

수산생물의 생산과 관리에 관한 기초연구 : ELISPOT 기법을 이용한 넙치의 항체생성 세포분석

하재이 · 박준호* · 김명석* · 정준기* · 정현도*
국립수산진흥원 동해수산연구소 증식과, *부경대학교 수산생명의학과

Study on the Production and Management of Aquatic Animal : Application of ELISPOT-Assay for the Detection of Antibody Secreting Cells in Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jai Yi HA, Jun-Hyo PARK*, Myoung Sug KIM*, Joon-Ki CHUNG*, Hyun Do JEONG*
Division of Aquaculture, East Sea Regional Fisheries Research Institute, National Fisheries R & D Institute, Kangwon-do 210-860, Korea, *Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

We examined the immune response in flounder, *Paralichthys olivaceus*, with immunization of formalin killed *Edwardsiella tarda* as an antigen. The ELISPOT-assay (enzyme-linked immunospot assay) was optimized technically and applied to count the number of total and specific antibody secreting cells (TASC and SASC) in lymphocytes of different lymphatic organs. Incubation of lymphocytes on 96 well plate for more than 2.5hrs came out enough time in ELISPOT-assay for counting the antibody secreting cells in the anterior kidney and spleen. However, too much of plate-coated antigen or rabbit anti-flounder immunoglobulin for SASC or TASC counting, respectively, was appeared to decrease the sensitivity of the assay system. Specificity of the system was also confirmed by the absence of TASC in lymphocytes treated with cycloheximide to prevent protein synthesis. The peak numbers of SASC appeared at wk 3 post immunization after that there was a sharp decrease and reached to almost zero at wk 7. In the spleen and kidney, the timing and numbers of SASC on peak response were concurrent without preferential organ distribution. The specific antibody level in the sera increased rapidly between wk 2 and 3 after immunization, i.e. like the specific cellular response found with ELISPOT-assay on that period. However, the remained high level of specific serum antibody from wk 5 after immunization until the end of experiment was clearly distinguishable from the kinetics of SASC response decreased sharply.

Key words: fish immune response, flounder, antibody secreting cell, ELISA, ELISPOT, cycloheximide

서 론

세균, 기생충 등을 포함한 외부 항원의 어체내 침입으로 인하여 자극된 어류의 임파세포는 분화와 증식이라는 일련의 과정을 거치면서 최종적으로 혈청내 항체를 생산해 낼 수 있는 항체생성세포 (antibody secreting cell, ASC)로서 어류의 임파장기에 존재하게 된다고 알려져 있다. 포유류와 마찬가지로 어류 체내의 immunoglobulin은 특이적 면역체계 변화를 이루어 나가는데 있어서 매우 중요한 기능을 가지는 것으로 보고되었다. 병원성미생물에 대한 특이적 면역반응기작에 관한 연구에서 Biering (1997)은 Atlantic halibut을 대상으로 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)의 인위 감염시 혈청내 특이항체 생성에 따른 면역능 획득에 관하여 보고하였으며 Höglund 등 (1994)은 유럽산 뱀장어에 기생하는 *Anguillicola crassus*의 균체추출항원의 면역 처리에 따른 특이항체 검출에 따른 체액성 면역반응을 보고하였다. 이와 같이 어류의 세균 및 기생충, 바이러스 감염에 대한 체액성 면역 반응을 설명하는데 있어서 중요한 의미를 가지는 특이항체의 검출 방법으로는 현재 항원-항체의 결합을 이용하는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법이 널리 사용되고 있다. ELISA법은 이전의 응집반응에 비하여 효소사용에 의한 신속성, 민감성, 안전성 등의 이점으로 항원-항체 결합을 주로 이용하는 분석 실험전반에 널리 응용되고 있다. 이러한 혈청내 분비, 순환되고 있는

항체의 검출 및 생성 kinetics에 관한 연구는 한 걸음 더 나아가 혈액 또는 면역 기관인 신장 및 비장 조직에 존재하는 전체 임파세포 가운데 혈청내 항체의 생산과 분비에 직접 관여하는 ASC를 단일세포 수준에서 분석함으로써 전체 체액성 면역반응의 해석에 보다 세분화되고 정확한 정보를 제공할 수 있을 것이다.

ASC를 검출하는 방법으로서 혈청내 존재하는 보체를 이용하는 Jerne과 Nordin (1963)의 haemolytic plaque assay법이 일반적으로 알려졌으나, 이 방법을 적용하는데 있어서 양의 적혈구에 감작시키는 항원 조제의 번거로움과 제한성 (Hardie et al., 1990) 그리고 어류 혈청내 natural haemolysin의 존재 유무의 확인 필요 (Pourreau et al., 1990, Secombes et al., 1991) 등 여러 가지 어려움이 발견되었다. Sedgwick 등 (1983)은 이러한 불편함을 개선하기 위하여 ELISA 분석법의 기본 원리를 응용, 발전시킨 solid-phase immunoenzymatic technique을 개발, 보고하였다. 항원을 감작시킨 양의 적혈구 대신 항원을 coating 시킨 solid-phase plate를 임파구와 반응시키면, *in vitro*에서 생성된 항체는 solid phase에 coating된 항원에 결합되며 이러한 항원-항체 복합체는 효소적 방법에 의하여 최종적으로 발색된 spot으로 검출되게 하였다. 이러한 enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT)은 포유류와 설치류에서는 보편적으로 널리 사용되어져 왔으나 어류에서는 최근에 이르러서야 적용되기에 이르렀다 (Secombes et al., 1991, Waterstrat et al., 1991). Secombes 등 (1991)은 dab

(*Limanda limanda* (L.))의 입과장기내에 존재하는 ASC를 검출하였으며 Davidson 등 (1992)은 무지개 송어에 적용한 예를 보고하였다. 또한 Bovine gammaglobulin (BGG)이 주사된 roach (*Rutilus rutilus*)에서 혈청내 항체량과 항체생성세포를 각각 ELISA와 ELISPOT 기법을 이용하여 분석한 Aaltonen 등 (1994)의 연구에서는 면역처리에 기인한 혈청내의 항체량 변화가 면역기관내에 존재하는 항체생성세포의 수적 변화와 상관관계가 있음을 보고하였다. 그러나 현재까지 이러한 기법을 이용하여 국내에서 양식되고 있는 어류의 면역 체계 및 면역 기관내 항체 생성세포의 동적 변화에 관한 연구는 되어 있지 않다.

본 연구에서는 현재 어류의 면역반응 분석에 사용되기 시작하고 있는 ELISPOT 기법을 국내 양식 산업의 주종을 이루는 어류인 넙치에 적용하여 면역 기관내 존재하는 총 항체생성세포 (total antibody secreting cells, TASC) 및 특이 항체생성세포 (specific antibody secreting cells, SASC)를 검출, 분석하고자 하였다. 따라서 기존의 ELISPOT 기법을 수정 및 보완함으로써 국내 어종의 면역 반응 분석에 다양하게 적용시키기 위한 최적화된 방법의 확립과 대표적 어류 세균성 질병인 edwardsiellosis의 원인균인 *E. tarda*의 FKC로서 면역 처리된 어류의 면역 기관내 존재하는 항 *E. tarda* 항체를 생산하는 SASC의 동력학적인 변화를 분석함으로써 향후 어류의 질병에 대한 보다 효과적인 백신 개발과 새로운 예방 대책 수립에 유용한 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험어

체중 200~300 g의 병력이 없는 건강한 넙치를 동해안 일대 양식장으로부터 공급받아 수온 22°C의 실험실 수조에서 2주 이상 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 면역처리

상법 (Itami et al., 1989)에 따라 0.5% formalin 처리에 의하여 불활화시킨 formalin killed cell (FKC)를 phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2의 완충용액을 사용하여 8,000rpm에서 3회 세척한 다음 freund's complete adjuvant (FCA)와 1:1로 혼합하여 어체 당 10 mg/kg의 농도로서 각각 복강주사를 실시하였다. 면역 후 1, 3, 5, 7 주째에 각 그룹에서 어류를 채취하고 미부 혈관을 통하여 전채혈을 실시하여 면역 처리에 따른 혈청내 특이항체 생성을 분석하였으며 항체생성세포 분석에는 신속하게 적출된 신장 및 비장조직을 단일 세포화하여 사용하였다.

3. 응집항체가 측정

미부 혈관을 통하여 전채혈된 혈액을 4°C에서 12시간 이상 정지시킨 후 원심 분리 (8,000 rpm, 10 min.)하여 혈청을 분리하였다. 혈청내 형성된 항 *E. tarda* Edk-2 항체의 측정은 96 well plate를 이용하여 연속적으로 희석하는 microtiter법을 사용하였으며 실온 습윤기에서 6시간 이상 반응시킨 후 응집도가 형성되는 최대 희석 배수를 응집 항체가로 결정하였다.

4. 항 flounder immunoglobulin의 제작

Bovine serum albumin (BSA)으로서 면역 처리된 넙치의 혈청에 포화된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 50%의 농도에서 침전된 단백질을 BSA coupled Sepharose 4B의 affinity column를 통과시킴으로써 항BSA immunoglobulin을 얻고 이를 순수 분리된 항원 (flounder immunoglobulin)으로 사용하였다. 분리된 항원과 동량의 FCA를 혼합하여 토끼에 개체당 2~10 mg/kg의 농도로서 최소 10 군데 이상의 곳에 피하주사 하였으며 3주후 동량의 항원으로 재 자극을 실시하였다. 재 자극 2주후 심장으로부터 전채혈을 실시하여 얻은 토끼 항혈청으로부터 Protein A-Sepharose CL-4B affinity chromatography (FPLC, Pharmacia)를 이용하여 토끼의 총 면역 글로부린을 얻고 이를 flounder immunoglobulin을 분석하는 항체로 사용하였다. Biotin이 결합된 토끼 항flounder immunoglobulin은 Guesdon 등 (1979)과 Bayer와 Wilchek (1980)의 방법에 따라 제조 및 분석하였으며 -20°C에 보관하면서 필요시 꺼내어 사용하였다.

5. 입과장기의 단일세포화

적출된 신장과 비장 조직은 3% FCS (Fetal Calf Serum, Sigma)와 100 µg/ml의 penicillin, 100 I. U/ml의 streptomycin이 함께 첨가된 RPMI-1640 (Sigma)에서 nylon mesh를 이용하여 단일세포로 현탁 시켰으며 1,000 rpm에서 5분간 3회 세척하고 haemocytometer를 사용하여 0.1% trypan blue 용액으로 염색하여 생존 세포가 95% 이상임을 확인한 후 실험에 사용하였다.

6. ELISPOT

Nitrocellulose membrane을 직경 6 mm의 원형으로 자른 후 PBS 완충용액에서 충분히 침지시킨 다음 96well plate의 각 well의 바닥에 부착시켜 ELISPOT을 위한 plate로서 준비하였다. TASC의 검출을 위하여 각기 다른 농도의 anti-flounder immunoglobulin (2.5, 100, 400 µg/ml) 100 µl씩을 well에 가한 다음 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.05%의 Tween20이 첨가된 PBS (PBS-T)로서 각각의 well을 3회 세척한 후 3%의 BSA로서 2시간 동안 masking을 실시하여 비특이적 결합을 억제하였다. 넙치의 비장과 신장 조직으로부터 분리된 세포는 well에 첨가되기전 RPMI-1640 배지로 3회 세척한 다음 각각 10^5 , 10^4 , 10^3 cells/0.1 ml/well씩 가하여 22°C 습윤기에서 각각 0.5, 2.5, 5시간 동안 정치하여 생성된 항체가 주위로 유출토록 하였다. PBS-T로서 조심스럽게 membrane위의 세포들을 제거한 후 반응시간동안 세포로부터 생성유출된 후 membrane에 고정되어 있는 토끼의 항체와 결합된 넙치의 항체를 검출하기 위하여 20 µg/ml의 biotin-conjugated rabbit anti-flounder immunoglobulin을 75 µl씩 가하여 37°C에서 45분간 반응시켰다. 상업적으로 시판되고 있는 ExtrAvidin labeled alkaline phosphatase (Sigma)를 1:1,000으로 희석하여 각 well에 75 µl씩 가하여 37°C에서 45분간 반응시킨 후 효소기질로서 BCIP/NBT용액 (Sigma)을 각 well에 100 µl씩 가하여 실온에서 10분간 발색시키고 증류수로 세척한 다음 형성된 spot을 stereomicroscope로 관찰하였다. 또한 SASC를 검출하기 위하여서는 각기 다른 농도 (0.2, 20, 200 mg/ml)

의 *E. tarda* Edk-2 FKC 100 μl 를 각 well에 가한 후 60°C의 건조기에서 건조시킴으로서 바닥에 있는 membrane에 항원을 부착시키고 10⁷, 10⁶, 10⁵ cells/ml의 농도로 회석된 임파조직 세포 현탁액을 100 μl 씩 각 well에 가하여 정치반응 시킨 후 TASC 분석과 동일한 biotin conjugated rabbit antiflounder immunoglobulin과 Extravidin labelled alkaline phosphatase를 처리하여 ELISPOT을 실시하였다.

결 과

1. 반응시간이 ELISPOT의 감도에 미치는 영향

면역처리 후 5주째 되는 넙치의 신장과 비장 조직의 세포를 단일세포로 현탁 하고 이것을 정제된 anti-flounder immunoglobulin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 overnight동안 coating시킨 nitrocellulose membrane 위에 가하여 22°C의 96 well plate에서 각각 0.5, 2.5, 5 시간 동안 반응시키면서 시간별로 나타나는 ASC를 조사하였다. 반응시간을 2.5 시간 주었을 때 신장조직에서 검출된 TASC는 평균 836 spots/10⁵cells 이었으며 이후 5시간 반응시킨 그룹에서는 약 28% 증가된 1,153개의 spots이 검출되었다 (Fig. 1). 비장 조직에서는 2.5시간과 5시간 동안 각각 반응시킨 것에서 835개와 755개의 spot이 검출되었으며 이러한 결과는 *E. tarda*를 불활화시킨 균체 항원 100 μl (20 mg/ml)를 nitrocellulose membrane에 부착시켜 분석한 SASC의 변화에서도 유사한 결과를 보여주었다 (Fig. 2). 형성된 spot은 해부현미경으로 관찰시 쉽게 계수 할 수 있을 정도로 명확한 결과를 보여 주었다 (Fig. 3).

2. Solid-phase 에 대한 항원 또는 항체의 처리농도가 ELISPOT의 감도에 미치는 영향

TASC 분석을 위하여 2.5, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 rabbit anti-flounder immunoglobulin을 그리고 SASC 분석을 위하여서는 0.2, 20,

200 mg/ml의 *E. tarda* Edk-2 FKC를 각각 100 μl 씩 사용하여 nitrocellulose membrane에 coating시킨 후 22°C에서 2.5시간 정치하여 solid-phase의 최적 처리조건을 확립하고자 하였다. 면역 처리 후 5 주째 되는 넙치의 신장 조직에 있는 TASC 분석에 있어서는 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 anti-flounder immunoglobulin 농도에서 812~1,140 spots/10⁵cells이 검출되었으나 40 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 고농도에서는 형성된 spot의 형태가 명확하게 드러나지 않아 계속시 오히려 감소되는 결과를 나타내었다 (Fig. 4). SASC 인 경우 *E. tarda* Edk-2 FKC가 2 mg/well로 coating 된 농도에서 61~146 spots/10⁶cells이 검출되었으며 더 높은 농도 사용에서도 모두 유사한 결과를 보여주었다 (Fig. 5). 그리고 이러한 경향은 신장과 비장 조직에서 모두 동일하게 나타났다.

3. 면역 장기내 ASC검출 및 cycloheximide 처리 효과

적정화된 ELISPOT을 이용하여 수온 22°C에서 순치 되었고 면역처리하지 않은 넙치의 임파장기에 존재하는 TASC 검출에 적용하여 본 방법의 특이성 분석을 실시하였다 (Table 1). 먼저 현탁된 세포를 단백질 생성억제제인 cycloheximide로서 얼음에서 2시간 동안 처리하여 세포내 항체의 생성을 억제시킨 후 10⁵cells/well을 토끼 항 넙치면역글로부린 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 coating한 nitrocellulose membrane에 가하여 22°C에서 2.5시간 동안 incubation하는 ELISPOT법을 실시하였을 때 spot은 전혀 나타나지 않았으며, cycloheximide 대신에 PBS로 처리한 양성 대조군의 신장조직 세포에서는 307~432/10⁵cells, 그리고 비장조직세포에서는 243~333 spots/10⁵cells이 관찰되어 항체생성분석이라는 ELISPOT 기법의 특이성이 충분히 입증되었다.

4. 항 *E. tarda* Edk-2 항체와 면역 장기내 SASC의 형성

면역 처리된 넙치의 신장 및 비장 조직내에 특이항체생성세포의 형성과 이러한 세포로부터 생성되어 혈액내에서 순환되고 있는

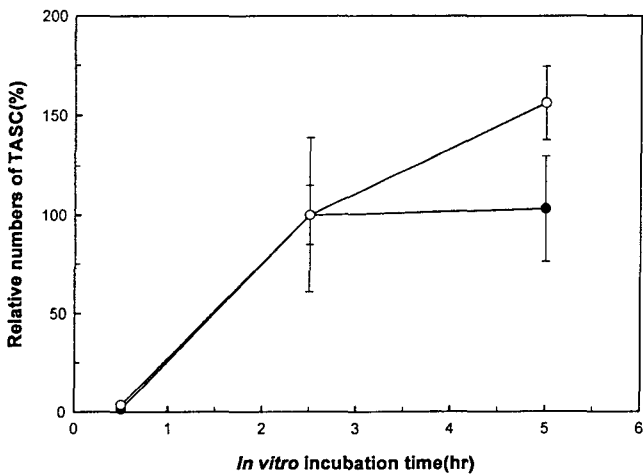


Fig. 1. Effect of incubation times on the relative numbers of total antibody secreting cells in the anterior kidney (—●—) and the spleen (—○—). The mean number of TASC on 100% response was 836 spots/10⁵cells/well.

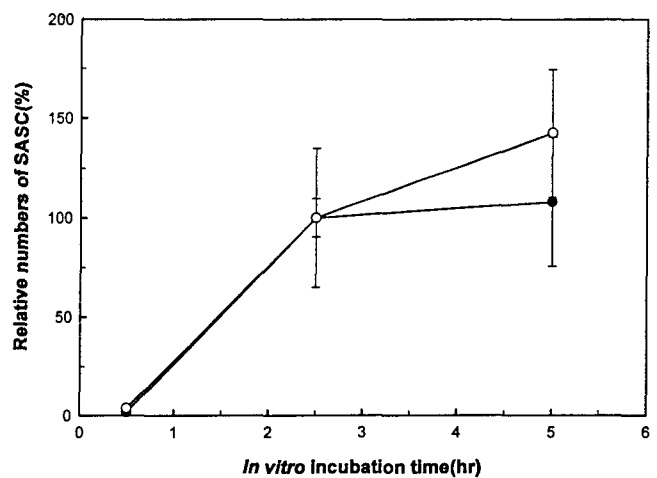


Fig. 2. Effect of incubation times on the relative numbers of specific antibody secreting cells in the anterior kidney (—●—) and the spleen (—○—). The mean number of SASC on 100% response was 104 spots/10⁶cells/well.

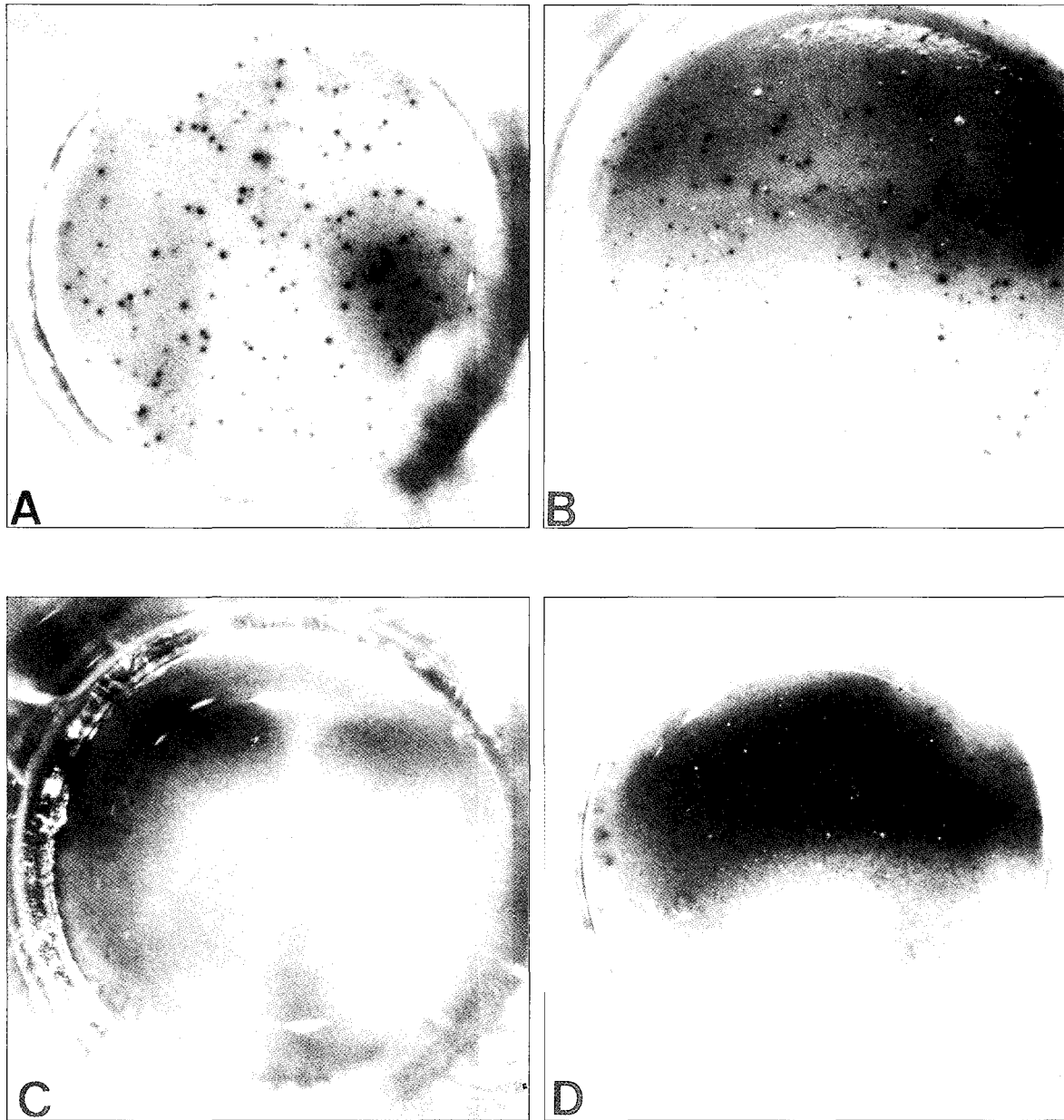


Fig. 3. Detection of antibody secreting cells with ELISPOT-assay.
 A: TASC in the kidney, 10^4 cells/well
 B: SASC in the kidney, 10^5 cells/well
 C: control wells for TASC counting, 10^4 cells/well
 D: control wells for TASC counting, 10^5 cells/well

항체의 변화를 동시에 비교 분석함으로써 주입된 항원에 대하여 나타나는 혈청내 항체량의 변화와 이를 생성하는 B세포의 수적 변화에 대한 상관관계를 분석하였다 (Fig. 6). SASC는 면역 처리 후 3주째 비장 조직의 백혈구를 10^6 cells/well 농도로 *E. tarda* FKC항원 (2 mg/well)으로 coating 한 nitrocellulose membrane 이 있는 96 well plate에 가하여 22°C 에서 2.5시간 incubation하였을 때 1,020~1,836 spots/ 10^6 cells이 검출되었으며 비장 조직에서도 1,163~1,325 spots/ 10^6 cells이 검출되었고 이후 급격하게

감소하여 분석된 기간중에는 다시 증가하는 경향이 나타나지 않았다. 또한 혈청내 항*E. tarda* Edk-2 항체는 SASC 형성이 최고치를 나타내는 3주째 5,120의 agglutination titer를 나타내며 빠르게 증가하였으며 (Fig. 6) 이후 7주까지 높은 수준으로 유지되었다. 그러므로 면역 초기에 나타나는 신장 및 비장조직의 항체 생성세포의 수적 변화는 혈청내 특이항체 생성과 상관관계가 있으나 면역장기에 따른 SASC 수의 변화에서는 뚜렷한 차이가 발견되지 않았다.

고찰

본 연구에서는 어류의 면역반응계 분석을 위하여 새로운 기법인 ELISPOT법을 우리 나라 주양식어종인 넙치에 적용하여 적정화 하며 이를 통하여 백신을 투여한 넙치의 항체생성세포 변화를 단일세포 수준에서 추적 분석해 나가고자 하였다. 먼저 ELISPOT법의 특이성을 조사하기 위하여 60S ribosome에서의 단백질 translocation 방해 기능을 가진 cycloheximide를 처리한 후 신장의 임파세포에 존재하는 TASC의 수를 분석한 결과, 양성대조구 (cycloheximide 비처리구)에서는 307~432 spots/10⁵cells이 검출된 반면 cycloheximide를 처리한 음성대조구에서는 spot이 형성되지 않았다 (Table 1). 그러므로 ELISPOT기법에서 solid-phase

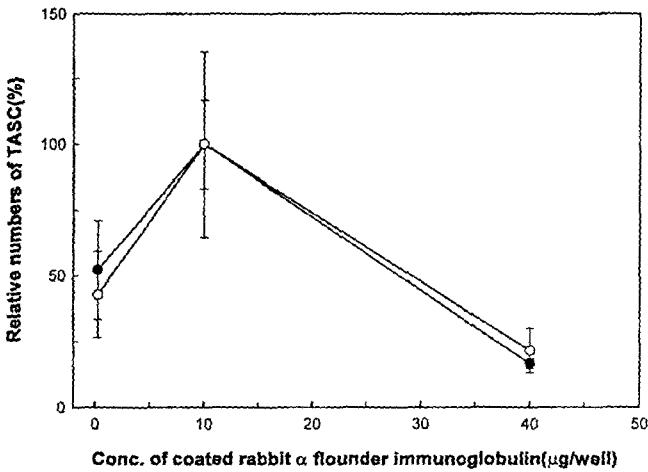


Fig. 4. Effect of rabbit anti-flounder immunoglobulin antibody concentration on the relative numbers (\pm SE) of total antibody secreting cells in the anterior kidney (—●—) and the spleen (—○—). The mean number of TASC on 100% response was 976 spots/10⁵cells/well.

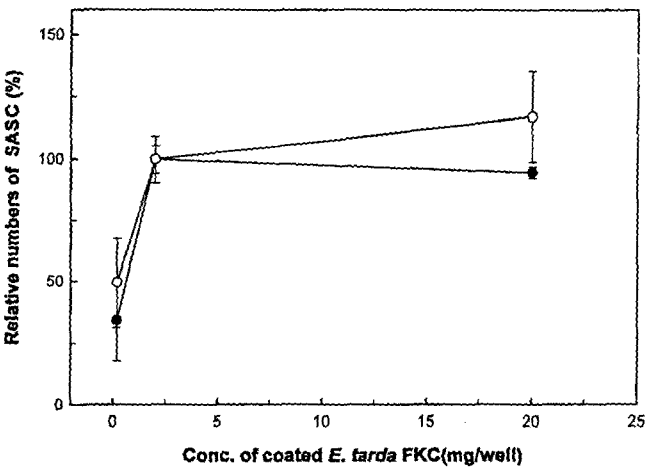


Fig. 5. Effect of *E. tarda* FKC concentration on the relative numbers (\pm SE) of specific antibody secreting cells in the anterior kidney (—●—) and the spleen (—○—). The mean number of TASC on 100% response was 104 spots/10⁵cells/well.

Table 1. Effect of cycloheximide on the detection of TASC in lymphoid organs

Organs	Numbers of spot per 10 ⁵ cells	
	Untreated group	Treated group*
kidney	307~432	0
spleen	243~333	0

*: treated with cycloheximide (100 μg/ml) on ice for 2 hours.

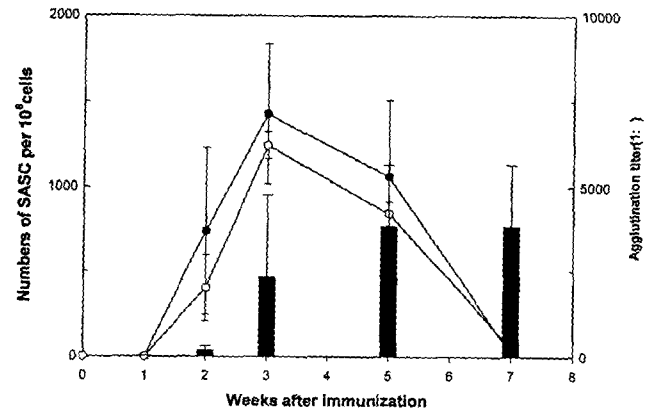


Fig. 6. Anti-*E. tarda* antibodies in the serum (■) and numbers of specific antibody secreting cells in the anterior kidney (—●—) and the spleen (—○—) following immunisation of flounder with *E. tarda* FKC. Each point represents the mean value \pm S.E. of 5 fishes.

membrane에서 검출되는 spot은 well 각각에 주입된 임파구의 surface-bound molecule보다는 반응시간 동안 *in vitro*에서 생산되어 분비된 항체에 의하여 형성된 것임을 확인 할 수 있었다.

최적의 분석 조건을 조사하기 위하여 membrane에 coating되는 항원의 양과 반응기간에 따른 spot의 변화를 조사하였다. *In vitro* 항체생성을 위한 처리 시간에 따른 spot의 형성정도는 신장 조직인 경우 22^oC 에서 2.5 시간까지 증가하고 이후에서는 증가되는 것을 발견할 수 없었고 비장 조직인 경우 2.5 시간 처리에 비하여 5시간 처리시의 spot수의 증가가 어느 정도 나타남이 관찰되었다 (Fig. 1 & 2). 그러나 background의 증가가 2.5시간 처리구에 비하여 높은 경향을 보여 주었다. Sedgwick 등 (1983)은 포유동물인 rat의 임파구를 사용하여 37^oC에서 1~2 시간 동안의 *in vitro* 항체생성 처리기간에서도 충분히 분석 가능함을 보여주었으며 Waterstrat 등 (1991)도 channel catfish를 대상으로하여 27^oC에서 실시한 실험에서 본 실험과 유사한 결과를 보고하였으나 Secombes (1991)과 Boesen 등 (1997)의 연구에서는 반응시간이 6시간 전후가 최적이라는 보고가 있었는데 그것은 이들 연구에서의 대상 어종이 주로 무지개송어 등의 냉수성 어류이며 이들의 *in vitro* 반응온도도 16^oC 전후를 사용하여 어종과 반응조건이 차이가 있었다. 그리고 12^oC 수온에 순치된 잉어의 전신조직에서 분리한 임파구를 25^oC에서 반응시킨 그룹이 12^oC에 비하여 더 많은 수의 plaque가 단시간내 형성됨이 보고되었으며 (Rijkers et al., 1980), tilapia에서도 유사한 연구 보고가 있었다 (Mohan, 1977). 그러므로 ELISPOT 실시시 *in vitro*에서의 항체의 생산 또는 분비는 생리적 범위내에서 온도가 높을수록 증가되고 활성화되는 것으로 사료된다.

TASC 검출에서 40 $\mu\text{g}/\text{well}$ 의 고농도의 순수분리된 항체가 coating된 membrane은 오히려 spot의 형성을 감소시키거나 또는 계측을 저해시키는 것으로 나타났으나 (Fig. 4) SASC인 경우 *E. tarda* FKc의 coating에서는 20 mg/well의 농도에서도 TASC와 같은 감소 현상은 나타나지 않았다 (Fig. 5).

최적화시킨 ELISPOT을 대조군 넙치의 신장과 비장조직에 적용한 결과, TASC인 경우, 신장에서는 307~432 spots/ 10^5 cell, 비장에서는 243~333 spots/ 10^5 cell의 ASC를 가지는 것으로 나타났다 (Table 1). 그러나 Secombes 등 (1991)은 dab의 신장조직에서 TASC를 3~27/ 10^3 cells로 보고하였으며 Aaltonen 등 (1994)은 roach에서 200~300/ 10^3 cells를 가지는 것으로 보고하였다. 그러므로 어류 면역 기관내 존재하는 TASC의 검출은 실험 대상 어종과 연령, 영양상태 등을 포함한 생리상태와 적용된 ELISPOT 기법의 세부적인 방법에 따라 결과의 차이가 나타날 수 있음이 추정 가능하였다 (Aaltonen, 1994, Nakanishi, 1987). 또한 면역처리 후 5 주 경과된 넙치 입파조직에서의 TASC 수 (812~1,140 spots/ 10^5 cell)는 면역처리되지 않은 것 (307~432/spots/ 10^5 cell)에 비하여 약 2~3배의 높은 수준을 나타내어 Aaltonen 등 (1994)의 결과 즉, bovine gamma globulin (BGG)으로 면역처리 후 0, 2, 3, 4주 후의 TASC의 수는 변화가 없다는 보고와는 차이를 보이고 있다. 이러한 이유는 본 실험에서 항원으로 사용한 *E. tarda*의 표면에 있는 LPS가 비특이적으로 B세포를 활성화시키는 mitogen으로 작용하여 순수단백질인 BGG를 사용한 연구와 다른 결과가 나타났거나 또는 Secombes 등 (1991)과 같이 총 세포의 1~2%만이 TASC로 분석되는 본 연구의 결과는 총세포의 20~30%가 TASC로 분석된 Aaltonen 등 (1994)의 보고에 비해 면역처리 후 증가한 SASC의 수가 TASC 수의 분석에 보다 많은 영향을 주었기 때문일 수 있을 것이다. 그러므로 TASC의 수적 변화 결과는 사용한 항원 그리고 SASC와 TASC 각각의 ELISPOT 분석 기법 등을 비교하면서 분석해 나가야 할 것이다.

항원투여에 따른 SASC의 동적 변화에서는 Davison 등 (1992)의 *Aeromonas salmonicida*를 주사한 무지개송어에서 주사후 3주째 SASC의 형성이 최고치에 도달하고 이후 4주째 거의 전무하게 급격하게 감소되는 'switch off' 경향을 보였으나 Boesen 등 (1997)은 *Vibrio anguillarum*의 outer membrane protein (OMP)와 FKc를 주사한 무지개송어에서 주사후 8주째 SASC가 최고치에 달하여 이후 12주째 까지 서서히 감소하는 것과 같은 지연반응을 보고하고 있어 사용 항원에 따라 다양한 SASC 수의 동적 변화가 나타날 수 있는 것으로 분석되었다. 또 Rijkers 등 (1980, 1981)이 haemolytic plaque assay를 이용하여 sheep red blood cell (SRBC)로서 면역 처리된 잉어의 SASC 수를 분석한 결과 수온 20°C에서는 10~12일째 SASC 형성이 최고치를 보이며 수온 16°C인 경우 27일째 최고치에 도달한다는 보고와 van Muiswinkel 등 (1985)이 수온 23°C에 순치된 잉어에서 SRBC에 대한 plaque forming cell (PFC)을 분석한 결과 9~11일째 최고치에 이른다는 결과, 그리고 Williams와 Hoole (1992)이 cestode parasite (*Ligula intestinalis*)의 whole cell homogenate를 주사한 수온 20°C에 순치된 roach에서 주사후 4~11일째 최고치에 도달하였다는 보고 등에서와 같이 사용한 항원과 함께, 대상어종, 분석 방법, 어류의 사

육환경 등에 의해서도 SASC 수의 동적 변화는 있을 수 있음을 알 수 있다. 면역 후 SASC 수의 변화는 혈액내의 항체량 변화와 다른 경향을 보여 주었다 (Fig. 6). 즉, 응집항체가로 분석된 혈액내의 특이 항체량은 3주까지 빠르게 증가하여 5주째 최대치를 보인 후 이것을 7주째까지 동일한 수준을 유지하였다. 그러나 SASC 수는 3주째에 최대치를 보인 후 5주째에 급격한 감소를 보이고 7주째에는 거의 나타나지 않아 Davison 등 (1992)의 보고와 유사한 경향을 보여 주었다. 그리고 이러한 경향은 입파장기인 전신과 비장 모두에서 동일하게 나타나 항체생성세포의 수적 변화는 혈액내 항체량과 비례하는 것은 아니며 입파구의 활성화도 장기라는 환경에 의하여 변화가 되는 것은 아니라는 것을 나타내었다. 이것은 roach에 BGG를 주사하여 분석한 Aaltonen 등 (1994)의 연구와 기생충 감염에서의 면역반응을 분석한 Williams와 Hoole (1992)의 연구에서 신장과 비장의 입파구 반응이 유사하다는 결과와 본 연구결과는 동일함을 보여 주었으나 다른 어종과 다른 항원을 사용한 Nakanishi 등 (1987), Rijkers 등 (1980)의 결과에서는 차이가 있음을 보고하고 있어 어류의 종류, 사용 항원 등에 따라 항체생성세포의 동적 변화나 장기별 분포가 다를 수 있음을 추정할 수 있었다.

향후 단일 세포가 생성하는 항체량의 변화 분석이나 2차 면역 반응에서 나타나는 특이항체생성세포의 변화 등에 관하여 각기 다른 면역조건과 여러 어종을 대상으로 하여 실시해 나가면서 보다 깊이 있는 어류의 면역반응 분석이 이루어져 어류의 질병예방 등에 기여 할 수 있는 정보의 확립이 이루어 져야 할 것이다.

요 약

한국 양식산업에서 중요한 어종인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 포르말린으로 처리한 *E. tarda*를 항원으로 하였을 때의 면역반응 분석을 위하여 ELISPOT 기법을 적정화시킨 후 넙치의 각 장기에 있는 총 항체생성세포와 특이 항체생성세포를 계수하는데 응용하고자 하였다. 전신과 비장의 항체생성세포를 2.5시간 이상 96 well plate에 배양하면 충분히 분석이 가능하였다. 그러나 총 또는 특이 항체생성세포 분석을 위하여 과량의 토끼 항 넙치 면역글로불린 또는 *E. tarda* 항원을 plate에 coating하는 것은 오히려 ELISPOT법의 감도를 감소시키는 것으로 나타났다. ELISPOT법의 특이성은 단백질 합성 억제제인 cycloheximide를 처리한 입파세포에서 총 항체생성세포가 발견되지 않는 것으로서 입증할 수 있었다.

특이 항체생성세포 수의 최대치는 면역 3주째에 나타났으며 이후 계속 빠르게 감소하여 7주째는 거의 발견되지 않았다. 이러한 반응은 신장과 비장에서 유사하게 나타나 입파장기에 따른 차이점은 발견할 수 없었다. 면역 후 2주와 3주 사이에 혈청내 특이 항체량 또한 빠르게 증가하여 ELISPOT법으로 분석된 특이 항체생성세포 수의 변화와 일치함을 발견할 수 있었다. 그러나 증가된 혈청내 특이 항체량이 면역 5주부터 실험 종료 시점까지 계속 높은 수준으로 유지되고 있는 것은 급격한 감소를 보이는 특이 항체생성세포의 동력학적 변화와는 명확히 구별되는 점이 있다.

사 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 (수산과학 분야)에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Aaltonen, T.M., Jokinen, E.T., and Valtonen, E.T. 1994. Antibody synthesis in roach (*Rutilus rutilus*); analysis of antibody secreting cells in lymphoid organs with ELISPOT assay. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 129~140.
- Bayer, E.A. and Wilchek, M. 1980. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. In *Methods of Biochemical Analysis* (D. Glick, ed.) pp. 2~45. New York: John Wiley and Son.
- Biering E. 1997. Immune response of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippalossus* L.) to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunology* 7, 137~149.
- Boesen, H.T., Pedersen, K., Koch, C., and Larsen, J.L. 1997. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to antigenic preparations from *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Fish & Shellfish Immunology* 7, 543~553.
- Davidson, G.A., Ellis, A.E., and Secombes, C.J. 1992. An ELISPOT assay for the quantification of specific antibody secreting cells to *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases* 15, 85~89.
- Guesdon, J.T., Ternyck, T. and Avrameas, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 27 (8), 1131~1139.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., and Secombes, C.J. 1990. The effect of vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 87, 1~13.
- Höglund, J. and Pilström, L. 1994. Purification of adult *Anguillicola crassus* whole-worm extract antigens for detection of specific antibodies in serum from the European eel (*Anguilla anguilla*) by ELISA. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 311~319.
- Itami, T., Takahashi, Y. and Nakamura, Y. 1989. Efficiency of vaccination against vibriosis in cultured kimura prawns, *Penaeus japonicus*. *J. Aqua. Animal Health* 1, 238~242.
- Jerne, K. and Nordin, A.A. 1963. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140, 405.
- Mohan, R. 1997. Studies on the humoral and cell-mediated immune response in a teleost, *Tilapia mossambica*. Ph. D. Thesis, Madurai University.
- Nakanishi, T. 1987. Kinetics of transfer of immunity by immune leucocytes and PFC response to GRBC in isogenic ginbuna crucian carp. *Journal of Fish Diseases* 30, 723~729.
- Pourreau, C.N., Pannevis, M.C., Kaastrup, P., Pilarczyk, A., and van Muiswinkel, W.B. 1990. Genetic variation in carp, *Cyprinus carpio* L., complement activation by *Aeromonas salmonicida* and its extracellular products. In: *Carp Erythrodermatitis*, C. N. Pourreau. Ph. D. Thesis, Agricultural university, Wageningen, The Netherlands.
- Rijkers, G.T., Fredrix-Wolters, E.M.H. and Muiswinkel W.B. van. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (*Cyprinus carpio*). *Immunology* 41, 91~97.
- Rijkers, G.T., van Oosterom, R., and van Muiswinkel, W.B. 1981. The immune system of cyprinid fish. Oxytetracycline and the regulation of humoral immunity in carp (*Cyprinus Carpio*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2, 281~290.
- Secombes, C.J., White, A., Fletcher, T.C. and Houlihan, D.F. 1991. The development of an ELISPOT assay to quantify total and specific antibody-secreting cells in dab *Limanda limanda* (L.). *Fish & Shellfish Immunology* 1, 87~97.
- Sedgwick, J.D. and Holt, P.G. 1983. A solid-phase immunoenzymatic technique of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods* 57, 301~309.
- van Muiswinkel, W.B., Anderson, D.P., Lamers, C.H.J., Egberts, E., van Loon, J.J.A. and Ijssel, J. P. 1985. In *Fish Immunology* (M. J. Manning & N. F. Tatner, eds) pp. 1~8. London: Academic Press.
- Watersrat, P.R., Brazil, J. and Ainsworth, A.J. 1991. Use of an ELISA-based assay for the detection of antibody secreting cells in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 14, 669~675.
- Williams, M.A. and Hoole, D. 1992. Antibody response of the fish *Rutilus rutilus* to the metacystode of *Ligula Intestinalis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12, 83~89.

1998년 12월 14일 접수

1999년 6월 28일 수리