

## Cyclophosphamide 투여 랫드의 혈구세포 변화 및 호중구 탐식능에 있어서 계란백유래물질의 효과

양만표<sup>1</sup> · 김기홍  
충북대학교 수의과대학

### Effects of Chicken Egg White Derivatives on the Changes of Blood Cells and the Neutrophil Phagocytosis of Rats Administered with Cyclophosphamide

Mhan-pyo Yang<sup>1</sup> and Ki-hong Kim

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

**ABSTRACT :** As an antitumor agent, cyclophosphamide (CPA) is frequently used in animal clinic. Important adverse effects of its administration are leukopenia, thrombocytopenia and anemia. We investigated the effects of chicken egg white derivatives (EWD and EF-203) on the changes of blood cells and the neutrophil phagocytosis of rats administered with CPA. Rats were administered CPA peritoneally at dose of 50 mg/kg once a day for 2 days plus either EWD or EF-203 orally at dose of 200 mg/kg once a day for 3 days. Thereafter, the changes of blood cells by automatic blood cell counter and the phagocytosis of neutrophils by flow cytometry were examined for 7 days. There was no change in RBC values regardless of administration of either EWD or EF-203 throughout experimental period. But rats receiving CPA plus either EWD or EF-203 showed a significant higher PCV values than those of CPA alone ( $p < 0.01$ ). The numbers of peripheral blood platelets and WBC and the differential count of neutrophils in the rats receiving CPA plus either EWD or EF-203 were significantly higher ( $p < 0.05$  to  $0.01$ ) than those of CPA alone. Moreover, these rats showed significantly enhanced phagocytoses of neutrophils when compared to rats with CPA alone ( $p < 0.01$ ). These results suggested that chicken egg white derivatives including EWD and EF-203 have immunomodulatory effects in regard to the increase of platelets, WBC, differential count of neutrophils, PCV, and the enhancement of phagocytic activity of neutrophils in immunosuppressed rats by CPA. Thus, co-administration of chicken egg white derivatives will be able to reduce the side effects in the animals treated with antitumor agents.

**Key words :** chicken egg white derivatives, cyclophosphamide, neutrophils, phagocytosis, rats

## 서 론

Cyclophosphamide(CPA)는 종양세포의 핵산대사를 저해하여 DNA와 RNA의 합성을 억제하는 항종양제이다. 그러나 CPA 투여는 이차적인 중양을 유발할 수도 있고 조혈기계에 작용하여 백혈구감소증, 혈소판 감소증, 빈혈, 출혈 등의 증상을 나타낸다<sup>6,16,21</sup>. 이런 부작용 중 백혈구감소증 특히, 호중구수의 감소는 비특이적 면역작용의 장애를 초래한다<sup>2,13,18</sup>.

호중구는 항원에 대한 특이성이 없고, 항체 및 보체

와 함께 미생물 침입에 대한 방어작용에 중요한 역할을 한다. 순환혈류중의 호중구가 감소하거나 그 기능이 약화되면 감염에 대한 감수성이 증가한다. 또한 항종양제의 빈번한 사용이나 면역억제제 질병에 이환된 동물에서 화학요법 등으로 인하여 호중구 수의 감소나 그 기능의 저하는 병원성미생물에 의한 감염증을 증중화하고 다른 질병의 합병화까지 초래하게 한다<sup>1,11,12,15,20</sup>. 그래서 동물에서의 면역기능 강화 및 각종 감염증에 대한 예방과 치료 대책으로 생물활성물질이나 비특이적 면역증강제의 중요성이 강조되고 있다<sup>15</sup>. 그렇지만 생물활성물질 및 비특이적 면역증강제의 지속적 사용이나 남용은 항생제의 경우와 마찬가지로 생체에 흥선

<sup>1</sup>Corresponding author.

의 비대나 내분비기능 장애 등 다른 부작용을 초래하거나 잔류하는 결점을 안고 있다<sup>4,5</sup>. 최근에는 이러한 부작용을 최소화하거나 배제하기 위해 식품유래 물질 중에서 면역기능을 강화시키는 연구가 활발하다. 최근에 개발된 계단백에서 유래된 몇가지 물질이 mouse, 돼지, 소, 닭의 실험에서 각종 세균 감염증(*Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*)에 현저한 예방 및 치료 효과를 보이면서 부작용이 없는 것으로 나타났다<sup>3,14,22</sup>.

따라서 본 연구에서는 항암치료 및 자기면역성질환의 환축에 적용하는 항종양제의 부작용을 최소화하기 위한 일환으로 CPA 투여로 면역을 억제시킨 랫드에 있어서 계단백유래물질에 의한 혈구세포들의 변화와 호중구 탐식활성에 대한 효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

대한 실험동물센터에서 5주령 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 분양받아 20±1°C에서 밤과 낮의 주기를 유지하고, 물과 사료는 자유급식하여 사육시킨 성숙 랫드(8주령: 체중 400±20 g)를 실험에 사용하였다.

### 실험설계

랫드를 cyclophosphamide(CPA, 알키록산<sup>®</sup>, 중의제약)투여군, CPA와 EWD(Eisai Co., Ltd., Tokyo., Japan) 병용투여군, CPA와 EF-203(Eisai Co., Ltd., Tokyo., Japan)병용투여군 및 생리식염수 투여군으로 분류하여 각 군을 8마리씩으로 하였다. CPA는 실험 1일째부터 2일간 50 mg/kg을 복강 투여하였으며 동시에 EWD 또는 EF-203은 200 mg/kg을 각각 실험 1일째부터 3일간 경구 투여하였다. 생리식염수 투여군은 생리식염수를 1 ml/head로 3 일간 경구 투여하였다. 채혈은 투약전(실험 0일), 실험 2, 5, 7, 10일째에 경정맥에서 실시하였다.

### 혈구세포

Ether 마취상태에서 혈액을 2 ml 채혈하고 30분 이내에 혈구세포를 자동혈구측정기(Celltac α nihon koden, Japan)를 이용하여 측정하였다. 호중구 감별치는 혈액 도말표본을 Wright-Giemsa 염색을 한 후, 광학현미경 400배의 배율에서 산정하였다.

### 호중구의 탐식능 측정

랫드의 말초혈액을 pH 7.6의 phosphate-buffered

saline(PBS)으로 1:1 희석한 후 동량의 Ficoll-hypaque (specific gravity, 1.077; Pharmacia, Japan)에 중층한 다음, 실온에서 400×g로 45분간 비중차 원심분리하여 말초혈액 다형핵백혈구(PMN)를 분리하였다. 분리한 PMN은 cellspin 원심 후 Wright-Giemsa 염색을 하여 관찰한 결과 호중구가 항상 95% 이상을 차지하였다(이하 본 세포들을 호중구로 기술). 호중구는 5% fetal calf serum(FCS; Gibco, MD, USA), 2 mM L-glutamine (Sigma, USA) 그리고 0.02 mg/ml gentamicin이 포함된 RPMI-1640(Sigma, USA)으로 희석하여 세포수가 2×10<sup>4</sup> cells/ml로 조정하였다. 희석한 호중구를 24-multiwell plate(Falcon 3047, Becton Dickinson Labware, NJ, USA)에 넣어서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2시간 배양을 한 후, 1×10<sup>9</sup> particles/ml로 제조한 FITC-labelled latex bead(latex beads; 2.0 μm; Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA)를 넣어서 1시간동안 배양하였다. 그 후 세포를 회수하여 3 mM EDTA-2Na(Wako Pure Chemical Industries, LTD, Tokyo, Japan)함유 PBS로 세척하여 Flow cytometry(FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA)를 이용하여 탐식능을 측정하였다<sup>19</sup>.

### 통계처리

Data는 평균±표준오차로 표시하였고, 통계분석은 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 적혈구 수와 적혈구용적(PCV)

적혈구 수의 변화는 전 실험기간동안 투약군에 관계없이 유의한 변화는 보이지 않았으며 정상범위내에 있었다(Table 1). 그러나 PCV치에 있어서는 CPA와 EWD 또는 EF-203을 각각 병용투여한 군은 CPA 단독투여군과 비교하였을 때는 실험 5 및 7일째 유의한 증가를(p<0.01) 나타냈다(Table 2).

### 혈소판 수

Table 3에 나타난 것처럼 혈소판의 수는 CPA와 EWD 또는 EF-203을 각각 병용투여한 랫드에서는 CPA 단독투여와 비교해서 실험 5일부터 10일째에 걸쳐 유의한(p<0.01) 증가를 보였다.

### 백혈구 수 및 호중구 감별치

총백혈구수 및 호중구 감별치는 실험 2일째부터 모든 CPA 투여군에서 급격히 그 수치가 감소하였다. 그

**Table 1.** The change of RBC values ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) in rats administered with either CPA plus EWD or CPA plus EF-203

	ime (day)				
	0	2	5	7	10
Saline	7.47±0.09	7.23±0.26	7.49±0.25	7.39±0.27	7.34±0.29
CPA	7.40±0.22	7.53±0.37	7.42±0.26	7.47±0.22	7.36±0.13
CPA+EWD	7.32±0.34	7.40±0.20	7.23±0.37	7.39±0.36	7.47±0.40
CPA+EF-203	7.54±0.31	7.28±0.34	7.27±0.37	7.47±0.30	7.37±0.27

The data represent mean±SEM (n=8).

**Table 2.** The change of PCV vlaues (%) in rats administered with either CPA plus EWD or CPA plus EF-203

	Time (day)				
	0	2	5	7	10
Saline	41.82±1.88	40.93±1.28	41.81±1.24	42.40±1.36	41.20±1.33
CPA	40.25±0.25	29.80±4.75 <sup>##</sup>	28.88±2.41 <sup>##</sup>	27.87±3.97 <sup>##</sup>	38.56±2.26
CPA+EWD	38.91±3.41	33.95±3.64	37.76±0.18 <sup>**</sup>	37.15±3.88 <sup>**</sup>	39.90±1.65
CPA+EF-203	38.74±1.77	31.85±0.88	36.16±1.46 <sup>**</sup>	37.30±4.61 <sup>**</sup>	39.55±1.98

The data represent mean±SEM (n=8).

<sup>##</sup>p<0.01, compared to saline.

<sup>\*\*</sup>p<0.01, compared to CPA.

**Table 3.** The change of platelet values ( $\times 10^5/\mu\text{l}$ ) in rats administered with either CPA plus EWD or CPA plus EF-203

	Time (day)		
	0	5	10
Saline	6.16±0.19	6.46±0.18	6.57±0.19
CPA	6.48±0.16	2.90±0.23 <sup>##</sup>	3.28±0.12 <sup>##</sup>
CPA+EWD	6.38±0.23	4.55±0.31 <sup>**</sup>	6.21±0.42 <sup>**</sup>
CPA+EF-203	6.46±0.17	4.37±0.38 <sup>**</sup>	5.47±0.44 <sup>**</sup>

The data represent mean±SEM (n=8).

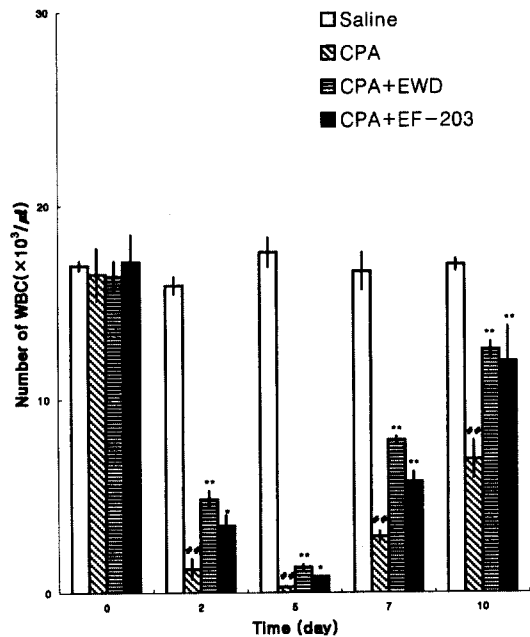
<sup>##</sup>p<0.01, compared to saline.

<sup>\*\*</sup>p<0.01, compared to CPA.

러나 총백혈구수는 CPA와 EWD를 병용투여한 군에서는 CPA 단독투여군에 비해 실험 2일째이후 유의하게(p<0.01) 증가하였다(Fig 1). CPA와 EF-203을 병용투여한 랫드에서도 실험 2일째이후 CPA 단독투여군에 비해 유의한 증가를 보였으나(p<0.05-0.01), EWD 병용투여군에 비해 다소 낮은 수치를 나타내었다. 호중구 감별치의 변화도 EWD 또는 EF-203 병용투여군에서 CPA 단독투여군 보다는 그 수치가 현저하게(p<0.05-0.01) 증가되어 있었다. 또한 그 증가정도는 EF-203 병용투여군에 비해 EWD 병용투여군에서 높게 나타났다(Fig 2).

**호중구 탐식능**

호중구의 탐식능은 CPA를 투여한 모든군에서 실험



**Fig 1.** The change of WBC values in rats administered with either CPA plus EWD or CPA plus EF-203. The data represent mean±SEM (n=8). <sup>##</sup>p<0.01, compared to saline. <sup>\*</sup>p<0.05, <sup>\*\*</sup>p<0.01, compared to CPA.

2일째부터 생리식염수만 투여한 군보다 감소하였다. 그러나 실험 2일째이후부터 CPA와 EWD를 병용투여

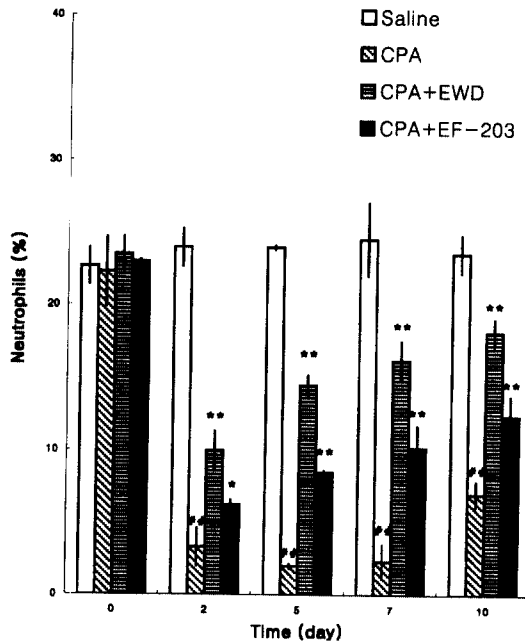


Fig 2. Differential count of neutrophils in WBC of rats administered with either CPA plus EWD or CPA plus EF-203. The data represent mean  $\pm$  SEM (n=8). ###p<0.01, compared to saline. \*p<0.05, \*\*p<0.01, compared to CPA.

한 군은 CPA 단독투여군에 비해 현저한 탐식활성의 증가(p<0.01)를 나타내었으며, 실험 10일째에는 생리 식염수 투여군 보다 증가하였다. CPA와 EF-203 병용 투여군은 CPA 단독투여군 보다 실험 5일이후부터 현저하게(p<0.01) 탐식능이 증가하였다. 그리고 전반적으로 CPA와 EWD 또는 EF-203 각각 병용투여한 군에서는 EWD 병용투여군이 EF-203 병용투여군 보다 높은 탐식활성을 나타내었다(Fig 3).

### 고 찰

최근 각종 동물의 노령화 및 각종 약물치료의 증가로 종양의 발생이나 자기면역성 질병의 발생률도 증가하는 추세에 있으며, 종양제거 수술이나 항암치료 또는 자기면역성 질병의 치료를 위해 항종양제의 사용은 혈구세포들의 숫자나 면역세포들의 고유기능을 감소시키기 때문에 격일째 또는 주 1~2회 투여 등으로 신중하게 투여하기를 권장하고 있다. 본 연구에서는 2일 연속 CPA 투여로 PCV치, 혈소판 수, 총백혈구 수 특히 호중구 감별치의 감소를 동반하는 CPA의 전형적인 골수억제 부작용을 나타내었을 뿐만 아니라 호중구의 탐식기능 또한 감소시키는 것으로 나타났

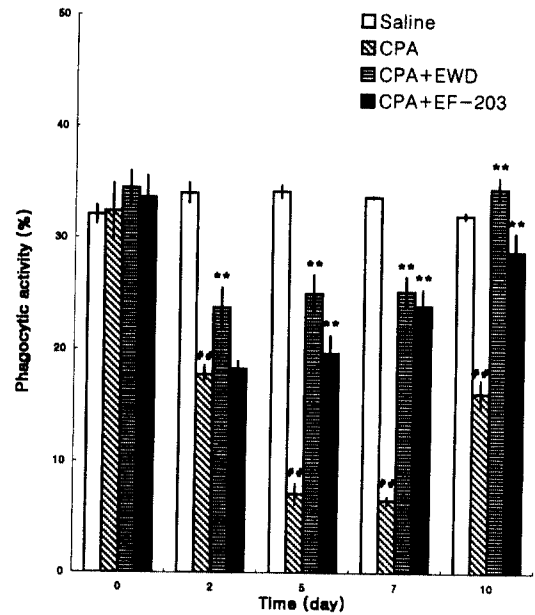


Fig 3. Phagocytic activity of PMN in rats administered with either CPA plus EWD or CPA plus EF-203. The data represent mean  $\pm$  SEM (n=8). ##p<0.01, compared to saline. \*\*p<0.01: compared to CPA.

다. 그러나 CPA 투여로 면역기능이 억제된 상태에서도 면역증강제인 계난백유래물질의 투여로 면역부활 효과가 촉진되거나 회복되는 것으로 나타나 항종양제의 연속투여에 따른 면역기능 억제를 예방할 수 있음을 본 결과는 제시하고 있다.

본 연구의 결과 CPA의 투여로 적혈구 수에는 변화가 없는 반면 적혈구용적의 감소가 나타났다. 이것은 적혈구 성숙에 있어서 CPA가 적혈구 조혈인자 작용을 억제하여 적혈구의 크기를 축소(microcyte화)시키기 때문이며<sup>7</sup>, 따라서 EWD 또는 EF-203을 투여함으로써 CPA에 의한 적혈구의 크기가 축소되는 것을 방지한 결과로 사료되었다.

한편 CPA 투여로 혈소판 수 및 총백혈구 수가 감소한 것은 CPA가 골수세포계의 혈소판 및 백혈구의 공통 전구세포를 억제하여 일어나는 것으로 알려져 있으며<sup>15,21</sup>, 계난백유래물질 투여로 골수세포계에 있어서 억제된 전구세포들을 활성화시키는 것으로 추측되었다.

호중구의 탐식능은 CPA 투여로 뚜렷하게 감소하였는데 CPA의 이와같은 효과는 호중구의 감별치에 있어서도 영향을 미치는 것으로 나타났으며, CPA와 EWD 또는 EF-203을 병용투여함으로써 정상 랫드에 비해서는 탐식활성이 낮았지만 CPA 투여로 감소된

탐식능을 현저하게 증강시켰다. 이러한 탐식활성의 증강작용은 계란백유래물질이 직접적으로 호중구의 탐식활성을 증강시켰다기 보다는 CPA에 의해 억제된 전구세포들을 포함한 말초 단핵구세포들을 활성화시킴으로써 이들 세포들이 분비하는 액상물질에 의해 탐식활성이 증가된 것으로 생각된다<sup>8,9,10,22</sup>. 호중구를 비롯한 다형핵백혈구의 탐식활성에 관여하는 액상물질로는 대표적으로 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 가 있으며, 이것은 호중구의 탐식활성을 증강시킬 뿐만 아니라 호중구 감소증이 있는 mouse에서 호중구의 증식도 일으킨다고 한다<sup>18</sup>. 이러한 호중구의 증식 및 탐식활성의 증강은 TNF- $\alpha$ 와 granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF)가 상호작용을 하며<sup>10</sup>, 또한 TNF- $\alpha$ 는 CSF와 interleukin(IL) 3의 수용체를 변화시켜 호중구의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>17,18</sup>.

이상의 본 연구 결과를 종합해 보면 CPA를 비롯한 항종양제로 인하여 골수기능 및 비특이적 면역기능 억제 동물에 있어서 계란백유래물질의 투여는 억제된 골수기능이나 면역기능을 효과적으로 회복시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

## 결 론

항종양제로써 CPA는 수의임상에서 자주 사용되는 약물이다. CPA의 중요한 부작용으로는 백혈구감소증, 혈소판감소증, 빈혈 등을 나타낸다. 본 연구는 CPA를 투여하여 면역을 억제시킨 랫드에 있어서 혈구세포와 호중구의 탐식능 변화에 대한 계란백유래물질(EWD 및 EF-203)의 효과를 조사하였다. CPA를 50 mg/kg의 용량으로 2일간 복강투여를 하고 동시에 EWD 또는 EF-203은 200 mg/kg의 용량으로 3일간 경구투여한 후, 7일간 자동혈구 측정기로 혈구세포의 변화를, flow cytometry로 호중구 탐식능을 분석하였다. RBC 수는 CPA나 계란백유래물질의 투여에 변화를 보이지 않았다. 그러나 PCV는 CPA 단독투여군 보다 CPA와 EWD 또는 EF-203을 병용투여군에서 유의하게 높게 나타났다( $p < 0.01$ ). 혈소판 수, 백혈구 수 그리고 호중구 감별치에 있어서도 CPA 단독투여군에 비해 CPA와 EWD 또는 EF-203을 병용투여한 군에서 유의하게 증가하였으며( $p < 0.05 \sim 0.01$ ), 호중구의 탐식능도 CPA 단독투여군에 비해 CPA와 EWD 또는 EF-203을 병용투여한 군에서 유의한 증가를 보였다( $p < 0.01$ ). 이상의 결과로부터 계란백유래물질(EWD 및 EF-203)은 CPA 투여로 면역이 억제된 랫드에서 혈소판 수, 백혈구 수, 호중구 감별치 그리고 PCV의 증가

및 호중구 탐식활성의 증강과 같은 면역조절 작용을 가지고 있음을 시사하였다. 따라서 항종양제와 계란백유래물질의 병용투여는 항종양제 치료를 받는 동물에 있어서 그 부작용을 줄일 수 있을 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB* 1994; 8(8): 335-359.
2. Amura C, Fontan P, Sanjuan N, Sordelli D. The effect of treatment with interleukin-1 and tumor necrosis factor on *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in a granulocytopenic mouse model. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73: 261-266.
3. Araki S, Suzuki M, Fujimoto M. Enhanced resistance to bacterial infections in mice by oral administration of an active egg white product. *J Vet Med Sci* 1992; 54(5): 1055-1056.
4. Baehner RL. Disorders of leukocytes leading to recurrent infection. *Ped Clin North Am* 1972; 19: 935-937.
5. Briggs RE, Kehrl M, Frank GH. Effects of infection with parainfluenza-3 virus and infectious bovine rhinotracheitis virus on neutrophil functions in calves. *Am J Vet Res* 1988; 49: 682-684.
6. Donald CP. *Veterinary drug handbook*. 1st ed. Minnesota, USA: Pharma Vet Publishing. 1991: 572-576.
7. Ettinger SJ, Feldman EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 4th ed. Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company. 1995: 1864-1891.
8. Hirota Y, Yang MP, Araki S, Mohamed A, Matsumoto Y, Onodera T, Sugii S, Akiyama K. Immunostimulating activities of chicken egg white derivatives (EWD) and recombinant bovine interferon alpha 1 (rBoIFN  $\alpha$  1) in dogs and cattle. *Bull Soc Fr Jpn Sci Vet* 1995; 6(2): 58-67.
9. Hirota Y, Yang MP, Araki S, Yoshihara K, Furusawa S, Yasuda M, Mohamed A, Matsumoto Y, Onodera T. Enhancing effects of chicken egg white derivatives on the phagocytic response in the dog. *J Vet Med Sci* 1995; 57(5): 825-829.
10. Jacobsen SEW, Ruscetti FW, Dubois CM, Keller JR. Tumor necrosis factor  $\alpha$  directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: role of colony-stimulating factor receptor modulation. *The Journal of Experimental Medicine* 1992; 175: 1759-1772.
11. Kapp A, Luger TA, Maly FE, Schöpe E. Granulocyte-activating mediators (GRAM): I. generation by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear cells. *J Invest*

- 1986; 86: 523-528.
12. Lindley I, Aschauer H, Seifert JM. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85(23): 9199-9203.
  13. Matsumoto M, Matsubara S, Matsuno T, Tamura M, Hattori K, Nomura H, Ono M, Yokota T. Protective effect of human granulocyte colony-stimulating factor on microbial infection in neutropenic mice. *Infect Immun* 1987; 55: 2715-2720.
  14. Nakagawa J, Osame S, Ichijyo S, Araki S, Kimura M. Effects of active egg white product on neutrophil function in calves. *J Vet Med Sci* 1993; 52(2): 259-263.
  15. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*. 3rd ed. London, UK: Mosby-Year Book Europe Ltd. 1993: 13-32.
  16. Rosenoff SH, Bostick F, Young RC. Recovery of normal hematopoietic tissue and tumor following chemotherapeutic injury from cyclophosphamide (CTX); comparative analysis of biochemical and clinical techniques. *Blood* 1975; 45: 465-475.
  17. Rusten LS, Jacobsen FW, Lesslauer W, Loetscher H, Smeland EB, Jacobsen SEW. Bifunctional effects of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) on the growth of mature and primitive human hematopoietic progenitor cells: involvement of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* 1994; 83(11): 3152-3159.
  18. Shirai R, Kadota J, Tomono K. Protective effect of granulocyte colony-stimulating (G-CSF) in a granulocytopenic mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection through enhanced phagocytosis and killing by alveolar macrophages through priming tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) production. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 73-79.
  19. Steinkamp JA, Wilson JS, Saunders GC, Stewart CC. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science* 1982; 215: 64-66.
  20. Willems J, Joniau S, Cinque S, Damme VJ. Human granulocyte chemotactic peptide (IL-8) as a specific neutrophil degranulator: comparison other monokines. *Immunology* 1989; 67: 540-542.
  21. Yoshida M. *In-vivo* enhancement of neutrophil function by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in cyclophosphamide (CPA) treated mice. *日泌尿會誌* 1992; 83(4): 518-527.
  22. Yoshida T, Sakai M, Kitao T, Khlil SM, Araki S, Saitoh R, Ineno T, Inglis V. Immunomodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout; *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 1993; 109: 207-214.