

## 넙치, *Paralichthys olivaceus* 병어에서 분리된 *Streptococcus parauberis*의 면역 저항 특성

황성돈 · 우승호 · 김수현 · 하수진 · 정영은 · 박수일<sup>†</sup>  
부경대학교 수산생명의학과

### Immunomodulatory characteristics of *Streptococcus parauberis* isolated from infected olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Seong Don Hwang, Sung Ho Woo, Su Hyeon Kim, Su Jin Ha,  
Young Eun Jung and Soo Il Park

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

Streptococcal diseases are known as serious problems in fresh water and marine fish culture industry worldwide. Recently, the importance of the infection of *Streptococcus parauberis* has been increased among the streptococcosis since severe outbreaks in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) were recorded in Korea. The aims of the present study were to investigate immunomodulatory differences between *S. parauberis* and *S. iniae*. In this study, *S. parauberis* isolated from diseased olive flounder was investigated on the characteristics of morphological and immune responses. Immune response of the fish to the pathogen was characterized by bactericidal activity in the serum, phagocytic activity and reactive oxygen intermediates (ROIs) production of olive flounder.

The capsules of both bacteria, *S. parauberis* and *S. iniae* seem to be associated with the ability to resist killing activity of normal sera. Also, capsulated strains could survive in the phagocytes and induce to lower ROIs production.

*Key words:* *Streptococcus parauberis*, Capsule, Immunomodulatory, Olive flounder

현재 넙치 연쇄구균병의 원인체로 분리되는 균주 중 출현 비율이 증가하고 있는 *Streptococcus parauberis*는 *S. uberis* genotype II로서, 생화학적 성상 및 혈청학적 성상이 거의 유사하여 표현형적으로는 구별하기 어려운 세균군에 속한다. Williams and Collins (1990)가 이 세균군의 특성을 분자생물학적 방법인 16s ribosomal RNA 염기서열 분석을 통하여 *S. parauberis*로 명명하였으며 육상동물의 경우 젖소의 유방염을 일으

키는 병원체로 알려져 있다. *S. parauberis*는 1996년 이래 스페인 Galicia 지역의 터봇 (*Scophthalmus maximus*)에 연중 발병하며 특히 여름철 고수온기에 발병하면 많은 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Domenech *et al.*, 1996). 우리나라에서 *S. parauberis*는 최근 제주 지역을 중심으로 연쇄구균의 원인체로 분리되고 있으며 (Woo *et al.*, 2006; Baeck *et al.*, 2006) 그 발생 양상이 제주뿐만 아니라 우리 나라 전역으로 확산

<sup>†</sup>Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-629-5939  
Fax : 051-629-5939, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

되고 있다. *S. parauberis*에 감염된 어류의 증상은 체색 흑화, 출혈 및 농양을 동반한 안구 돌출, 비장 및 간 비대, 복부와 복벽의 점상출혈 등이 나타난다 (Domenech *et al.*, 1996). 그리고 *S. parauberis*는 수온이 높은 시기뿐만 아니라 dormant 상태에서 해수와 퇴적물에 독성을 유지하고 있어 양식장 환경 및 자연 환경이 병원체의 감염원으로서 중요한 역할을 한다 (Curras *et al.*, 2002).

우리 나라에서 분리되는 Streptococci 중 *Lactococcus garvieae*와 *S. iniae*는 많은 연구가 되어 있으며 이들 균주들은 capsule 유무 및 항원성에 따른 병원성 차이가 있다. *L. garvieae*는 capsule 유무에 따라 항원성이 다르며 capsule을 가진 균주의 항혈청은 capsule을 가지지 않는 균주와는 약한 교차반응이 일어났으나 capsule을 가지지 않는 균주의 항혈청은 capsule을 가진 균주와는 교차반응이 일어나지 않는다. Kitao (1982)는 KG 7409 균주의 항혈청에 대해 응집하는 KG+ (capsule-)과 KG- (capsule+)의 두 가지 항원성 type으로 구분하고 KG- (capsule+) 균주가 높은 병원성을 나타냄을 보고하였다. 이는 capsule을 가진 균주가 응집반응 중 capsule에 의해 주요 antigen이 가려져 일어나는 현상으로 (Barnes *et al.*, 2002) KG- 균주의 capsule이 KG+ 균주의 응집 항체에 대한 반응부위를 점유하고 있음을 시사하고 있다 (Ooyama, 1999). 또한 KG- phenotype cells를 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 첨가 KF *Streptococcus* agar에 수 차례 계대 배양하면 KG+ phenotype cells로 antigenic conversion이 일어난다 (Kitao, 1983; Alim *et al.*, 1996).

*S. iniae*의 경우 arginine dehydrolase 이용능에 따라 AD+, AD-로 구분할 수 있으며 (Zlotkin *et al.*, 1998), arginine 이용능에 따른 항원성 차이가 있다. AD+를 serotype I (capsule-), AD-를 serotype II (capsule+)이라 칭하며 serotype I에 대한 항혈청은 serotype II와 교차반응이 일어나지 않지만 serotype II에 대한 항혈청은 serotype I

과 교차반응이 일어났다(Bachrach *et al.*, 2001). 그리고 *S. iniae* 역시 capsule 유무에 따라 병원성에 차이가 있다. 이것은 Streptococcal polysaccharide capsules가 신선 혈청과 면역 혈청에 대해 견디는 저항성을 가지고 있으며, 식작용을 회피하기 때문이다. Opsonophagocytosis에 대한 저항성에서 capsule을 지닌 균주가 높은 독성을 가지는 것은 complement-mediated serum killing에 저항성을 가지며, capsule이 특히 항체에 대한 Fc receptor와 결합을 방해하기 때문이다 (Yoshida *et al.*, 1997).

우리 나라 양식 넙치에 심각한 세균성 질병을 유발하는 *S. parauberis*가 양식장에 미치는 피해량은 크지 않은 편이지만 최근 들어 질병의 발생 빈도가 증가하고 있으므로 이 질병에 관한 연구가 시급히 요구된다.

따라서, 본 연구에서는 우리 나라의 대표적 해수 양식 대상종인 넙치에서 분리된 *S. parauberis*를 이용하여 넙치 정상 혈청에서의 생존능 및 macrophage의 식작용에 대한 저항성을 평가하여 수산 질병 대책에 관한 기초 자료를 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험 균주

본 연구에 사용된 균주들은 넙치, *Paralichthys olivaceus*에서 연쇄구균병의 증상이 전형적으로 관찰되는 비장 및 심장에서 조직을 무균적으로 적출하여 BHIA 배지에 도말한 후 27°C에서 24~48시간 배양하여 분리한 균을 실험에 사용하였다. 비교를 위해 사용된 참조 균주로는 각 Williams *et al.* (1990)의 *S. parauberis* KCTC 3651와 Pier *et al.* (1976)의 *S. iniae* KCTC 3657 등을 사용하였다 (Table 1).

### TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

Capsule의 유무를 확인하기 위해 TEM을 행하였다. *S. parauberis* 분리 균주인 2-50, 6-40 그리

**Table 1.** Present isolated strain and reference strain used in this study

	Strains		Origin of tested bacteria		
<i>S. parauberis</i>	Isolated	2-50	Spleen, Olive flounder	2005. June	Jeju
	Strains (n=2)	6-40	Heart, Olive flounder	2005. Aug.	Wando
<i>S. iniae</i>	Isolated	BS 9	Olive flounder	1998	Tongyoung
	Strains (n=2)	BS 10	Olive flounder	1998	Jeju
<i>S. parauberis</i>	Reference strains (n=2)	KCTC 3651	Mastitis sample milk	1990	Williams and Colins
		KCTC 3657	Brain of amazon fresh water dolphin	1972	USA

고 참조 균주인 KCTC 3651을 사용하였다. 시료의 준비 과정은 Banes *et al.* (2003)의 방법을 변형하여 행하였다.

각 균주를 BHIB에 접종한 후 27°C에서 24시간 배양하여 3,000×g, 10분간 원심 분리한 다음 phosphate-buffered saline (PBS, 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)으로 세척하고 Macfarland 2 standard의 탁도가 되도록 현탁액을 제작하였다. 이 현탁액을 각 균주에 대한 불활화 균주 항혈청과 2:8이 되도록 첨가한 후 4°C에서 overnight 반응시키고 나서 3,000×g, 10분간 원심 분리하여 집균한 후 PBS로 두 번 세척하였다. Pellet은 2.5% glutaraldehyde (pH 7.2, 4°C)에 24시간 전고정하고 3번 세척한 다음 PBS에 재현탁하여 polycationic ferritin (Sigma)을 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 첨가한 후 20°C에서 30분간 반응시키고 2번 세척하였다. 1% osmium tetroxide (pH 7.2)로 4°C에서 2시간 동안 후고정한 다음 Alcohol 탈수 과정을 거쳐 propylene oxide로 치환하고 Epon 혼합물로 열중합 처리한 다음 ultrathin section (60~90 nm)하였다. 이러한 과정을 거쳐 제작한 미세 절편을 grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 TEM (JEM 1200- II, JEOL)으로 관찰하였다.

**시험 균주의 넙치 혈청에 대한 저항성 시험**

**1) 넙치 혈청의 준비**

시험에 사용한 혈청은 시험어를 MS-222 50 ppm으로 3~5분간 마취시킨 후 1회용 주사기를 사용하여 피부 정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채혈된 혈액은 상온에서 1시간 방치하고, 4°C에서 3시간 정지한 후, 8,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 이렇게 분리한 혈청을 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

**2) 넙치 혈청에서의 생존능 시험**

시험균의 넙치 혈청에 대한 저항성 시험은 Barnes *et al.* (2003)의 방법으로 행하였다. 시험균으로는 *S. iniae* 분리 균주, BS 9(capsule+), BS 10(capsule-), *S. iniae* KCTC 3657(capsule+), *S. parauberis* 2-50(capsule+), 6-40(capsule+), *S. parauberis* KCTC 3651(capsule+)을 사용하였다. 약술하면, BHIB에 27°C, overnight 배양한 균을 1,500×g, 20분간 원심 분리하여 집균한 다음 멸균 PBS로 3회 세척하여 OD<sub>540</sub> 값이 0.6이 되도록 농도를 조정하였다. OD<sub>540</sub>에서 흡광도 값이 0.6일 때 약 1×10<sup>7</sup> cfu/ml이 되므로 이렇게 준비한 시험균액을 불활화한 정상 혈청과 1:1로 혼합하여 실온에서 1 시간동안 반응시켰다. 이후,

실험구에는 complement source로서 신선 혈청을 1:4가 되도록 첨가하고 대조구에는 PBS를 첨가하여 실온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 상징액을 PBS로 단계 희석하여 BHIA 평판 배지에 dropping 후 27°C에서 28시간동안 배양하였다. 시험균의 반응 결과는 Miles & Misra (1938)에 따라 배양 후 생성된 colony의 수를 계산하였고 혈청에서 생존율은 PBS를 첨가한 대조구의 생존율(%)을 비교하여 나타내었다.

### 3) 녀치 혈청에 대한 시험균의 반응 시간별 균 수 변화 시험

시간별 *S. paruberis* 균주의 혈청에서의 생존능 시험에서는 시험균과 혈청 혼합액을 0, 1, 3, 6, 9, 12시간 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles & Misra (1938)에 따라 배양한 후 생성된 colony의 수를 계산하였다.

### 시험 균주의 식균율과 식균 지수의 측정

식균능의 실험에는 녀치의 whole blood를 사용하였으며 녀치의 미부 정맥으로부터 heparin (Sigma) 처리된 주사기로 어체당 0.5 ml씩 채혈하였다. 채혈된 혈액은 실리콘 처리한 tube에 넣고, 100 mg/ml로 준비된 각 균액 30  $\mu$ l를 첨가하였다. 시험균은 혈청내 생존능 시험에서 사용한 균주와 동일하게 사용하였다. 20°C로 유지된 shaking incubator에서 3시간 동안 반응시킨 후 시료를 채취하여 slide glass에 도말한 다음 May-Grünwald Giemsa 염색법으로 염색하고 검경하였다. 식세포에 대한 식균율과 식균지수는 아래 식을 이용하여 구하였다.

식균율(%) = [식균 작용을 한 식세포의 수 / 관찰한 식세포의 수]  $\times$  100

식균지수 = 식균한 식세포의 총 식균수 / 식균 작용을 한 식세포의 수

### 녀치 두신 macrophage에서의 시험 균주별 ROIs 생성능 측정

#### 1) 녀치 두신 macrophage의 분리

녀치 두신 macrophage는 Secombes (1990)의 방법에 따라 분리하였다. 녀치의 미부 정맥에서 채혈하여 순환 혈액을 가능한 한 모두 제거한 후, 무균적으로 해부하여 두신을 절취하였다. 이를 2% FBS, 1% penicillin/ streptomycin 및 0.2% heparin이 함유된 L-15 medium (Sigma)을 멸균 petridish에 분주한 뒤 40  $\mu$ m의 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 실리콘 처리된 tube에 미리 분주해둔 34%와 51% percoll용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 500  $\times$  g, 30분간 원심 분리하여 macrophage를 분리하였다. 분리한 macrophage를 0.1% L-15 medium으로 2회 세척한 다음 0.1% trypan blue로 viability를 관찰한 후,  $1 \times 10^5$  cell/ml로 조정하였다.

#### 2) 시험균의 준비 및 시험균의 감작

시험균의 준비는 BHIB 5 ml에 25°C, 24시간 배양한 균을 원심 분리하여 PBS에 3회 세척한 다음 생균 시험균으로 사용하였다. 시험균은 혈청내 생존능에서 사용한 균주와 동일한 균주를 사용하였다. 세균의 감작은 생균 시험균의 습중량 0.01 g에 녀치 혈청 500  $\mu$ l를 첨가하여 25°C, 30분간 진탕 배양 후에 원심 분리한 다음 PBS로 1회 세척하여 감작 생균 시험균으로 사용하였다.

#### 3) Nitroblue tetrazolium (NBT) response

$2 \times 10^5$  cell/ml로 조정된 macrophage를 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 20°C, 2시간 부착시킨 다음 상징액을 제거한 후, 3회 세척하여 시험용 식세포를 준비하였다. 생균 시험균과 감작 시험균을 NBT 용액에 현탁시킨 후 식세포가 부착된 well에 100  $\mu$ l씩 첨가하고 20°C에서 30분간 반응시킨 다음 100% methanol로 세포를 고정시켰다. 각 well에 2M KOH 용액 120  $\mu$ l와 dimethyl sulphoxide (DMSO) 140  $\mu$ l를 첨가한 후 OD<sub>630</sub>에서 흡광도를 측정하였다.

#### 통계학적 분석

각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값을 측정하였고,  $P < 0.01$ 와  $P < 0.05$  수준에서 유의성을 평가하였다.

## 결 과

### 1. TEM을 이용한 capsule의 유무 관찰

세균 표면에 부착되어 있는 capsule을 TEM으로 관찰하였으며 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 넙치에서 분리된 *S. parauberis*의 균주 중 2-50, 6-40의 세균 세포 형태는 구형이었으며, 세균 표면 바깥 쪽에는 polycationic ferritin이 결합된 뚜렷한 capsule 층을 확인할 수 있었다. 참조 균주인 *S. parauberis* KCTC 3651의 경우에도 capsule 층을 확인할 수 있었으나 capsule 층의 발현량이 분리 균주에 비하여 적은 것을 알 수 있었다.

### 2. 넙치 혈청에 대한 시험균의 저항성 시험

#### 2-1. 혈청에서의 생존능 시험

넙치 혈청에 대한 시험 균주별 저항성 시험에서는 *S. iniae* 중에서 capsule이 없는 BS 10 균주와 KCTC 3657 균주를 제외한 모든 시험 균주가 넙치 혈청의 살균능에 대해 저항력을 나타내었다. 즉 PBS를 첨가한 대조구와 capsule을 가진 시험균은 그 수가 증가하여 넙치 혈청의 살균능에 대해 저항성을 가지는 것을 확인하였

다 (Fig. 2).

#### 2-2. 혈청에 대한 시험균의 시간별 균 수 변화

*S. parauberis*의 시험 균주는 시간의 경과에 따라 균 수가 지속적으로 증가하였고, KCTC 3651 균주 또한 시험 균주보다 낮지만 지속적으로 균 수의 증가를 확인할 수 있었다. *S. iniae*의 경우 BS 9 균주 역시 균 수가 증가하였지만 capsule을 가진 BS 10과 KCTC 3657의 경우 넙치 정상 혈청에서 반응 1시간 이후부터 시간이 경과함에 따라 균수가 감소하는 현상이 나타났다. 균 수가 증가하는 2-50, 6-40, BS 9, KCTC 3651과 균 수가 감소하는 BS 10과 KCTC 3657 간에는 유의적인 차이가 있었으며 균 수가 증가하는 그룹 중에서도 2-50, 6-40 및 KCTC 3651 사이에는 유의적인 차이가 있었다( $P < 0.05$ , Fig. 3).

### 3. 넙치 혈액 식세포의 식균율과 식균 지수

식세포의 시험균에 대한 식균율은 *S. parauberis* 시험 균주 2-50과 6-40 및 *S. iniae* 시험 균주 BS 9가 다른 균주에 비해 낮게 나타났으며 *S. iniae* BS 10, *S. parauberis* KCTC 3651 및 *S. iniae* KCTC 3657은 식균율이 높게 관찰되었다(Fig. 4). 그리고 식균율이 낮은 *S. parauberis*의 2-50과 6-40 및 *S. iniae* BS 9 균주와 식균율이 높은 *S. iniae* BS 10, *S. parauberis* KCTC 3651 및 *S. iniae* KCTC 3657 균주 간에는 유의적인 차이가 있었

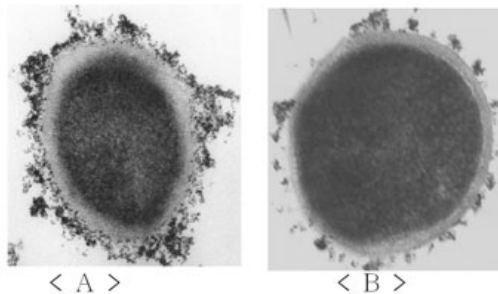


Fig. 1. Electronic micrographs of (A) ferritin-labelled *Streptococcus parauberis* Strain 2-50 and (B) *S. parauberis* KCTC 3651.

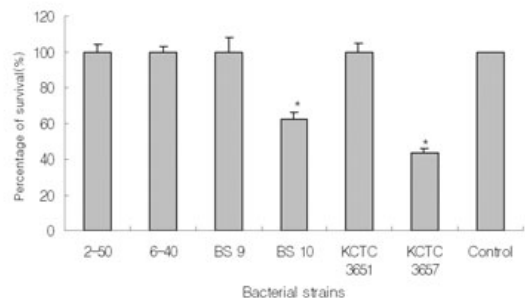


Fig. 2. Bactericidal activity in normal serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. \*, significant differences between references and other strains;  $P < 0.05$ .

다( $P<0.05$ ). 식균 지수는 식균을 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 5). 즉 capsule을 가지는 균주가 capsule을 가지지 않는 균주에 비하여 macrophage에 의해 식균되는 균수가 적은 것으로 나타났다.

**4. Nitrobluel tetrazolium response**

시험 균주가 넘치 두신 macrophage의 respiratory burst 활성을 자극할 수 있는지를 평가하였

다. 생균 시험균과 신선 혈청으로 감작시킨 시험균을 사용하여 macrophage가 생성하는 ROIs의 양을 측정 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 생균 시험균은 PBS를 사용한 대조구와 유사한 값을 나타내었고 capsule이 존재하지 않는 *S. iniae* BS 10, KCTC 3657 그리고 *S. parauberis* KCTC 3651 균주는 capsule이 존재하는 *S. parauberis* 2-50, 6-40 및 *S. iniae* BS 9균주 보다 높게 나타났고 유의적인 차이가 있었으며, 감작 시험균은 생균 시

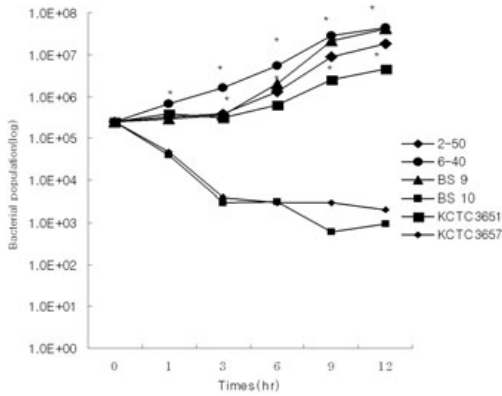


Fig. 3. Survival of various bacterial strains in the normal serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

\*, significant differences between references and other strains;  $P<0.05$ .

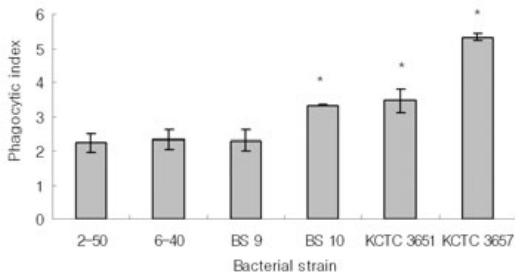


Fig. 5. The Phagocytic index of leucocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to bacterial strains for 3hr incubation. \*, significant differences between references and other strains;  $P<0.05$ .

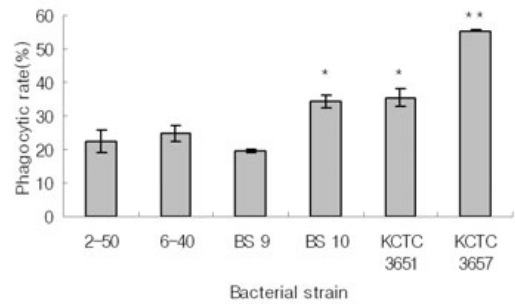


Fig. 4. The Phagocytic rate of leucocyte in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, to bacterial strains for 3 hr incubation. \*, significant difference between other strains;  $P<0.05$ .

\*\*, significant differences between references and other strains;  $P<0.01$ .

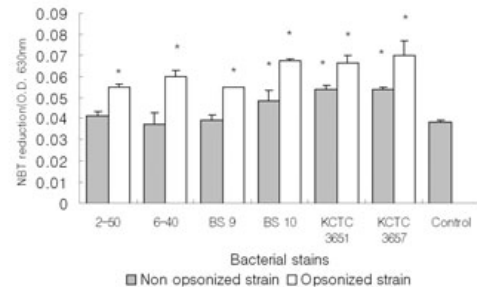


Fig. 6. Reactive oxygen intermediates production of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* head kidney macrophages after being infected with various opsonized or nonopsonized bacterial strains for 30 min incubation.

\*, significant differences between control and other strains;  $P<0.05$ .

평균보다 ROIs 생성이 더 높게 나타났고 대조구와 비교하여 유의적인 차이가 있었다( $P < 0.05$ ).

## 고 찰

최근 연쇄구균의 분리 비율이 증가하고 있으며 특히 우리 나라 주요 양식 대상 어종인 넙치에서 분리된 *S. parauberis* 비율이 현저하게 증가함에 따라 본 연구에서는 넙치 병어에서 분리된 *S. parauberis*의 어체 면역능에 대한 저항 특성을 파악하고자 하였다.

Cell wall 표면의 capsule 유무를 확인하기 위해서 ferritin을 이용하여 TEM으로 관찰한 결과 *S. parauberis*의 시험 균주 및 참조 균주에서 capsule을 확인할 수 있었으나 참조 균주인 KCTC 3651은 시험 균주에 비하여 capsule의 두께가 얇았다. 인간의 병원성 연쇄구균류는 polysaccharide capsule을 가지고 있는 것이 잘 알려져 있으며 이러한 세균의 cell wall 표면의 capsule은 일반적으로 polysaccharide로 구성되어 있으며 amino acid polymers, hyaluronic acid, chondroitin 또는 heparin으로 구성되어 있다. 본 연구에서 나타난 capsule은 anionic site와 ferritin-labelled antisera가 정전기적으로 결합하고 extracellular fibrous layer가 강하게 염색되어 전자 현미경 상에서 capsule을 관찰할 수 있었고 관찰된 capsule은 세균을 탈수로부터 보호하고, 숙주 조직에서의 부착 그리고 선천성, 후천성 면역에 대한 저항성을 가지고 있어 독성 메카니즘에서 매우 중요하다 (Wai *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1992). 특히 병원성이 있는 streptococci는 extracellular polysaccharide capsule이 molecular mimicry, complement-mediated killing, 항원 다양성 그리고 식작용 억제제를 유발하여 독성요소로서 작용한다 (Locke *et al.*, 2007).

넙치 혈청 내의 살균 작용에 대한 *S. parauberis* 균주별 저항성을 시험한 결과 capsule이 있는 2-50, 6-40, *S. iniae* BS 9 및 *S. parauberis* KCTC 3651은 넙치 혈청 내에서 생존할 수 있

으며 또한 증식할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 capsule이 결핍되어 있는 *S. iniae* BS 10과 KCTC 3657은 넙치 혈청에서 시간이 지남에 따라 균 수가 감소되는 것으로 나타났다. 혈청 내에서 생존할 수 있는 능력은 병원성 세균과 비병원성 세균을 구별할 수 있는 중요한 indicator가 되며, 넙치의 혈청에는 세균 세포벽의 구성 성분인 peptidoglycan을 파괴할 수 있는 lysozyme 및 LPS에 의해 활성화되는 complement가 존재하여 침입한 세균을 용균시킬 수 있다. 그러나 병원성 세균의 경우는 이러한 어류 숙주의 면역 반응을 회피하거나 억제할 수 있는 여러 가지 기작을 가지고 있다. 예를 들어, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *L. garviae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* 등은 polysaccharide capsule을 가지며, *Aeromonas salmonicida*는 A-layer를 가지고 있어서 어류 혈청 내에서 생존할 수 있다 (Magarinos *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 2002; Bisno *et al.*, 2003). 본 연구에서는 *S. parauberis*가 polysaccharide capsule을 가지고 있어 넙치 혈청의 살균작용을 회피하고 혈청 내에서 생존함으로써 병원성 측면에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

병원체가 동물 숙주 내에 감염되면 초기 면역을 담당하는 macrophage는 병원체를 비특이적으로 식작용하여 살해할 수 있고, 면역 반응의 초기에 accessory cell로 작용함으로써 어류의 비특이적 면역 반응에서 중요한 역할을 담당하고 있다 (Secombes, 1990). 이러한 capsule은 식작용에 대한 저항성을 가지는 두 가지 메카니즘이 있다. 첫째로는 capsule이 보체 또는 항체와 같은 opsonic factor의 binding을 방해하며 (Horwitz and Silverstein, 1980) 둘째로는 capsule이 phagocytic cell의 receptors와 opsonin ligand 사이의 접촉을 방해하는 physical barrier로 작용한다 (King and Wilkinson, 1981). 게다가, capsule은 surface antigen masking, complement consumption 유발, 세균 표면에 binding할 수 있는 보체 또는 식세포 표면 receptor의 결합을 방해하여 식작용으로

부터 세균을 보호할 수 있다. 따라서 세균 capsule의 antiphagocytic 역할 때문에 독성 요소로서 고려되며 이러한 것은 세균 감염에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, *P. damsela* subsp. *piscicida*의 경우 anti-phagocytic surface components인 polysaccharide capsule에 의해 식세포 결합에 필요한 ligands에 접근하기 어렵고 serum과의 결합력을 감소시켜 식작용에 저항성을 나타낸다 (Czuprynski, 1988). 그리고 세포의 대사과정에서 생성되는 reactive oxygen intermediaters (ROIs)는 Oxygen이 환원된 superoxide radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )와 hydroxyl radical ( $OH^-$ ) 등의 형태로서 독성 작용을 나타내어 미생물을 살균한다 (Fridovich, 1995; Keyer *et al.*, 1995). 그러나 일부 병원성 세균의 경우는 SOD와 catalase가 있어 식세포의 respiratory burst 작용을 극복할 수 있다. 예를 들어, *A. salmonicida*, *Staph. aureus*의 경우, 식세포의 respiratory burst 활성을 통하여 생성된 reactive oxygen species를 무독화시킬 수 있는 SOD와 catalase 등의 효소로써 oxygen radical의 살균능을 감소시킴으로서 macrophage의 식작용에 저항성을 나타내는데 중요한 작용을 하는 것으로 나타났다 (Barens *et al.*, 1999; Barens *et al.*, 1996; Mandell, 1975). 본 연구의 넙치 혈액 식세포의 식균율, 식균 지수 및 넙치 두신 macrophage에서의 ROIs 측정 결과 capsule을 가진 *S. parauberis* 분리 균주와 *S. iniae* BS 9 균주를 capsule이 존재하지 않는 BS 10 균주와 비교해 보면 식세포에 의한 식균율, 식균 지수가 capsule의 유무에 따라 현저한 차이가 남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 신선 혈청으로 감작시킨 균주를 사용하더라도 macrophage에서 ROIs 생성이 낮게 나타나는 것을 알 수 있었으며 이는 낮은 식균율과 식균 지수의 원인이 될 것으로 생각된다. 이러한 것은 병원체가 체내에 들어왔을 때 세포벽 바깥쪽에 존재하는 capsule이 식작용을 회피하여 병원성을 나타낼 수 있게 하는 주요한 요소로 사료된다. 이와 같은 현상은 Locke *et al.* (2007)가 cap-

sule이 있는 wild type *S. iniae*와 capsule이 결여된 mutant *S. iniae*를 hybrid striped bass 혈액 macrophage로 시험해본 결과, capsule이 결여된 mutant *S. iniae*에서는 binding 방해와 숙주의 phagocytosis 회피 능력이 동시에 감소되고 ROIs에 대한 감수성도 증가되지 않았다는 연구 결과에서도 잘 나타나 있다.

본 연구 결과, 넙치 병어에서 분리된 *S. parauberis*를 capsule의 존재 유무에 따라 병원성 차이가 나타나는 *S. iniae*와 면역학적으로 비교한 결과, capsule이 존재하는 *S. parauberis*와 *S. iniae*는 모두 넙치 혈청의 세균 살해능에 저항성을 지니며 식작용을 회피하는 기작을 지니고 있음을 알 수 있었다.

## 요 약

연쇄상구균은 우리 나라 양식 넙치에 큰 피해를 주는 세균성 질병의 원인균으로 알려져 있다. 연쇄구균중 중 *Streptococcus parauberis*도 큰 피해를 내고 있으나 원인균에 대한 구체적인 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라의 주요 양식종인 넙치 병어에서 분리된 *S. parauberis*를 형태학적 특성 및 넙치 혈청에서의 생존능 및 넙치 혈액에서의 식균율과 식균 지수를 조사하고, 넙치 두신 macrophage에 대한 ROIs 생성능을 측정하였다. *S. parauberis* 면역학적 특성은 어류 병원체로서 잘 알려진 *S. iniae* 균주 중 병원성이 강하며 capsule을 갖춘 BS 9 균주와 병원성이 낮고 capsule이 없는 *S. iniae* BS 10 균주와 비교하였다.

본 연구 결과, ferritin-labelled antisera를 이용하여 *S. parauberis* 세포벽 바깥쪽의 capsule을 TEM으로 관찰하였다. capsule이 존재하는 *S. parauberis*와 *S. iniae*는 혈청의 균주 살해능에 대한 저항성을 나타내는 반면, capsule이 존재하지 않는 *S. iniae*는 넙치 혈청에서 시간이 지남에 따라 살균되었다. 또한 capsule이 존재하는 균주는 식작용을 회피하는 기작이 나타났으며 ROIs 생



산 자극 정도가 낮았다.

이상의 결과에서 넙치 병어에서 분리한 *S. parauberis*는 세균 표면 바깥쪽에 존재하는 capsule이 식작용과 혈청 살균능 등에 강한 저항성을 가지는 것으로 판단되었다.

### 감사의 글

본 연구의 일부는 국립수산물과학원의 연구 지원 사업에 의해 수행된 연구 결과임을 밝힙니다.

### 참고 문헌

- Alim, A. R., K. Kawai and R. Kusuda: Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. *J. Fish Dis.*, 19: 39-46, 1996.
- Bachrach G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D. L. Evans and A. Eldar: Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. *Appl. Environ Microbiol.*, 67: 3756-3758, 2001.
- Baeck, G. W., J. H. Kim, D. K. Gomez and Park, S. C.: Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. *J. Vet. Sci.*, 7: 53-58, 2006.
- Barenes, A. C., C. Guyot, B. G. Hansen, K. Mackenzie, M. T. Horne and A. E. Ellis: Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, 12: 155-168, 2002.
- Barenes, A. C., F. M. Young, M. T. Horne and A. E. Ellis: *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 241-247, 2003.
- Bisno, A. L., M. O. Brito and C. M. Collin: Molecular basis of group A Streptococcal virulence. *Lancet Infect. Dis.*, 3: 191-200, 2003.
- Currás, M., B. Magariños, A. E. Toranzo and J. L. Romalde: Dormancy as survival strategy of the fish pathogen *Streptococcus parauberis* in the marine environment. *Dis Aquat. Org.*, 52: 129-136, 2002.
- Czuprynski, C. J.: Bacterial invasion of cellular defense mechanisms: an overview. In: Virulence mechanisms of bacterial pathogens (ed. by Roth, J. A). 141-160, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1988.
- Domenech, A., J. F. Fernandez-Garayzabal, C. Pascual, J. A. Garca, M. T. Cutuli, M. A. Moreno, M. D. Collins and L. Dominguez: Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, 19: 33-38, 1996.
- Horwitz, M., and S. C. Silverstein: Influence of the *Escherichia coli* capsule on fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 65: 82-94, 1980.
- Johnson, J. A., P. Panigrahi and J. G. Morris, Jr.: Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT 36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance and virulence in mice. *Infect. Immun.*, 60: 864-869, 1992.
- King, B. F. and B. J. Wilkinson: Binding of human immunoglobulin to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 33: 666-672, 1981.
- Kitao, T.: The methods for detection of *Streptococcus* sp., causative agent of streptococcal disease in cultured yellowtail, *Seriola quin-*

- queradiata*, especially their cultural, biochemical and serological properties. Fish Pathology, 17: 17-26, 1982.
- Kitao, T: Strain variation associated with pathogenesis of *streptococcus* sp., the causative bacteria of streptococcosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Proc. 2nd Natl. Pacific Aquaculture Symposium, Tokyo and Shimizu, Japan, Tokai University, 196-210, 1983.
- Locke, J. B., K. M. Colvin, A. K. Datta, S. K. Patel, N. N. Naidu, M. N. Neely, V. Nizet and J. T. Buchanan: *Streptococcus iniae* Capsule impairs phagocytiv clearance and contributes to virulence in fish. J. Of Bac., 189: 1279-1287, 2007.
- Margarinos, B., R. Bonet, J. L. Romalde, M. J. Martinez, F. Congregado and A. E. Toranzo: Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. Microbio. Pathol., 21: 289-297, 1996.
- Miles, A. A. and S. S. Misra: The estimate of the bacterial power of the blood. J. Hygiene, 38: 873-885, 1938.
- Pier, G. B. and S. H. Madin: *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from and Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 26: 545-553, 1976.
- Secombes, C. J.: The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. and T. Nakanishi editor. The fish immune system: organism, pathogen and enviroment. San Diego: Academic Press., 105-157, 1996.
- Yoshida, T., M. Endo, M. Sakai and V. Inglis: A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Dis. Aquat. Org., 29: 233-235, 1997.
- Wai, S. N., Y. Miszunoe, A. Takade, S. I. Kawabata and S. I. Yoshida: *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance and biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol., 64: 3648-3655, 1992.
- Williams, A. M. and M. D. Collins: Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* type I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. J. Appl. Bacteriol., 68: 485-490, 1990.
- Woo, S. H., H. J. Kim, J. S. Lee, J. W. Kim and S. I. Park: Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. J. Fish Patholo., 19: 17-33, 2006 (*in Korean*).
- Zlotkin, A., H. Hershko and A. Eldar: Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4065-4067, 1998.

---

Manuscript Received : August 7, 2007

Revision Accepted : September 21, 2007

Responsible Editorial Member : Kang, Ju-Chan  
(Pukyong National University)