



## *Edwardsiella tarda*에 대한 미꾸라지의 항체 특성과 PS-K의 면역증강효과 분석

전려진, 이 영<sup>1</sup>, 김명석<sup>2</sup>, 정현도\*

부경대학교 수산생명의학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 고성수산사무소, <sup>2</sup>국립수산과학원 병리연구팀

## Characterization of Antibody and Enhanced Immune Response by PS-K against *Edwardsiella tarda* in Loach *Misgurnus mizolepis*

Lyu Jin Jun, Young-Lee<sup>1</sup>, Myoung Sug Kim<sup>2</sup> and Hyun Do Jeong\*

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>National Fisheries Research and Development Institute, Goseong Fisheries Office, Goseong 638-805, Korea

<sup>2</sup>National Fisheries Research and Development Institute, Pathology Team, Busan 619-902, Korea

Two different *Edwardsiella tarda* isolates, KFE and Edk-2, were obtained from Korea and Japan respectively. On the base of the previous results showing higher pathogenicity of *E. tarda* KFE compared to that of *E. tarda* Edk-2 isolate, we tried to determine the differences of antigenicities of these two isolates in loach which is one of the important species in freshwater aquaculture in Korea. Concentration of specific antibody in the serum appeared to be much higher in loach immunized with FKC of *E. tarda* Edk-2 than those found in loach immunized with FKC of *E. tarda* KFE. Cross-reaction analysis using agglutination test with normal and antigen-absorbed antisera implied the differences epitopes in the antigens of these *E. tarda* isolates. For the comparison of bactericidal activity of the produced antibody with different antigens, absorption analysis was performed and confirmed the presence of critical epitopes in the FKC of *E. tarda* KFE strain. The prophylactic agent, polysaccharide-bound protein (PS-K) injected 1 week before the artificial infection with *E. tarda* KFE isolates decreased the cumulative mortality in loach and would be an effective method to prevent the occurrence of bacterial infection including *E. tarda*.

**Keywords:** Loach, *Edwardsiella tarda*, Cross reaction, Defence system

### 서 론

우리나라의 양식 산업에 있어서 양식 회수가 거듭되고 어류의 사육밀도가 높아짐에 따라서 양식 환경의 악화, 어류 내병성의 저하 및 세균 감염기회의 증대로 인한 다양한 질병이 발생되고 있으며 이러한 질병들로 인해 생산력의 저하, 품질 하락 등의 원인으로 막대한 경제적 손실을 가져오고 있다. 이 중에서도 세균성 질병인 edwardsiellosis로 인한 피해가 크다(Miwa and Mano, 2000). Edwardsiellosis의 원인균인 *Edwardsiella tarda*는 담수어인 뱀장어(Alcaide et al., 2006), 잉어(Sae-Dui et al., 1984), 틸라피아(Clavijo et al., 2002), 등과 해수어인 감성돔(Kusuda et al., 1977), 참돔(Nakatsugawa, 1983), 넙치(Bang et al., 1992) 등 여러 가지 경골어류에 감염하여 질병을 일으킨다. 감염시 일반적인 임상 증상으로서의 복수에 의한 복부팽만, 안

구백탁, 체색흑화, 탈장, 항문 부위의 출혈, 그리고 간, 신장, 비장이나 아가미에 작은 흰색 결절 형성 등으로 알려져 있다 (Mohanty and Sahoo, 2007).

미꾸라지에 대한 *E. tarda* 감염 예는 외국에서는 보고되어진 바가 있으나(Liu and Fong, 1987 ; Park et al., 1983) 우리나라에서는 없을 뿐만 아니라 다른 담수어에 비해 미꾸라지를 사용한 어류질병 세균의 항원성 및 병원성 연구는 되어진 바가 없으며, 특히 미꾸라지의 면역반응에 대한 연구는 미비한 실정이다.

어류의 질병을 관리하는 방법은 질병의 치료 외에 질병을 예방하는 방법이 더 근본적인 관리대책이라 할 수 있다. 어류의 질병예방법으로는 백신을 통한 특이적 면역반응 증진 및 각종 생리활성물질들을 이용한 면역 반응 증진법을 들 수 있다. 최근 까지 양식어의 주요 질병에 대한 백신 개발에 대한 연구가 많은 학자들에 의해서 진행되어 있으나(Christopher et al., 2006) 아직까지는 경제적이면서 실용적인 백신은 일부의 질병에 국한된 상태이다. 백신은 병인이 분명하게 알려져 있는 하나의 질병

\*Corresponding author: jeonghd@pknu.ac.kr

에 대해서만 특이적 면역반응을 증강시켜 줌으로 단순감염 보다는 복합감염이 일어나기 쉬운 어류질병의 특성상 어류 질병을 예방하는데 있어 한계를 가지고 있다. 그러므로 각종 생리활성물질들을 이용하여 어류의 면역반응을 활성화함으로써 여러 종류의 어류 질병들의 복합적인 감염에 대하여 광범위하게 저항성을 증진시켜줄 수 있는 면역 증강제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Jo et al., 2002). 이에 관련된 보고중에 미생물의 세포벽 구성 성분으로서 불용성 다당류인 glucan이나 (Yano et al., 1989 ; Anderson, 1992) BCG (Bacillus Calmette-Guerin) (Sakha and Behbahan, 2008) 등은 면역 증강 작용이 있는 것으로 확인되었다. 이러한 물질들은 고등동물의 방어 기작을 자극하여 비특이적, 특이적 면역반응에 중요한 역할을 하며 동시에 항암 효과 및 항균활성 등의 기작을 가진다(Seljelid et al., 1987). 이와 유사한 물질들은 균류, 지의류, 효모, 식물 등에서 수 없이 많이 분리되었는데 그 많은 부분을 비특이적 생체 방어력 증강 효과를 가지고 있는 다당류 계열의 고분자 물질이 차지하고 있다(Duffus et al., 1982). 그 중에서도 polysaccharide-bound protein (PS-K) 는 Basidiomycetes 계열의 *Coriolus versicolor*로부터 열탕으로 추출된 protein-bound polysaccharide 로서 포유류에서 항암 효과를 가지며 나일 틸라피아에서 질병 예방제 및 면역보조제로서의 효과가 입증되어져 있다(Park et al., 1997).

본 연구에서는 병원성이 약한 *E. tarda* Edk-2 그리고 병원성이 강한 *E. tarda* KFE 두 균주의 항원성에 대한 연구로 혈청학적인 방법을 이용하였다. 각 균주의 항원을 제작하여 미꾸라지에 접종한 후 응집항체와 각 균주에 대한 미꾸라지 항혈청의 교차반응 및 살균 능력 등을 관찰함으로써 병원성과 항원의 변화 그리고 이에 대응하는 미꾸라지의 방어체계 변화를 분석하였다. 동시에 *E. tarda*가 미꾸라지에 대해서도 병원성이 있다면 그에 대한 예방책으로, 세균병에 대한 저항력 증강효과가 있다고 보고되어 있는 PS-K의 투여효과를 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 어류 및 균주

실험어는 평균 어체중 15 g 정도의 시판되고 있는 양식산 미꾸라지를 구입하였으며 외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 개체들을 사용하였다. 실험어를 50 L용량의 실험용 수조에 수용하고 수온을 25°C 로 유지하여 2주정도 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. 일본의 뱀장어에서 분리한 *E. tarda* Edk-2 와 우리나라의 넙치에서 분리한 *E. tarda* KFE를 API 20E kit 를 사용하여 *E. tarda*임을 확인한 후 사용하였다.

### 항원제작 및 접종

Formalin killed cell (FKC) 는 상법(Itami et al., 1989)에 따라 제조하여 미꾸라지를 면역시키는 항원과 항혈청의 응집항체

가 측정 시 항원으로 사용하였다. *E. tarda* Edk-2 와 *E. tarda* KFE의 FKC를 PBS로 3번 washing한 후 동량의 FCA (Freund's Complete Adjuvant, Sigma)와 혼합하여 어체중 1 kg 당 10 mg의 농도로 0.1 mL씩 복강 주사하였다. 넙치와 토끼의 항혈청은 실험실에서 제작되어 보관하고 있는 것을 사용하였다.

### 응집항체가 측정 및 교차반응 분석

주사한 후 1, 2, 3, 5, 7 주째에 실험어의 미부정맥에서 채혈하여 혈청을 분리하였다. 혈청내 형성된 항 *E. tarda* 항체의 측정은 U형 96 well plate에 연속적으로 2배 희석된 항혈청을 각 well에 50 µL씩 가하고 준비된 항원을 4 mg/mL로 50 µL씩 첨가하여 습윤기에서 실온, overnight 동안 반응시킨 후 응집과가 형성되는 최대 희석 배수를 응집항체가로 결정하였다. *E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* KFE에 대한 미꾸라지, 넙치 및 토끼 항혈청과 *E. tarda* Edk-2, *E. tarda* KFE, *Vibrio anguillarum* HUF5001, *Yersinia ruckeri* 11-4, *E. tarda* H-4의 FKC로 응집항체를 측정하여 교차반응을 비교하였다.

### 미꾸라지와 넙치 및 토끼 항혈청의 흡착

흡착시키고자 하는 FKC 항원 500 mg을 10,000 g에서 20분간 원심 분리하여 PBS 완충용액(pH 7.2) 으로 3회 세척한 후 1:3 으로 희석한 *E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* KFE에 대한 미꾸라지 항혈청과, 1:10 으로 희석한 *E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* KFE 에 대한 넙치, 토끼의 항혈청 500 µL에 현탁시켜 25°C 에서 1시간 동안 교반하면서 흡착하였다. 그리고 다시 10,000 g에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 이용하여 미꾸라지 항체의 살균 능력 조사에 사용하였다.

### 살균능력 조사

살균 작용 시험의 결과 판정은 항혈청과 실험균 *E. tarda*를 반응시켜 시간 경과별로 나타나는 생균수의 변화를 지표로 하였다. 여기에 사용된 항혈청은 각 *E. tarda*에 대하여 항체가 1:960 으로 동일한 것으로 사용하였고, 대조구로는 PBS가 접종된 미꾸라지 혈청을 사용하였다. 살균 반응은 각 실험구의 혈청과 GVB<sup>2+</sup> (gelatin veronal buffer; veronal buffer 200 mL, 1% gelatin solution 50 mL, 0.02M CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 5 mL, 0.1M MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 5 mL, DW 740 mL pH 7.4)를 1:12 로 혼합 희석한 다음, 10<sup>5</sup> cfu/mL 으로 조정된 *E. tarda* 세균 부유액과 1:1 로 혼합하여 실험하였다. 세균과 희석된 혈청 혼합액을 25°C 로 조정된 진탕 배양기로 반응시키면서 0, 1, 3, 6 시간 경과할 때마다 단계 희석하여 Bosnea et al. (2000)에 따라 균 집락수를 계수하여 생균수를 측정하였다.

### PS-K의 효과 분석

PS-K의 세균성 질병 예방효과를 보기 위하여서는 PS-K를 0.1 mg/g 당 어체중의 농도로 복강주사한 후 1주째에 *E. tarda*

KFE를 배양, 세척한 후  $10^6$  cfu/fish 농도로 실험구당 10 개체에 각각 0.1 mL씩 복강 주사하여 7일간의 누적 폐사율을 조사하였다. 대조구로는 실험어에 PBS를 0.1 mL씩 복강 주사한 후 1주째에 동일한 방법으로 생균을 주사하였다.

## 결 과

### 혈청내 특이 항체의 변화

*E. tarda* KFE와 *E. tarda* Edk-2의 FK (10 mg/Kg body weight)를 미꾸라지의 복강내에 접종 후 혈청내 특이 응집 항체를 분석하였다. 접종 후 2주째부터 두 그룹 모두 응집항체가 증가하기 시작하여 3주째에 최고 수준에 도달하였으며 그 후 서서히 감소하였으나 7주째까지 검출되어졌다. 전체 실험 기간에 걸친 응집 항체 역가의 비교에서 *E. tarda* Edk-2의 FK를 투여한 실험구의 혈청내 특이 응집 항체는 *E. tarda* KFE의 FK를 접종한 실험구에 비해 4배 이상 높게 나타났다(Fig. 1).

### 교차반응 분석

항혈청의 교차반응성을 응집항체가 측정법으로 분석하여 보았다. *E. tarda* Edk-2와 *E. tarda* KFE에 대한 미꾸라지의 항혈청의 응집항체는 10-20으로서 낮은 교차반응성을 보여주었다. 그리고 *E. tarda* 균주들과 다른 4종의 어류병원세균과는 교차 반응이 나타나지 않았다. 넙치 및 토끼 항혈청을 사용했을 때에도 Edk-2와 KFE는 서로간에 20-160의 낮은 항체를 보여 낮은 교차 반응성을 보였다. 그리고 국내에서 분리된 *E. tarda* H-4와 *E. tarda* KFE는 서로 간에 높은 교차반응성을 보였다 (Table 1).

### 미꾸라지 항체의 살균 능력

*E. tarda* KFE에 대한 항혈청의 살균효과 실험결과, PBS를 접종한 대조구 혈청과 반응시킨 *E. tarda* KFE의 실험 시작시의 세균수가  $7.0 \times 10^4$  cfu/mL에서 반응 6시간 경과 후에는  $6.55 \times 10^5$  cfu/mL로 약 9배 정도 증가한 것에 비해, *E. tarda* KFE에 대한 항혈청과 반응시켰을 때는 시작시의 세균수에 비해 약 2배 정도만 증가하였다. *E. tarda* KFE의 FK로 흡착시킨 항혈청과 반응시켰을 때에는 실험 시작시의 세균수가  $7.1 \times 10^4$  cfu/mL에서 6시간 경과 후에는  $3.01 \times 10^5$  cfu/mL로 나타

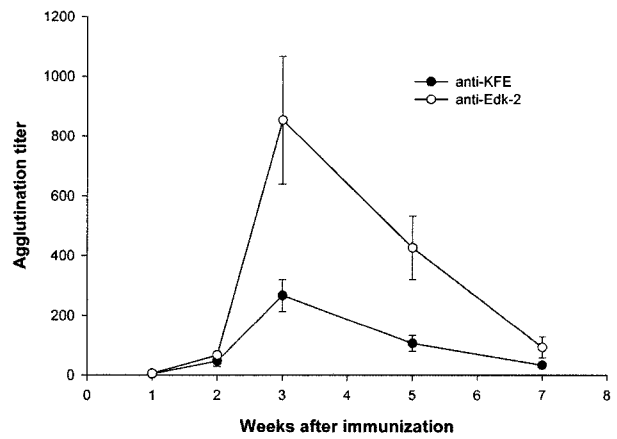


Fig. 1. Specific antibody levels in the serum of loach after different periods of immunization with FK of *E. tarda* KFE (●) and *E. tarda* Edk-2 (○).

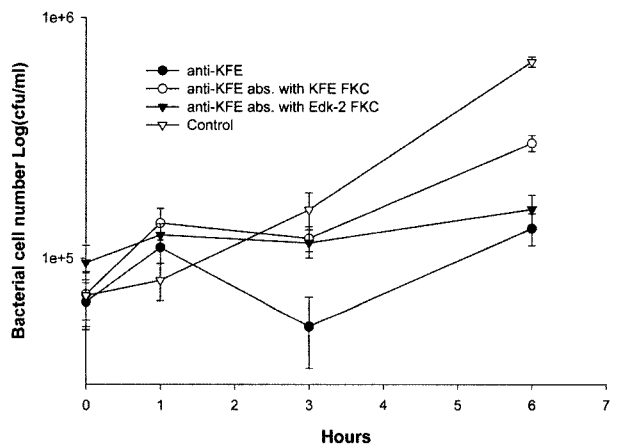


Fig. 2. Bactericidal activity of the absorbed and unabsorbed loach antisera against *E. tarda* KFE. Normal rabbit serum was used as a negative control.

나 살균효과의 감소를 보여 주었으나 *E. tarda* Edk-2의 FK로 흡착시킨 항혈청과 반응 시켰을 때는 시작당시  $9.6 \times 10^4$  cfu/mL에서 6시간 경과 후  $1.6 \times 10^5$  cfu/mL로 나타나 살균 효과의 감소를 보여주지 않았다(Fig. 2). *E. tarda* Edk-2에 대한 항혈청의 살균효과를 보았을 때에는, PBS를 접종한 대조구 혈청과 반응시킨 *E. tarda* Edk-2의 실험 시작시의 세균수가  $1.06 \times 10^5$  cfu/mL에서 6시간 경과 후에는  $2.73 \times 10^5$  cfu/mL로 약 3배 정

Table 1. Cross reaction of antibodies by agglutination test

| Antigen                           | Antiserum      |                  |                   |                   |                     |
|-----------------------------------|----------------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
|                                   | Loach anti-KFE | Loach anti-Edk-2 | Rabbit anti-Edk-2 | Flounder anti-KFE | Flounder anti-Edk-2 |
| <i>E. tarda</i> KFE               | 320            | 20               | 40                | 1280              | 160                 |
| <i>E. tarda</i> Edk-2             | 10             | 320              | 5120              | 20                | 5620                |
| <i>E. tarda</i> H-4               | 320            | 20               | 40                | 640               | 160                 |
| <i>Vibrio anguillarum</i> HUF5001 | <10            | <10              | <10               | <10               | <10                 |
| <i>Yersinia ruckeri</i> 11-4      | <10            | <10              | <10               | <10               | <10                 |

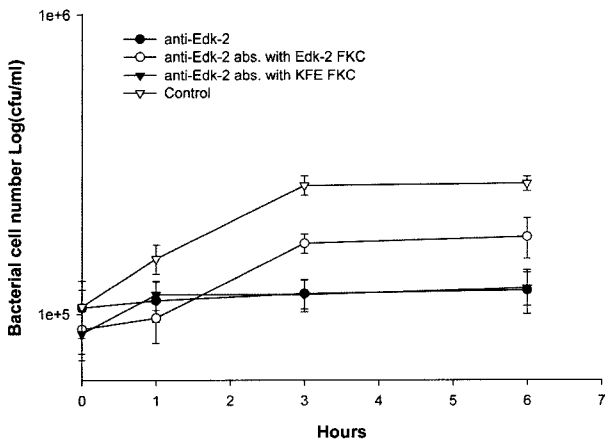


Fig. 3. Bactericidal activity of the absorbed and unabsorbed antisera against *E. tarda* Edk-2. Normal rabbit serum was used as a negative control.

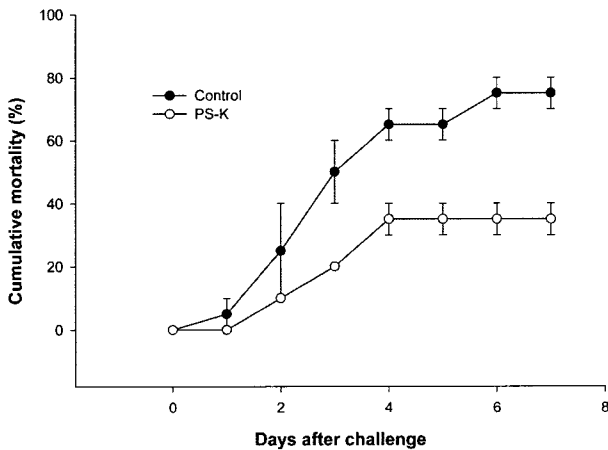


Fig. 4. Effect of pre-treated PS-K for the protection of loach (*Misgurnus mizolepis*) to the challenged *E. tarda* KFE ( $10^6$  cfu/fish).

도로 증가한 것에 비해, *E. tarda* Edk-2에 대한 항혈청과 반응시켰을 때는 반응 시작시의 세균 수에 비해 거의 증가하지 않았다. 그리고 *E. tarda* Edk-2의 FKC로 흡착시킨 항혈청과 반응시켰을 때에는 실험 시작시의 세균수가  $8.9 \times 10^4$  cfu/mL에서 6시간 경과 후에는  $1.81 \times 10^5$  cfu/mL로 나타나 살균효과의 감소를 보여 주었으나 *E. tarda* KFE의 FKC로 흡착시킨 항혈청과 반응시켰을 때는 시작당시  $8.6 \times 10^4$  cfu/mL에서 6시간 경과 후  $1.22 \times 10^5$  cfu/mL로 나타나 뚜렷한 살균 효과의 감소를 보여주지 않았다(Fig. 3).

#### PS-K의 효과

공격실험으로 미꾸라지의 세균성 감염에 대한 PS-K의 방어력 증강효과를 보았다. *E. tarda* KFE 균주로 복강주사한 후 실험구별 누적 폐사율을 조사해본 결과, PBS를 주사한 대조구에서는 1일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 7일째까지 누적 폐사율이 75%인데 비해 PS-K를 복강 주사한 실험구에서는 2일

째부터 폐사가 나타나기 시작하여 7일째까지 누적 폐사율이 35%이었으므로 대조구에 비해 상대적으로 낮은 누적 폐사율을 보여주었다(Fig. 4). PS-K를 투여한 실험구에서 7일 이후로 폐사하는 개체는 없었다.

## 고 찰

본 연구에서는 미꾸라지를 사용하여 면역혈청학적 방법으로 각기 다른 병원성을 갖고 있는 두 종의 *E. tarda* 분리균주에 대한 항원성을 비교하고자 하였다. 항원 투여 후 면역반응 분석은 체액성 면역반응 분석을 위해 응집항체를 실시하였다. 실험 전 기간에 걸쳐 *E. tarda* KFE 항원을 투여한 실험구에 비해 *E. tarda* Edk-2 항원을 투여한 실험구의 혈청내 특이 항체가 높게 나타났으며 특히 면역 후 3주째의 혈청내 특이 항체는 *E. tarda* Edk-2 항원을 투여한 실험구가 *E. tarda* KFE 항원을 투여한 실험구에 비해 3.2배 정도 높았다. 이는 병원성이 높은 *E. tarda* KFE에 비해 병원성이 낮은 *E. tarda* Edk-2 균주의 항원 결정기가 host 어류의 방어 시스템에서 보다 쉽게 인식이 되고 높은 반응을 유도한다고 추정되어진다. 미꾸라지에서 *E. tarda* KFE와 *E. tarda* Edk-2 균주의 복강주사 시 LD<sub>50</sub>은  $3.7 \times 10^5$  그리고  $>10^8$  cfu/fish를 각각 보여 주었다(data not shown). 본 연구의 실험 전 기간에 걸쳐 *E. tarda* KFE 항원을 투여한 실험구에 비해 *E. tarda* Edk-2 항원을 투여한 실험구의 혈청내 특이 항체와 특이 항체 생성 세포의 수치가 높게 나타났다. 특히 면역 후 3주째의 혈청내 특이 항체는 *E. tarda* Edk-2 항원을 투여한 실험구가 *E. tarda* KFE 항원을 투여한 실험구에 비해 3.2배 정도 높았으며, 면역 후 3주째의 특이 항체 생성 세포의 수는 *E. tarda* Edk-2 항원을 투여한 실험구에서 *E. tarda* KFE 항원을 투여한 실험구에 비해 3.9배 정도 높았으므로 *E. tarda* KFE에 비해 *E. tarda* Edk-2 균주의 항원성이 더 강하다는 것을 알 수 있었다.

서로 다른 *E. tarda*의 항원에 의하여 생성된 항혈청이 나타내는 교차반응을 분석하여 보았을 때 *E. tarda* Edk-2에 대한 미꾸라지 항혈청과 *E. tarda* KFE에 대한 미꾸라지 항혈청은 비교적 낮은 교차 반응을 보여주었다. 그러나 국내에서 분리된 *E. tarda* H-4와 *E. tarda* KFE는 높은 교차 반응을 보여주었다. 어종이 다른 주요 해산어인 넙치의 항혈청에서도 이와 동일한 반응이 나타났으며 포유류인 토끼의 항혈청에서도 이와 동일한 반응을 볼 수 있었다(Table 1). 이러한 본 실험에서 얻어진 결과로 볼 때 우리나라의 넙치에서 분리된 *E. tarda* KFE와 일본의 뱀장어에서 분리된 *E. tarda* Edk-2 균주 사이에서는 공통적인 항원이 미약하게 존재하며 국내의 넙치에서 분리된 *E. tarda* H-4와 *E. tarda* KFE 사이에서는 다수의 공통항원이 존재하는 것으로 볼 수 있다. 그러므로 *E. tarda*는 종간의 homology가 높다고 하나 *E. tarda* 균주가 분리된 지역과 분리된 어종에 따라서 항원성의 차이도 날 수 있음을 추정할 수 있다. 그리고 방

(1993)의 연구에서 우리나라의 넙치에서 분리된 분리균주와 일본의 뱀장어에서 분리된 분리균주를 혈청학적으로 비교해 보았을 때 공통항원면에서 서로 유사성이 많은 균주가 보고되었지만 몇몇 분리균주는 매우 다른 혈청학적인 특성을 갖고 있음도 보고된 바가 있다. 따라서 본 연구의 결과만으로는 균주가 분리된 지역 및 어종에 따라 항원조성의 차이가 많은 것으로 보여지지만 보다 많은 지역 및 여러 어종 유래 균주에 대하여 조사한다면 또 다른 결과가 나올 수도 있을 것이다.

본 연구에서 *E. tarda* KFE와 *E. tarda* Edk-2에 대한 미꾸라지 항혈청의 살균효과를 보았을 때 *E. tarda* KFE의 항혈청이 대조구와 비교하여 많은 차이를 보였으나 *E. tarda* Edk-2의 항혈청도 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였으므로 두 종류의 항혈청 모두에서 항체의 살균 능력이 있음을 확인하였다. 흡착된 항혈청과 반응시키는 실험에서도 대조구와 비교해 보았을 때 살균효과를 보여주었다(Fig. 2, 3). 또, 본 연구에서는 항혈청의 살균효과에 관여하는 '항체' 이외의 '보체' 라는 다른 인자를 제한하지 않았으므로 항혈청을 흡착한 후에 특이적인 항체가 모두 흡착되어 사라졌다 하더라도 면역 후 증강된 보체활성에 의하여 살균효과가 일어났을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 특이 항체가 존재하지 않는 혈청 내에서의 살균 작용은 보체의 대체 경로에 의한 것이다(Iida and Wakabayashi, 1983). Moritomo et al. (1988)에 의하면 어류의 혈청 내에서 특이 항체 없이도 보체가 대체 경로를 통해 활성화되면 여러 가지 생물학적 작용 및 살균 등의 생물학적 활성을 나타내었다고 하였고, 그람음성 세균의 lipopolysaccharide (LPS)가 이러한 보체의 대체 경로를 활성화시킨다고 보고되어 있다(Sakai, 1983 ; Iida and Wakabayashi, 1983).

박 등(1997)의 보고에서, 나일 틸라피아에 있어서 *E. tarda*의 감염에 대하여 PS-K가 최대의 방어력 증강 효과를 나타내는 것을 0.1 mg/g 당 어체중의 농도의 PS-K를 복강 주사로 투여한 뒤 7일이 지난 후 입을 알 수 있었고, 이러한 결과는 glucan 등을 연어에 대해서 실험했을 때 3-8일 후 최대의 방어력 증강 효과가 있다는 Robertsen et al. (1990)와 유사하였으므로, 본 연구에서는 이를 기준으로 PS-K 투여 농도 및 투여 후의 기간을 결정하였다. PS-K 투여 후 병원성이 강한 *E. tarda* 첨가 KFE 균주를 LD<sub>50</sub> 이상의 농도로 복강주사 하는 방법으로 공격실험을 실시하여 미꾸라지의 세균성 감염에 대한 PS-K의 방어력 증강효과를 관찰한 결과, 누적 폐사율이 75% 이었던 대조구에 비해 PS-K를 복강 주사한 실험구에서 누적 폐사율 35%로서 상대적으로 낮은 누적 폐사율을 보여주었으므로 PS-K는 방어력 증강에 좋은 효과를 나타내어 감염 대책 방안의 하나가 될 수 있음을 확인하였다(Fig. 4). 박 등(1997)이 나일 틸라피아를 사용하여 PS-K가 질병에 대한 방어력을 증강시켜주는 기작에 관하여 연구하여 본 결과, PS-K가 식세포의 활성을 증가시켜 비특이적 면역반응을 증강시켜주는 효능을 가지고 있으며 B 세포의 활성화에도 영향을 미쳐 특이적 면역반응까지 증강시켜주

로 결과적으로 질병에 대한 방어력 증강을 유도할 수 있다는 것을 보여주었다. 그러나 이러한 방어 기작에 대한 분석이 틸라피아와는 다른 어종인 미꾸라지에서는 이루어지지 않았으므로 향후 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. PS-K 이외에도 어류의 면역반응을 증강시켜 질병에 대한 저항성을 증진시킨다고 보고되어 있는 Glucan (Jorgensen et al., 1993 ; Baulny et al., 1996), Levamisole (Mulero et al., 1998a, b) 및 각종 Vitamin (Ortuno et al., 1999) 등의 생리활성물질을 이용하여 미꾸라지의 질병 예방에 관한 연구를 해보는 것도 의미가 있을 것이다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 *E. tarda* KFE는 *E. tarda* Edk-2에 비하여 강한 병원성을 가지고 있으며, 위의 두 *E. tarda* 균주는 항원성에 있어서도 많은 차이를 보여주었는데 *E. tarda* Edk-2가 더 강한 항원성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 그리고 PS-K 투여가 미꾸라지의 감염예방에 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 우리나라에서 분리된 *E. tarda* KFE와 일본에서 분리된 *E. tarda* Edk-2 두 균주의 항혈청을 만들어 생산된 항체의 특성과 방어효과를 분석하고자 하였다.

우리나라에서 많이 양식되어지고 있는 담수어인 미꾸라지를 사용하여 위의 두 가지 분리균주의 항원성에 있어서의 차이점을 조사하고자 하였다. 미꾸라지를 *E. tarda* 두 균주의 FKc로 각각 면역시킨 후의 혈청내 특이 항체량은 *E. tarda* KFE 균주로 면역시켰을 때에 비해 *E. tarda* Edk-2 균주로 면역시켰을 때 훨씬 높은 수치를 나타내었다. 그리고 교차반응 분석에서는 두 균주 간에 공통 항원이 미약하게 존재하는 것을 확인하였으며 미꾸라지 항혈청의 살균효과를 보았을 때에는 두 종류의 항혈청 모두에서 항체의 살균 능력이 있음을 확인하였다. 감염 예방 효과를 가지고 있는 polysaccharide-bound protein (PS-K)을 미꾸라지에 주사한 후 1주째에 *E. tarda* KFE 분리균주로 공격 실험을 실시하여 본 결과 누적 폐사율이 감소하였으므로, PS-K의 투여는 *E. tarda*를 포함한 세균성 감염에 대한 효과적인 감염 대책 방안의 하나가 될 수 있음을 확인하였다.

## 사 사

본 연구는 국토해양부 마린바이오21사업의 해양바이오프로세스 연구단 연구비 지원(M2007-07)에 의해 수행되었습니다.

## 참고문헌

Alcaide, E, S. Herraiz and C. Esteve, 2006. Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla*

- from Mediterranean Spain. *Dis. Aquat. Org.*, 73, 77–81.
- Andersen, K., 1979, The use of Furanace against vibriosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in salt water. *J. Fish Dis.*, 2, 79–80.
- Bang, J. D., S. K. Chun, S. I. Park and Y. J. Choi, 1992. Studies on the biochemical and serological characteristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 5, 29–35.
- Baulny, M. O., C. Quentel, V. Fournier, F. Lamour and R. L. Gouvello, 1996. Effect of long-term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, 26, 139–147.
- Bosnea, D., C. Stodoleanu, F. J. Boswell and D. Buiuc, 2000. Bactericidal activity of Trovafloxacin and Moxifloxacin against Gram-negative anaerobic bacilli. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, 104, 117–122.
- Christopher, M. A. C., I. Hirono and T. Aoki, 2006. Immunogenicity, retention and protective effects of the protein derivatives of formalin-inactivated red seabream iridovirus (RSIV) vaccine in red seabream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 20, 597–609.
- Clavijo, A. M., G. Conray, J. Santander and F. Aponte, 2002. First report of *E. tard* from tilapias in Venezuela. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 22, 280–282.
- Duffus, J. H., C. Levi and D. J. Manners, 1982. Yeast cell-wall glucans. *Advances in Microbial Physiology*, 23, 151–181.
- Iida, T. and H. Wakabayashi, 1983. Bactericidal reaction by the alternative pathway of fish complement. *Fish Pathol.*, 18, 77–83.
- Itami, T., Y. Takahashi and Y. Nakamura, 1989. Efficiency of vaccination against vibriosis in cultured kimura prawns, *Penaeus japonicus*. *J. Aqua. Animal Health.*, 1, 238–242.
- Jo, M. R., J. W. Kim and D. S. Kim, 2002. Antimicrobial effects of natural plant and mushroom, *Dicyphora indusiata* extracts on fish pathogenic bacteria. *J. Kor. Fish. Soc.*, 35, 578–582.
- Jorgensen, J. B., G. J. E. Sharp, J. S. Christopher and B. Robertsen, 1993. Effect of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish & Shellfish Immunol.*, 3, 267–277.
- Kusuda R, T Itami, M Mumekiyo and H. Nakajima, 1977. Characteristics of an *Edwardsiella* sp. from an epizootic of cultured crimson sea breams. *Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.*, 43, 129–134.
- Liu, C.-K. and A. A. Fong, 1987. Disinfection study of iodophor on the pathogenic bacteria of eels. *COA Fish. Ser.*, 10, 115–124.
- Mohanty, B. R. and P. K. Sahoo, 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J. Biosci.*, 32, 1331–1344.
- Moritomo, T., T. Iida and H. Wakabayashi, 1988. Chemiluminescence of neutrophils from peripheral blood of eel. *Fish Pathol.*, 17, 269–280.
- Mulero, V., M. A. Esteban, J. Munoz and J. Meseguer, 1998a. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, 8, 49–62.
- Miwa, S. and N. Mano. 2000. Infection with *Edwardsiella tarda* causes hypertrophy of liver cells in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis. Aquat. Organ.*, 42, 227–231.
- Mulero, V., M. A. Esteban, J. Munoz and J. Meseguer, 1998b. *In vitro* levamisole fails to increase seabream (*Sparus aurata* L.) phagocyte functions. *Fish & Shellfish Immunol.*, 8, 315–318.
- Nakatsugawa, T., 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol.*, 18, 99–101.
- Ortuno, J., M. A. Esteban and J. Meseguer, 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, 9, 429–443.
- Park, S. I., H. Wakabayashi and Y. Watanabe, 1983. Serotype and virulence of *Edwardsiella tarda* isolated from eel and their environment. *Fish Pathol.*, 18, 85–89.
- Robertsen, B., G. Rorstad, R. Engstad and J. Raa, 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salta* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cells walls. *J. Fish Diseases*, 13, 391–400.
- Sae-Dui, D., K. Muroga and T. Nakai, 1984. A case of *Edwardsiella tarda* in cultured colored carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Pathol.*, 19, 197–199.
- Sakai, D. K., 1983. The activation of alternative pathway by Pronase, LPS and Zymosan in the complement system of rainbow trout serum. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 49, 347–351.
- Sakhan, K. and A. G. Behbahan, 2008. Immunogenicity of neonatal BCG vaccination in children entering primary school. *Pak J. Biol. Sci.*, 11, 930–933.
- Seljelid, R., L. T. Rasmussen, O. Larm and J. Hoffman, 1987. The protective effect of beta-1,3-D-glucan-derivatized plastic beads against *Escherichia coli* infection in mice. *Scand. J. Immunol.*, 25, 55–60.
- Yano, T., H. Mstsuyama and R. E. P. Mangindaan, 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14, 577–582.
- Park, K. H., J. Y. Ha, M. D. Huh, S. H. Huh and H. D. Jeong, 1997. Effect of PS-K on nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, as an adjuvant and prophylactic agent. *J. Fish Pathol.*, 10, 45–52.
- Bang, J. D., 1993. Immunological characteristics of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, against *Edwardsiella tarda*. Ph. D. Thesis, National Fisheries University of Pusan, Busan, Korea. 107 pp.

원고접수 : 2008년 10월 31일

심사완료 : 2008년 11 7일

수정본 수리 : 2008년 11월 9일