

## 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*) 의 면역활성변화와 Melano - Macrophage Centers (MMCs) 의 행동특성에 관한 병리조직학적 연구

박정희 · 허민도

부산수산대학교 어병학과

경골어류의 비장과 두신에 분포하는 대식세포의 탐식과정 및 탐식활력에 상응한 Melano - Macrophage Centers (MMCs) 의 형태학적 변화가 갖는 병리학적 의의를 규명하기 위하여, 어체의 면역활성상태의 변화를 인위적으로 야기한 틸라피아, *Oreochromis niloticus* 에 콜로이드성 탄말을 주입하여 비장 및 두신 MMCs 의 병리조직학적 변화에 대한 추이를 경시적으로 추구하였다. 면역활성상태의 변화를 야기할 목적으로 *Edwardsiella tarda* 유래 formalin killed cell (FKC) 및 lipopolysaccharide (LPS) 를 복강내 주사하거나, dexamethasone 을 경구투여하였다. 각 처치군에서 모든 틸라피아의 비장 및 두신에 분포하는 대식세포의 탄말탐식유형이나, MMCs 와 관련한 탄말탐식세포의 이동상은 유사하였으나, 경시적으로 본 대식세포의 탐식활력과 기존 MMCs 또는 새롭게 형성된 탄말함유세포의 응집유형에 있어서는 무처치군을 포함한 처치군간에 큰 차이를 나타내었다. 무처치군에서는 비장과 두신에 있어 다소 차이는 있으나, 두신의 경우, 탄말투여 12 일이 지나서야 MMCs 내의 집적정도가 치밀하였다. 이에 반해 2 가지의 세균유래 항원을 처치한 군에서는 탄말투여 8 일째에 탄말이 기존 MMCs 내로 치밀하게 집적하거나, 탄말함유세포로만 구성된 치밀한 집괴형상을 완료한 반면, dexamethasone 을 처치한 군에서는 8 일째 이후에도 탄말을 함유한 세포는 소수만이 관찰되었으며, MMCs 내로의 치밀한 집적이나 탄말함유세포의 집괴는 볼 수 없었다. 본 연구의 결과, 어체의 면역활성상태는 MMCs 의 출현 수, 크기, 치밀성 및 윤곽에 큰 영향을 미칠 수 있음을 강하게 시사하며, MMCs 의 각종 형태학적 소견은 경골어류의 병리조직학적 소견해석에 있어서 도움을 줄 수 있는 중요한 형태학적 증거가 될 수 있는 것으로 사료된다.

Key Words : Lymphomyeloid organ, Melano - macrophage centers, Ellipsoid, Portal vein

경골어류에서 주요 조혈성 임파장기 (lymphomyeloid organ) 로 알려져 있는 것은 흉선 (thymus), 두신 (head kidney), 체신 (trunk kidney) 그리고 비장 (spleen) 을 들 수 있다 [Yoffey, 1966]. 그러나, 이들 경골어류 조혈성 임파장기에서는 포유류의 임파장기 중 임파절과

편도에 특징적으로 형성되는 종자중심 (germinal center) 과 같은 구조는 볼 수 없으며, 비장에 있어서도 백색수 (white pulp) 의 미분화로 적색수 (red pulp) 와의 명확한 구분이 어려운 것이 고등척추동물의 경우와 다르다. 더우기, 포유류에서는 볼 수 없는 특징적인 조직학적 소견의 하

나로, 각각 기원을 달리하는 각종 색소물질을 함유한 대식세포들이 존재하며, 특히 경골어류에서는 이들이 모여, 대소의 집합체를 형성하고 있다 (Robert, 1975; Agius, 1980). 본 구조물에 대한 명칭은 구조물의 특징에 따라 다양하게 사용되어 오고 있으나, 대부분의 보고에서 Melano - Macrophage Centers (MMCs) 로 기술하고 있다 (Robert, 1975). 따라서 본 논문에서도 Melano - Macrophage Centers 또는 약하여 MMCs 라는 용어를 사용하기로 하였다.

MMCs 는 정상어의 임파성 조혈조직과 기타 연조직 (soft tissue) 에 널리 분포하며, Ellis (1974) 와 Robert (1975) 는 특히, 병어에서 출현이 많은 경향이 있다고 보고하였다. 그러나, MMCs 의 기능적 중요성, 나아가서 병리조직학적 의의에 대해서는 관심을 기울이지 않았다. 그러나, 최근 들어서 MMCs 의 기능적 중요성을 추궁하기 시작하였고, 이를 어류의 세망내피계 (reticulo - endothelial system) 의 필수 구성요소 일 것으로 생각하고 있다 (Agius, 1985).

어류의 MMCs 에 대한 최초의 보고는 1908 년 Blumenthal 에 의하여 적혈구 파괴장소로서의 비장을 관찰하던 중 본 구조물을 확인하게 되었고, 파괴된 적혈구와 혈구색소 (iron) 를 함유한 대식세포라고 보고하였다. 1923 년 Jolly 또한 MMCs 내의 파괴된 적혈구로부터 유리된 hemoglobin 의 파괴산물을 함유한 대식세포를 보고한 바 있다 (Wolke, 1992). Yoffey (1929) 는 경골어류와 판새어류 비장을 조직학적으로 비교할 때 경골어류에서의 특징으로서 임파성 장기의 Pigment Nodule 이 인정됨을 보고하였으며, Mackmull 과 Michel (1932) 은 cunner *Tautogolatus adspersus* 에 탄말 (colloidal carbon) 을 복강내 주사하였을 때, 결국 본 구조물로 모인다고 보고하였다. 이 보고는 1976 년 Ellis 등에 의해 넙치에서 재확인된 바 있다.

Ferguson (1976) 은 MMCs 의 전자현미경적 연구에서 MMCs 에 연하여 연속적인 섬유성 막이 주위조직과의 경계를 이루고, 때로는 주위에 임파성 세포의 집단이 에워싼 형태로 출현한다고 보고하였다. 또한, 세균이나 기생충성 감염어의 임파성 기관의 MMCs 를 조사한 결과 원인체가 대식세포의 용해소체 (lysosomes) 와 연관되어서 MMCs 내에 집적, 한국화하고 있었으며 특히, 멜라닌이 다량 침착하고 있음을 보고하였다 (Ferguson, 1976; Bach *et al.*, 1978; Vogelbein *et al.*, 1987). 특히, 절창병등과 같이 조혈조직의 괴사와 빈혈을 동반하는 감염어에서는 hemoglobin 의 파괴로 인해 다량의 hemosiderin 이 MMCs 내에 축적한 것을 볼 수 있었다. Kranz 와 Gercken (1987) 은 potassium dichromate 와 같은 환경오염물질에 처리된 어류에서는 비장과 두신의 MMCs 가 크기는 작아지는 반면, 수는 증가한다고 보고하였다.

경골어류에 비활성 입자물질 또는 항원성 물질을 투여하였을 경우, 양자 모두는 비장의 유초동맥 (ellipsoid) 이나 신장의 조혈조직내의 식세포에 의해 탐식된다고 보고하였다 (Ellis, 1980; Secombes and Manning, 1980; Page and Rowley, 1984; Herraez and Zapata, 1986, 1987). 또한 이들 물질들은 시간이 경과함에 따라 실질조직에 존재하는 MMCs 로 이동하거나, 때때로 임파성 세포와 근접하여 스스로 MMCs 를 형성하는 것으로 되어 있다 (Ferguson, 1976; Lamers and Pilarczyk, 1982; Lamers and De Haas, 1985; Lamers and Paramentie, 1985; Lamers, 1986). 특히, 항원성 입자일 경우에는 면역복합체 (항원 - 항체 복합체) 로서 MMCs 에 장시간 머물면서 면역조절에 관여하는 것으로 보고하고 있다 (Ellis, 1980; Secombes *et al.*, 1982).

경골어류의 MMCs 는 임파성 조직내에서 혈관

과 밀접히 존재한다. 비장에서는 유초동맥 (ellipsoid) 및 정맥동과, 두신에서는 문맥 주위에 존재하고 있으며, 특히 두신의 경우, 문맥과 MMCs 주위로 임파구의 집적이 둘러싸고 있어 혈관으로부터의 이물질 제거나 항원에 대한 면역 반응의 용이성을 제시하고 있다 (Imagawa *et al.*, 1990). 또한 Ellis 와 De Sousa (1974) 는 소임파구가 순환과정 중 MMCs 를 지나는 현상을 보고하였다. 이와 같이 탄말이나 항원성 물질을 함유한 대식세포 또는 병원체가 MMCs 내로 집적한다는 사실로 미루어, 경골어류에 있어서 MMCs 를 면역반응의 관점에서 포유류 및 조류에서 볼 수 있는 germinal center 기능과 대응관계에 있어 germinal center 의 미분화성 구조물 (primitive analogue) 이라는 가설이 제시되고 있다 (Agius, 1980; Secombes *et al.*, 1982; Lamers, 1986).

이상과 같이 경골어류의 MMCs 는 면역반응에 관여할 뿐만 아니라, 혈액소와 같은 재순환을 요구하는 물질의 저장장소 및 대사과정 중 생긴 불활성 부산물의 처리장소로서의 다양한 기능을 수행한다. 이에, 최근에는 MMCs 를 그 출현수, 크기, 색소의 침착정도 및 형태학적 변화를 근거로 어류의 새로운 Biomarker로서의 가능성을 제시하고 있으나 (Wolk *et al.*, 1985), 이에 대한 체계적이며, 일괄적인 기술은 부족하다.

본 연구는 경골어류에서의 MMCs 를 구성하는 주세포인 대식세포의 식세포로서의 본기능을 재조명하고, 각종 항원의 접촉이나, 질병 및 환경오염등 각종 스트레스적 요인에 의해 야기될 수 있는 대식세포의 고유기능 변화를 예상하여, 어체의 면역활성상태를 인위적으로 변화시켜서, 틸라피아의 임파성 기관인 비장과 두신의 MMCs 와 비장의 유초동맥 구조를 중심으로 한 대식세포의 행동특성을 조사하고, 이에 상응한 MMCs

의 형태학적 변화를 병리조직학적으로 추구하고 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어

부산수산대학교 부속양어장에서 공급받은 체중 40 - 60 g (체장 13 - 17 cm) 인 Tilapia, *Oreochromis niloticus* 를 평균수온 22 - 26°C 의 순환 여과식 수조에서 15 일간 순치 후 실험에 제공하였다. 실험기간 중 임상적 이상유무를 계속 관찰하였으며, 상업용 사료를 1 일 3 회 투여하였다.

### 2. 병리조직학적 검사

광학현미경적 표본을 제작하기 위하여 본 실험에서 절취한 모든 비장 및 두신조직을 10% 중성 포르말린 (neutral buffered formalin) 액 또는 Carnoy 씨액에 24 시간 동안 고정한 후, 순차농도의 알콜 (alcohol) 계로 탈수, 파라핀 (paraffin) 포매 후 4 - 5  $\mu$ m 로 박절하였다.

필요에 따라 흑색 멜라닌과 주입한 탄말을 명확히 구별하기 위해 20% hydrogen peroxide 에서 24 시간 적용시킨 다음, Harris Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다. 임파장기의 세망조직을 보다 명확히 가시화하기 위하여 Azan - Heidenhain's Aniline Blue 로 염색하였으며, 형질세포를 포함한 활발한 단백합성세포의 분포 및 MMCs 와의 구조적 배열을 알기 위하여 Methyl Green - Pyronin 염색법을 적용하였다.

병리조직학적 관찰은 광학 현미경 (Olympus CH - 2, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) 하에 100 - 400 배와 필요에 따라 1,000 배에서 관찰하였다.

### 3. 콜로이드 탄말의 조제

조직표본상에서 대식세포의 위치를 동정하고, 탐식활성을 알아보기 위하여 비활성 탄말 (colloidal carbon) 을 이용하였다. 예비실험을 통한 조직내 분포와 식별 용이성을 기준으로 한 적절한 탄말의 농도 및 투여량은 1 : 10 희석액 0.2 ml 이었다. 농도 조절액으로는 생리식염수를 사용하였다.

### 4. 비처치어에 대한 탄말 (colloidal carbon) 투여

Ethyl Aminobenzoate 100 ppm 으로 마취한 후, 콜로이드 탄말희석액을 0.2 ml 씩 단회 복강내 주사하였다. 주사 후 4, 8, 12, 16 및 20 일째에 각각 10 마리로부터 비장과 두신조직을 절취하여 조직학적 검사를 하였고, 주사 후 임상적 이상유무를 알기 위하여 오전 및 오후 각 한번씩 관찰하였다.

### 5. 항원 제작

본 실험에서 항원투여를 목적으로 사용한 균주는 1993 년 동해안 넙치 양어장에서 *Edwardsiella tarda* 감염어로부터 분리동정한 *Edwardsiella tarda* H - 4 였으며, 부산수산대학교 어병학과 진단학실험실에서 분양받은 것을 사용하였다.

#### 1) Formalin - killed cell (FKC) 항원

동결보존시킨 *Edwardsiella tarda* H - 4 균주를 tryptic soy agar (TSA, Difco) 배지에서 25°C 하에 24 시간 동안 예비배양한 후 tryptic soy broth (TSB, Difco) 배지에서 같은 조건으로 진탕배양하여 균액을 준비하였다. 여기에 0.5% 가 되도록 formalin 을 첨가하여 24 시간 동안 실온에서 방치한 후 4°C, 10,000 × g 에서 30 분간 원심분리하여 균체를 농축시켰다. 농축된 균체를 다시 멸균생리식염수로 3 회 세척한 후, 100 mg/ml 의 농도가 되도록 멸균생리식염수로 현

탁, 0.05% NaN<sub>3</sub> 를 첨가하여 4°C 에 냉장보존하였다 (Fig. 1).

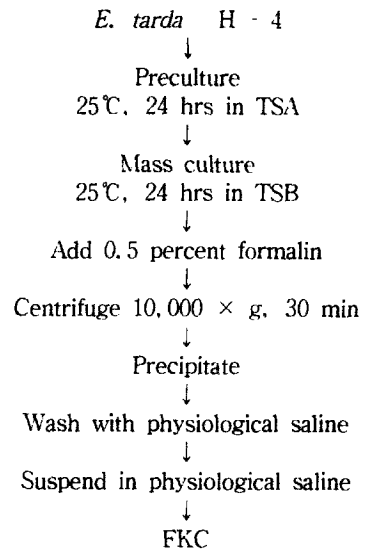


Fig. 1. Schematic drawing for preparation of FKC antigen

#### 2) Lipopolysaccharide (LPS) 항원

동결보존시킨 *Edwardsiella tarda* H - 4 균주를 tryptic soy agar (TSA, Difco) 배지에서 25°C 하에 24 시간 동안 예비배양한 다음, tryptic soy broth (TSB, Difco) 배지에서 동일한 조건으로 진탕배양하였다. 배양된 균액을 4°C, 10,000 × g 에서 30 분간 원심분리하여 균체를 얻었다. 얻어진 균체량에 해당하는 증류수 (증류수 17.5 ml / 균체량 20 g) 와 동량의 90% phenol 을 처리한 후, 65°C 에서 15 분간 진탕하고, 10°C 로 냉각시킨 후 4°C, 10,000 × g 에서 30 분간 원심분리하여 LPS 성분이 들어 있는 수층을 1 차 분리하였다. 남은 균액에 1 차 분리한 수층량에 해당하는 증류수를 다시 첨가, 4°C, 10,000 × g 에서 30 분간 원심분리하여 수층을 2 차 분리하였다. 2 차에 걸쳐 분리된 액을 1°C 에서 투석시킨 후 PEG (polyethylene glycol) 로 농축하였다 (Fig. 2).

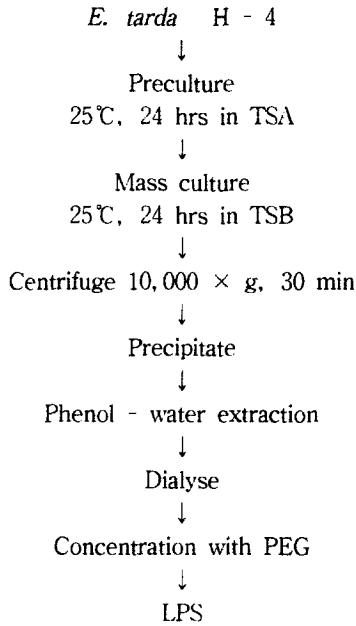


Fig. 2. Schematic drawing for preparation of LPS antigen

6. 항원 투여

1) FKC 처치군

Ethyl Aminobenzoate 100 ppm 으로 마취한 후 어체중 g 당 *E. tarda* H - 4 FKC 를  $1 \times 10^8$  cell 씩 복강내 주사하고, 12 일 후 동량의 FKC 와 탄말 희석액 0.2 ml 를 혼합하여 복강내 주사 하였다. 주사 후 2, 4, 8 및 12 일째에 각각 10

마리의 어체로부터 비장과 두신조직을 절취하여 병리조직학적 검사를 위해 고정하였다.

2) LPS 처치군

Ethyl Aminobenzoate 100 ppm 으로 마취한 후 어체당 *E. tarda* H - 4 LPS 를 0.1 ml 씩 복강내 주사하였다. 5 일 후 탄말 희석액 0.2 ml 를 복강내 주사하였다. 주사 후 2, 4, 8 및 12 일째 각 10 마리의 어체로부터 비장과 두신조직을 절취하여 병리조직학적 검사를 위해 고정하였다.

7. Dexamethasone 의 투여

Ethyl Aminobenzoate 100 ppm 으로 마취한 후 어체중 kg 당 dexamethasone 을 1.5 및 5.25 mg 을 PBS (phosphate buffered solution) 에 현탁시킨 후 0.4 ml 씩 존대를 이용하여 2 일 간격으로 2 차에 걸쳐 경구투여하였다. 2 일 후 탄말 희석액 0.2 ml 을 복강내 주사하였다. 투여 후 4, 8, 12 및 16 일째 각각 10 마리의 어체로부터 비장과 두신조직을 절취하여 병리조직학적 검사를 위해 고정하였다.

8. 탄말분포 및 집적도 관찰

탄말투여 후, 임파장기의 탄말분포 및 집적도의 변화를 관찰하였다. 탄말분포는 비장의 경우 유초동맥 및 MMCs, 두신의 경우 정맥동과 문맥

Fig. 3. The changes for aggregation degree of carbon in the head kidney of tilapia.

주위의 MMCs 를 중심으로 관찰하였다. 탄말집적도는 집적량과 집적구조의 치밀성을 중심으로 관찰하였다. 특히, 두신의 경우에는 집적구조의 광선의 선명함을 기준으로 + 에서 +++ 까지 나누었으며, 그 기준은 Fig. 3 과 같다.

## 결 과

### 1. 정상 비장과 두신의 조직학적 구조

#### 1) 비장의 조직조건

고등척추동물의 비장조직은 적색수 (red pulp) 와 백색수 (white pulp) 로 구성되는 실질부 (splenic parenchyma) 와 세망세포 (reticular cell) 및 세망섬유 (reticular fibre) 로 구성된 지지조직인 세망조직으로 되어 있다. 그러나, 다른 대부분의 경골어류와 같이 틸라피아의 비장에서도 적색수와 백색수의 명확한 구별이 되지 않았으나, 주로 적혈구를 함유한 큰 정맥동 (sinus) 으로 구성되는 부분과 유초동맥을 비롯한 임파구, 대식세포 및 세망세포로 구성되는 부분이 섞여 있는 소견을 보였으며 각각 고등척추동물의 적색수와 백색수에 해당하는 것으로 여겨졌다.

장축방향 절편상에서 두드러진 조직학적 소견은 혈관분포의 특징을 들 수 있었다. 중앙에는 내강이 큰 정맥계 혈관들이 다수 존재하였고, 그 주위에 비교적 두꺼운 혈관벽을 가지고 있는 동맥성 혈관들이 분포하였다. 이들 혈관과 연결한 곳 또는 혈관벽 외막 결합조직내에는 MMCs 가 존재하였으며, 임파구 집단이 둘러싸고 있었다. 반면, 절편의 가장자리에는 세동맥의 말단 주위로 유초동맥 (ellipsoid) 이 다수 인정되고 간간히 이들 사이에서 세망세포와 임파구들이 관찰되었다 (Fig. 4 - 1). 장축에 직각인 절편상에서는 부위에 따라 적색수역과 백색수역 구성비에 차이를 보였으며 혈관 주위에 임파구들이 밀집하여 있었다. Pyronin 양성 세포는 MMCs 와 유초동맥을 비롯한 혈관벽 외막 주위에 소수 존재하고

있었다 (Fig. 4 - 2).

#### 2) 두신의 조직조건

두신은 약간의 결합조직 성분과 다수의 정맥, 동맥 및 정맥동 등의 혈관계로 구성되는 기질부 (stroma) 와 임파구, 세망세포 및 과립구로 구성된 실질부로 구성되어 있었다. 정맥계 혈관은 내피세포가 간신선 또는 크로마핀 세포와 같은 내분비세포로 구성되어 있는 비교적 큰 내강의 고유정맥 (conversional vein) 과 주위가 임파구로 둘러싸인 좁은 내강의 문맥 (portal vein) 으로 구성되어 있었다. 실질은 세망세포 및 과립구등으로 구성되어 있는 비임파성 구역과 MMCs 와 함께 소임파구 (small lymphocyte) 들이 밀집하여 존재하는 임파성 구역으로 나뉘어져 있었다 (Fig. 4 - 3). Pyronin 양성 세포는 두신 전조직의 정맥동을 따라 다수의 세포가 분포하고 있었다 (Fig. 4 - 4).

### 2. 비처치어에서의 탄말분포

비장에서는 콜로이드성 탄말주사 후 4 일째 다량의 탄말이 미세한 입자상태나 응집상태로 유초동맥내에서 관찰되었으며, 때때로 유초동맥과 정맥동의 혈관벽과 인접하여 새로운 집합소를 형성할 뿐만 아니라, 기존의 MMCs 내에도 출현하였다 (Fig. 5 - 1). 두신에서도 문맥을 중심으로 주위의 임파성 조직과 정맥동내에서 다량의 탄말이 인정되었으며, 일부 탄말입자는 기존의 문맥 주위의 MMCs 내로 들어가 있었다 (Fig. 5 - 2). 8 일째 비장의 유초동맥내에는 비교적 작은 집적상태의 탄말이 다량 함유되어 있으며, 정맥동과 유초동맥 주위에 다소 큰 집적물을 형성하고 있었다 (Fig. 5 - 3). 두신에서는 문맥 주위에 대형의 탄말이 집적해 있었으며 정맥동과 문맥주위 임파성 조직에서는 미세한 탄말과립이 흩어져 있었다 (Fig. 5 - 4).

투여후 시간에 따른 비장과 두신의 탄말분포의 추이는 매우 유사하였으며 기존의 MMCs 내로의

탄말이동에서 경미한 정도의 변화가 있었다. 비장의 경우, 유초동맥상에서 탄말이 계속해서 인정되었으나, 20 일째에는 감소하는 경향을 보였으며 일부 탄말입자만이 유초동맥에서 인정되었으며, 탄말은 주로 혈관주위 결합조직에 집적하는 경향이 있었다. 한편, 두신의 경우에는 표본 절취의 같은 시간대에서 비장과 비교해 볼 때, 탄말의 탐식량이나 기존의 MMCs 내로의 이동량이 많을 뿐만 아니라, 12 일째부터는 MMCs 의 집적정도가 상당히 증가하였다. 그러나, 비장의 경우와는 달리 20 일 이후에도 정맥동 주위와 문맥주위 임파구 영역에서 잔 입자 상태의 탄말이 인정되었으며, 20 일째의 MMCs 는 둥글고 선명한 외곽선을 가지고 있었다 [Fig. 5 - 5].

### 3. 세균항원 처치어에서의 탄말분포

#### 1) FKC 처치군

비장과 두신에서 전반적으로 혈관으로부터의 탄말의 탐식정도나 MMCs 내로의 집적정도는 정상어에 비하여 현저히 높았다. 탄말투여 2 일째 비장에서는 정상어의 4 일째의 소견과 유사한 소견을 보였으며, 다량의 탄말이 유초동맥과 정맥동 상에서 인정되었으며, 때로는 유초동맥 주위에 작은 집적상을 볼 수 있었다 [Fig. 6 - 1, 2].

FKC 처치군에서의 시간에 따른 소견 변화는 LPS 처치군과 거의 유사하였다. 두신의 초기반응 (탄말 투여 2 - 4 일) 에서 탄말이 문맥주위 임파구 영역내와 정맥동 상에서 비교적 다량 관찰되었으나, LPS 처치어에서의 소견과 비교하여 볼 때, 다소 지연되는 경향이 있었다 [Fig. 6 - 3]. 그러나, 비장의 경우에서는 별 차이를 볼 수 없었다. 시간에 따른 비장 및 두신에서의 탄말의 추이는 점차 기존의 MMCs 로 이행할 뿐 아니라, 혈관주위 임파구 영역에서 새로운 탄말의 MMCs 를 형성하였다. 특히, 두신의 문맥주위 MMCs 형성은 상당히 증가하여 12 일째 뚜렷한 원형의 MMCs 를 검출할 수 있었다. 또한

Pyronin 양성 세포는 비장의 경우 혈관벽을 따라 소수가 인정되었으며, 두신에서는 정맥 주위를 비롯한 전 조직에서 다수의 세포가 인정되었다.

#### 2) LPS 처치군

탄말주사 2 일째부터 다량의 탄말이 비장의 유초동맥 및 정맥동 뿐만 아니라, 기존의 MMCs 내로 이동하여 있었다. 두신에서는 문맥 주위의 임파구성 영역내의 MMCs 와 주위의 정맥동에 탄말이 상당량 집적하였으며 [Fig. 7 - 1], 두신 조직에서는 Pyronin 양성 세포의 출현이 두신 전 조직에서 현저하였다 [Fig. 7 - 2]. 투여 4 일째의 비장은 2 일째의 소견과 전반적으로 유사하였으며 특히, 두신에서는 MMCs 내로의 이동량이 더욱 많은 것으로 나타났으며, MMCs 의 외곽선이 둥근 형태로 되는 경향이 있었다 [Fig. 7 - 3]. 투여 8 일째부터 탄말은 유초동맥에서 거의 인정할 수 없었고 비교적 깨끗한 상태였다. 한편, 두신에 있어서는 정맥동에서만 소량의 탄말이 검출되었고 거의 모든 탄말이 MMCs 내로 이동하여 있었다 [Fig. 7 - 4]. 투여후 시간이 경과함에 따라 두신이나 비장에서 탄말이동은 활발하게 일어나며, MMCs 의 탄말집적구조는 치밀하며 둥근 외곽선을 보이고 있었다. 또한, Pyronin 양성 세포가 처치군 전군의 비장과 두신에서 인정되었다. 비장에서는 주로 MMCs 내 및 유초동맥 주위에서 다소 정상어에 비해 증가하였으며 [Fig. 7 - 5], 두신에서는 전체적으로 분포가 균일하였을 뿐만 아니라, 출현세포수도 증가하였다 [Fig. 7 - 2].

### 4. Dexamethasone 처치어에서의 탄말분포

Dexamethasone 저용량 처치군에서 볼 수 있는 특징적인 조직학적 소견은 비장의 유초동맥의 顯在化 (현재화) 및 유초동맥 구성 세포들의 비대와 함께 두신세포의 특징적인 세포형태의 변화였다. 또한 Pyronin 양성 세포의 수가 현저히 감소

Table 1. Distribution of carbon in the lymphomyeloid organs of tilapia after i. p. injection.

Organ			Days after injection of colloidal carbon					
			2	4	8	12	16	20
Non - pretreated Control	Spleen	Ellipsoid Pre - existing MMCs		++ <sup>a</sup> +	++ +	++ ++	+ ++	± ++
	Head kidney	Sinus Pre - existing MMCs		++ ++ 40 - 50 <sup>b</sup>	++ +++ 70 - 80	++ +++ 75 - 100	+ +++ 80 - 100	+ +++ 80 - 100
Antigen ( LPS )	Spleen	Ellipsoid Pre - existing MMCs	++ +	+ ++	± +++	± +++		
	Head kidney	Sinus Pre - existing MMCs	++ ++ 70 - 100	++ +++ 90 - 120	+ +++ 80 - 130	+ +++ 90 - 130		
Dexamethasone ( Low dose )	Spleen	Ellipsoid Pre - existing MMCs		+ +	++ +	+ ++		
	Head kidney	Sinus Pre - existing MMCs		+ + 30 - 50	++ + 30 - 50	+ ++ 60 - 90		

a The amount of carbon present +++ , much; ++ , moderate; + , little; ± , very little

b The size of carbon aggregated in the head kidney ( μ m )

Table 2. Aggregation degrees of carbon in the lymphomyeloid organs of tilapia.

Organ			Days after injection of colloidal carbon					
			2	4	8	12	16	20
Non - pretreated Control	Spleen		+ <sup>a</sup>	++	++	++	++	
	Head kidney			+ ++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	
Antigen ( LPS )	Spleen		+ ++	+++ +++	+++ +++			
	Head kidney		++	+++ +++	+++ +++			
Dexamethasone ( Low dose )	Spleen		±	±	±			
	Head kidney			+ +	++ ++			

a The aggregation degrees of carbon present



하였으며 두신에서 투여 초기 (4 일) 에 정맥주위에서만 볼 수 있었다.

탄말주사 후 4 일째의 비장에서는 유초동맥과 정맥동에서 극히 소량의 탄말만이 검출되었다 (Fig. 8 - 1). 더우기 집적 상태이기 보다는 산재하는 경향이 있었으며 두신에서는 문맥 주위에 존재하는 임파구 영역내와 그 주위에 위치하는 정맥동에서 탄말을 함유한 세포가 산재하였다. 그러나, 특징적으로 정상어에서 볼 수 있었던 MMCs 내로의 탄말 이동상은 관찰되지 않았다. 탄말주사 후 8 일째의 비장은 4 일째에 비하여 다소 많은 양의 탄말이 유초동맥에서 인정되었으며 소량의 탄말만이 MMCs 내로 이동하여 있었다. 두신에서도 문맥주위 임파구 영역내의 MMCs 에 탄말이 집적하는 경향이 있었다 (Fig. 8 - 2). 탄말주사 12 일째의 비장과 두신은 8 일째의 것과 전반적으로 유사한 소견을 보였으나, 항원 처치어 또는 정상어에서 볼 수 있는 MMCs 내로의 치밀한 탄말이동은 일어나지 않았다.

고용량 처치군에서는 탄말의 탐식, 처리과정등 전반적인 소견에 있어서, 큰 차이는 보이지 않았으나, 저용량 처치군에 비하여 고용량 처치군에서 비장과 두신의 탄말탐식정도가 상당히 떨어지는 경향을 보였다.

탄말주사 후 8 및 12 일째 비장에서 유초동맥상에서 탄말의 탐식상이 전혀 관찰되지 않았으며, 두신의 정맥동, 임파구 영역 및 MMCs 내에서 극히 소량의 탄말만이 인정될 뿐이었다. 탄말주사후 16 일째에 비로소 비장 유초동맥상에서 탄말의 출현이 있었다 (Fig. 8 - 3).

##### 5. 탄말분포 및 집적도의 변화

이상의 결과에서 시간에 따른 탄말분포의 변화를 볼 수 있었다. 두 임파장기의 탄말집적량 및 두신 문맥주위로 형성된 MMCs 의 집적크기 변

화를 Table 1 에 나타내었다. 또한, Table 2 에는 각 처치군별 탄말집적도의 변화를 나타내었다. 항원처치군의 경우, 탄말집적량, 집적크기 및 집적도가 비처치군과 dexamethasone 처치군에 비하여 상당히 증가하였음을 알 수 있다.

##### 고 찰

경골어류의 주요한 탐식장소로는 비장, 두신, 체신 및 장간막이 있으며, 어종에 따라서 심방, 간장, 아가미 및 장 등이 있다 (Mackmull and Michels, 1932; Ferguson, 1975; Ellis *et al.*, 1976; Mori, 1980). 일반적으로 항원성 물질을 탐식한 조직은 임파구들과 밀접히 관련하여 적절한 면역반응을 야기한다. 이 중에서 경골어류의 비장과 두신은 이물질 탐식을 수행하는 가장 중요한 장기로 알려져 있다 (Yoffey, 1966; Secombes *et al.*, 1982).

경골어류의 임파성 조직에서는 조직학적으로 특징적이며 뚜렷한 구조물로 Melano - Macrophage Centers (MMC) 가 있다. 본 구조물에 대한 조직학적 및 조직 생화학적 연구는 Ellis (1974) 와 Robert (1975) 에 의해 시작되었으며, Robert (1975) 는 Edelstein (1971) 의 멜라닌 정의에 따라 본 구조물을 Melano - Macrophage Centers 로 명명하였다. 그러나, 1981 년 Wolke 등은 표피성 멜라닌 (integumental melanin) 과 내장성 멜라닌 (lipofuscin and ceroid) 을 구별하여 Macrophage Centers 란 명칭을 제시하였다. 이외에도 연구자들마다 Pigment Nodule, Pigment Center, Pigment Granule, Hemosiderin Body, Ceroid Center 등의 다양한 명칭을 사용하고 있다.

MMCs 는 광학현미경하에서 주위 임파조직으로부터 명확히 구별되는 소대형의 원형 내지 타원형의 구조물이며, 전자현미경적으로 대식세포

의 집단인 것으로 확인되었다. 정상어류에서도 관찰될 뿐 아니라, 질병이나 각종 생리학적 조건 하에서 수, 크기 및 윤곽등이 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다. MMCs 의 세포질내에는 melanin, hemosiderin, 지방 유래색소인 lipofuscine 과 ceroid 등의 다량의 색소를 함유하고 있어 [Agius, 1979b; Agius and Agbede, 1984], PAS, Schmorl's, Ziehl - Neelson 반응에 양성 반응을 보이며, 색소 함유량에 따라 노란색에서 검은색까지 다양하게 나타난다. 색소형성의 주 원인은 조직의 이화작용 (tissue catabolism) 의 결과이며 [Micale and Perdichizzi, 1990], 색소침착정도는 어종, 나이, 건강도에 따라 다양하게 출현하는 것으로 알려져 있다 [Robert, 1975; Agius, 1981; Agius and Robert, 1981; Kranz, 1989].

Lipofuscin 과 ceroid 는 MMCs 에 가장 많이 존재하는 색소로 [Agius, 1985], 조직의 불포화 지방이나 지단백의 산화 결과 형성되는데, 생물학적 인자의 세포내 변성이나 세포막 성분의 과산화가 주원인이다 [Agius, 1979a; Agius and Agbede, 1984]. 특히, 변온동물인 어류에서의 다량의 불포화 지방산 함유는 상대적인 비타민 E 부족으로 lipofuscin 이 형성되기 쉽다 [Tappel, 1975]. 어류 MMCs 내 멜라닌은 함유색소 중 가장 보편적인 것으로 정확한 기원과 형성에 관해서는 현재 논란이 되고 있다. 일반적으로 melanosome 은 표피계와 매우 유사하다고 알려져 있으나, MMCs 내의 멜라닌 침착은 표피계 멜라닌 침착과 무관한 것으로 보고 있다. MMCs 의 멜라닌이 melanocyte 나 멜라닌을 함유하는 진구세포의 탐식으로 인한 것인지, MMCs 자체가 멜라닌을 형성하는 것인지는 지금까지 의문이다. 일반적으로 멜라닌은 전자 교환 중합체로서 과산화 반응으로 생긴, 세포에 해로운 강한 자유 결합족이나 양이온을 흡수하는 것으로 보고 있으

나 불명확한 점이 많다 [Robert, 1975]. 이러한 성질을 MMCs 내의 멜라닌에 적용할 수 있는지에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다.

MMCs 의 크기, 모양, 색소의 침착정도, 기관내 분포도 등은 계통발생적 측면과 관계가 있는 것으로 보인다 [Agius, 1980]. 즉, 연골어류와 하등경골어류에서는 MMCs 가 비장이나 신장보다는 오히려 간장 조직에 있으며 고등경골어류보다 다소 검은 색소를 함유하며, 다수의 세포가 집적을 형성하기 보다는 단세포로 있거나 작은 세포 집단으로 존재한다. 반면, 고등경골어류에서는 다수의 세포가 모여 큰 집단을 형성하며 주로 비장이나 신장에 두드러지게 분포한다. MMCs 의 임파성 조직내 특징적인 분포 양상은 혈관과 매우 밀접히 존재하는 것이다. 일반적으로 간장에서는 간문맥 주위로, 비장에서는 말초 동맥계 모세혈관인 유초동맥과 연결해서, 두신은 문맥 주위로, 체신에서는 간질 조혈조직에서 관찰된다 [Robert, 1975; Graf and Schlus, 1979]. 이같은 사실로 미루어 MMCs 형성에 대한 호적 장소는 혈관벽등의 결합조직내인 것으로 사료된다.

본 연구결과에서도 틸라피아의 정상 임파성 장기의 조직학적 관찰에서 비장의 유초동맥이나 혈관과 연결하여, 두신에서는 문맥 주위로 소량의 색소를 함유한 MMCs 가 형성되어 있었다. 이러한 소견은 다른 각종 경골어류에서도 관찰된 바 있다 [Ellis *et al.*, 1976; Lamers and De Haas, 1985; Imagawa, 1990]. 또한, 비장 실질조직은 잘 발달된 세망조직으로 이루어져 있었으며, 두신 또한 잘 발달된 혈관계와 혈관 주위로 임파구들이 다수 집적하고 있었다. 이러한 혈관계와 임파구들의 구조적 배열 및 세망조직의 발달은 틸라피아의 임파성 기관이 혈관내의 항원성 또는 비항원성 이물질들을 포획하여 면역반응을 유도하기에 유리한 조건을 제공하리라 사료되며 이러한 성질은 틸라피아의 탄말투여 초기반응 (3 시간

후) 에서 임파성 기관의 풍부한 정맥동 내에서 다량의 탄말입자가 검출됨으로서 설명할 수 있다.

또한, 정상 비장이나 신장조직내의 Pyronin 양성 세포의 분포는 비장에서는 유초동맥과 MMCs 주위에 소수 존재하는 반면, 두신에서는 혈관을 중심으로 전 조직에 걸쳐 다수가 분포하고 있었다. 두신에서 다량의 Pyronin 양성 세포의 존재는 형질세포 뿐만 아니라, 과립형성세포가 다량 존재하는 것에 기인하며, Pyronin 양성 세포 중 형질세포의 기능적 중요성을 고려해 볼 때, 두신이 항체생산의 주요 기관임을 형태학적으로 뒷받침하고 있다. 이는 Atlantic salmon 의 두신에서 비장보다 많은 양의 Ig + 세포가 존재한다는 보고와 일치한다 [Press *et al.*, 1994].

탄말을 투여한 예에서 비장 및 신장조직내에서의 탄말탐식부위와 처리과정 방식은 각각의 실험 조건 차이에도 불구하고 모든 군의 어류에서 유사하였다. 일반적으로 비활성 입자 또는 항원성 물질을 어체 내 투여하였을 경우, 우선 비장의 유초동맥이나 신장의 조절조직의 대식세포에 의해 탐식되며 [Ellis, 1980; Secombes and Manning, 1980], 결국 이들 물질들은 시간이 경과함에 따라 실질조직에 존재하는 MMCs 로 이동하거나, 때때로 임파구 집단과 근접하여 스스로 MMCs 를 형성한다고 보고하고 있다 [Ferguson, 1976; Lamers and Pilarczyk, 1982; Lamers and De Haas, 1985; Lamers and Paramentie, 1985; Lamers, 1986]. 이러한 대식세포의 탐식활력은 어류의 방어계 (defense system) 가 포유류에 비해 비특이적 면역반응이 특이적 기억성 면역반응보다 우세한 것으로 알려져 있기 때문에 [Carr, 1976; Weir, 1977], 대식세포로 구성되어 있는 MMCs 와 어체 방어기능과의 연관성은 매우 높다고 할 수 있다.

탄말만을 주사한 비처치 대조어에서의 탄말탐

식과정을 Ellis 등 (1976) 및 Lamers 와 Parmentier (1985) 이 보고한 내용과 비교하여 볼 때, 탄말의 MMCs 로의 이행경로에서는 유사하였다. 그러나, 본 실험결과에서는 비장 및 두신의 경우, 기존의 MMCs 내로의 집적이 보다 빨리 (4 일) 이행되고 있었을 뿐 아니라, 두신이 비장에 비해 탐식활력이 떨어진다는 그들의 보고와는 달리 틸라피아에서는 두신이 비장에 비해 탐식률이나 집적도면에서 상당히 우월한 것으로 사료된다.

*Edwardsiella tarda* FKC 및 LPS 의 적용으로 어체에서 면역의 활성상태를 기대하였다. FKC 처치어의 경우, 비처치된 정상어의 경우에 비해, 대식세포의 탐식양상 및 초기변화 뿐만 아니라, MMCs 내로의 이동 및 집적이 상당히 빨리 일어나고 있었다. 즉, 탄말투여 8 일후 임파성 기관의 정맥동이나 실질부의 탄말이 거의 MMCs 내로 집적이 끝난 상태였다. 또한 비장과 두신의 탄말집적 경향을 비교해 볼 때, 정상어에서와 같이 두신의 집적정도가 상당히 우세함을 볼 수 있었다. 이는 면역후, 임파장기의 MMCs 형성에 미치는 영향을 비교한 Harraez 와 Zapata (1986) 의 보고와 일치하는 경향이 있다. *Edwardsiella tarda* LPS 처치군에서도 탄말의 탐식이나 집적도면에서 이와 유사한 반응이 유도되었다. 이는 FKC 와 LPS 가 면역자극제로서 작용하여 어체의 비특이적 면역계가 활성화되고, 그로 인하여 대식세포의 탐식활성 및 이주율이 상승한 결과, MMCs 로의 집적속도가 비처치군에 비하여 빨라진 것으로 사료된다.

또한, FKC 와 LPS 실험군의 모든 틸라피아의 임파장기에서 Pyronin 양성 세포가 현저히 증가한 것을 볼 수 있었다. Secombes 등 (1982) 은 잉어에서 *Aeromonas salmonicida* FKC 투여 5 일 후부터 두신의 혈관을 주위로 Pyronin 양성 반응이 증가하며, 특히, 아쥘반트 (adjuvant) 와

HGG 를 섞어 투여하였을 경우, 이 현상이 더욱 두드러진다고 보고하고 있다. 특히, 본 연구에서 LPS 투여실험을 수행한 것은 LPS 가 생체의 B 임파구를 분화시키는 mitogen 으로서 알려져 있기 때문에 임파성 기관에 존재하고 있던 임파구가 형질 세포로 분화할 것이며, Pyronin 양성 반응세포 출현에 있어 차이를 보기 위한 목적이었다. 그 결과, *Edwardsiella tarda* FKC 와 LPS 처치군에서는 실험기간 동안 모든 투여어의 비장과 두신에서 Pyronin 양성 세포가 많이 출현하였으며 그 반응도도 증가하였다. 특히, 정상어의 비장에서 보았듯이 비장은 소수의 MMCs 와 유초동맥동의 혈관벽에 인접하여 일부 세포만이 인접된 반면, 항원처치어에서는 그 반응도가 증가되었을 뿐만 아니라, 그 수도 증가하여 MMCs 및 유초동맥 주위로 집적을 이루기도 하였다. 두신의 경우에서도 항원처치군이 정상어 및 무처치군에 비해 그 반응도와 수가 증가하였다.

LPS 실험어 중 두신조직에서 MMCs 와 인접하여 육아종 형성조건을 보이는 예가 관찰되었다. 본 어체는 육아종 내에 다량의 탄말을 함유하고 있었으며 그 주위로 두꺼운 유상피세포층을 볼 수 있었다. 특이한 점은 일반적으로 LPS 후기반응 (8 - 12 일) 시 실험어의 두신조직에서는 일부 정맥동 및 문맥주위 임파구 영역에서 탄말 입자를 발견할 수 있는 반면, 육아종 형성어의 경우에는 정맥동 및 주위조직에서 전혀 탄말 입자를 볼 수 없었다. 본 어체의 육아종 소견이 LPS 자극으로 야기된 것인지, 이전의 감염으로 인한 소견인지는 알 수 없으나, 육아종 소견으로 보아 본 어체는 치유단계에 있는 것으로 보이며, 자극으로 인한 면역증강 상태로 어체의 대식세포의 활성이 증가된 것으로 사료된다. 또한 두신에서의 육아종 형성 부위가 문맥 주위로, MMCs 의 형성 부위와 동일하며, 이는 육아종이 이전의 MMCs 에서 유래된 것으로 MMCs 의 기능상실

로 인하여 염증소로 변화한 것으로 여겨지며, MMCs 의 조직내 처리과정이 육아종 형태로 처리되는 것이 아닌가 사료된다.

Dexamethasone 과 같은 부신피질 호르몬인 corticosteroid 는 면역억제제로서 생체가 스트레스하에 있을 때 체내 항상성을 유지하기 위한 general adaptation syndrome 반응의 현상으로 hypothalamus - hypophysis - adrenal (HPA) 반응에 의해 혈중에 다량 분비되는 것으로 알려져 있다 [Selye, 1936].

포유류에서의 corticosteroid 호르몬 상승은 일반적으로 혈중의 백혈구와 임파구의 수를 감소시키며, 또한 골수의 식세포 분화와 혈액으로의 유리 및 탐식기능을 억제시키는 것으로 알려져 있다. 그 중 특히 대식세포는 corticosteroid 에 민감히 반응하여 생체내 투여시 혈중 단구의 수가 상당히 감소하고 임중부위로의 이주 (chemotaxis) 가 억제된다. *In vitro* 에서는 대식세포의 탐식결과 형성되는 intracellular killing 능력을 상실시킨다는 보고가 있다 [Goldstein *et al.*, 1992].

경골어류의 corticosteroid 에 대한 반응도 포유류와 유사한 반응을 보인다고 알려져 있다 [Pickford *et al.*, 1971; Mcleay, 1975; Ellis, 1981]. 즉, 혈중의 백혈구 및 임파구의 수가 감소할 뿐만 아니라, 임파성 기관의 임파구 수를 감소시키며 [Anderson *et al.*, 1982; Mcleay, 1975; Pickering, 1984; Ellsaesser and Clem, 1986], 비특이적 면역반응인 식세포 기능에도 영향을 준다고 보고하고 있다 [Stave and Roberson, 1985]. 스트레스로 인한 cortisol 상승은 어류의 면역계를 억제시키며 [Wiik *et al.*, 1989], 나아가 감염증에 대한 감수성을 증가시킨다 [Pickering and Dustin, 1983; Pickering and Pottinger, 1983, 1985; Woo *et al.*, 1987]. 인위적 투여시 비장의 항체생성세포, 혈청항체가, 비

장의 임파구 수가 감소한다 [Anderson *et al.*, 1982].

Dexamethasone 은 포유류의 경우, hydrocortisone 에 비해 역가가 25 배 정도로, corticosteroid 중에서 비교적 긴 반감기를 가지며 체내에서 지속적인 영향을 줄 수 있다. 본 실험에서도 dexamethasone 을 처치한 군에서는 대식세포의 탐식활력이 현저히 떨어졌으며, MMCs 내로의 이동 및 집적도에 있어 비처치군과 현저한 차이를 보였다. 저농도를 처치한 군에서는 4 일째 극히 소량의 탄말만이 유초동맥상에서 검출되었으며 시간의 경과에 따라 양적으로는 일부 증가하였으나, 비처치군과는 현저한 차이를 보였으며 치밀한 탄말집적구조는 볼 수 없었다. 또한 고농도의 dexamethasone 처치군에서는 실험기간 중 극히 소량의 탄말입자만을 검출할 수 있었다. 이 결과는 어체가 corticoid 계 호르몬에 의하여 비장의 유초동맥과 두신의 대식세포 탐식활성이 감소하였으며 이로 인하여 MMCs 로의 탄말이행이 억제되었음을 의미한다.

또한, dexamethasone 투여군은 정상어의 두신 Pyronin 양성 세포가 전혈관주위로 존재하는 소견과 비교해 볼 때, 그 수가 감소하였으며 일부만이 문맥 주위로 존재하였다. 이는 Pyronin 양성 세포가 dexamethasone 에 의해 그 반응도가 억제되었을 뿐만 아니라 그 수가 감소한 것으로 사료된다.

이 결과로 수온급변이나 밀식등 스트레스 요인에 의한 혈중의 cortisone 의 증가는 어체의 대식세포의 기능을 저하시켜 어체의 방어계를 약화시킬 뿐 아니라, 대사과정의 불활성 부산물 등의 원활한 처리에도 영향을 주어 MMCs 의 형태 및 색소침착에 영향을 줄 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 비처치군, 항원처치군 및 dexamethasone 처치군등의 비장과 두신조직에서 대식세포의 탄말탐식능력과 MMCs 내로의 이동

양상을 비교해 볼 때, 어체의 면역활성상태에 따라 그 양상이 현저하게 차이를 보였다. 항원 처치군에서는 탄말의 MMCs 내로의 이동이 빠르고, 집적정도가 치밀하였으며 시간의 경과에 따라 MMCs 의 외곽선이 원형으로 뚜렷하였다. 특히, 두신의 경우에서는 그 주위로 다수의 강한 Pyronin 양성 세포가 보였다. 이에 반해, dexamethasone 처치군에서는 대식세포의 활성 저하로 극히 소량의 탄말만이 유초동맥이나 임파조직에서 검출되었으며, MMCs 내로의 이동량도 극히 소량이었다. 저농도 처치군에서 볼 수 있었던 MMCs 형상은 집적된 탄말의 양이 작을 뿐만 아니라, 외곽선이 불규칙적이며 뚜렷하지 못하였다.

이는 어체의 면역활성상태에 따라 대식세포의 체내 항원성 물질이나 대사 부산물의 탐식활성 및 처리능력이 변화함을 의미한다. 이에 대식세포의 MMCs 내로의 이동양상이 달라져서 MMCs 의 출현수, 크기, 치밀성 및 윤곽에 큰 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 이로 MMCs 의 각종 형태학적 소견이 경골어류의 병리조직학적인 소견해석에 있어서 고려되어야 할 중요한 형태학적 증거가 될 수 있는 것으로 사료된다.

#### 참 고 문 헌

- Agius, C. : Aspects of the melano-macrophage centres in fish. Ph. D. Thesis, University of Stirling, 1979 a.
- Agius, C. : The role of melano - macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. J. Fish Dis., 2 : 337 - 343, 1979b.
- Agius, C. : Phylogenetic development of melano - macrophage centres in fish. J. Zool. Lond., 191 : 11 - 31, 1980.
- Agius, C. : Preliminary studies on the ontogeny

- of the melano - macrophages of teleost haemopoietic tissues and age - related change. *Dev. Comp. Immunol.*, 5 : 597 - 606, 1981.
- Agius, C. : The melano - macrophage centres of fish : A review. *In Fish immunology*, eds., Manning, M. J. and Tatner, M. F., Academic Press, London, pp. 85 - 105, 1985.
- Agius, C. and Agbede, S. A. : An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *J. Fish Biol.*, 24 : 471 - 488, 1984.
- Agius, C. and Roberts, R. J. : Effects of starvation on the melano - macrophage centers of fish. *J. Fish Biol.*, 19 : 161 - 169, 1981.
- Anderson, D. P., Roberson, B. S. and Dixon, O. W. : Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo trutta*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin. *Comp. Immunol. Supplement.*, 2 : 197, 1982.
- Bach, R., Chen, P. K. and Chapman, C. B. : Change in the spleen of the channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 1 : 205 - 217, 1978.
- Carr, I. : The RES and the mononuclear phagocyte system. *In The Reticuloendothelial System in Health and Disease*, eds., Reichard, S. M., Escobar, M. R. and Friedman, H., Plenum Press, New York, pp. 3 - 9, 1976.
- Edelstein, L. M. : Melanin : A unique biopolymer. *In Pathobiology annual*, ed., Ioachim, H. L., pp. 309 - 324, 1971.
- Ellis, A. E. : Aspects of the lymphoid and reticuloendothelial system in the plaice *Pleuronectes platessa*. Ph. D. Thesis, University of Aberdeen, Scotland, pp. 317, 1974.
- Ellis, A. E. : Antigen - trapping in the spleen and kidney of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Fish Dis.*, 3 : 413 - 426, 1980.
- Ellis, A. E. : Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. *In Stress in Fish*, ed., Pickering, A. D., Academic Press, London, pp. 147 - 169, 1981.
- Ellis, A. E. and De Sousa, M. : Phylogeny of the lymphoid system. 1. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Eur. J. Immunol.*, 4 : 338 - 343, 1974.
- Ellis, A. E., Munroe, A. L. S. and Roberts, R. J. : Defence mechanisms in fish 1. A Study of the phagocytic system and the fate of intra - peritoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J. Fish Biol.*, 8 : 67 - 78, 1976.
- Ferguson, H. W. : Phagocytosis by the endothelial lining cells of the atrium of plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Comp. Path.*, 85 : 561 - 569, 1975.
- Ferguson, H. W. : The relationship between ellipsoids and melano - macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maxiums*). *J. Comp. Path.*, 86 : 377 - 380, 1976.
- Goldstein, R. A., Bowen, D. L. and Fauci, A. S. : Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates, 2nd eds., Gallin, J. I.,

- Goldstein, I. M. and Synderman, R., Raven Press, Ltd., New York, 1992.
- Graf, R. and Schlus, J. : Ultrastructural and histochemical investigation of the terminal capillaries in the spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Cell Tissue Res., 196 : 289 - 306, 1979.
- Herraez, M. P. and Zapata, A. : Structure and function of the melano - macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. Vet. Immunol. Immunopathol., 12 : 117 - 126, 1986.
- Herraez, M. P. and Zapata, A. : Trapping of intraperitoneal - injected *Yersinia ruckeri* in the lymphoid organs of *Carrasius auratus* : The role of melano - macrophage centres. J. Fish Biol., 31 (Suppl. A) : 235 - 237, 1987.
- Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kon, Y. and Sugimura, M. : Vascularization and related distribution of leucocytes in carp, *Cypronus carpio* L., head kidney. J. Fish Biol., 37 : 357 - 366, 1990.
- Kranz, H. : Changes in splenic melano - macrophage centres of Dab (*Limanda limanda* L.) during and after infection with ulcer disease. Dis. Aquat. Org., 6 : 167 - 173, 1989.
- Kranz, H. and Gercken, J. : Effects of sublethal concentrations of potassium dichromate on the occurrence of splenic melano - macrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa*, L. J. Fish Biol., 31 (Suppl. A) : 75 - 80, 1987.
- Lamers, C. H. J. : Histophysiology of a primary immune response against *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Exp. Zool., 238 : 71 - 80, 1986.
- Lamers, C. H. J. and De Haas, M. J. H. : Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). Cell Tissue Res., 242 : 491 - 498, 1985.
- Lamers, C. H. J. and Parmentier, H. K. : The fate of intraperitoneally injected carbon particles in cyprinid fish. Cell Tissue Res., 242 : 499 - 503, 1985.
- Lamers, C. H. J. and Pilarczyk, A. : Immune response and antigen localization in carp (*Cyprinus carpio*) after administration of *Yersinia ruckeri* O - antigen. Dev. Comp. Immunol. Suppl., 2 : 107 - 114, 1982.
- Mackmull, G. and Michels, N. A. : Absorption of colloidal carbon from the peritoneal cavity in the teleost *Tautoglabrus adspersus*. Am. J. Anat., 51 : 3 - 47, 1932.
- McLeay, D. J. : Sensitivity of blood cell counts in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to stressors including sublethal concentrations of pulp mill effluent and zinc. J. Fish. Res. Board Canad., 32 : 2357, 1975.
- Micale, V. and Perdichizzi, F. : A quantitative and histochemical study on melano - macrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. J. Fish Biol., 37 : 191 - 197, 1990.
- Mori, M. : Studies on the phagocytic system in goldfish I. Phagocytosis of intraperitoneally injected carbon particles. Fish Pathol., 15 : 25 - 30, 1980.
- Page, M. and Rowley, A. F. : The reticulo - endothelial system of the adult river lamprey, *Lamptera fluviatilis*, (L.) : The fate of intravascularly injected colloidal carbon. J.

- Fish Dis., 7 : 339 - 353, 1984.
- Pickering, A. D. : Cortisol - induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. Gen. Comp. Endo., 44 : 252 - 259, 1984.
- Pickering, A. D. and Dustin, J. : Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to Saprolegnia infection and furunculosis. J. Fish Biol., 23 : 163 - 175, 1983.
- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G. : Seasonal and diel changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta*, L. Gen. Comp. Endocrinol., 49 : 232 - 239, 1983.
- Pickering, A. D. and Pottinger, T. G. : Cortisol can increase the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta* L.) to disease without reducing the white blood cell count. J. Fish Biol., 27 : 611 - 619, 1985.
- Pickford, G. E., Srivastava, A. K., Slicher, A. M. and Pang, P. K. T. : The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. 3. The role of the adrenal cortex and a concluding discussion of the leucocyte stress syndrome. J. Exp. Zool., 177 : 109 - 117, 1971.
- Press, C. M., Dannevig, B. H. and Landsverk, T. : Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish & Shellfish Immunol., 4 : 79 - 93, 1994.
- Robert, R. J. : Melanin - containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In The Pathology of Fishes, eds., Ribelin, W. E. and Migaki, G., University of Wisconsin Press, Madison, WI, pp. 399 - 428, 1975.
- Secombes, C. J. and Manning, M. J. : Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians : antigen localization in the carp *Cyprinus carpio* L. J. Fish Dis., 3 : 399 - 412, 1980.
- Secombes, C. J., Manning, M. J. and Ellis, A. E. : The effect of primary and secondary immunization on the lymphoid tissues of carp, *Cyprinus carpio* L. J. Exp. Zool., 220 : 277 - 287, 1982.
- Selye, H. : A syndrome produced by diverse noduous agents. Nature, Lond., 138 : 32, 1936.
- Stave, J. W. and Roberson, B. S. : Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of Striped bass phagocytes. Dev. Comp. Immunol., 9 : 77 - 84, 1985.
- Tappel, A. L. : Lipid peroxidation and fluorescent molecular damage to membranes, In Pathobiology of Cell Membranes, Vol. 1, eds., Trump, B. F. and Arstila, A. U., Academic Press, London, pp. 145 - 175, 1975.
- Vogelbein, W. K., Fournie, J. W. and Overstreet, R. M. : Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano - macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. J. Fish Biol., 31 (Suppl. A) : 145 - 153, 1987.
- Weir, D. M. : Immunology. An outline for



- students of medicine and biology, 4th ed, Churchill Livingstone, New York, 1977.
- Wiik, R., Andersen, K., Uglenes, I. and Egidius, E. : Cortisol - induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmon salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on blood cell pattern. *Aquaculture*, 83 : 201 - 215, 1989.
- Wolke, R. E. : Annual Review of Fish Disease : Piscine macrophage aggregates : A review, pp. 91 - 108, 1992.
- Wolke, R. E., George, C. J. and Blazer, V. S. : Pigmented macrophage accumulations (MMC : PMB) : Possible monitors of fish health. *In Proc. US - USSR Symposium Parasites Pathogens World Oceans*, Leningrad, W. J. ed., Hargis, Jr., pp. 35 - 36, 1981.
- Wolke, R. E., Murchelano, R. A., Dickstein, C. D. and George, C. J. : Pigmented macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 35 : 222 - 227, 1985.
- Woo, P. T. K., Leatherland, J. E. and Lee, M. S. : *Cryptobia salmositica* : cortisol increases the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. *J. Fish Dis.*, 10 : 75 - 83, 1987.
- Yoffey, J. M. : A contribution to the study of the comparative histology and physiology of the spleen, with reference chiefly to its cellular constituents. *J. Anat. Lond.*, 63 : 314 - 344, 1929.
- Yoffey, J. M. : The fourth circulation. *In The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis*, ed., Yoffey, J. M., London : Edward Arnold, pp. 1 - 10, 1966.

### Legends of figures

Fig. 4. Normal histologic structures of spleen and head kidney of tilapia.

- 1) The arteries (a) and veins (v) are located in splenic central zone. Cluster of lymphocytes (l) is accumulated adjacent to ellipsoids (e) and blood vessel (v). H - E ( $\times 100$ ).
- 2) Only a few pyroninophilic cells (arrow) are observed around the sinus (s) and lymphoid tissue (l) of spleen. Methyl Green - Pyronin ( $\times 400$ ).
- 3) Numerous blood vessels (p, c and sinus) are interspersed in the parenchyma of head kidney. Note the lymphoid cell accumulations (l) around the portal vein (p). H - E ( $\times 100$ ). p : Portal vein, c : Conversional vein.
- 4) Pyroninophilic cells (arrow) adjacent to the sinus of head kidney. Methyl Green - Pyronin ( $\times 400$ ).

Fig. 5. Histologic structures of spleen and head kidney after injection of colloidal carbon particles to normal non - treated tilapia.

- 1) Spleen. 4 days after carbon particles injection. Carbon particles are accumulate adjacent to the connective tissue of ellipsoids (e) and sinuses (s). Azan - Heidenhain's Aniline Blue ( $\times 200$ ).

- 2) Head kidney. 4 days after carbon particles injection. Note many carbon particles associated with lymphoid tissue (l) and sinuses. H - E ( $\times 200$ ).
- 3) Spleen. 8 days after carbon particles injection. Large accumulations of carbon particles are associated with sinuses (s) and ellipsoids (e). H - E ( $\times 200$ ).
- 4) Head kidney. 8 days after carbon particles injection. Large accumulations of carbon particles are present around portal vein (p). Methyl Green - Pyronin ( $\times 200$ ).
- 5) Head kidney. 20 days after carbon particles injection. In parenchyma, some amount of carbon particles are remained in sinuses and the adjacent lymphoid tissue (l). H - E ( $\times 200$ ).

Fig. 6. Histologic structures of spleen and head kidney after injection of colloidal carbon following the application of *E. tarda* FKC.

- 1 - 2) Spleen. 2 days after carbon particles injection. Large amount of carbon particles is accumulated in ellipsoids (e). H - E ( $\times 200$ ,  $\times 400$ ).
- 3) Head kidney. 4 days after carbon particles injection. Carbon particles are accumulated in lymphoid tissue (l) and sinuses. H - E ( $\times 200$ ).

Fig. 7. Histologic structures of spleen and head kidney after injection of colloidal carbon following the application of *E. tarda* LPS.

- 1) Head kidney. 2 days after carbon particles injection. Large amount of carbon particles is found in parenchyma. H - E ( $\times 200$ ).
- 2) Head kidney. 2 days after carbon particles injection. Numerous pyroninophilic cells (arrow) are interspersed throughout the parenchyma. Methyl Green - Pyronin ( $\times 200$ ).
- 3) Head kidney. 4 days after carbon particles injection. Large amount of carbon particles is densely accumulated in parenchyma, some carbon particles are also found in the sinuses (s). H - E ( $\times 200$ ).
- 4) Head kidney. 8 days after carbon particles injection. In parenchyma, some carbon particles are remained in sinuses (s) and the adjacent tissue. Most of carbon particles are located within MMCs. H - E ( $\times 200$ ).
- 5) Spleen. 2 days after carbon particles injection. Pyroninophilic cells (arrow) are closely associated with ellipsoids (e) and sinuses (s). Methyl Green - Pyronin ( $\times 400$ ).

Fig. 8. Histologic structures after injection of colloidal carbon following the application of dexamethasone.

- 1 - 2 : Low dose of dexamethasone (1.5 mg/kg of B. W.).
  - 1) Spleen. 4 days after carbon particles injection. Only a few carbon particles are observed in ellipsoids (e). Azan - Heidenhain's Aniline Blue ( $\times 200$ ).
  - 2) Head kidney. 8 days after carbon particles injection. Some amount of carbon particles is accumulated in parenchymal tissues. H - E ( $\times 200$ ).
- 3 : High dose of dexamethasone (5.25 mg/kg of B. W.).
  - 3) Spleen. 16 days after carbon particles injection. Only a few carbon particles are observed in ellipsoids (e). Azan - Heidenhain's Aniline Blue ( $\times 400$ ).

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

**Histopathological studies on melano - macrophage centers (MMCs)  
in spleen and head kidney of immuno - modified  
tilapia, *Oreochromis niloticus***

**Jeong - Hee Park and Min - Do Huh**

*Department of Fish Pathology, College of Fisheries Sciences,  
National Fisheries University of Pusan,  
Pusan 608 - 737, Korea*

Histopathological studies on the two lymphomyeloid organs of spleen and head kidney in tilapia, *Oreochromis niloticus*, were carried out to clarify the significance on the morphological characteristics of melano - macrophage centers (MMCs) which are varied in different physiological and pathological conditions of teleosts. To examine the histological changes by the artificial modification of the immunological states, tilapia were treated intraperitoneally with FKC and LPS of *Edwardsiella tarda*, and orally with dexamethasone, and then followed by the intraperitoneal injection of colloidal carbon for chasing the macrophages. There were marked differences in phagocytic avidity of macrophages, and accumulating patterns of carbon - laden macrophages into the MMCs among the test groups. In the non - pretreated control group, carbon - laden macrophages were densely accumulated at 12th and 20th day within the MMCs of head kidney and spleen, respectively. And, in the groups treated with bacterial antigens (FKC & LPS), the macrophages were more rapidly and densely aggregated within MMCs. But in the group with dexamethasone, only a few carbon particles were detected in both organs. Any compactly isolated form of particles was not found in this group. From the present results, it was strongly suggested that certain changes in immunological states of tilapia influence on the morphology of MMCs including the frequency of appearance, sizes, aggregating patterns or outlines. Therefore, morphology of MMCs would be very important in the interpretation for histopathological findings seen in the teleost's lymphomyeloid organs.

---

Key Words : Lymphomyeloid organ, Melano - macrophage centers, Ellipsoid, Portal vein