

구기자 투여가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 *Edwardsiella tarda* 백신 처리에 미치는 효과

권문경[†] · 김이청* · 손영찬 · 박수일

부경대학교 어병학과, *국립수산진흥원

본 연구에서는 구기자의 투여가 나일틸라피아의 면역 반응에 미치는 영향을 알기 위하여, 나일틸라피아에 구기자 3% 첨가 사료를 14주일간 투여하면서 어병 세균인 *Edwardsiella tarda* 유래의 FKC와 ECP를 복강 주사 또는 침지법으로 FKC와 ECP를 단독 또는 혼합 처리하였을 때의 비특이적 및 특이적 면역 반응에 대하여 조사하였다. 비특이적 면역 반응의 지표로서 보체의 용혈능과 lysozyme의 활성을, 특이적 면역 반응의 지표로서 로켓 형성 세포 수의 변화와 응집 항체를 조사하였으며, 어병 세균인 *E. taylori*로 생균 공격 실험하여 상대 생존률을 구하였다. 구기자 첨가 사료를 투여하였을 때, 조사한 모든 비특이적 면역 반응 지표들이 활성화되었으며, 백신 처리 후에도 무첨가 사료 투여구에 비하여 높은 면역 활성을 보였다. 백신 처리구의 응집 항체는 FKC와 ECP의 혼합 처리구가 가장 높았고 FKC 주사구, FKC 침지구의 순으로 응집 항체가 낮게 나타났으며, 로켓 형성 세포 수도 같은 경향을 보였다. *E. tarda*로 생균 공격 실험한 결과, 구기자 투여만으로도 방어력이 증가되었다. 그리고 백신 처리하였을 때에는 혼합 처리구가 가장 높은 방어력을 보였으므로, 본 실험에서 사용한 구기자는 기존의 adjuvant와 같이 면역 반응의 증강 효과가 있는 것으로 판단되며, FKC와 ECP로 혼합 백신 처리하는 방법은 효과가 기대되는 백신 방법으로 사료된다.

Key words : Nile tilapia, Kugija, Immune response, *Edwardsiella tarda*, FKC, ECP

우리 나라의 많은 담수어 양식장은 고밀도 집약적 양식으로 각종 질병들이 증가하고 있다. 그러나 항생제의 부적절한 투약으로 인한 내성균의 출현 등의 문제로 양식어의 세균성 질병에 대한 치료 효과가 잘 나타나지 않는 경우가 많아지고 있다. 그러므로 질병에 대한 대책으로 사육수의 살균 처리를 비롯한 몇 가지 백신 투여법 등이 시도되어 왔으며, 최근에는 유용 물질을 사료에 첨가하여 면역능을 증가시킬 수 있다는 사실이 밝혀져 이에 대한 관심이 높아가고 있다(Nematipour *et al.*, 1988; Ramadan and Sabry, 1989; Ramadan and Atef, 1991; Satoh *et al.*, 1987; Yano *et al.*, 1989). 구기자에는 간 기능을 보호하는 betaine, choline, carotene, 비타민 B₁, B₂, PP, C, 칼슘, 인, 철, 코발트 등이 함유되어 있으며, 동물 실험 결과 몸무게를 늘이는 기능과 함께 총콜레스테롤, 인지질이 늘어나는 것을 막고, 혈압과 혈당량을 낮출 뿐만 아니라 대장균이나 백색칸디다에 대한 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다(차진현,

1984). 이외에도 박 등(1992)과 차(1984)는 구기자가 세균 억제 능력이 뛰어난 것으로 보고하였다.

따라서 본 실험에서는 우리 나라의 담수어 고밀도 기온 양식의 대부분을 차지하고 있는 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에 구기자 첨가 사료를 14주 동안 투여하면서 면역 반응을 조사하였으며, 나일틸라피아 양식장에서 연중 발생하는 에드워드 병의 원인균인 *Edwardsiella tarda*의 FKC와 ECP를 제작한 다음, 사료 투여 10주째에 이들을 단독 또는 혼합 투여하여, 구기자 첨가 사료 투여 및 백신 처리가 나일틸라피아의 각종 면역 반응에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

경상남도 소재 사설 양어장에서 분양 받은 평균 어체중 50 g 정도의 나일틸라피어를 0.5 ton 용량의 순환 여과식 사육조에 2주간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 사육 수온은 22~25°C, 용존 산소는 5.3~5.5 ppm으로 유지하였으며, 면역

[†]Corresponding author

시킨 후도 같은 조건으로 사육하였다.

실험용 사료 제작 및 투여 방법

황(1997)의 방법에 따라 제조한 건조 구기자의 분말을 잉어용 분말 사료에 3%되게 첨가하여 펠렛으로 제작하였다. 제작한 사료는 일일 어체중의 2%를 4회에 나누어 14주 동안 투여하였으며, 사료 투여 10주 째 백신 처리를 하였다.

항원의 제작 및 투여 방법

실험용 균주는 -80°C에 보존된 *E. tarda* FSW 910410을 사용하였으며, 이 균주로부터 실험용 항원인 FKC와 ECP를 제작하여 각종 면역 반응을 조사하였다. 먼저 tryptic soy agar(TSA) 배지에서 27°C, 24시간 배양한 *E. tarda*를 tryptic soy broth(TSB) 배지에 접종하여 27°C, 48시간 진탕 배양한 것을 항원 제작용 균액으로 사용하였다. 배양균액을 원심 분리(4°C, 10,000 g)하여 침전된 균에 0.5% formalin을 처리하여 실온에서 48시간 작용시킨 후 생리식염수로 3회 세척(4°C, 10,000 g)한 것을 FKC로 하였다. 그리고 원심분리한 상정액(上澄液)을 0.45 µm filter로 여과하여 ECP를 제작하였다.

제작된 항원의 종류별 농도 및 투여 방법은 Table 1에 나타내었다

보체의 용혈 능력 조사

Mayer(1971)의 방법을 변형하여 용혈 반응을 시험하였다. 즉, GVB²⁺(gelatin veronal buffer: veronal buffer 200 ml, 1% gelatin solution 100 ml, 0.02M CaCl₂ · 2H₂O 5 ml, 0.1M MgCl₂ · 6H₂O 5 ml, DW 690 ml, pH 7.4)로 희석한 항 sheep red blood cells(SRBCs) 혈청과 GVB²⁺로 농도 조절한 SRBC(1×10⁹cells/ml)액을 동량으로

섞어 30°C, 30분 동안 감작시킨 후 같은 buffer로 SRBC의 농도를 3×10⁸cells/ml로 조절하여 용혈 반응 시험에 사용하였으며, 용혈 정도를 흡광도(540 nm)로 측정하였다.

혈청의 lysozyme 활성 조사

lysozyme activity는 Parry *et al.*(1965)의 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus*(0.2 mg/ml) 현탁액 950 µl와 혈청 50 µl를 혼합하여 25°C에 30초 및 4분 30초 씩 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. lysozyme activity는 units/ml로 나타내었으며, 1unit는 흡광도 값이 0.001/min 감소한 양을 기준으로 하였다.

로젯 형성

로젯 반응 시험은 Yoshida & Kitao(1990)의 방법에 따라 미부 정맥에서 채혈한 후 림프구를 분리하였다. L-15 medium으로 림프구 현탁액(1.0×10⁷cells/ml)을 맞춘 후 SRBCs(1.0×10⁸cells/ml)액과 동량으로 섞어, 20°C, 3시간 배양한 후 1% brilliant cresyl blue로 염색하여 검경하였다. 결과는 Ownby & McCullough(1983)에 따라 최소 림프구 200 cells 중 4개 이상의 SRBC가 부착된 림프구 수를 계수하여 순환 혈액 림프구 1×10⁷ cells당 로젯 형성 세포 수로 표현하였다.

응집 항체가 조사

면역시킨 후 4주 째까지 매주 미부 정맥에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 분리된 혈청을 이용하여 microtiter 법으로 응집 항체를 측정하였다.

공격 실험

E. tarda 910410을 1×10⁸cfu/ml 생리식염수가 되도록 현탁시켜 공격 실험용 세균액으로 사용하

Table 1. Vaccines and their administration methods used in this study

Vaccine composition	Treated concentration	Administration**
FKC	1 mg/fish	Intraperitoneal injection
FKC	0.1 mg/ml	Immersion for 30 min
FKC and ECP*	FKC 1 mg/fish and 20% ECP diluted with rearing water	Intraperitoneal injection Immersion for 20 min

*Immersion treatment of ECP followed immediately FKC injection.

**Each group was pretreated with or without Kugija-supplemented diet.

였다. 공격 실험은 실험 사료를 10 주 동안 투여 한 어체에 백신을 처리한 후 4 주째에 준비한 *E. tarda* 균액을 0.1 ml 씩 복강 주사하였다. 공격 실험의 결과는 누적폐사율로 나타내었다.

통계학적 분석

대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's *t*-test로 비교하였다.

결 과

보체의 용혈능

구기자 또는 백신을 투여한 실험어에서 보체의 용혈능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 구기자 투여구는 대조 사료 투여구에 비하여 높은 CH₅₀ 값을 나타내었으며, 백신 투여 후에도 보체의 용혈능은 구기자 투여구가 높게 유지되었다. 한편 구기자

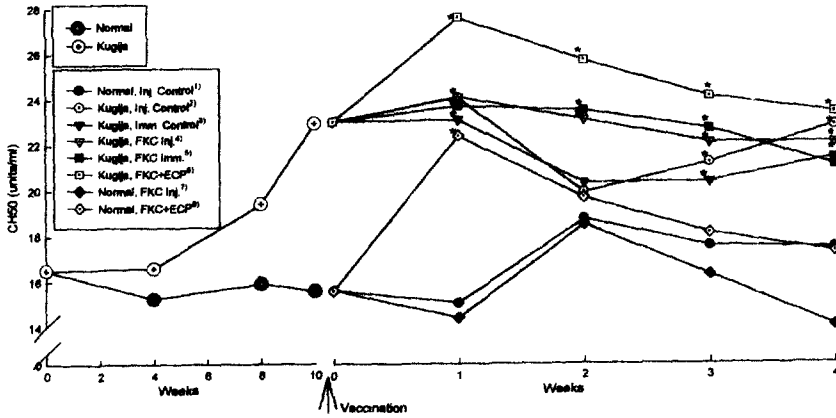


Fig. 1. Changes in the complement titer (CH50) of Nile tilapia fed on Kugija followed by immunization with different antigens.

- 1) Normal diet and 0.1 ml PS injection
 - 2) Kugija diet and 0.1 ml PS injection
 - 3) Kugija diet and 30 min fresh water immersion
 - 4) Kugija diet and 1 mg FKC i.p. injection
 - 5) Kugija diet and 30 min immersion in 0.1 mg/ml FKC
 - 6) Kugija diet and 30 min ECP immersion +1 mg FKC i.p. injection
 - 7) Normal diet and 1 mg FKC i.p. injection
 - 8) Normal diet and 30 min ECP immersion +1 mg FKC i.p. injection
- *significant difference from control, P<0.05.

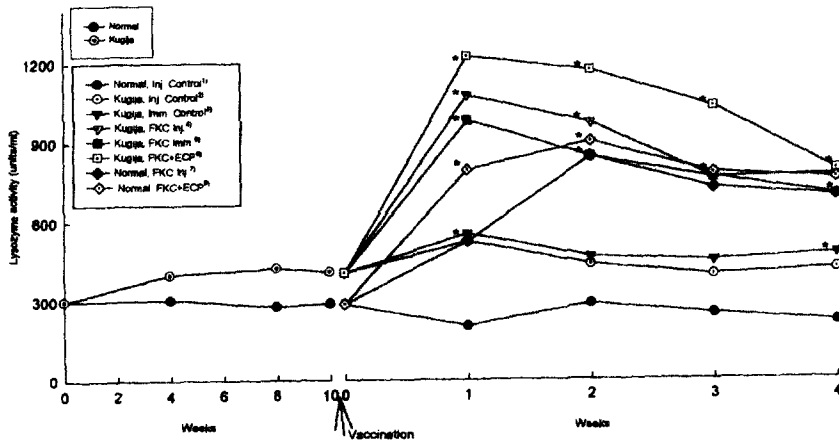


Fig. 2. Lysozyme activity in the serum from Nile tilapia fed on Kugija followed by immunization with different method Refer to Fig. 1 for symbols.

*significant difference from control, P<0.05.

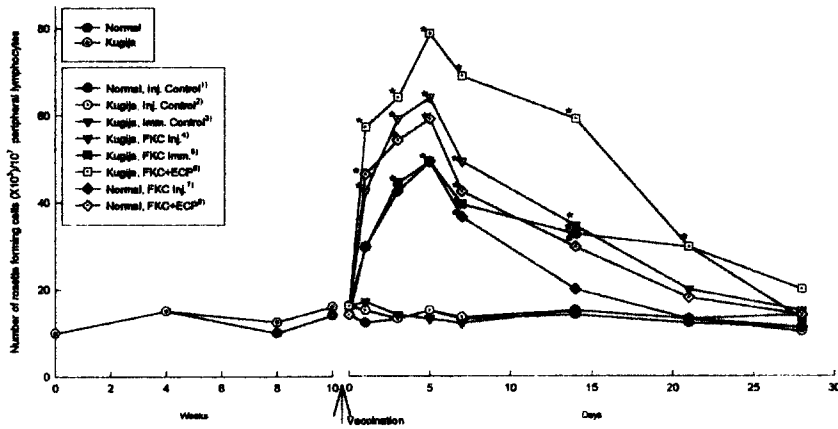


Fig. 3. Kinetics of rosette forming cells ($\times 10^3/10^7$ lymphocytes) in the peripheral blood of Nile tilapia fed on Kugija followed by immunization with several different methods. Refer to Fig. 1 for symbols. *significant difference from control, $P < 0.05$.

와 백신을 투여한 시험구 중에서는 FKJ와 ECP를 혼합 투여한 시험구의 용혈능이 가장 높게 나타났는데, 백신 투여 후 1주째부터 현저하게 높은 용혈능을 보이기 시작하여, 실험 종료시까지 높은 수준을 유지하였다.

혈청의 lysozyme 활성

혈청의 lysozyme 활성 조사의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 혈청의 lysozyme 활성은 구기자 투여구에서 유의적으로 높게 나타났으며, 백신 처리 이후에도 같은 경향을 보였으며, 백신 처리구 중에서는 FKJ와 ECP 혼합 처리구에서 가장 높은 활성을 보였다.

로제트 형성 세포(Rosette forming cells, RFCs)

May-Giemsa 염색하여 림프구 10^7 cells 중의 로제트 형성 세포 수를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 백신 처리구에서 백신 처리 1일째부터 증가하여 5일째 최고 값을 보였으며, 점차적으로 감소하여 백신 처리 후 4주째에는 대조구와 비슷한 상태로 되었다. 또, 백신 처리구 중에서는 FKJ와 ECP의 혼합 처리구에서 RFCs의 수가 가장 많았다.

응집 항체가

실험어에 백신을 처리한 후 응집 항체를 조사한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 모든 실험구에서 백신 처리 후 1주째부터 응집 항체가 증가하기

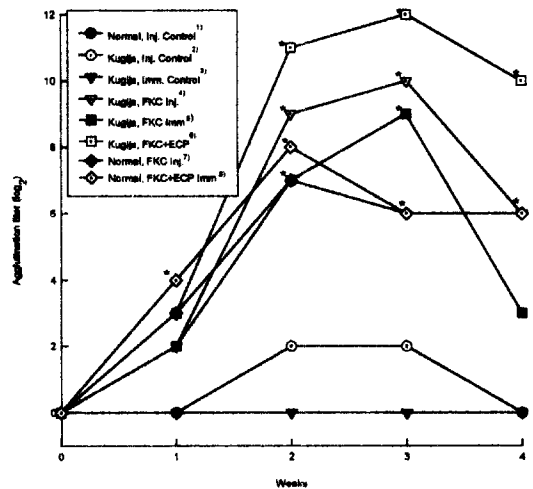


Fig. 4. Agglutination titer in the serum of Nile tilapia fed on Kugija followed by immunization with different methods. Refer to Fig. 1 for symbols. *significant difference from control, $P < 0.05$.

시작하였으며, 구기자 투여구가 대조 사료 투여구에 비하여 높은 응집 항체를 보였다. 백신 처리구 중에서는 FKJ와 ECP의 혼합 처리구에서 가장 높은 값을 나타내었고 응집 항체도 지속적으로 높게 관찰되었다. 다음으로 FKJ 주사구에서 높게 나타났으며 FKJ 침지구의 순으로 낮아지는 것을 알 수 있었다.

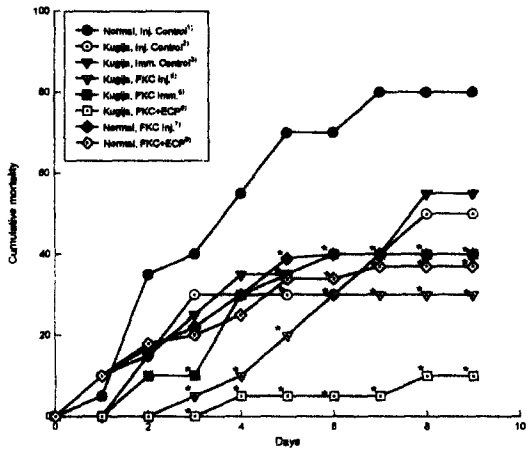


Fig. 5. Effect of Kugija on cumulative mortality of Nile tilapia following intraperitoneal injection of *Edwardsiella tarda* FSW 910410 (1.0×10^8 /fish). Refer to Fig. 1 for symbols. *significant difference from control, $P < 0.05$.

E. tarda에 대한 방어력

실험어에 *E. tarda* FSW 910410의 생균을 이용하여 공격 실험한 후 누적 폐사율을 조사한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 공격 실험에서 대조 사료 투여구가 가장 높은 폐사율을 보였으며, 구기자 투여구 중 백신 처리 방법에 따라서는 FKC 침지구의 폐사율이 가장 높고 이어서 FKC 주사구, FKC와 ECP 혼합 처리구의 순으로 낮아지고, 백신의 혼합 처리구 *E. tarda*에 대하여 가장 방어력이 높았다.

고 찰

양식 산업에서 경제성과 경쟁력을 높이기 위하여 어류의 성장을 촉진시키고 질병에 대한 방어력을 증가시키고자 필요한 여러 가지 방법들이 연구되고 있다.

그 중에도 어류의 성장률을 증가시키기 위하여 사료의 질을 개선시키는 방법이 다각도로 연구되고 있으며(Yone *et al.*, 1986; Nematipour *et al.*, 1988), 사료에 유용 물질을 첨가하여 성장 뿐만 아니라 질병에 대한 방어력도 증가시키고자 하는 노력(Nakagawa *et al.*, 1981, 1984; Matsuo & Miyazono, 1993; Satoh *et al.*, 1987)도 계속되고 있다. 이외에도 특정 질병의 예방을 위해서 여

러 가지 백신의 제작법 및 처리 방법들이 연구되고 있다.

본 실험에서는 구기자 첨가 사료를 나일틸라피아에 투여하면서 각종 백신을 투여한 후, 이들이 나일틸라피아의 생체 방어에 미치는 효과를 밝히고자 보체의 용혈능, 혈청 중의 lysozyme, lymphocytes의 로켓 반응 및 응집 항체가 등을 조사하였다.

경골 어류의 보체계는 포유류와 유사하여 뱀장어(Iida & Wakabayashi, 1983; Kusuda & Fukunaga, 1987), 잉어(Yano *et al.*, 1985; Matsuyama *et al.*, 1988a), 차벌메기(Ourth & Wilson, 1982; Lobb & Hayman, 1989), 은어(Matsuyama *et al.*, 1988b; Yano *et al.*, 1988) 및 나일틸라피아(Matsuyama *et al.*, 1988b; Yano *et al.*, 1988)등 여러 어종에서 고전 경로와 대체 경로의 존재가 확인되었다. 그리고 Yano *et al.* (1988)은 포유류의 보체계와 비교해 볼 때, 어류의 보체계는 고전 경로에 의한 활성의 의존도가 더 높은 것으로 보고하였다. 경골 어류의 보체는 용균, 외독소 중화(Sakai, 1984a), 기생충의 용해(Wehner & Woo, 1980; Bower & Evelyn, 1988) 등의 직접적 항미생물 작용 외에 식세포에 대한 옵소닌 효과도 나타낸다.

본 실험에서 보체의 고전 경로에 의한 면역적 혈구에 대한 용혈능을 Mayer법의 변법으로 실험해 본 결과, 활성이 구기자 투여 및 백신 처리에 의해 증가되었으며, 특히 FKC와 ECP 혼합 처리구에서 가장 높게 나타났다.

보체의 활성화에 관해서는 Obach *et al.*(1993)이 sea bass에 비타민 E를 첨가하여 투여하였을 때, CH_{50} 의 증가를 확인하였고, 병원성 세균에 대한 방어능도 증가한다고 보고하였다. 그리고 Yano *et al.*(1989)은 사료에 glucan을 첨가하여 투여하였을 때 보체의 활성을 확인하였으므로 본 실험에서 사용한 구기자도 어류의 보체 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 사료된다.

하등 척추동물에 속하는 어류는 고등 척추동물에 비하여 비특이적 방어기구에 대한 의존성이 높은 것으로 여겨지고 있으며, 그 중에 대표적인 것으로 lysozyme을 들 수 있다(Ellis, 1982). 실제로 lysozyme은 많은 어류에서 정균 효과가 있다는 보고가 있으며(Grinde, 1989), 김 등(1992)은 넙치의

lysozyme이 *Micrococcus luteuse*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 높은 정균 효과를 갖는다고 하였다.

박 등(1996)은 한국산 메기(*Silurus asotus*)에 β -glucan을 접종하였을 때 lysozyme 증강 작용을 관찰하였으며, 이것이 방어력의 강화와 관련이 있다고 하였다.

본 실험에서도 구기자 첨가 사료의 투여는 어류의 lysozyme 활성을 증가시켰으며, 백신 처리에 의해서도 그 활성의 증가가 나타났다. 특히 FKc와 ECP를 혼합 처리한 실험구에서 비특이적 면역계를 더욱 자극하여 lysozyme의 분비를 자극한 것으로 생각되어지며, 이러한 활성은 실제 생체의 방어에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

나일틸라피아의 순환 혈액 림프구의 로젯 형성은 20°C, 3시간일 때가 가장 뛰어난 것으로 밝혀져, 잉어의 15°C, 3시간(조와 박, 1996), 넙치의 20°C, 4시간(최, 1995)과 비교하여 보면 어종에 따라 로젯 형성 온도와 배양 시간에서 차이가 있는 것으로 생각된다. 한편 구기자 투여 및 백신 처리가 나일틸라피아의 로젯 형성 세포 수를 증가시키는 것으로 나타났다. Sakai *et al.*(1989)는 Formalin killed *Renibacterium salmoninarum*으로 복강 주사시 로젯 형성 세포 수가 증가되었으며, 조와 박(1996)은 mitogen으로 LPS를 투여하였을 때에는 로젯 형성 세포 수의 변화가 없었지만, BCG와 PHA 투여구에서는 로젯 형성능이 가장 높아서, BCG와 PHA 투여 후 증가한 세포군이 T-like cell로서 로젯을 형성한 것으로 추정된다고 하였다.

일반적으로 어류 림프구의 면역 기능이 포유류와 유사한 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서 로젯을 형성한 세포가 포유류의 T cell과 유사한 작용을 한다면, 로젯 형성 세포의 수가 백신 1주일째부터 증가한 것으로 보아 이때에 이미 세포성 면역에 관여하는 세포의 증식, 분화가 이루어지는 것으로 추정되며 투여 백신 중에는 T-like cell을 자극하는 mitogen이 혼합되어 있는 것으로 생각된다.

백신 처리 후 응집 항체가를 조사한 결과 구기자 투여구가 대조 사료를 투여한 실험구보다 높은 항체가를 나타내었으며, 백신 처리구 중에서는 FKc와 ECP의 혼합 처리구가 가장 높았고, 주사

구, 침지구의 순으로 낮아지고 있었다. Sakai *et al.*(1984)는 무지개송어에 주사법 및 침지법으로 백신 처리하여 응집 항체가를 조사한 결과, 주사구, 침지구, 내조구의 순으로 낮아져서 본 실험과 같은 경향을 보였다. 이것으로 볼 때 생약재 및 백신 처리는 특이적 면역계를 활성화시키며, 백신 처리 방법에 따라 활성화에 미치는 영향이 다른 것으로 생각된다.

잉어, 무지개송어, chinook salmon, 메기, 대서양연어 등 여러 가지 어류에 glucan을 투여하면 비특이적 면역능이 증가되며, 비특이적 면역 증강제는 비특이적 면역 반응 뿐만 아니라 특이적 면역 반응계의 활성화에도 관여하여(Niki *et al.*, 1993), 감염성 질병의 예방적인 면에서 유용한 것으로 생각되고 있다.

세균을 배양하였을 때 배양액에 분비되는 ECP는 세균의 속 및 종간에서 그 성분이 다르며, strain의 독성에 따라서도 다르다(Magarinos *et al.*, 1994). Suprpto *et al.*(1996)은 *E. tarda*의 ECP에서 toxin을 분리, 정제하였을 때 37kDa에서 proteolytic activity가 있는 물질이 검출되었으며, 이 물질은 virulent strain에서만 나타난다고 하였다. Magarinos *et al.*(1994)는 *Pasteurella piscicida*에 대한 ECP가 어류의 방어력에 좋은 영향을 미치는 것으로 보고하였으며, Sakai(1984b)는 *Aeromonas salmonicida*의 ECP로 무지개송어의 보체를 활성화시켰다고 보고하였다. 본 실험에서 사용한 *E. tarda*는 어독성 균주이므로 배양액에 toxin이 있을 것으로 추측되며, 이러한 물질이 나일틸라피아의 면역계를 자극하여 방어능을 증가시키는 것으로 생각된다. 본 실험에서 다른 항원의 단독 투여보다 균체 항원인 FKc와 균체의 성분인 ECP를 혼합 사용한 실험구의 방어력이 높게 나타난 것은 FKc와 ECP가 B cell과 T cell에 대한 mitogen으로서 작용이 서로 다른데 기인했을 가능성이 있으나, 이에 대해서는 앞으로 계속 검토해보고자 한다. 그리고, FKc와 ECP의 혼합 투여구에서는 T cell, B cell 모두 자극되고 단독 투여구 보다 보체 및 lysozyme의 활성이 높게 나타났으며, 어병 세균인 *E. tarda*의 공격 실험에 대한 생존률이 다른 실험구보다 높게 나타나서 방어력의 증강 효과가 가장 좋았던 것으로 판단되었다.

참고문헌

- Bower, S. M. and Evelyn, T. P. T.: Acquired and innate resistance to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Dev. Comp. Immunol., 12: 749-760, 1988.
- Ellis, A. E.: Difference between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In Microbial Diseases of Fish. ed. by R. J. Roberts, pp. 1-29, 1982.
- Grinde, B.: Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis., 12: 95-104, 1989.
- Iida, T. and Wakabayashi, H.: Bactericidal reaction by the alternative pathway of fish complement. Fish Pathol., 18(2): 77-83, 1983.
- Kusuda, R. and Fukunaga, T.: Characterization of antibody dependent hemolytic activity in eel serum. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 111-2115, 1987.
- Lobb, C. J. and Hayman, J. R.: Activation of complement by different immunoglobulin heavy chain isotypes of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Mol. Immunol., 26: 457-465, 1989.
- Magarinos, B., Romalde, J. L., Santos, Y., Casal, J. F., Barja, J. L. and Toranzo, A. E.: Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against Pasteurella piscicida. Aquaculture, 120(3-4): 201-208, 1994.
- Matsuo, K. and Miyazono, I.: The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(8): 1377-1379, 1993.
- Matsuyama, H., Tanaka, K., Nakao, M. and Yano, T.: Characterization of the alternative complement pathway of carp. Dev. Comp. Immunol., 12: 403-408, 1988a.
- Matsuyama, H., Nakao, M. and Yano, T.: Compatibilities of antibody and complement among different fish species. Nippon Suisan Gakkaishi, 54: 1993-1996, 1988b.
- Mayer, M. M.: Complement and complement fixation. In: Kabat, E. A. (ed) Experimental immunochemistry, 2nd ed. Charles C. Thomas, Springfield IL, pp. 133-240, 1971.
- Nakagawa, H., Kasahara, S., Uno, E., Minami, T. and Akira, K.: Effect of *Chlorella*-extract supplement in diet on resisting power against disease of cultured ayu. Aquaculture, 29(2): 109-116, 1981.
- Nakagawa, H., Kasahara, S., Sugiyama, T. and Wada, I.: Usefulness of *Ulva*-meal as feed supplementary in cultured black sea bream. Aquaculture, 32 (1): 20-27, 1984.
- Nematipour, G., Nakagawa, H., Kasahara, S. and Ohya, S.: Effect of dietary lipid level and *Chlorella*-extract on ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(8): 1395-1400, 1988.
- Nikl, L., Evelyn, T. P. T. and Albright, L. J.: Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3-glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org., 17: 191-196, 1993.
- Obach, A., Quentel, C. and Laurencin, F. B.: Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Dis. aquat. Org., 15: 175-185, 1993.
- Ourth, D. D. and Wilson, E. A.: Alternate pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*. Dev. Comp. Immunol., 6: 75-85, 1982.
- Ownby, D. R. and McCullough, J.: An improved technique for separating rosetted from non-rosetted lymphocytes. J. Immunol. Methods, 56: 281-284, 1983.
- Parry, R. M., Chandau, R. C. and Shahani, R. M.: A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119: 384-386, 1965.
- Ramadan, A. and Sabry, M.E.: Comparative studies on the growth promoting effect of probioticum "S" and flavomycin in chickens. J. Egypt. Vet. Med. Association, 49: 617-634, 1989.
- Ramadan, A. and Atef, M.: Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen "S") on growth rate of tilapia fish. In proceedings of the 5th Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, 18-22, Copenhagen-Denmark. Acta Veterinaria Scandinavia 87(suppl.): 304-306, 1991.
- Sakai, D. K.: Opsonization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudate cells isolated from salmonid fishes. J. Fish Dis., 7: 29-38, 1984a.
- Sakai, D. K.: The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and the correlation of complement activities with the inactivation of lethal toxicity products. J. Fish Dis., 7: 329-338, 1984b.
- Sakai, M., Aoki, T., Kitao, T., Rohvec, J. R. and Fryer, J. L.: Comparison of the cellular immune response of fish vaccinated by immersion and injection of *Vibrio anguillarum*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50(7): 1187-1192, 1984.
- Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M.: The immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, vaccinated by *Renibacterium salmoninarum*. Program of the first international marine biotechnology conference IMBC '89, 71, 1989.
- Satoh, K., Nakagawa, H. and Kasahara, S.: Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red seabream. Nippon Suisan Gakkaishi, 53(7): 1115-1120, 1987.
- Secombes, C. Chung, J. S. and Jeffries, A. H.: Superox-

- ide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome c. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 201-206, 1988.
- Suprpto, H., Hara, T., Nakai, T. and Muroga, K.: Purification of a lethal toxin of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol.*, 31(4): 203-207, 1996.
- Wehnert, S. D. and Woo, P. T. K.: In vivo and in vitro studies on the host specificity of *Trypanoplasma salmositica*. *J. Wild. Dis.*, 16: 183-190, 1980.
- 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. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51: 841-846, 1985.
- Yano, T., Hatayama, Y., Matsuyama, H. and Nakao, M.: Titration of the alternative complement pathway activity of representative cultured fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(6): 1049-1054, 1988.
- Yano, T., Mangindaan, R. E. P. and Matsuyama, H.: Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some beta-1,3-glucan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1815-1819, 1989.
- Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K.: Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(10): 1817-1819, 1986.
- Yoshida, T. and Kitao, T.: Spontaneous rosette formation of carp peripheral leucocytes with mammalian red blood cells. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(10): 1579-1585, 1990.
- 김진우, 박수일, 전세규: 양식 넙치로부터의 Lysozyme 정제와 병원성 세균에 대한 정균작용. *J. Fish Pathol.*, 5(2): 61-76, 1992.
- 박성우, 김영길, 최동립: β -glucan을 접종한 한국산 메기 (*Silurus asotus*)의 호중구와 리소자임 활성 증가. *J. Fish Pathol.*, 9(1): 87-93, 1996.
- 박옥연, 장동석, 조화래: 한약재 추출물의 항균 효과 검색. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 21(1): 91-96, 1992.
- 조미영, 박수일: Mitogen 투여에 대한 잉어 순환 혈액 림프구의 반응. *J. Fish Pathol.*, 9(1): 95-109, 1996.
- 차진현: 실용동의약학, 일월서각, 1984.
- 최인숙: 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 *Edwardsiella tarda*에 대한 면역 반응. 석사 학위 논문, 부산수산대학교, 1995.
- 황미혜: 나일틸라피야, *Oreochromis niloticus*의 면역 반응에 대한 생약재 투여 효과. 석사 학위논문, 부경대학교, 1997.

The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*

Mun Gyeong Kwon, Yi-Chung Kim*, Young-Chan Sohn and Soo-Il Park

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University

**National Fisheries Research and Development Institute*

To study the supplementing effects of kugija, *Lycium chinense*, in commercial diet on the immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, nonspecific immune responses were investigated. The activities of complement and lysozyme were higher in sera of the fish fed diet with kugija than control diet. The effects of kugija on vaccination of fish to *Edwardsiella tarda* were compared in three different vaccination methods after feeding kugija for ten weeks. Intraperitoneal injection and bath administration with formalin killed cells (FKC) and bath with extracellular products (ECP) after injection of FKC showed differences in immune responses of vaccinated fish. Bath administration with ECP after injection of FKC was more stimulated than any other methods in each of nonspecific and specific responses such as the activities of complement and lysozyme, antibody production and rosette forming cells. Moreover, cumulative mortality was significantly lower in the fish vaccinated with combination FKC and ECP after injection challenge with live *E. tarda*.

Key words : Nile tilapia, Kugija, Immune response, *Edwardsiella tarda*, FKC, ECP