

여僽증 넛치, *Paralichthys olivaceus*의 증상에 대한 병태생리학적 고찰

김이경 · 정준범* · 이무근 · 박수일 · 박명애** · 최미경*** · 여인규†

부경대학교 수산생명의학과, *제주대학교 해양의생명과학부, **국립수산과학원 병리연구과,
***수산자원사업단 제주사업소

Pathophysiology of olive flounder *Paralichthys olivaceus* suffering from emaciation

Yi Kyung Kim, Joon Bum Jeong*, Mu Kun Lee, Soo Il Park, Myeong Ae Park**,
Mi Kyung Choe*** and In Kyu Yeo*

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

*School of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Jeju Province 690-756, Korea

**Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, 408-1 Silang, Gijang,
Busan 619-902, Korea

***Jeju Branch, Korea Fisheries Resources Agency, Korea

This study was aimed to investigate the pathophysiological changes of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* suffering from emaciation. A plasma osmolality was higher in the emaciated and control flounders than that of normal teleost, suggesting osmoregulatory failure in both of them. Also, the control in the same stock with emaciated flounder seem to be classified into a primary degree of emaciation. According to microscopic observations, the inflammatory responses were observed in the submucosal layer of anterior intestine, although the some of mucosal intestinal epithelium still remained. It was suggested that the pathological changes of the anterior part give rise to malabsorption of nutrients through the mucosa. In the posterior intestine and rectum, the mucosal epithelium were almostly sloughed off and severe inflammatory responses were observed in the submucosa. Immunoreaction for NKCC was not detected in the mucosal epithelial cells in intestine because of sloughing of epithelium. These changes would lead to functional disorder in the intestine, such as malabsorption of nutrients and osmoregulatory failure. Also important is to investigate the recovery phase.

Key words :Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Emaciation, Osmoregulatory failure, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) cotransporter, Intestine

1990년대 들어서 일본 규슈지방의 자주복의 양식장에서 출하직전의 자주복에서 여僽병이 발생하여 양식업 종사자에게 사할의 문제가 될 만큼 크나큰 피해를 입혔다. 자주복의 외형적인 특징은 1일 내지

2일이라는 단시간 내에 극도로 움푹 들어간 눈, 등과 볼 부분이 특히 여僽 증상을 나타낸다. 이러한 여僽병의 원인체로 점액포자충, *Enteromyxum leei* 와 *Leptotheca fugu* 의 두 종류로 밝혀져 있으며, 어느 쪽이든 한 종류가 기생하는 경우와 2종류 모두 기생하는 경우가 있는 것으로 알려져 있다 (Ogawa and Yokoyama,

†Corresponding Author: In Kyu Yeo, Tel : 064-754-3474

Fax : 064-702-2463,

E-mail : ikyeo99@jejunu.ac.kr

2001; Tintun et al., 2002; Yanagida et al., 2004). Ogawa and Yokoyama (2001)는 자주복의 급격하게 여위는 메커니즘에 대해서 장내 myxosporeans에 의해 자주복의 장 상피조직이 박리 및 붕괴되고, 장내 물흡수를 저해하는 등 삼투조절장애로 인하여 여윌증상이 발생한다는 결론을 내렸다. 2007년에 들어서부터 제주도 넓치 양식장에서 약 20cm 전후 크기의 넓치에서 여윌증이 발생하여, 1~3주 동안 발병, 폐사되는 사례가 발생하고 있다. 일본의 자주복과는 달리, 넓치의 여윌증 원인은 아직 밝혀지지 않은 실정이다.

다양한 염분 농도의 수생환경에서 생활하는 경골어류의 경우, 삼투압과 농도구배에 따라 물과 이온의 수동적인 이동이 이루어지고 있다. 경골어류에 있어서의 삼투조절작용은 아가미, 장 그리고 신장에서의 통괄적인 물과 이온의 이동 활동에 의해서 이루어지며, 이로 인해서 물과 이온의 균형을 유지할 수 있다. 이러한 삼투조절기관 중에서도 장은 해수 적응시 물 조절에 매우 중요한 역할을 한다 (Smith, 1930; Collie and Bern, 1982; Ando et al., 2003). 해수나 해수에 적응된 경골어류는 체표 밖으로 수분이 빠져나가는 것을 보충하기 위해서는 대량의 해수를 들이마시고 들이마신 물로부터 수분을 보충하는 수밖에 없다. 장 내의 물 흡수의 주요한 구동력은 수동적이고 능동적인 이온 흡수에 의한 장내 소화액과 체액 사이에 일어나는 삼투압차 (osmotic gradient)이다. 해수 장어의 경우 (Hirano and Mayer-Gostan, 1976), 들이마신 해수는 식도를 통해 위에 달하는 동안에 탈염되어 Na^+ 이온과 Cl^- 이온 농도가 약 반정도까지 저하된다. 이러한 이온 흡수는 장관 내 물이 이동하는 동안에 일어나는데, 이는 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 에 의해서이다 (Loretz, 1995). 결과적으로 들이마신 해수의 삼투압은 체액 삼투압과 거의 비슷한 수준까지 감소된다 (Kim et al., 2008).

최근 들어서 장 상피세포에 있어서의 NaCl 흡수에 관련된 이온채널 단백질에는 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (NAK), $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC)와 Na^+/Cl^- (NC) cotransporter로 알려져 있다 (Marshall and Grosell, 2006). 이 모델에서는 NAK가 상피세포의 측저막에 위치하여 상피세포에 있어서의 이온수송의 구동력을 제공하고, 정단막에 위치한 NKCC 및 NC cotransporter를 통한 Na^+ 와 Cl^- 이온이 상피세포 내로 흡수되는 것으로 추측하고 있다.

뱀장어와 연어과 어류에서 장의 물흡수는 장의 전반부보다는 후반부에서 왕성하게 일어난다고 예상하고 있다 (Collie and Bern, 1982; Veillette et al., 1993; Aoki et al., 2003). 특히, 뱀장어의 직장에서 직장액의 삼투압이 체액보다도 약 10 mOSm/L 낮게 유지되어, 그러한 삼투압 차에 의해서 직장에서 발현되는 아쿠아포린 단백질에 의해서 수분이 흡수된다는 사실을 밝혀내었다 (Kim et al., 2008).

빠져나가는 물을 체내에서 보충하기 위해서 장 내에서의 물흡수와 이온흡수기능이 상호보완적으로 이루어져야 한다. 자주복의 장의 삼투압 기능이 상실됨으로써 여윌병이 발생하였다는 결론을 근거로 하여 본 연구에서는 양식넓치의 여윌증상에 대해서 생리학적 관점에서의 원인분석과 해결책을 모색하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험어

2010년 6월과 8월에 제주도 남제주군에 위치한 2개소의 넓치 양식장으로부터 전형적인 여윌증상을 보이는 넓치, *Paralichthys olivaceus*를 수집하여 삼투압 측정 및 면역조직화학법을 실시하기 위한 분석시료로 사용하였다. 평균 체중은 46.1 g, 평균 체장은

18.6 cm였으며, 양식장 수온은 약 21~22°C였다.

장의 고정 및 절편 제작

동일한 수조의 정상넙치와 여윌넙치로부터 장을 적출하여, 부항액에 침투시켜, 16시간 고정하였다. 고정 후, 장을 전장, 후장 그리고 직장으로 나누어 각각 5 µm 정도의 두께로 절단하였다. 70, 90, 95, 99, 100%의 에탄올 중에 차례로 이동시켜, 조직 내 수분을 에탄올로 치환하였다. 이어서, xylene으로 치환하여, 파라핀 포매를 한 후 microtome을 사용하여 약 4 µm 두께의 절편을 제작하였다. 이를 H&E염색하여 광학현미경으로 관찰하여 정상 넙치와 여윌 넙치의 장을 형태학적으로 비교·관찰하였다. 단, 면역염색 화학법에 사용된 정상어는 부산에서 샘플링한 개체이다.

삼투압 측정

정상 및 여윌증 넙치의 혈장 삼투압을 측정하기 위하여 0.2% 2-phenoxyethanol에 마취를 시킨 후, 헤파린 처리한 1 ml 주사기를 이용하여 미부정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 혈장은 2000 g, 5분 동안 원심분리를 하여 얻었고, 삼투압 측정을 할 때까지 -20 °C에 보관하였다. 삼투압 측정은 Wescor 5520 (Logan, UT, USA)을 이용하였다.

면역조직화학법

면역조직화학법은 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)법을 이용하였다. 제작한 절편을 매뉴얼대로 탈파라핀을 행하여, 0.6% H₂O₂에 30분간 침투시키고, 조직 내의 peroxidase활성을 잃게 한 후 2% Normal Goat Serum (NGS)으로 30분간 blocking한 후 효소항체법으로 면역염색을 행하였다. 1차 항체로는 T4 항체 (2000, 4000배 희석)를 이용하였다. T4는

사람의 NKCC1의 C말단 310 아미노산 잔기를 인식하는 monoclonal antibody로, 틸라피아의 아가미에 있어서 NKCC와 NCC와 반응하는 것이 밝혀져 있다 (Hiroi et al., 2008). 4°C에서 반응시켜, 실온에서 30분간 반응 후, 시판 염색kit (Vestastain ABC kit)를 이용하여 2차 항체와 실온에서 30분간 반응시켰다. 다음 ABC시약과 1시간 반응시켰다. 항체 희석액은 0.01 M PBS (1.9 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 8.1 mM NaH₂PO₄ · 12H₂O, 0.8% NaCl, pH 7.4)에 2% NGS, 0.1% BSA, 0.02% KLH, 0.01% NaN₃을 넣은 것이다. 또, 반응 후 증류수로 세척한 다음, 0.01% PBS로 다시 세척하였다. 마지막으로 dianimobenzidine (DAB)반응액 (0.02% DAB, 0.005% H₂O₂, 50 mM Tris-HCl Buffer, pH 7.6)으로 4분간 발색반응을 시켜, Parmount (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 봉입하여, 광학현미경 하에서 관찰하였다.

결 과

혈장 삼투압 측정

여윌증상을 보이는 넙치가 발생한 수조 내 정상넙치의 평균 혈액 삼투압은 361.2 ± 19.1 mOsm/L였고, 여윌넙치의 삼투압은 평균 405.1 ± 9.0 mOsm/L였다.

정상넙치와 여윌넙치의 장 조직의 비교

광학현미경학적 관찰에 의하면 어류의 장벽은 점막층, 점막하직, 근육층, 장막으로 구성되어 있다 (Aoki et al., 2003). 여윌증상을 보이는 넙치 장의 조직 절편을 광학현미경적으로 분석한 결과, 전장부에 있어서는 변성변화를 보이는 점막상피가 남아 있으나 점막하직 내 다양한 염증성 세포의 광범한 침윤 및 모세혈관확장, 염증성 부종이 확인되었다 (Fig. 1-A). 후장부의 경우 점막상피는 거의 소실되었으며 전장

부와 흡사하게 점막하직 내 심도의 염증반응이 관찰되었으며 (Fig. 1-B), 후장 일부에서는 점막상피의 재생소견도 함께 확인되었다 (Fig. 1-C). 직장도 후장부와 동일한 소견으로 점막상피의 소실과 아울러 장관 고유의 folding 구조가 거의 확인되지 않았다 (Fig. 1-D).

여윌넙치의 장조직에 대한 면역조직학적 관찰 여윌넙치의 장을 이용하여 면역조직화학법을 실시한 결과, 장상피점막층의 탈락으로 인하여 NKCC에 대한 면역염색반응은 확인되지 않았다 (Fig. 2-B). 정상적인 넙치의 경우에는 장 내 장상피세포의 정단부에 존재하는 NKCC에 대한 면역양성반응이 관찰되었다 (Fig. 2-A).

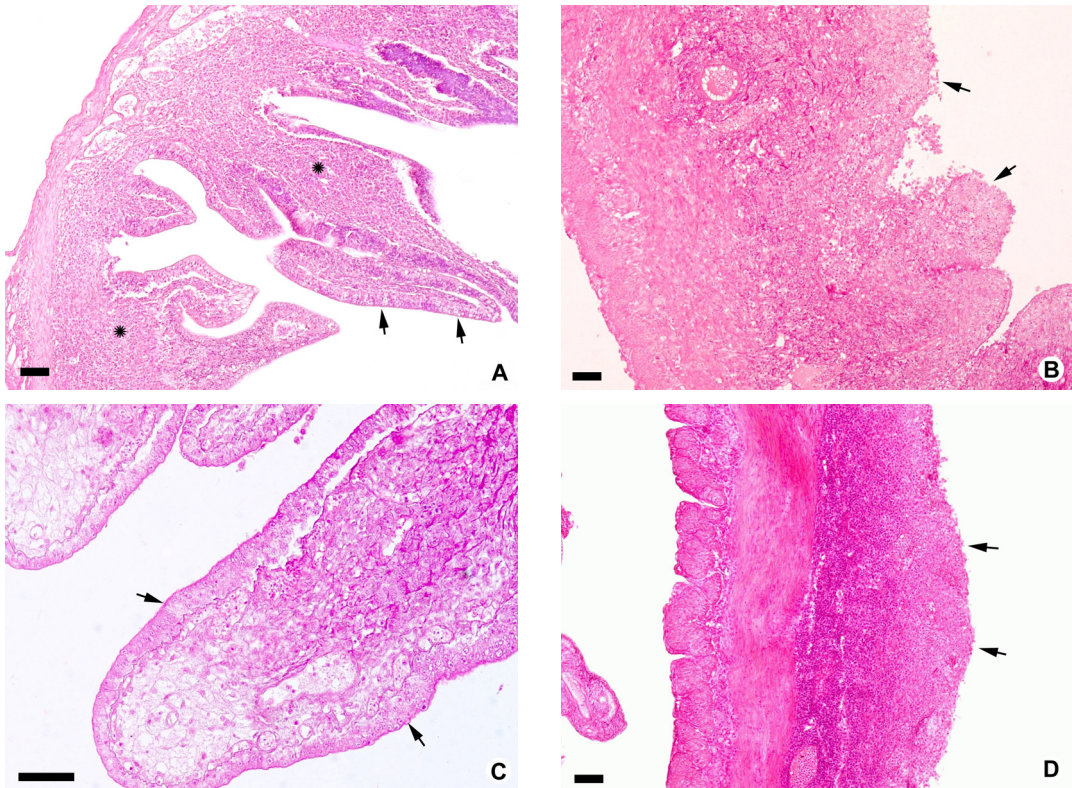


Fig. 1. Histological features of intestine from emaciated flounder. A: Anterior intestine. Degenerative mucosal epithelium (arrows) and submucosal layer with extensive inflammatory response (astriks). B: Posterior intestine. Extensive inflammatory response with slough-off of mucosal epithelium (arrows). C: Posterior intestine. Regenerative mucosal epithelium (arrows). D: Rectum. Extensive inflammatory responses with slough-off of epithelium. Bar=100 μ m

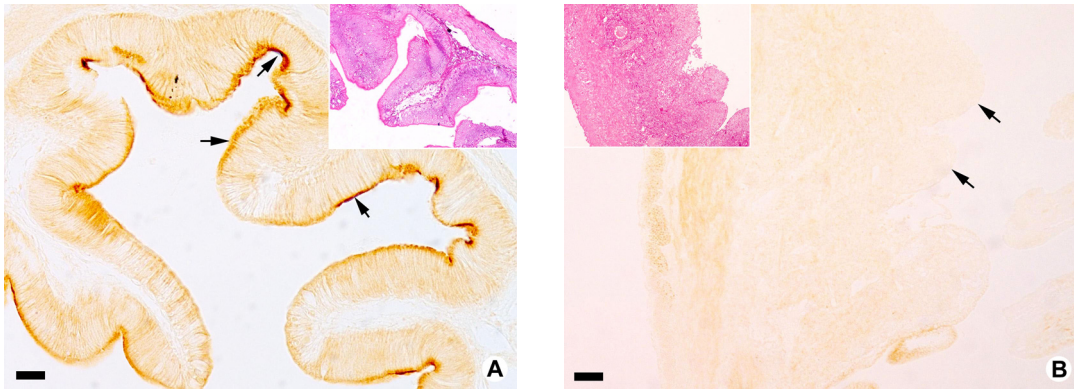


Fig. 2. NKCC immunohistochemical features of intestine from emaciated flounders. A: The intense immunoreactions for NKCC are observed in the apical surface of posterior intestine (arrows). B: No NKCC immunoreactions was detected in epithelial apical membrane of posterior intestine in emaciated flounders (arrows). Insets: histological sections with H&E stain. Bar=100 μ m

고찰

본 연구는 일본 자주복의 여崈증에 대한 연구결과를 근거로 하여 여崈 넉치의 장에 집중하여 우리나라 넉치 양식장에서 문제로 대두되고 있는 여崈증상의 원인을 분석하기로 하였다. 혈장 삼투압을 측정해본 결과 여崈넉치와 동일한 수조 내의 정상넉치의 평균 삼투압은 361.2 ± 19.1 mOsm/L 이고, 여崈넉치의 삼투압은 평균 405.1 ± 9.0 mOsm/L로 나타났다. 정상적인 해산어의 혈장 삼투압의 범위가 280-330 mOsm/L라는 사실을 감안하면 여崈넉치가 발생한 수조 내 정상넉치와 여崈넉치의 혈장 삼투압은 정상적인 범위보다 매우 높은 수치를 나타내고 있음을 알 수 있다. 이는 정상 및 여崈증 넉치 모두 삼투압 조절기능에 이상이 있음을 시사하고 있다. 여崈증에 걸린 자주복도 마찬가지로 정상어보다 높은 수치(약 355 mOsm/L)를 나타내었으며, 혈장 내 Cl-이온의 농도가 정상어에 비해서 유의적으로 높은 수치를 나타내었다 (Ishimatsu et al., 2007).

여崈증상을 보이는 넉치에 대한 조직학적 분석결

과, 전장부를 제외한 후장부 및 직장부의 점막상피가 모두 소실되고 장 전역의 점막하직에서 모세혈관확장, 염증성 부종 및 염증성 세포의 광범한 침윤이 확인되어 일종의 궤양성 장염(ulcerative enteritis)의 소견을 보이는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 특히, 전장부에서 관찰되는 심한 염증성 반응은 전장부의 고유한 영양물질 흡수 기능의 심각한 손상을 야기할 가능성이 있어 영양학적 관점에서의 여崈증상과의 상관성이 깊을 것으로 사료되었다. 또한, 후장 및 직장부의 광범한 상피탈락 및 염증성 반응은 심각한 수분소실 및 이온 교환장애로 이어질 수 있어 체내 삼투조절 기능부전으로 이어질 수 있을 것으로 생각된다. 정상넉치의 장을 보면, 여崈넉치에 비해서 상피조직 자체는 유지되고 있으나, 여崈넉치와 마찬가지로 염증세포의 침윤과 혈관 확장이 관찰되었다. 따라서, 여崈넉치가 발생한 수조 내의 정상넉치는 외관상 아무런 증상이 보이지 않으나, 여崈증 초기 단계의 개체로서 정의내릴 수 있을 것이다.

장에서의 탈염과정, 즉 NaCl 흡수의 중요한 요소인 NKCC와 NCC는 cation-Cl cotransporter (CCC)

family에 속해 있으며, electroneutral적으로 양이온과 Cl-을 cotransport하는 단백질이다. CCC family는 물과 전해질의 조절을 통하여 상피세포에 있어서 염분과 물의 수송에 관련되어 있다 (Greger, 1985; Hass and Forbush, 1998; Isenring et al., 1998; Warth et al., 1998). NKCC에는 적어도 2개의 isoform NKCC1과 NKCC2가 존재한다고 알려져 있고, NKCC1은 여러 장기에 있어서 세포의 측저막상에 존재한다 (Mount et al., 1998, Haas and Forbush, 2000). NKCC2는 신장에서 특이적으로 발현하고 있으며, 포유류에서는 ascending limb loop of Henle과 원위세뇨관의 상피세포 정단막에서 국재하고, NaCl 흡수에 관계하고 있다고 예상되고 있다 (Knepper and Brooks, 2001; Starremans et al., 2003). 유럽 장어, *Anguilla anguilla*에 있어서는 신장 이외에도 장에서 특이적 발현하는 NKCC2의 isoform인 NKCC2 β 가 동정되었다 (Cutler et al., 2008). 우리나라의 넙치와 뱀장어의 장에서 발현하고 있다는 사실이 동정되었다 (unpublished data). 뱀장어와 넙치의 경우, T4를 이용한 면역염색의 결과, 정상 넙치의 장의 상피세포 정단막 위에서의 면역양성반응을 확인하였다. 여웬넙치를 이용한 면역염색에서는 아무런 반응이 나타나지 않았으며, 이러한 결과는 H&E염색의 결과를 통해서 예상할 수 있는 결과였다. 또한 장상피조직에 존재하는 NAK에 대한 면역염색도 실시하였으나, NKCC에 대한 결과와 마찬가지로 장상피조직의 탈락으로 인하여 아무런 면역반응이 확인되지 않았다 (data not shown).

지금까지의 조직학적 결과를 토대로 하여 양식넙치의 생리학적 관점에서 여웬증상을 살펴보면 다음과 같은 과정을 추론할 수 있다. 즉, 해산어는 들어마신 해수(약 1000 mOsm/L)는 식도와 위에서 탈염되어 전장 내에서는 약 400 mOsm/L, 장의 끝 부분인 직장액의 삼투압은 300~360 mOsm/L이 된다고 알려져

있다 (Hirano and Mayer-Gostan, 1976; Ando et al., 2003; Marshall and Grosell, 2006). 특히, 뱀장어의 직장에서는 직장액의 삼투압이 체액보다도 약 10 mOsm/L 낮게 유지되고, 그러한 삼투압 차에 의해서 수분이 흡수된다고 시사하고 있다 (Kim et al., 2008). 그러나 여웬넙치는 장상피조직의 박리·탈락됨으로써 삼투압을 낮출 수 없으므로, 역으로 체내의 물이 혈액을 통해 빠져나가게 되므로 탈수현상이 보이고 따라서 여웬증상이 나타나는 것으로 예상된다. 이처럼 심하게 장상피세포가 탈락되어 생존하기 어렵다고 예상되나, 여웬증상으로 보이다가 회복되는 개체가 있으므로 이에 대한 검토와 영양학적 관점에서의 여웬증에 대한 고찰도 필요하다. 그리고 앞으로 여웬넙치의 삼투조절기능 장애에 대한 검증을 하기 위해서 장 뿐만 아니라, 다른 삼투조절기관인 신장과 아가미에 대해서도 검증되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 여웬증상을 보이는 넙치의 병태생리학적 변화를 관찰하는 것으로 목적으로 하였다. 여웬넙치가 발생한 수조 내의 정상넙치와 여웬넙치의 혈장 삼투압을 측정하고, 정상적인 해산어의 삼투압(280~330 mOsm/L)보다 훨씬 높은 약 361과 405 mOsm/L로 각각 나타났다. 이러한 사실은 여웬넙치와 동일한 수조 내의 정상넙치의 삼투압 조절기능에 이상이 있음을 시사하고 있다. 또한, 외관상 증상을 나타내고 있지 않으나, 여웬넙치가 발생한 수조의 정상적인 넙치는 여웬증상이 나타나기 이전의 초기 단계로 정의할 수 있다. H&E염색을 통하여 여웬넙치의 장을 관찰한 결과, 여웬넙치의 전장에서는 상피세포가 남아 있기는 하나, 점막하 조직에서는 염증반응이 확인되었으며, 전장의 영양물질 흡수 기능에 손상

이 야기되어 있을 가능성이 시사되었다. 그리고 후장의 경우 점막상피는 거의 손실되었으며, 직장에서는 점막상피의 소실과 아울러 소화관 고유의 folding 구조가 거의 확인되지 않았다. 면역염색의 결과에서도 장의 상피조직이 손실됨으로써 점막상피에 존재하는 Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC) cotransporter 에 대한 면역반응이 확인되지 않았다. 따라서, 해산어의 수분흡수의 중요한 장소인 후장과 직장의 상피조직이 심하게 손실됨으로써 넙치의 삼투조절기능의 균형이 깨지고 탈수현상이 보이고 따라서 여윌증상이 나타난 것으로 여겨진다. 뿐만 아니라 전장의 조직학적 변화를 통한 여윌증상에 대한 영양학적 관점에서의 고찰이 이루어져야 한다. 양식넙치의 여윌증 원인분석을 위해서 여윌증상 개체뿐만 아니라 여윌증상을 보이다가 회복된 개체에 대한 검토도 필요하다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원(수산동물 질병 역학 및 진단연구, RP-2011-AQ-022)의 지원에 의하여 운영되었습니다.

참고문헌

- Ando, M., Mukuda T. and Kozaka, T.: Water metabolism in the eel acclimated to seawater: from mouth to intestine. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 136: 621-633, 2003.
- Aoki, M., Kaneko, T., Katoh, F., Hasegawa, S., Tsutsui, N. and Aida, K.: Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted Japanese eel. *J. Exp. Biol.*, 206:3495-3505, 2003.
- Bentley, P.J.: Endocrines and osmoregulation, In *Zoophysiology*, vol.39, Springer, Berlin, 2002.
- Collie, N.L. and Bem, H.A.: Changes in intestinal fluid transport associated with smoltification and seawater adaptation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*(Walbaum), *J. Fish Biol.* 21:337-348, 1982.
- Cutler, C.P. and Cramb, G.: Differential expression of absorptive cation-chloride-cotransporters in the European eel *Anguilla anguilla*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 149:63-73, 2008.
- Evans, D.H.: Osmotic and ionic regulation, pp.315-341, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- Greger, R.: Ion transporter mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol. Rev.* 65:760-797, 1985.
- Hass, M. and Forbush, B.III.: The Na-K-Cl cotransporters. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30:161-172, 1998.
- Hass, M. and Forbush, B.III.: The Na-K-Cl cotransporters of secretory epithelia. *Annu. Rev. Physiol.*, 62:515-534, 2000.
- Hirano, T. and Mayer-Gostan, N.: Eel esophagus as an osmoregulatory organ. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 73:1348-1350, 1976.
- Hiroi, J., Yasumasu, S., McCormick, S.D., Hwang, P.P. and Toyoji, K.: Evidence for an apical Na-Cl cotransporter involved in ion uptake in a teleost fish. *J. Exp. Biol.* 211:2584-2599, 2008.
- Isenring, P., Jacoby, S.C., Chang, J. and Forbush, B.: Mutagenic mapping of the Na-K-Cl cotransporter for domains involved in ion transport and bumetanide binding. *J. Gen. Physiol.*, 112:549-558, 1998.
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Nakane, M. and Sameshima, M.: Pathophysiology of cultured tiger puffer

- Takifugu rubripes suffering from the Myxosporean emaciation disease. *Fish Pathol.*, 42:211-217, 2007.
- Kim, Y.K., Ideuchi, H., Watanabe, S., Park, S.I., Huh, M.D. and Kaneko, T.: Rectal water absorption in seawater-adapted Japanese eel *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 151:533-541, 2008.
- Knepper, M.A. and Brooks, H.L.: Regulation of the sodium transporter NHE3, NKCC2 and NCC in the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 10:655-659, 2001.
- Loretz, C.A.: Electrophysiology of ion transport in teleost intestinal cells. In: *Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*, pp.25-56, Academic, New York, 1995.
- Marshall, W.S. and Grosell, M.: Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance, In *The physiology of fishes*, pp.179-230, CRC Press, Boca Raton, 2006.
- Mount, D.B., Delpire, E., Gamba, G., Hall, A.E., Poch, E., Hoover, R.S. and Herbert, S.C.: The electroneutral cation-chloride cotransporter. *J. Exp. Biol.*, 201:2091-2102, 1998.
- Ogawa, K. and Yokoyama, H.: Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Bull. Natl. Res. Inst., Suppl.*, 5:65-70, 2001.
- Smith, H.W.: The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts. *Am. J. Physiol.* 93:480-505, 1930.
- Starremans, P.G., Kersten, F.F., Knoers, N.V., van den Heuvel, L.P. and Bindels, R.J.: Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14:1419-1426, 2003.
- Tin Tun, Ogawa, K. and Wakabayashi, H.: Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *J. Fish Dis.*, 25:63-72, 2002.
- Yanagida, T., Nomura, Y., Kimura, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H. and Ogawa, K.: Molecular and morphological redescrptions of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathol.*, 39:137-143, 2004.
- Veillette, P.A., White, R.J., Specker, J.L.: Changes in intestinal fluid transport in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) during parr-smolt transformation. *Fish Physiol. Biochem.* 12:193-202, 1993.
- Warth, R., Bleich, M., Thiele, I.I., Lang, F. and Greger, R.: Regulation of the Na^+2Cl^- cotransporter in in vitro perfused rectal gland tubules of squalus acanthias. *Pflugers Arch.*, 436:521-528, 1998.

Manuscript Received : February 11, 2011

Revised : April 5, 2011

Accepted : April 5, 2011