

In vitro에서 Levamisole이 양식뱀장어의 면역조절작용에 미치는 영향

최민순 · 박관하 · 정경민 · 심현빈 · 윤성호

군산대학교 해양과학대학 해양생명의학과

Levamisole(LMS)이 뱀장어의 면역반응에 미치는 영향을 측정하기 위해서 뱀장어의 혈액 및 신장으로부터 백혈구를 분리하여, 림프구의 증식능, MIF 생산능, 자연살해세포활성능, 탐식세포의 탐식능, superoxide anion, hydrogen peroxide 및 lysozyme 활성능 등을 측정하였다. LMS는 T-cell 마이토젠인 Con A 및 PHA 처리 시에는 LMS 농도에 비례감소를 보인 반면에 B-cell 마이토젠인 LPS에는 LMS 처리와는 무관하게 큰 차이를 보이지 않았다. 한편 MIF 및 MAF의 생성에는 LMS 처리 농도에 비해 증가되었다. NK 세포의 활성은 LMS 첨가농도에 비해 증가하였는데, 이는 표적세포에 대한 결합율을 증가시킨 결과 NK 세포의 활성이 증가된 것으로 보인다. LMS는 백혈구의 탐식능, superoxide anion의 생성능, hydrogen peroxide 생성능 및 lysozyme의 활성을 증가시켰다. 이러한 결과로부터 LMS가 어체의 면역작용에 관여하는 작용기전은 면역 작동세포수의 증가를 촉진시키기보다는 분화를 촉진시켜서 cytokine의 방출증가 및 세포의 기능활성을 증강시킬 수 있다.

Key words : Levamisole, NK-cells, Mitogen, Leucocytes, Cytokine

어류 질병의 예방 및 치료를 위해 통상적으로 이용되고 있는 항균 및 화학요법은 과도한 약제사용으로 인한 다제내성균의 출현으로 치료에 어려움이 있다. 최근 균체항원의 변조를 통한 백신처리법을 시도하고 있으나 특이항체가 낮으며, 지속기간이 짧기 때문에 실효를 거두지 못하고 있다(Aoki *et al.*, 1989; Salitai *et al.*, 1985; 최 등, 1996).

이러한 문제점을 개선하기 위한 일환으로 인체 및 가축에서 비특이적인 면역증강제로서 효과가 인정되고 있는 생리활성물질들은 일부의 양식어종을 대상으로 어류질병의 예방을 위한 적용에 관심이 증가되고 있다. 면역증강제중의 하나인 levamisole(LMS)은 탁월한 항선충효과를 갖는 저분자의 합성물질로서, 수용성으로 체내에 쉽게 흡수되므로 어류에 투여가 용이한 장점을 가지고 있기 때문에 일부의 양식어종을 대상으로 실험한 바 매우 긍정적인 평가를 받고 있다(Geets *et al.*, 1992; Swicki *et al.*, 1990; 1994; Kajita *et al.*, 1990; Baba *et al.*, 1993).

한편, 지금까지 알려진 LMS의 면역활성은 직접적으로 감염미생물, 정상세포 및 암세포 등에 상해작용을 보이지 않으면서 숙주의 억제된 면역능을 회복시키는 것으로 알려져 있으나, 면역활성효과는 처리시기, 방법, 투여량 및 어종에 따라서 다양한 반응을 나타내어 구체적인 작용기전이 구명되지 않았다(Renox and Renox, 1977; Sampson and Lui, 1977; Otteess *et al.*, 1980).

이에 본 실험에서는 LMS가 면역조절세포에 대해서 어떠한 영향을 미치는지 여부를 파악하기 위해서 뱀장어를 대상으로 *in vitro* 상에서 림프구, 자연살해세포 및 탐식세포의 활성능에 미치는 영향을 평가하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

혈액 림프구의 분리

뱀장어의 동맥구로부터 헤파린(500 IU) 처리 주사기로 채혈한 혈액을 RPMI 1640 배지와 동량 혼합하였다. 혼합액을 Ficoll-hypaque(1,077)를 이용한 밀도구배법으로 단핵세포를 수거하여 3회 원심세정(500×g, 10분)하여 배양용기에 1% FCS-

[†]Corresponding author

RPMI 1640(Gibco)에 5×10^6 cells/ml 농도로 부유하였다. 그 후 27°C, 5% CO₂하에서 2시간 배양한 다음 RPMI 1640으로 세척하여 비부착된 세포만을 실험에 사용하였다. 공시한 배지는 5% FCS, gentamicin(2 µg/ml) 및 heparin(10 units/ml) 등을 함유한 RPMI-1640배지였다.

두신의 대식구 분리

Baba 등(1993)의 방법에 준하였다. 즉 백장어의 미부를 절단하여 방혈시킨다음 어체로부터 두신을 분리 세척하여 teasing 하였다. 세포부유액을 원심분리용 튜브관에 넣고서 5분간 침전 시킨 후 상층의 세포부유액을 Percoll(34.51%) 용액에 중층하여 4°C의 냉장상태로 원심분리(400×g, 25 min)한 다음 분획된 세포를 수거하여 RPMI 배지로 원심세정하였다. 그 후 분리된 백혈구를 10⁷/ml 농도로 조정하여 27°C, 5%-CO₂ 배양기에서 2시간 배양하여 비부착세포를 제거하고 부착세포를 대식세포로 실험에 이용하였다.

신장의 백혈구 분리

Kusda and Taira(1990)의 방법에 준하였다. 즉 어체로부터 신장을 분리 teasing한 후 세포부유액을 원심분리용 튜브관에 넣고서 5분간 침전 시킨 후 원심분리(200×g, 10 min)후 상층의 세포부유액을 수거하여 RPMI 배지로 원심세정하였다. 그 후 분리된 백혈구를 10⁷/ml 농도로 조정하여 27°C, 5%-CO₂ 배양기에서 1시간 배양하였다. 이때 비부착세포를 자연살해세포로 부착세포를 백혈구로 실험에 이용하였다.

중식능 측정

혈액으로부터 분리한 비부착 단핵구를 5%-FCS RPMI배지에 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 96-well(flat bottomed plate, Nunclon)에 LMS(0, 0.1, 1 및 10 g/ml) 및 mitogen(PHA, Con A 및 LPS) 10 g/ml을 가하여 well당 총량이 0.2 ml씩 되도록 조정후 27°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 배양세포에의 [³H] thymidine ([³H]TdR, 20 Ci/mmol, NEN)의 pulse는 0.5Ci의 [³H]TdR를 각 well에 배양종료 12시간 전에 가하였다. (³H)TdR의 incorporation 측정에는 multiple cell harvester로 glass-fiber에 세포를 수거 후

liquid scintillation counter(Packard)를 이용하여 측정하였다.

Lymphokine 생산

혈액으로부터 분리한 비부착 단핵구(10⁶ cell/ml)를 Con-A와 다양한 농도(0, 0.1, 1 및 10 g/ml)의 LMS를 혼합처리하여 27°C, 5% CO₂ 배양기에서 40시간 배양한 다음 400×g로 30분간 원심분리하여 배양 상층액만을 얻었다. 그 후 배양상층액을 Sephadex G-10(Sigma, St. Louis, MO)에 통과시킨후 0.22 µm의 filter로 여과멸균하여 -96°C 냉동고에 보존하여 사용하였다.

Macrophage activating factor(MAF) 측정

MAF의 측정은 NBT법(Rook *et al.*, 1985)에 준하였다. 두신유래의 부착세포를 5% FCS-RPMI 배지에 5×10^6 cells/ml 농도로 조정한다음, MAF가 함유된 배양상층액과 0.1% NBT 용액을 각각 동량(0.5 ml) 혼합하여 30°C에서 1시간 반응시켰다. 그 후 원침(400×g로 30분)하여 상층액을 제거하고 100% 알콜로 3회 세정후 건조시킨 다음 2M-KOH 120 µl와 DMSO 140 µl로 반응시킨후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 환원된 NBT치를 탐식세포의 활성치로 산정하였다.

Migration inhibition factor(MIF) 측정

MIF의 측정은 Microcapillary tube법(Bellina and Salerno, 1987)으로 측정하였다. 즉 닭의 익화정맥으로부터 채혈한 말초혈액을 원심(200×g 10 min.)하여 buffy coat층을 얻은후에 HBSS로 2회 세척(500×g 10분간)하여 5% FCS-RPMI 배지에 2×10^9 cells/ml 농도로 조정하였다. 모세혈관에 부유액을 흡인하고 한쪽 끝을 Release로 밀봉하고 원심(500×g, 10 min)한 후 세포의 경계면을 절단하여 2 ml의 배양용기에 넣어 silicone grease로 부착하였다. MIF가 함유된 배양상층액을 5% FCS RPMI 배지와 동량 넣은후 30°C, 5% CO₂ 배양기에서 20시간 배양 후 유주대를 측정하였다. 이때 유주 저지율은 다음 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{Migration inhibition(\%)} = [1 - \frac{\text{area of migration in experimental well}}{\text{area of migration in control well}}] \times 100$$

탐식능 측정

탐식능의 측정은 Salitai and Kusuda(1985)의 방법에 의해서 측정하였다. 두신유래의 대식세포를 2×10^6 /ml 농도로 부유시킨 후 다양한 농도의 LMS(0, 0.1, 1 및 10 g/ml)와 formalin 처리한 1%의 *E. tarda* 균액을 0.1 ml 혼합하여 30°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 배양하였다. 배양혼합액 1 적을 슬라이드에 도말 후 Giemsa 염색하여 광학현미경으로 200개의 세포를 측정하여 탐식능을 백분율(%)로 환산하였다.

Superoxide anion(O₂⁻) 측정

Superoxide anion(O₂⁻)의 측정은 ferricytochrome C를 ferrocycytochrome C로 환원시키는 비색법으로 측정하였다(Babior, 1984). 즉 두신유래의 대식세포를 24 well plate에 well 당 3×10^6 cells/ml씩 넣고, 각 well에 다양한 농도의 LMS와 100 µl의 cytochrome C(2 mg/ml, Sigma)을 첨가하여 30°C에서 1시간 반응시켰으며, 이때 blank well에는 100 µl superoxide dismutase(2 mg/ml, sigma)를 첨가하였다. 그 후 배양액을 냉장상태로 400×g로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 UV-비색계(Shimadzu, Japan)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 cytochrome의 환원치는 $\Delta E_{550} = 2.1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ 을 사용하여 환산하였다.

Hydrogen peroxide(H₂O₂) 측정

hydrogen peroxide(H₂O₂)의 측정은 phenol red 법으로 측정하였다(Takeshige *et al.*, 1979). 즉 신장유래의 부착세포를 phenol red free-HBSS로 3회 세정한 다음 24 well plate well에 백혈구(3×10^6 /ml), phenol red(1 mg/ml, Sigma) 0.56 mM과 horseradish peroxidase(500 µg/ml, Type II, Sigma) 20 unit/ml로 조정한다음 다양한 농도의 LMS를 첨가하여 30°C에서 1시간 배양하였다. 이때 blank는 HBSS에 phenol red solution을 첨가하였다. 그 후 배양상층액을 얻은 다음 25 µl의 NaOH(3 M)을 첨가한 다음 UV-비색계(Shimadzu, Japan)를 이용하여 610 nm에서 phenol red의 산화 정도에 의한 색의 변화를 측정하였다. 이때 기지의 H₂O₂(Kanto Chemical, Japan)를 회석하여 얻은 표준 곡선을 이용하여 시료에서의 생성량을 계산하였다. 그 후 각 well당 함유하고 있는 cell protein(mg)에 의해

서 생성된 H₂O₂(nM)로 환산하였다.

Lysozyme의 측정

Grinde(1979)의 방법에 준하였다. 즉 신장유래의 부착세포를 24 well plate 각 well에 2×10^6 /ml 농도로 조정한다음 다양한 농도의 LMS를 첨가하여 30°C에서 1시간 배양한 후 원심 분리하여 상층액을 4°C에 보관한다. lysozyme활성도는 *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma)의 용해율로 측정하였다. 즉, 0.1 M potassium phosphate(pH = 7.0)에 *M. lysodeikticus*을 0.2 mg/ml되게 용해시킨 다음 각 상층액의 200 µl를 혼합하여 비색계(Shimadzu, Japan)로 530 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 lysozyme활성도는 1분에 0.001의 흡광도 감소를 가져오는 효소량을 1 unit으로 하였다.

NK세포의 활성능 측정

Grimm and Bonavida(1979)에 의한 single cell assay법을 이용하여 측정하였다. 신장유래의 비부착 백혈구를 작동세포로, 표적세포로는 마우스 림프종 세포주인 YAC-1을 이용하였으며, 이때 표적 세포 및 작동세포의 세포생존율은 각각 98% 이상이었다. 즉 작동세포와 표적세포를 동량(2×10^6 cells/ml)혼합하여 200×g로 5분간 원심하여 0.5 ml이 남도록 상층액을 제거하여 Pasteur pipette으로 부유한 후 0.5% agarose액을 첨가 혼합하였다. 혼합 즉시 조직배양 dish(Falcon)에 분주한 다음 RPMI를 증충시킨 후 30°C, 5% CO₂ 배양기에 3시간 배양하였다. 그 후 배양여액을 제거 후 0.1% trypan blue액으로 염색하고 PBS로 세정한 다음 0.5%의 formalin으로 고정시켜서 400배 광학현미경으로 검경하여 살해능을 측정하였다. 이때 살해능은 다음 공식에 의해서 산출하였다.

$$\% \text{ of NK cell} = \% \text{ of conjugated cell} \times \% \text{ of conjugated cell lysed} / 100$$

결과 및 고찰

LMS가 림프구 증식능에 미치는 영향

LMS 단독 처리시 대조군에 비해서 LMS 첨가군에서 증식능이 농도의 증가에 따라 증가되는 경향을 보였다. B-cell 마이토젠인 LPS와 LMS를 동

시에 처리시 대조군과 처리군사이에는 증식능에는 차이가 나타나지 않았다. 그러나 T-cell 마이토젠인 Con A와 LMS를 같이 처리시에는 대조군에 비해서 LMS 처리군에서는 첨가농도에 비례하여 증식도의 감소하는 현상을, PHA와 LMS를 같이 처리시는 대조군에 비해서 LMS 처리군에서는 LMS 첨가농도에 비례하여 큰 폭으로 감소를 보였다(Fig. 1). 한편, LMS는 마우스 및 사람의 흉선세포, 혈액 림프구와 과립구등의 존재하는 수용체에 다양한 친화성이 있으며 특히 미숙림프구를 분화 성숙시키는 작용을 나타내는 보고 등(Merluzzi *et al.*, 1976; Renox and Renox, 1977; Galiin *et al.*, 1976)으로 미루어 LMS 농도에 비례하여 증식능이 증가될 것으로 추정하였으나 전혀 예기치 않은 결과를 보였다. 이러한 결과는 LMS가 혼입된 대식구를 자극시켜서 PGE₂의 생산 증가로 인해 세포증식이 억제되었을 가능성을 배제할 수는 없었으나, LMS는 대식구의 PGE₂의 생성에는 관여하지 않는 점(Gilman, 1985)으로 미루어 앞으로 더 많은 검토가 필요하다. 한편, LMS로 부터 유도되는 OMPI[DL-2-oxo-(2-mercaptoethyl)-5-phenylimidazolidine] 분획물질이 농도차에 따라서 흉선세포나 혹은 T-cell 마이토젠처리시 세포 증식능에 영향을 미친다는 보고 등(Otterness *et al.* 1979; Otterness and Bliven, 1980; Hanson and Heidrick, 1991; Hanson *et al.*, 1991)으로 미루어 LMS처리시 유도되는 OMPI의 물질이 Con A 혹은 PHA에 의해서 활성화된 수용체와의 비특이적 및 경쟁적 결합으로 인하여 증식능을 억제시켰거나, 혹은 LMS

및 OMPI의 물질 등이 주요 T세포 또는 특정 아 집단세포의 특정주기를 차단 및 연장에 따른 IL2 등의 감수성이 낮은 세포주기로 변조되어서 증식능이 낮게 나타난 것으로 추정된다.

Levamisole이 lymphokine의 생산능에 미치는 영향

Levamisole은 MAF 및 MIF의 생산활성은 대조군(100%)에 비해 첨가군에서 LMS 농도에 비례하여 증가된 결과(Fig. 2)는 증식능과는 매우 대조적인 결과로서 LMS가 면역적격세포의 증식능 보다는 일련의 lymphokine의 생산 활성을 촉진시킴을 알수 있었다. 이러한 결과는 LMS는 세포의 수용체(IL-1, neopterin 및 soluble IL-2) 발현 촉진에 따른 면역작용세포로의 분화를 활성화시켜서 세포성 면역반응에 주요한 lymphokine 생산활성을 증강시킨다는 보고등(Liberman and Hsu, 1976; Kimbol *et al.*, 1991, 1993) 및 *in vivo*상에서 LMS 처리 후 뱀장어 복강 대식세포가 일련의 림포카인의 작용에 따라서 면역작용세포로 활성을 유도시켰다는 보고(Baba *et al.*, 1993)와 일치된다. 한편, 사람과 동물에 있어서 LMS 처리시 억제된 면역능을 회복시킨다는 보고(Golding *et al.*, 1976)와 LMS가 세포성 매개면역반응의 중요한 지표가 되는 MAF 및 MIF 등의 lymphokine의 생산을 활성화시킨 본 실험의 결과로 미루어 최근 각종 환경호르몬의 수계유입으로 인한 내분비계의 교란 및 고밀사육에 따른 환경적 스트레스등으로 인한 어체의 저항력 저하시 발병되는 각종 세포내재성의 세균성 및

Fig. 1. Effect of levamisole on the proliferation of non-adherent mononuclear cells. Nonadherent mononuclear cells were cultured in the presence of levamisole for 72hr. [³H] TdR(0.5 μ ci) was pulsed for 12hrs before cell harvest and radioactivity was measured by scintillation counting. Each value represents the mean cpm of triplicates. All mitogens were added at 10 μ g/ml.

Fig. 2. Effect of levamisole on Con A-induced MAF and MIF production of nonadherent mononuclear cells. Non-adherent mononuclear cells(10⁶ cell/ml) were cultured in RPMI 1640 with 5% FCS and 10 μ g/ml Con A-Sepha-rose for 40hr in the presence of levamisole. The culture supernatant was harvested and assayed for MAF and MIF. Results are normalized to the values obtained from levamisole free control supernatant and expressed as % of control.

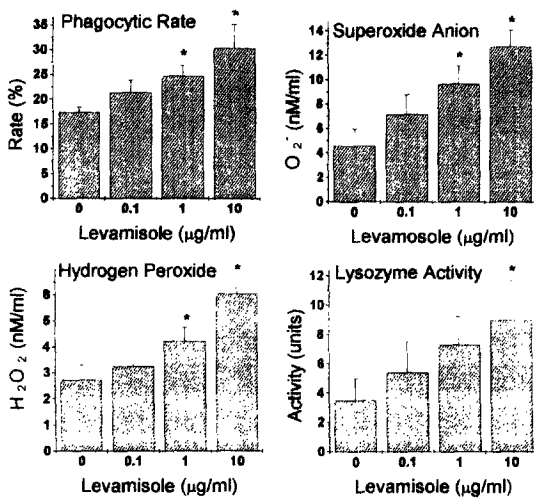


Fig. 3. Effect of levamisole on the kidney phagocytic cells in eel, A unit of lysozyme activity is defined as the amount of sample causing a decrease in absorbance of 0.001/min. Results were mean \pm standard error. * Significantly different from untreated group, at $p < 0.05$ with student's t-test.

기생충성 질병의 예방에 매우 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

LMS가 탐식세포 활성에 미치는 영향

LMS가 탐식세포의 활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 탐식능, superoxide anion(O_2^-)과 hydrogen peroxide(H_2O_2) 생성능 및 Lysozyme 활성능 등을 조사하였던 바 대조군에 비해서 LMS 처리농도에 비례하여 활성이 증가되었다(Fig. 3). 한편, Itou 등(1996, 1997)은 뱀장어의 호중구에는 myeloperoxidase의 기여로 인해서 HOCl의 생성이 안되기 때문에 효율적인 살균효과를 위해서는 산소비의존성 효소계를 활성화시키는 것이 필요하다고 주장하였는데, 본 실험 및 타 보고등(Baba *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1989; Swicki *et al.*, 1990; 1994; Geets *et al.*, 1992)에서 LMS가 양식어 탐식세포의 산소비의존 및 비의존성 효소계를 모두 활성화시키는 결과 등으로 미루어 볼때 LMS의 처리는 향후 모든 양식현장에서 질병의 예방 및 치료제로서 매우 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Levamisole이 NK세포의 활성에 미치는 영향

Levamisole이 자연살해세포의 활성에 미치는 영

Table 1. Effect of levamisole on natural killer cell activity of eel leucocytes against target cells(YAC-1)

Levamisole (g/ml)	Conjugated lymphocytes	Conjugated target cell lysed	NK cells
None	2.20 \pm 0.40	38.8 \pm 5.4	0.85 \pm 0.12
0.1	2.53 \pm 0.33	37.7 \pm 5.5	0.95 \pm 0.17
1	2.66 \pm 0.24*	38.7 \pm 4.6	1.03 \pm 0.16*
10	2.92 \pm 0.41*	40.3 \pm 4.0	1.18 \pm 0.16*

Results were average percentage and standard error from five experiments below for 1:1 effector - target cell ratio. Effector cells were pretreated for 1h at 30°C, 5% CO₂ with above concentration of levamisole before the addition of target cells. Percentage of NK cells was calculated from % of conjugated lymphocytes \times % of conjugated target cell lysed/100. *: $p < 0.05$, with student's t-test

향을 조사하였던 바, YAC-1 세포에 대한 NK 세포의 살해능은 대조군(38.8 \pm 5.4%)에 비해서 첨가군(37.7 \pm 4.4 - 40.3 \pm 4.0%)과는 큰 차이를 보이지 않았으나, 작동세포와 표적세포와의 결합율은 대조군(2.20 \pm 0.40%)에 비해서 첨가군(2.53 \pm 0.33 - 2.92 \pm 0.41%)에서 증가되어 결과적으로 자연살해세포 활성은 대조군(0.85 \pm 0.12)에 비해서 첨가군(0.95 \pm 0.17 - 1.18 \pm 0.16)에서 유의성 있는 증가를 보였다(Table 1). 본 실험에서 LMS가 직접적으로 NK 세포의 활성을 증강시켰으며, 그 작용기전은 lymphotoxin유리 및 세포의 사멸과정을 활성화 시키는 표적세포를 인식-결합하는 과정을 활성화 시킨 결과 표적세포와의 결합을 촉진시켜서 NK cell의 활성능을 증가시킨 것으로 나타났다. 이러한 결과는 LMS가 특정암세포의 MHC-1수용체 발현의 억제시킴으로써 표적세포의 살해능이 증가를 통한 항암효과를 발휘한다는 보고등(Persico and potter, 1974; Sampson and Lui, 1976; Kovach *et al.*, 1988; Kajita *et al.*, 1990)과 일치하는 것으로서 지금까지 알려진 LMS의 항암효과를 나타내는 작용기전은 암세포와의 결합친화력을 증가시키는 것이 부분적 혹은 주요한 작용 경로일 것으로 사료된다. 한편, 최근 각종 산업화의 따른 각종 중금속 등 유해물질들의 수계유입이 증가되어짐에 따라 종양성 질병 발생이 증가추세에 있는 점으로 미루어 비특이적으로 NK세포의 활성을 증가시키는 LMS는 향후 양식어의 종양성 질병의 예방 및 치료제로서도 큰 효과를 거둘수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약해보면 LMS는 림프구의 숫적인 증가보다는 분화 및 성숙을 증강시켜서 림포카인등의 생산을 활성화시켰으며, 탐식세포의 활성을 증가시켜서 산소의존성 및 비의존성 살균효소계의 활성을 증강시켰다. 또한 자연살해세포와 표적세포와의 수용체 결합촉진에 따른 자연살해세포의 활성능도 증가시켰다. 이러한 일련의 결과들은 LMS가 면역계작동세포에 직 간접적으로 작용하여 면역조절작용을 발현시키는 것으로 추정된다.

감사의 말씀

본 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공보과제(지방대학육성과제)에 의해서 수행되었습니다.

참고문헌

- Anderson, D. P., Swicki, A. K., Dixon, O. W and Lizzio, E. F. : Immunostimulation by levamisole in rainbow trout(*Salmo gairdneri*) in vivo. J. Fish Biol., 470-476, 1989
- Aoki T, T., Sakaguchi, T. and Kitao, T. : Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *E. tarda* in cultured eel. Fish Pathol., 34(3): 161-168, 1989.
- Baba, T., Watase, Y. and Yoshinaga, Y. : Activation of mononuclear phagocyte function of levamisole immersion in carp. Nippon Susian Gakkaishi, 59(2): 301-307, 1993
- Babior, B. M. : Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. Blood, 64: 959-966, 1984.
- Bellina, L. and Salerno, A. : Chicken buffy coat leukocyte as indicator cells for human leukocyte migration inhibitory factor. J. Immunol. Methods, 43: 227-233, 1987.
- Geets, A., Liewes, G. and Ollevier, F. : Efficacy of some antihelminthics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. Dis. of Aaqua. Org., 13: 123-128, 1992.
- Gallin, J. I., Golding, B., Jacobson, R., Lomnitzer, R., Koornhof, H. J. and Robson, A. R. : In vitro reversal of cellular unresponsiveness induced levamisole. Clin. Exp. Immunol., 26: 295-302, 1976.
- Gillman, S. C., Carson, R. P., Chang, H. and Lewis, A. J. : The anti-inflammatory activity of the immunomodulator WY-18,251(p-chlorophenyl) thiazolo[3,2-a]benzimidazole-2-acetic acid). Agents Actions, 17: 53-59, 1985.
- Golding, H., Golding, B., Jacobson, R., Lomnitzer, R., Koornhof, H. J. and Rabson, A. R. : In vitro reversal of cellular unresponsiveness induced by levamisole. Clin. Exp. Immunol., 26: 295-299, 1976.
- Grinde, B. : Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis., 12: 95-104, 1989.
- Grimm, E. and Bonavida, B. : Mechanism of cell mediated cytotoxicity at the single cell level estimation of cytotoxic T lymphocyte frequency and relative lytic efficiency. J. Immunol., 2861-2866, 1979.
- Hanson, K. A., Nagel, D. L., Heidrick, M. L. : Immunomodulatory action of levamisole.I. Structural analysis and immunomodulating activity of levamisole degradation products. J. Int. Pharmacol., 13(6): 655-662, 1991.
- Hanson, K. A. and Heidrick, M. L. : Immunomodulatory action of levamisole II. Enhancement of con A response by levamisole is associated with an oxidation degradation product of levamisole formed during lymphocyte culture. Int. J. I. Phamacol., 13(6): 669-76, 1991.
- Itou, T., Idia, T. and Kawatsu, H. : kinetics of oxygen metabolism during respiratory burst in Japaness eel neutrophils. Dev. Comp. Immunol. 20: 323-330, 1996.
- Itou T, Iida, T and Kawatsu, H. : The importance of hydrogen peroxide in phagocytic bacterial activity of Japaness eel neutrophils. Fish Ppathol., 32(2): 121-125, 1997.
- Kajita, Y., Sakai, M., Astuta, S. and Kobayashi, M.: The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fish pathol., 25(2): 93-98, 1990.
- Kovacs, E. J., Young, H. A., Raden, R. and Varesio, L. : Differential biochemical pathways involved in the expression of IL-1 and tumor necrosis factor in mouse peritoneal macrophages. J. Immunol., 141: 3101-3105, 1988.
- Kimball, E. S., Clark, M. C., Schneider, C. R. and Perssico : Enhancement of in vitro LPS-stimulated IL-1 production by levamisole. Clin. Immunol. and Immunopathol., 58: 385-398, 1991.
- Kusuda, R. and Taria, T.: Change of biological activities of phagocytes from the eel immunized with *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol., 25(2): 53-58, 1990.
- Liberman, R. and Hsu, M. : Levamisole mediated restoration of cellular immunity in peripheral blood lymphocytes of patients with immunodeficiency diseases. Clin. Immunol. Immunopathol., 5: 142-148,1976.
- Merluzzi, V. J., Kaiser, C. W., Badger, A. M. and Cooperband, S. R. : Differential effects of murine lymphoid tissue. Fed. Proc.(abstract), 212-213, 1976.
- Otterness, I. G., Bliven, M. L. and Holden, H. E.: Effect of levamisole on the mitosis of murine thymocyte in

- culture. *Immunopharmacology*, 1: 245-250, 1979.
- Otterness, I. G. and Bliven, M. L. : Comparative stimulatory and antimetabolic effects of levamisole and its metabolite OMPI on thymocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* 2: 23-30, 1980.
- Persico, F. J. and Potter, W. A.: The effect of levamisole on an *in vitro* model of cellular immunity. The First International Conference on Modulation of Host Immune Resistance in the Prevention or Treatment of Induced Neoplasias, Maryland, December, 1974.
- Renox, G. and Renox, M. : Thymus-like activities of sulphur derivatives on T-cell differentiation. *J. Exp. Med.*, 145: 466-472, 1977.
- Rook, G. A. W., Steele, J., Umar, S. and Dockrell, H. M. : A simple method for the solubilization of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma interferon. *J. Immunol. method.*, 82: 161-167, 1985.
- Sampson, D. and Lui, A. : The effect of levamisole on cell mediated immunity and suppressor-cell function. *Cancer Res.*, 36: 962-968, 1976.
- Salitai, F. and Kusuda, R. : Chemical composition of lipopolysaccharide from *E. tarda*. *Fish. Pathol.*, 20(3): 187-191, 1985.
- Siwicki, A. D., Anderson, D. P. and Dixon, O. W. : In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen ceels with levamisole. *Dev. Comp. Immunol.*, 14: 231-237, 1990.
- Swicki, A. K., Anderson, D. P. and Rumsey, G. L. : Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protein against frunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41: 125-139, 1994.
- Takeshige, K., Matsumoto, T., Shibata, R. and Minakami, S. : Simple and rapid method for the diagnosis of chronic granulomatous disease, measuring hydrogen peroxide and superoxide anions released from leukocytes in whole blood. *Clin. Chem. Acta.*, 92: 329-335, 1979.
- 최민순, 최상훈, 박관하, 장선일, 윤창용, 조정근, 송희종 : 뱀장어 병어로부터 분리한 *E. tarda*의 약제내성. *한국어병학회지*. 9(2): 195-201, 1996.

Effect of Levamisole on Immunomodulation of Eels (*Anguilla japonica*) *In Vitro*

**Min-Soon Choi, Kwan Ha Park, Kyung Min-Joung,
Hyun-Bin Shim and Sung-Ho Yun**

Dept. of Marine Biomedical Sciences, Kunsan National University, Chunbuk 573-400, Korea

The immunomodulatory effects of levamisole (LMS) were evaluated in leucocytes of eels in vitro. Proliferation of lymphocytes treated with T-cell mitogen (Con A or PHA) was markedly inhibited by LMS in a dose dependent manner. B cell mitogen (LPS), in contrast, slightly increased the proliferation. On the other hand, production of MIF and MAF when treated with Con A was increased in a dose-dependent way. NK cell activities were somewhat increased when LMS was pretreated and this augmentation was due to an increase in binding capacity of effector-target cell, but not due to the target cell lytic activity of effector cells. Phagocytic activity, superoxide anion formation, hydrogen peroxide formation and lysozyme activity of leucocytes were enhanced by LMS in a dose related-manner. These results suggest that LMS might modulate the immune responses by activation of cytokine production and by augmentation of leukocyte activity but not by increment of immunocompetent cell numbers.

Key words : Levamisole, NK-cells, Mitogen, Leucocytes, Cytokine