청의 살균작용

넙치 정상혈청의 살균작용에 대한 실험결과는 Fig. 3과 같다. *E. coli*는 넙치의 정상혈청에서 초기의 세균수가 3.2×10^5 CFU/ml였으나 12시간에는 1.2×10^4 CFU/ml로 감소되었고 보체를 불활성화한 혈청에서는 초기의 6.4×10^5 CFU/ml가 3시간이 경과 후부터 증가하기 시작하여 12시간이 경과 후에는 1.2×10^7 CFU/ml로 현저하게 증가되었다. zymosan으로

처리한 혈청에서는 초기반응의 1.2×10^6 CFU/ml가 1시간에 2.0×10^6 CFU/ml로 약간 증가되었고 그것이 12시간까지 유지되었다. EGTA로 처리한 혈청에서는 초기의 4.0×10^5 CFU/ml에서 12시간에 1.7×10^4 CFU/ml로 감소되었다.

*E. tarda*는 넙치의 정상혈청에서 초기의 1.0×10^6 CFU/ml가 3시간에 5.2×10^5 CFU/ml로 감소되었고 12시간에 1.4×10^6 CFU/ml로 다시 증가되어 초기의 균수와 비슷하게 나타났다. 보체를 불활성화한 혈청에서는 초기에 8.0×10^5 CFU/ml에서 12시간이 경과 후 2.8×10^6 CFU/ml로 증가되었다. zymosan으로 처리한 혈청에서는 초기의 8.0×10^5 CFU/ml에서 12시

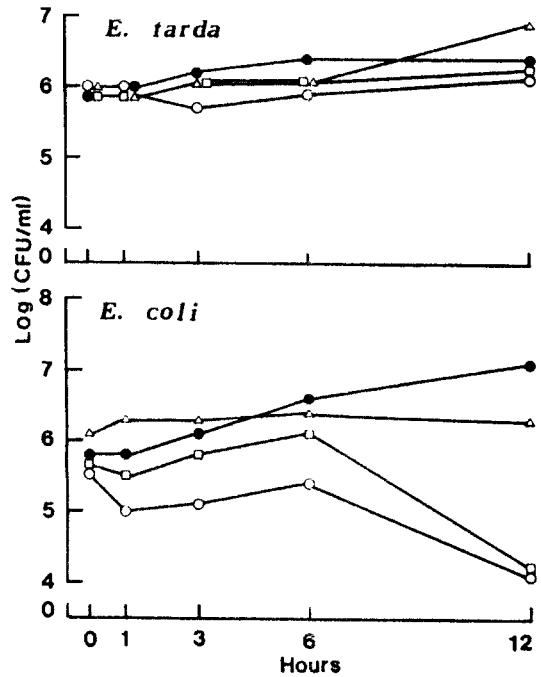


Fig. 3. Bactericidal activity against *E. coli* and *E. tarda* in the normal serum and each treated serum of flounder

- : Normal serum,
- : EGTA treated serum,
- : Heat inactivated serum,
- △- : Zymosan treated serum.

간이 경과후 8.6×10^6 CFU/ml로 증가되었고 EGTA로 처리한 혈청에서는 초기의 8.0×10^5 CFU/ml가 12시간 경과 후에는 2.1×10^6 CFU/ml로 증가되었다.

병원성 실험

세 어종의 정상혈청 중에 존재하는 보체는 *E. coli*에 대해 살균작용을 나타냈으나 *E. tarda*에 대해서는 살균작용을 나타내지 않았다. 그래서 그것이 균주의 병원성과 관련되어 있는 지에 대해 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다.

세 어종에 대한 병원성실험 결과는 Table 1에 나타내었다. 즉, *E. coli*가 세 어종의 실험어에 대해서는 병원성이 없는 것으로 나타났다. 그러나 *E. tarda*에 대해서는 세 어종 모두 폐사율이 80% 이상으로 높게 나타났다.

면역혈청의 항체가

*E. coli*와 *E. tarda*에 대한 잉어와 틸라피아 그리고 넙치에 대한 항체를 Table 2에 나타내었다. 잉어, 틸라피아 그리고 넙치의 항 *E. coli*혈청은 항원인 *E. coli*항원에 대해 64의 항체를 나타내었고 *E. tarda*항원에 대해 잉어와 틸라피아 두 어종의 항 *E. tarda*혈청은 64의 항체를 나타내었고 넙치의 항 *E. tarda*혈청은 32의 항체를 나타내었다.

잉어 면역혈청의 살균작용

잉어 면역혈청의 살균작용에 관한 실험결과는 Fig. 4와 같다. 잉어의 항 *E. coli*혈청과 *E. coli*균을 반응시켰을 때 *E. coli*균은 초기의 4.0×10^6 CFU/ml가 1시간에 8.0×10^6 CFU/ml로 감소되었고 3시간에 약간 더 감소된 4.0×10^6 CFU/ml로 나타났으며 그것이 12

Table 1. Pathogenicity test¹ of *E. coli* and *E. tarda* against fishes by intraperitoneal injection

Fish	Mean body weight(g)	Water temp(°C)	Injection dose(mg/fish)	Number of fish died/fish		Mortality ² (%)	
				Ec ³	Et ⁴	Ec	Et
Carp	120	27	1	0/5	5/5	0	100
Tilapia	50	27	1	0/5	4/5	0	80
Flounder	40	20	1	0/5	5/5	0	100

¹ Throughout the observation period of 10 days, dead fish were examined bacteriologically

² Mortality was determined 10 days after challenge

³ *Escherichia coli*

⁴ *Edwardsiella tarda*

Table 2. Agglutinin titers of anti-*E. coli* and *E. tarda* fish sera against *E. coli* and *E. tarda*

Immunized Fish	Antigen	Agglutinin titers of antiserum	
		<i>E. coli</i> ¹	<i>E. tarda</i>
Carp	<i>E. coli</i> ²	64	
	<i>E. tarda</i>		64
Tilapia	<i>E. coli</i>	64	
	<i>E. tarda</i>		64
Flounder	<i>E. coli</i>	64	
	<i>E. tarda</i>		32

¹ heated serum at 48°C for 30min

² formalinized antigen

시간까지 유지되었다. 그러나 잉어의 항혈청을 가열하여 보체를 불활성화시킨 혈청에서는 초기의 4.0×10^5 CFU/ml가 6시간까지 균수가 변화를 나타내지 않다가 12시간 후 4.8×10^5 CFU/ml로 약간 증가되어 나타났다.

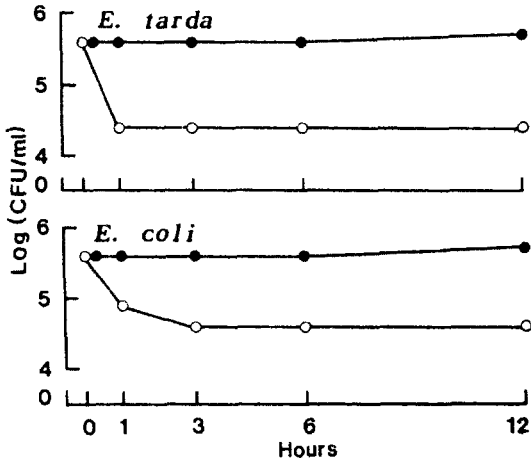


Fig. 4. Bactericidal activity against *E. coli* and *E. tarda* in the immune serum of carp

○-○- ; Normal serum,
●-●- ; Heat treated serum.

잉어의 항 *E. tarda* 혈청과 *E. tarda* 균을 반응시켰을 때 *E. tarda* 균은 초기의 4.0×10^5 CFU/ml가 1시간에 8.0×10^4 CFU/ml로 감소되었고 이후의 감소현상은 볼 수 없었다. 가열로써 보체를 제거시킨 항혈청에서는 초기의 4.0×10^5 CFU/ml가 6시간까지 균수의 변화를 나타내지 않다가 12시간 후 4.8×10^5 CFU/ml로 약간의 증가를 나타내었다.

틸라피아 면역혈청의 살균작용

틸라피아 면역혈청의 살균작용에 관한 실험결과는 Fig. 5와 같다. 틸라피아의 항 *E. coli* 혈청과 *E. coli* 균의 반응에서는 초기의 2.8×10^5 CFU/ml가 1시간에 2.8×10^3 CFU/ml로 감소되었으며 3시간에 5.2×10^3 CFU/ml로 약간 증가되었다가 이후 12시간까지 유지되었다. 대조구로서 보체를 제거하고 항체하고 항원만을 반응시켰을 경우 초기의 2.8×10^5 CFU/ml가

3시간에 5.2×10^5 CFU/ml로 약간 증가되었고 그것이 12시간까지 유지되었다.

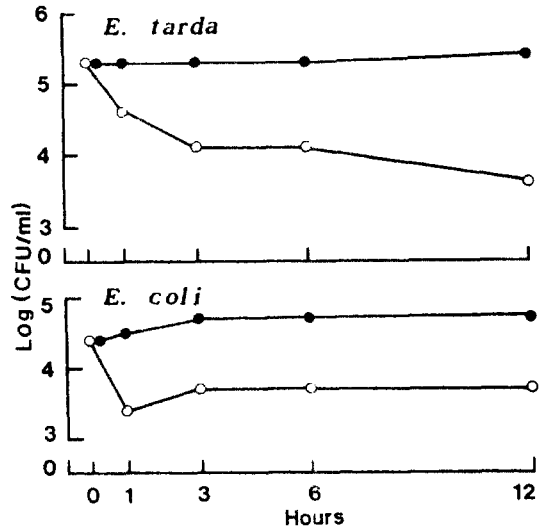


Fig. 5. Bactericidal activity against *E. coli* and *E. tarda* in the immune serum of tilapia

○-○- ; Normal serum,
●-●- ; Heat treated serum.

틸라피아의 항 *E. tarda* 혈청에 대하여 *E. tarda* 균은 초기의 2.0×10^5 CFU/ml가 1시간에 4.0×10^4 CFU/ml로 감소되었고 12시간 후에 4.0×10^3 CFU/ml로 더 많은 감소를 나타내었다. 보체를 불활성화시킨 항혈청에서는 초기의 2.0×10^5 CFU/ml가 6시간까지 균수의 변화를 나타내지 않다가 12시간 후에는 약간 증가된 3.0×10^5 CFU/ml로 나타났다.

넙치 면역혈청의 살균작용

넙치 면역혈청의 살균작용에 관한 실험결과는 Fig. 6과 같다. 넙치의 항 *E. coli* 혈청과 *E. coli* 균의 반응에서 초기의 1.0×10^6 CFU/ml가 1시간에 4.6×10^4 CFU/ml로 급격히 감소되었고 12시간에는 그보다 약간 더 감소된 1.6×10^4 CFU/ml로 나타났다. 보체를 불활성화시킨 항혈청에서는 초기의 1.0×10^6 CFU/ml가 6시간에 약간 증가된 1.6×10^6 CFU/ml로 나타났고 그것이 12시간까지 유지되었다.

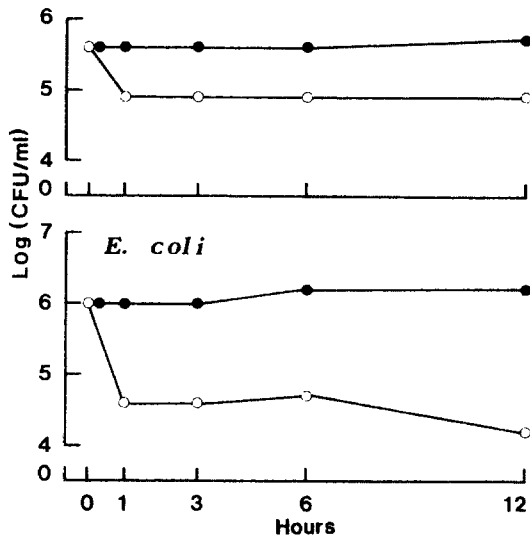


Fig. 6. Bactericidal activity against *E. coli* and *E. tarda* in the immune serum of flounder

○ : Normal serum,
● : Heat treated serum.

넙치의 항 *E. tarda* 혈청과 *E. tarda* 균의 반응에서는 초기의 4.0×10^5 CFU/ml가 1시간에 8.0×10^4 CFU/ml로 감소되었고 12시간까지 더 이상의 균수변화를 나타내지 않았다. 보체를 불활성화한 항혈청에서는 초기의 4.0×10^5 CFU/ml가 6시간까지 균수의 변화를 나타내지 않다가 12시간에 5.6×10^5 CFU/ml로 약간 증가되었다.

고 찰

보체는 동물의 혈청이나 임파액 등에 존재하는 효소로서 항체를 도와서 세포성항원을 용해시키는 작용을 갖고 있으며 포유류의 보체는 56°C 에서 30분 정도의 가열로 파괴되는 이열성물질이다.

보체는 9개의 독립된 단백질로 구성되어 있고 이들 성분이 합동으로 용해반응 등 여러 가지 면역반응을 일으키게 되는데, 어느 조직에서 만들어 지는가는 아직 분명하지 않으며 1968년 WHO의 제청에 의해서

보체를 C로 나타내고, 보체의 각 성분을 C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9의 기호로 표시하게 되었다.

Sakai(1981)에 의하면 어류의 보체는 $45 \sim 48^\circ\text{C}$ 에서 30분 가열하면 활력이 소실된다고 하였다. 그러므로 순수하게 항체로서만 사용하든지 그 외 여러 실험에서 보체를 제거하고자 할 때는 위의 조건을 주면 어류의 보체는 제거된다.

본 실험에서 Sakai(1981a)에 의한 어류의 불활성화혈청에서는 *E. coli*와 *E. tarda*가 12시간 후에 초기보다 현저한 균수의 증가를 나타내서 살균작용이 나타나지 않았지만 정상혈청에서 *E. coli*의 균수가 감소되어 살균작용을 볼 수 있었다. 따라서 Sakai(1981)가 보고했던 것과 마찬가지로 보체는 이열성이므로 가열했을 경우 보체는 소실되어 살균작용이 나타나지 않았고 가열하지 않은 정상혈청에서는 살균작용이 나타났다. 그러므로 세 어종의 정상혈청에서는 보체가 존재하고 있음을 알 수 있었고 또한 그 보체가 살균작용을 한다는 것이 *E. coli*를 통하여 알 수 있었다.

Pronase, trypsin, inulin, LPS와 zymosan은 보체의 C3 활성인자로 알려진 물질이므로(Fine et al., 1972; Sakai, 1983) LPS와 zymosan 등은 보체의 대체경로를 입증하는데 사용되기도 하는 물질이다.

본 실험에서 zymosan을 세 어종의 정상혈청에 처리했을 때 세 어종의 정상혈청에서 *E. coli*는 모두 증가되어 살균작용이 나타나지 않았으므로 이는 zymosan에 의해 C3가 모두 소비된데 기인하는 것으로 생각된다.

C1이 C2와 결합할 때 Ca^{2+} 이 필요하고 C2가 C142와 결합하여 C3로 전환될 때 Mg^{2+} 이 필요하다(Ourth and Wilson, 1982a; Yano et al., 1985). 그러므로 혈청을 EDTA로 처리하게 되면 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 이 킬레이트되므로 C3이하의 성분이 차단되고 EGTA로 처리하게 되면 Ca^{2+} 만을 킬레이트하므로 C3이하의 성분들이 계속 반응을 하는대는 아무런 장애를 일으키지 않으므로 살균작용을 일으키게 된다

(Ourth and Wilson, 1982a; Giclas *et al.*, 1981).

본 실험에서도 틸라피아와 넙치의 정상혈청을 EGTA로 처리했을 때 *E. coli*는 증가의 억제 또는 감소를 나타내었다. 그러나 여기서 주목할만한 것은 잉어의 EGTA처리혈청에서는 두 어종과는 달리 증가를 나타내었다는 점이다.

포유류의 대체경로는 Mg^{2+} 에 의해서만 활성화되고 Ca^{2+} 에 의해서는 활성화되지 않고 어류에서는 잉어를 제외한 대부분 어류의 대체경로에서 Mg^{2+} 그리고 Ni^{2+} 등으로 활성화되고 Ca^{2+} 으로는 활성화가 되지 않는데 잉어만 유독히 Ca^{2+} 단독으로 활성화가 된다고 하였다(Yano *et al.*, 1988). 잉어의 혈청에는 다른 어종에 비해 Ca^{2+} 이 많이 포함되어 있어 그로 인한 대체경로의 활성화가 일어난다(Yano *et al.*, 1988). 이것을 고려해 볼 때 정상혈청 중의 Ca^{2+} 을 킬레이트하고 Mg^{2+} 만 존재하게 하는 EGTA를 혈청에 첨가했을 때 보체의 살균능력은 낮아지게 된다. 그래서 틸라피아와 넙치에 비해 잉어의 EGTA처리혈청에서 살균작용이 나타나지 않은 것은 Yano등(1988)의 결과와 일치한다고 할 수 있다.

위의 실험결과들로부터 *E. coli*에 대한 세 어종의 정상혈청의 살균작용이 보체의 대체경로에 의한 것이라는 것이 보체의 불활성화혈청, zymosan처리혈청 및 EGTA처리혈청의 실험결과로서 알 수 있었다.

넙치의 경우 정상혈청에서 정균작용을 나타내었다. 그래서 그 정균작용이 보체에 의한 정균작용인지를 확인하기 위해 정상혈청을 zymosan 또는 EGTA로 처리했을 때 모두 균수가 증가되었다. 그러므로 이 정균작용은 Iida와 Wakabayashi(1983)의 견해와 같이 혈청 속에 존재하는 보체 이외의 다른 어떤 인자라고 생각된다.

한편 잉어와 틸라피아의 정상혈청이 *E. tarda*에 대해서는 정균작용 또는 살균작용을 나타내지 않았다. 그래서 이 원인이 세균의 병원성과 관련되어 있는 지에 대해서 알아보기 위해 병원성실험(Table 2)을 실시하게 됐는데, 이때 *E. coli*에 대해서는 세 어종 모두에게 병원성이 없는 것으로 나타났으나 *E. tarda*에

대해서는 세 어종 모두 폐사율이 80%이상으로 병원성이 높게 나타났었다. Munn등(1982)은 *Aeromonas salmonicida*가 보체의 살균작용에 저항하는 능력이 이 세균이 갖고 있는 표면막구조성분으로서 A-protein과 LPS 때문이라고 하며 이들 두 성분이 세균의 막을 용해하는 보체성분의 접근을 막는 보호벽으로서의 역할을 하기 때문이라고 하였다. 또한 Nakai(1985)는 *Pseudomonas anguilliseptica*가 혈청의 살균작용에 대해 저항하는 요인이 그들 병원성과 관련되어 있어서 K⁻ strain(병원성)은 보체의 살균작용에 대해 높은 저항성을 나타냈으나 K⁺ strain(비병원성)은 혈청의 살균작용에 대해 저항을 하지 않는다고 보고하였다. Ourth와 Linda(1987)는 병원성 세균에는 혈청의 살균작용이 거의 나타나지 않았으나 비병원성 세균에는 혈청의 살균작용이 나타났다. 그것은 병원성세균에는 비병원성세균보다 sialic acid가 많이 포함되어 있기 때문이라고 한다. 그러므로 병원성세균은 혈청의 살균작용에 저항하게 되는데 그 원인이 병원성세균이 많이 갖고 있는 sialic acid 때문에 그렇고 결국 sialic acid가 보체의 살균작용에 저항하는 분자성분이라고 보고하였다. 이와같은 관점에서 볼 때 본 실험에서 *E. tarda*의 성분 분석을 행하지 않았으므로 *E. tarda*의 정상혈청에 대한 저항력의 요인은 알 수 없지만, *E. tarda*의 병원성이 정상혈청의 살균작용에 대한 저항력과 깊이 관련되어 있는 것으로 판단된다.

보체의 용해반응 가운데 항원이 세균인 경우를 살균반응이라고 하고 이 반응에 관여하는 항체를 살균소(bacteriolysin)라 한다. 살균반응에 대해 처음으로 보고한 것은 Pfeiffer(1984)로서 그는 콜레라(*Vibrio cholerae*)로 면역시킨 기니피그의 복강내에 콜레라균을 집어넣으면 곧 콜레라균이 운동정지, 팽화, 입자상이 되어 결국 소실되어 버리는 것을 관찰하였다(菊地浩吉 등, 1989). 이것은 *in vivo* 뿐만 아니라 *in vitro*에서도 확인되어졌다.

본 실험에서 항혈청의 살균작용은 Fig. 4~Fig. 6에 나타난 것과 같이 정상혈청에서는 살균작용이 나

타나지 않았던 *E. tarda*도 항혈청에서는 살균작용이 나타났다. 또한 정상혈청이 *E. coli*에 대해 12시간에 걸쳐 지속적으로 살균작용을 나타낸 반면 항혈청의 *E. coli*와 *E. tarda*에 대한 살균작용은 반응시킨 후부터 1시간에 거의 모든 살균작용이 완료되었다. 이때 정상혈청이 12시간에 걸쳐 나타낸 살균작용이나 면역혈청이 1시간 만에 나타낸 살균작용의 정도가 비슷하였다. 즉, 항체가 존재하고 있을 때는 항체가 존재하지 않는 비특이적인 상태보다 살균작용이 빠르게 일어난 것이다.

*In vitro*에서 항원이 항체와 결합해서 복합체를 만들면 항체가 항원의 운동을 억제 또는 정지시키게 되는데 이때, 항체의 표면성상의 변화가 일어나기 시작하고 보체가 물리·화학적으로 항체에 흡착되어 세균을 살균시키게 된다. 그러나 시험관 내에 보체는 일정한 양이므로 항원과 항체의 복합물의 일부가 보체를 다 소비해 버리면 나머지 항원과 항체의 복합물은 보체에 의해 더이상 살균되지 않고 시험관 내에 유리된 채 남게된다(문희주 등, 1980). 그래서 본 실험의 Fig. 4~Fig. 6에서 볼 수 있었던 것처럼 1시간 안에 항원항체복합물에 보체가 결합해서 살균시키는 것은 거의 종료가 되고 그 후 12시간까지는 거의 변화가 없었다. 그리고 보체를 불활성화시킨 항혈청에 실험균을 반응시켰을 때 세균의 증식이 억제된 상태로 유지되었다. 이것은 시험관 내에서 항체와 항원만 결합했을 때 항체가 항원의 운동을 정지시키고 있는 상태를 나타내 주고 있고, 보체가 존재하고 있을 때는 살균작용이 일어났는데, 이것은 항원과 결합하여 항원의 증식을 억제시키고 있는 항체를 도와 보체가 살균작용을 일으킨다는 것을 확인시켜 준 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 어류에도 보체의 방어효과가 중요하며 보체는 대체경로를 통하여 세균을 살균시킬 수 있을 뿐만 아니라 고전경로에 의해서도 살균작용을 할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그리고 고전경로에 의한 살균작용은 대체경로의 그것에 비해 작용이 빠르며 효과적이라는 것이 밝혀졌다.

참 고 문 헌

- Day, K. K. B., Gewurz, H., Johannsen, R., Finstad, J. and Good R. A. : Complement-like activity in lower vertebrate and invertebrate. *J. Exp. Med.* 132 : 941-950, 1970.
- Fine, D. P., Marney, S. R., Colly, D. G., Sergent, J. S. and Des Prez R. M. : C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J. Immunol.* 109 : 807-809, 1972.
- Giclas, P. C., Morrison, D. C., Curry, B. J., Laurs, R. M. and Ulevitch R. J. : The complement system of the albacore tuna *Thunus alalunga*. *Dev. Comp. Immunol.* 5 : 437-447, 1981.
- Iida, T. and Wakabayashi H. : Bactericidal reaction by the alternative pathway of fish complement. *Fish Pathol.* 23(1) : 55-58, 1983.
- 菊地浩吉, 今村正克, 谷内昭, 坂岡博, 板倉克明, 石井良文, 松本椿三, 菊地由生子 : 最新免疫學(李淵台譯), pp. 121-179, 集文堂, 1989.
- Miles, A. A. and Misra S. S. : The estimate of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*, 38 : 732-749, 1938.
- Munn, C. B., Ishiguro, B. E., Kay, W. W. and Trust T. J. : Role of surface components of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* 36 : 1069-1075, 1982
- 문희주, 송재웅, 김석홍, 김신무, 장기봉 : 임상혈청학 실습, pp. 22-79, 대학서림, 1980.
- Nakai, T. : Resistance of *Pseudomonas anguilliseptica* to bactericidal action of fish serum. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 51 : 1431-1436, 1985.
- Ourth, D. D. and Wilson E. A. : Alternative pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*. *Dev. Comp. Immunol.* 6 : 75-85, 1982a.
- Ourth, D. D. and Wilson E. A. : Bactericidal se-

- rum response of the channel catfish against gram negative bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 6 : 579–583, 1982b.
- Ourth, D. D. and Linda M. B. : Bacterial sialic acid modulates activation of the alternative complement pathway of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.* 11 : 551–564, 1987.
- Sakai, D. K. : Heat inactivation of complement and immune hemolysis reaction in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 47(2) : 565–571, 1981.
- Sakai, D. K. : Spontaneous and antibody-dependent hemolysis activities of fish sera and applicability of mammalian complements to the immune hemolysis reaction of fishes. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 47(8) : 979–991, 1981a.
- Sakai, D. K. : Titration of hemolysis and analysis of primary antibody response in rainbow trout. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 48(3) : 345–349, 1981b.
- Sakai, D. K. : The activation of alternative pathway by pronase, LPS and zymosan in the complement system of rainbow trout serum. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 49(3) : 347–345, 1983a.
- Sakai, D. K. : Lytic and bactericidal properties of salmonid sera. *J. Fish. Biol.* 23 : 457–466, 1983b.
- Yano, T., Ando, H. and Nakao M. : Two activation steps of carp complement requiring Ca^{2+} and Mg^{2+} and an intermediate product in immune hemolysis. *J. Fish. Biol.* 51(5) : 841–846, 1985.
- Yano, T., Fujiki, K., Nakao, M. and Matsuyama H. : Characteristics of the alternative complement pathway in fish serum. *Fish Pathol.* 23 (4) : 213–217, 1988.
- Yano, T., Hatayama, Y., Matsuyama, H. and Nakao M. : Titration of the alternative complement pathway activity of representative cultured fishes. *Bull. J. Soc. Sci. Fish.* 54(6) : 1049–1054, 1988.

Bactericidal action by complement of fish serum

Byoung-Hwa Yoo, Soo-Il Park and Seh-Kyu Chun

Department of Fish pathology, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 608–737, Korea

In order to know the defense mechanism of fish, bactericidal activity was examined into the sera of carp *Cyprinus carpio*, tilapia *Oreochromis niloticus* and flounder *Paralichthys olivaceus*. Each examined normal serum of fishes showed the bactericidal activity against avirulent *Escherichia coli* but it wasn't appeared against virulent *Edwardsiella tarda*. When the normal serum of each fish was treated with zymosan, it lost the bactericidal activity completely. After addition of EGTA into the normal serum of each fish, the sera of tilapia and flounder still exhibited the bactericidal activity but the serum of carp lost it. In the presence of specific antibody and complement, bactericidal activity of each antiserum was exhibited high level with in one hour incubation. On the other hand, heat inactivated antiserum showed bacteriostatic reaction. From the above results, although the activity of alternative or classical pathway of each fish complement is different, it is an important function in fish defense mechanism.