

해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업

연 구 보 고 서

**항생물질이 어류의 생리, 방어체계 및
내성 유전자 발생에 미치는
영향 분석**

2005. 6. 15

부경대학(교) SG연구사업단

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “항생물질이 어류의 생리, 방어체계 및 내성 유전자 발생에 미치는 영향 분석에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 6 월 15 일

대학(교)명 : 부 경 대 학 교
사업단장 : 김 동 수
연구팀장 : 정 현 도
참여교수 : 정 준 기
허 민 도

요 약 문

I. 과 제 명

항생물질이 어류의 생리, 방어체계 및 내성 유전자 발생에 미치는 영향 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 항생제 내성에 대한 연구와 생리적 부작용에 대한 연구로 구성되어 있다.

1. 어류 병원성 내성 세균의 유전적 특성 분석

가. 필요성

지난 10여 년간 전 세계적으로 tetracycline(Tc)의 활용이 넓어짐에 따라서 내성 세균의 유전자에 대한 분석작업도 폭넓게 이루어지고 있는 실정이지만, 어류 병원성 세균에서 나타나는 유전자에 대한 분석은 이루어지지 않고 있다.

나. 연도별 목표

(1) 1 차년도: 어류의 중요 질병 원인균인 *E.tarda*에서 나타나는 *tet gene*의 분포와 그 특성 분석

(2) 2 차년도: 어류의 중요 질병 원인균인 *E.tarda*에서 나타나는 DNA gyrase 및 topoisomerase IV gene의 cloning과 내성균에서의 변이 분석에 의한 fluoroquinolone의 내성 특성 분석

2. Chloramphenicol (CAP)이 어류의 생리적 기능에 미치는 영향 및 독성학적 분석

가. 필요성

(1) 생리학적 영향

항생물질의 어류에 대한 생리적 부작용을 분석하기 위하여, 최근 어류에 적용되어 그 독성작용이 의심되고 있는 항생물질의 하나인 chloramphenicol(CAP)을 선택하고, 생리학적 및 면역학적 영향을 조사할 필요성이 있다. CAP는 잠재된 독성에 의한 예상치 못한 부작용 때문에 선진국에서는 특수한 경우를 제외하고는 식용 가축 및 가축 사료에 사용을 금지하고 있다. 그럼에도 불구하고 CAP의 그람 음

성·양성 세균 등에 대한 광범위한 항균효과와 저렴한 가격으로 인한 장점 때문에 국내 양식장에서는 여전히 불법적으로 많이 사용되어 그에 따른 약물사고가 발생하여 많은 피해를 입고 있다. 육상동물에 있어서는 CAP이 유발하는 여러 가지 독성은 알려져 있지만 (Holt *et al.*, 1993, 1997; Trevett *et al.*, 1992), 양식 어류에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 양식 어류에 대한 각종 혈액세포학적 및 혈액생화학적 파라메타, 소화, 조혈 및 순환기계에 미치는 생리학적 영향을 조사하고 식작용(phagocytosis), respiratory burst 및 chemiluminescence에 미치는 영향 분석을 통하여 방어체계에 대한 영향을 조사하고자 하였다.

(2) 병리학적 영향

병리학적 영향은 CAP계열 항생제 투여 후 피부의 괴사를 동반한 대량폐사 상황이 발생하는 것으로 알려져 있어, 이 약물이 어체에 미치는 독성 영향 유무를 중심으로 병리학적 수법을 통하여 평가하고자 하였다. 또한 광감작 독성이 의심되어 그 잠재성을 평가할 필요성이 있어 평가방법을 고안하여 적용하고자 하였다.

나. 연도별 목표

(1) 1 차년도: CAP의 독성영향을 평가하기 위하여 급성독성 시험을 수행하고, 어류의 혈액성상 및 순환기계와 방어체계에 대한 생리적 부작용을 조사하고, 조사 광감작 독성 시험 장치 개발하여 CAP의 광감작 독성 발현 잠재성 평가를 위한 예비적 실험을 시도하고자 하였다.

(2) 2 차년도: 환경변화에 따른 CAP의 어류에 대한 독성수준 변화와 carbon tetrachloride(CCl₄)에 투여에 의한 인위적 간장손상 모델 개발을 개발하고 이 개체에 대한 CAP의 광감작 독성의 평가를 시도하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. Tc 내성균의 유전적 특성 분석

가. 1993년 이래 양식현장과 해양환경으로부터 발생한 내성 균주(*E. tarda*) 185 strains 의 확보를 이루고 이들이 갖는 다양한 항생제에 대한 내성정도 및 분포와 세균학적인 특성 분석을 이루었고,

나. 32종 이상으로 알려져 있는 Tc 내성 유전자중 어떠한 type의 *tet* gene들이 본 연구에서 분리한 Tc내성 *E.tarda* 균에서 활용되고 있는지를 분석하기 위한 새로운 multiplex PCR를 개발하여 그 응용성과 잠재력을 이미 논문으로 확정 받았으며,

다. 이러한 multiplex PCR 기법을 활용하여 실시된 *tet* gene들의 분포도 분석은 우리나라에서 최초로 *E.tarda* 내성균에는 높은 *tet A, D* 유전자가 활용되고 있다는 것과 함께 *E.tarda*에서도 *tet B* 와 *tetG*의 활용이 있다는 새로운 사실도 발견하였다.

라. 한편 *E.tarda* 뿐만 아니라 양식장 환경에서 나타나는 미생물 총에서 나타나는 내성균 분석도 실시하여 양식장주변의 해수, 항생제 투여 여부, 가두리의 그물 또는 양식장 밑의 저질에서도 각기 다른 비율의 내성균과 각기 다른 *tet* 유전자를 활용하는 내성균이 있음을 확인 하였으며,

마. 이러한 결과를 실험실에서 직접 항생제를 투여하는 *in vivo*에서의 내성균 발생과 *tet* 유전자의 변화를 분석하여 그 내성균 발생의 빈도와 장내에서의 유지기간 그리고 이용한 *tet* 유전자의 활용도 변화를 함께 분석 하였다.

2. Fluoroquinolone resistant *E. tarda* 의 연구

가. 136 *E. tarda* 중 quinolone에 내성이 있는 35 균주를 확보 하고 이들이 나타내는 fluoroquinolone에 대한 내성 특성을 분석 완료 하여 우리나라 *E. tarda*에서 나타나는 내성균의 빈도를 결정 하였다.

나. 이러한 *E. tarda* 내성균이 나타내는 quinolone 내성특성을 유전적으로 해석하기 위하여 먼저 DNA gyrase 의 중요 유전자인 DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene cloning 법을 개발 하고 *E. tarda gyrA* gene 의 부분 염기 서열을 결정하였다.

다. 부분 염기 서열을 바탕으로 한 DNA walking 으로 *gyrA*의 전체 염기 서열 분석과 그 motif들의 분석에 의한 유전적 해석을 완결하였으며

라. 양식 현장에서 분리한 *E. tarda* 내성균이 보여주는 *gyrA* gene의 QRDR부위의 유전적 변화 분석을 통하여 우리나라의 *E. tarda* 내성균 (또는 모든 *E. tarda* 내성균)은 매우 제한적인 유전적 변이를 가지고 있어 아직은 비교적 안전한 상태에 있음을 확인 하였다.

마. 전체 *E. tarda gyrA* gene 이 과연 다른 세균 특히 *E. coli*에서 발현이 되는지를 분석하기 위하여 temperature sensitive한 *gyrA* 유전자를 가지고 있는 *E. coli* KNK453에서 *E. tarda GyrA* 발현 분석을 실시하여 그 발현을 확인하였다.

바. Quinolone의 내성은 DNA gyrase 및 topoisomerase IV gene 들에 의하여 나타나는 것이므로 관련 3개 유전자 모두를 cloning 하고 그 full sequence를 밝혀 새로운 학문적 진전을 이루었다.

사. 현장 분리균에서 제한적인 QRDR 부위의 변화를 확인한 결과를 *in vitro* 변이주에서도 동일하게 나타나는 것인지를 확인하기 위하여 30종 가까운 새로운 *gyrA* mutant를 screening하고 이들이 갖는 QRDR의 유전적 변화를 분석한 결과 다양한 유전적 변이가 현장 분리균과는 다르게 나타남을 확인하였다.

아. 그러나 좀더 많은 변이주의 유전적인 변화를 분석하기 위하여 다량의 정보를 한꺼번에 얻을 수 있는 mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR을 이용한 새로운 유전적 변이 확인 법도 개발 완료 하여 그 응용성을 증가시켰다.

3. Chloramphenicol의 생리적 부작용 검토

가. HPLC system을 이용하여 어류의 각종 조직 및 혈청 내에서 CAP의 잔류 농도를 조사한다

나. CAP의 어류 조혈기관 및 면역 능력에 대한 영향 조사하기 위하여 혈청 내 각종 효소성분 및 혈액학적 성분들의 변화와 chemiluminescence 기법으로 넙치 식세포의 식작용 능력을 조사한다.

다. 어류 각종 조직 장기에 미치는 CAP의 조직학적 영향을 광학현미경학적으로 관찰한다.

라. CAP이 어류의 순환기, 소화기 및 호흡기의 생리적 기능에 미치는 영향 조사하기 위하여 생체반응 측정기를 이용하여 다양한 생리적 기능 변화를 측정한다.

마. 양식장 환경조건과 CAP의 어류에 대한 부작용과의 상관관계 분석하기 위하여 자외선 조사 하에서 CAP의 어류에 대한 생리적 부작용을 분석한다.

4. CAP에 대한 독성학적 분석

가. CAP 자체의 급성적 독성 영향을 평가하기 위하여 단회 또는 다회의 과다 용량 투여에 따른 영향을 임상적 및 병리조직학적으로 검토하였다.

나. CAP의 광감작 잠재 독성을 평가하기 위하여, 실험적 장치로써 UV 조사장치(UV-A 및 B)를 설계하였으며, 광감작 평가 시험 전에 광감작과 구별되는 화상 발생 유무를 평가하였다.

다. CAP 투여 후, 정상 개체에 대하여 UV-A 및 B 조사에 따른 피부 광감작 독성 평가를 실시하였다.

라. Carbon tetrachloride(CCl₄) 투여에 의하여 인위적으로 간장 손상 모델을 작성을 시도하였다.

마. Carbon tetrachloride(CCl₄) 투여에 의하여 인위적으로 작성한 간장 손상 모델에 대한 광감작 잠재 독성을 평가하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용계획

1. 연구 결과

가. 어류 병원성 내성 세균의 유전적 특성 분석

(1) Tc 내성균의 유전적 특성 분석

(가) 1993년 이래 양식현장과 해양환경으로부터 발생한 내성 균주(*E. tarda*) 185 strains의 확보를 이루고 이들이 갖는 다양한 항생제에 대한 내성정도 및 분포와

세균학적인 특성 분석을 이루었고,

(나) 32종 이상으로 알려져 있는 Tc 내성 유전자중 어떠한 type의 *tet* gene들이 본 연구에서 분리한 Tc내성 *E. tarda* 균에서 활용되고 있는지를 분석하기 위한 새로운 multiplex PCR를 개발하여 그 응용성과 잠재력을 이미 논문으로 확정 받았으며,

(다) 이러한 multiplex PCR 기법을 활용하여 실시된 *tet* gene들의 분포도 분석은 우리나라에서 최초로 *E. tarda* 내성균에는 높은 *tet* A, D 유전자가 활용되고 있다는 것과 함께 *E. tarda*에서도 *tet* B 와 *tet*G의 활용이 있다는 새로운 사실도 발견하였다.

(라) 한편 *E. tarda* 뿐만 아니라 양식장 환경에서 나타나는 미생물 총에서 나타나는 내성균 분석도 실시하여 양식장주변의 해수, 항생제 투여 여부, 가두리의 그물 또는 양식장 밑의 저질에서도 각기 다른 비율의 내성균과 각기 다른 *tet* 유전자를 활용하는 내성균이 있음을 확인하였으며,

(마) 이러한 결과를 실험실에서 직접 항생제를 투여하는 *in vivo*에서의 내성균 발생과 *tet* 유전자의 변화를 분석하여 그 내성균 발생의 빈도와 장내에서의 유지기간 그리고 이용한 *tet* 유전자의 활용도 변화를 함께 분석하였다.

(2) Fluoroquinolone resistant 균의 특성 연구

(가) 136 *E. tarda* 중 quinolone에 내성이 있는 35 균주를 확보 하고 이들이 나타내는 fluoroquinolone에 대한 내성 특성을 분석 완료하여 우리나라 *E. tarda*에서 나타나는 내성균의 빈도를 결정하였다.

(나) 이러한 *E. tarda* 내성균이 나타내는 quinolone 내성특성을 유전적으로 해석하기 위하여 먼저 DNA gyrase 의 중요 유전자인 DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene cloning 법을 개발 하고 *E. tarda gyrA* gene 의 부분 염기 서열을 결정하였다.

(다) 부분 염기 서열을 바탕으로 한 DNA walking 으로 *gyrA*의 전체 염기 서열 분석과 그 motif들의 분석에 의한 유전적 해석을 완결하였으며,

(라) 양식 현장에서 분리한 *E. tarda* 내성균이 보여주는 *gyrA* gene의 QRDR부위의 유전적 변화 분석을 통하여 우리나라의 *E. tarda* 내성균 (또는 모든 *E. tarda* 내성균)은 매우 제한적인 유전적 변이를 가지고 있어 아직은 비교적 안전한 상태에 있음을 확인하였다.

(마) 전체 *E. tarda gyrA* gene 이 과연 다른 세균 특히 *E. coli*에서 발현이 되는지를 분석하기 위하여 temperature sensitive한 *gyrA* 유전자를 가지고 있는 *E. coli* KNK453에서 *E. tarda GyrA* 발현 분석을 실시하여 그 발현을 확인하였다.

(바) Quinolone의 내성은 DNA gyrase 및 topoisomerase IV gene 들에 의하여 나타나는 것이므로 관련 3개 유전자 모두를 cloning 하고 그 full sequence를 밝혀 새로운 학문적 진전을 이루었다.

(사) 현장 분리균에서 제한적인 QRDR 부위의 변화를 확인한 결과를 *in vitro* 변이주에서도 동일하게 나타나는 것인지를 확인하기 위하여 30종 가까운 새로운 *gyrA*

mutant를 screening하고 이들이 갖는 QRDR의 유전적 변화를 분석한 결과 다양한 유전적 변이가 현장 분리균과는 다르게 나타남을 확인하였다.

(아) 그러나 좀더 많은 변이주의 유전적인 변화를 분석하기 위하여 다량의 정보를 한꺼번에 얻을 수 있는 mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR을 이용한 새로운 유전적 변이 확인 법도 개발 완료 하여 그 응용성을 증가시켰다.

나. Chloramphenicol이 어류의 생리적 기능에 미치는 영향 및 독성학적 분석

(1) Chloramphenicol의 경구투여에 따른 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 생리적 기능 및 혈액학적 변화

본 연구는 chloramphenicol (CAP)의 경구 투여에 따른 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 조직내 잔류와 혈액학적인 변화를 관찰하였다. 이 연구를 위해 시중에서 판매되고 있는 CAP 약물인 헤로세친(종근당)을 150 mg/kg/bw/day으로 넙치의 위장관 속으로 4일 동안 투여 후, 6일 동안 실험을 수행하였다. 실험 기간동안 어류 신장 및 간으로부터 CAP 잔류량을 분석하였으며, CAP 투여에 따른 넙치의 다양한 생리적 변화를 관찰하기 위해 혈청학적·조직학적 영향 분석 및 면역 능력에 관한 검사를 실시하였다. 약물의 조직 내 잔류량은 넙치 신장에서 보다 간에서 잔류하는 양이 더 많았으나, 약물투여 종료 후 CAP 소멸은 신장보다는 간에서 더 빨리 일어났다. Ht 수치는 약물을 투여하는 2일째와 3일째에서 유의하게 감소하였으나 나머지 기간동안 대조구와 별다른 차이를 나타내지 않았다. 혈청 내 효소 성분 분석인 AST, ALT와 ALP, GGT는 모두 투약구의 수치가 투약기간 중에 상승하고 투약종료 후 감소하는 경향을 나타내었고, CK와 BUN은 투약기간 동안 실험구에서 유의적으로 증가하는 경향을 보이나, 투약구와 대조구 사이의 유의한 변화를 관찰할 수 없었다. LDH는 투약기간 동안에는 유의한 변화가 없었지만, 투약 종료 후 투약구에서 증가하는 경향을 보였다. 그리고 생리적 기능 분석 및 조직학적 분석에서는 약물 투여에 따른 순환기 및 호흡기 기능과 두신, 체신, 장, 위, 간 및 비장에서 조직학적 이상을 관찰할 수 없었다. 이 결과들은 CAP의 투여가 양식넙치의 조혈 기관에 있어 부작용을 일으킨다는 사실을 나타내었다.

(2) Chloramphenicol의 경구투여에 따른 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 방어 체계의 영향

본 연구는 chloramphenicol (CAP)의 투여에 따른 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)의 면역학적 변화를 조사하였다. 면역학적 영향을 조사하기 위하여, 넙치에 CAP를 각각 농도 의존적 (150, 300, 500 mg/kg/B.W./day)으로 *in vitro* 및 *in vivo* 상으로 투여한 후, 넙치로부터 분리한 식세포의 chemiluminescence(CL) 반응을 측정함으

로써 면역학적 변화를 관찰하였다. *In vitro* 상에서 분리한 넙치 식세포에 대한 면역 능력 검사를 위해 CL 반응을 조사한 결과, CAP의 농도에 의존적으로 leukocyte의 CL 반응이 유의하게 억제되었다. 이와 유사하게, *in vivo* 실험에서는 분리한 넙치 식세포의 CL 반응이 시간이 지남에 따라 (3주째) 높은 농도에서 억제 되는 변화를 관찰하였다. 이러한 결과들을 미루어 볼 때, CAP 투여가 넙치의 면역 반응의 억제에 관여하리라 추정되었다.

(3) UV-A(파장 320~400nm) 조사하가 넙치의 혈액조성과 면역반응, 장기조직에 대한 chloramphenicol의 부작용에 미치는 영향

본 연구에서는 넙치(*paralichthys olivaceus*)에 chloramphenicol의 경구투여 시 UV-A(파장 320-400nm)의 조사가 혈액학적인 변화와 면역반응, 장기조직의 변화에 어떤 영향을 미치는 지에 대해 관찰 하였다. 이 연구에 사용된 넙치는 평균 체중 257g 이며 시판되는 chloramphenicol (CAP)약물인 헤로세틴(중근당)을 150mg/kg/bw/day으로 4일간 경구 투여 후, 8일간 실험을 수행 하였다. 실험기간 동안 혈액학적 변화를 조사하고 두신, 체신, 비장, 간 등 어류의 주요 조혈 면역 조직의 병리조직학적 변화를 관찰 하였으며 어류 두신 식세포의 활성 산소(ROIs)를 측정 하였다. CAP와 UV를 함께 처리한 실험구의 적혈구 수는 다른 실험구와는 달리 투약 마지막 날인 4DT에 급격히 증가하다 감소하는 것으로 나타났으며 이 경향은 Ht value에서도 비슷하게 나타났다. Hb의 농도도 다른 실험구에 비해 CAP에 UV를 함께 처리한 구에서 증가와 감소의 폭이 큰 것으로 조사 되었다. 어류의 두신 식세포를 이용한 활성산소의 측정 결과는 UV 조사 하에 CAP를 투여한 실험구가 대조구에 비해 상당히 높은 수치를 기록했으며 투약 마지막 날인 4DT에 급격한 증가를 나타내었다. 그리고 조직 병리학적 관찰에서 control group이나 UV 처리구, CAP 처리구 그리고 UV와 CAP을 함께 처리한 실험구 간에 구별되는 병변 없이 모든 처리구의 모든 날짜에 위축이나 지방 변성이 모두 일관되게 나타났으므로 이 병변은 약물이나 UV의 처리에 영향을 받은 것이라 단정할 수 없다.

(4) CAP에 대한 독성학적 분석

(가) CAP 자체의 급성적 독성 영향을 평가하기 위하여 단회 또는 다회의 과다 용량 투여에 따른 영향을 임상적 및 병리조직학적으로 검토하였다.

(나) CAP의 광감작 잠재 독성을 평가하기 위하여, 실험적 장치로써 UV 조사장치(UV-A 및UV-B)를 설계하였으며, 광감작 평가 시험 전에 광감작과 구별되는 화상 발생 유무를 평가하였다.

(다) CAP 투여 후, 정상 개체에 대하여 UV-A 및 UV-B 조사에 따른 피부 광감작 독성 평가를 실시하였다.

(라) Carbon tetrachloride(CCl₄) 투여에 의하여 인위적으로 간장 손상 모델을 작

성을 시도하였다.

(마) Carbon tetrachloride(CCl₄) 투여에 의하여 인위적으로 작성한 간장 손상 모델에 대한 광감작 잠재 독성을 평가하였다.

2. 활용 계획

가. 내성균이 갖는 내성 유전자의 변화 확인

- (1) 증가하고 있는 내성균의 특이적 분별
- (2) 내성 특성의 원천을 이해할 수 있게 되어 이식경로 등의 파악에 활용
- (3) 내성균 발생을 최소화하고 이식 내성균의 이입에 대한 근원적인 차단책 마련
- (4) 수산생물의 원산지 확인에 이어 세계적인 질병 원산지 확인 가능

나. 검역의 중요 정보 제공

- (1) 수입되어 들어오는 종묘 또는 활어에 대한 검역사업에서 이식산 내성균의 전파 가능성에 대한 위험성 제고
- (2) 국제적으로 내성균 문제에 의한 분쟁의 소지가 있을 때 활용도 높은 gene database
- (3) 양식 현장에서 증대되고 있는 내성균의 진원지에 대한 과학적인 접근이 가능

다. 학문적 활용

- (1) DNA walking에 의한 새로운 variable region screening법은 family적으로 나타나는 유전자에 대한 다른 학문 분야에서 활용 가능
- (2) 외국에서 밝혀진 유전정보를 제외한 새로운 유전정보도 확실하게 얻을 수 있음
- (3) Beta-lactamase 유전자등과 같이 보다 다양성을 내포하고 있는 유전자에 대하여도 훨씬 진전된 유전적 해석이 가능케 함

라. 항생제를 중심으로 한 각종 약제의 어류 특이의 독성영향 연구

- (1) 어류 특이의 독성 발현 양상 연구 필요성에 대한 실마리 제공 가능
- (2) 약물 투여 이전 숙주 건강의 중요성 제시 가능
- (3) 어류에 대한 각종 약물의 일반약리 실험의 중요성 제시 필요성 인식
- (4) 약물의 효과에 대한 평가를 위해서는 어류의 간장 기능 중요성 제시

마. 양식현장에서의 약화사고 평가 및 약물의 안전 사용에 관한 정보 제공

- (1) 양식현장에서 항생제 및 각종 약제의 타당한 사용법 근거 제시 가능
- (2) 양식 현장에서 증대되고 있는 각종 약화사고에 대한 과학적인 평가 가능

V. 기대효과

1. 내성균에 대한 정보 체계 확립

가. 내성균의 유전자 특성과 현황을 파악하여 과학적으로 증명된 내성 정보의 data를 이루게 함으로서 (database) 향후 우리나라에서 나타나는 내성균이 새로운 출현인지 아닌지를 정확하게 알 수 있게 하였다.

나. 국내 어류에서 나타나는 또는 현재 나타나 있는 내성균은 어떠한 경로로 유입되었고, 그 변이와 분포는 현재와 미래에 어떤 상태로 진행 되고 있는지에 대한 예측을 가능하게 하였다. 즉 내성 유전자의 분자생물학적인 비교 분석은 양식 현장에서 나타난 내성균이 함유한 유전자의 근원이 외국인지 또는 주변 환경인지 명확하게 밝혀 줄 수 있게 해 줄 것이다.

다. 현재 우리나라 어병세균이 나타내는 항생제 내성의 정도 분석과 유전적 특성 분석이 이루어지게 되어 어류질병 치료를 위한 보다 효과적인 대책 마련이 가능하게 되었다.

2. 각종 약제의 병어에 대한 일반약리 및 독성시험의 필요성 부각

가. 어류에 대하여 사용되는 물질 중 항생제는 이미 고등동물에서 그 독성이 확인된 것이 대부분으로 어류에 대한 급성 독성의 발현이 있을 확률이 적으므로 사용으로 큰 해 작용을 갖지 않을 수 있음을 주지 시키는 정보를 제공 할 수 있다.

나. 대부분의 어류에 적용되는 항생제가 어류가 세균성 질병과 다른 기질적인 질병에 이환되었을 때, 그 효과나 부작용을 검토해야 할 필요성이 인식되었고, 병어 모델의 개발과 이를 통한 어류특이의 평가방법의 중요성을 인식시킬 수 있게 되었다.

다. 양식어류는 대부분 식이성으로 간장병이 발생할 것으로 예상되기에, 반드시 항생제를 포함한 약물의 적용이전에 간장기능의 평가를 수행하여 야 할 근거를 제시 할 수 있게 되었으며, 이에 따라 약물의 어류에 대한 적용 전 사용안전 사항에 간장을 포함한 건강평가의 필요성 부각에 중요한 정보를 제시 할 수 있게 되었다.

VI. 도출 결과에 대한 업적

이상과 같은 결과들은 이미 최초 목표인 SCI 급 논문 2편은 발표완료 되었고, 더불어 국내 학술 진흥재단 등재 후보지에도 2편이 발표완료 되어 이미 소기의 과학적 업적을 이루었고 향후에도 계속적으로 발표 할 예정으로 있다.

[국외 SCI 학회지 : 2건]

Lyu Jin Jun, Joon Bum Jeong, Min-Do Huh, Joon-Ki Chung, Dong-lim Choi, Chang-Hoon Lee, and Hyun Do Jeong. (2004). Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture* 240. 89-100.

Soon Bum Shin, Min Ho Yoo, Joon Bum Jeong, Young Min Kim, Joon-Ki Chung, Min Do Huh, Jack L. Komisar, and Hyun Do Jeong. (2005). Molecular cloning of the *gyrA* gene and its mutation in clinical isolates of quinolone resistant *Edwardsiella tarda*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (in press)

[국내 학회지 : 2건]

So Jung Jung, Jung Soo Seo, Hye Kyung Eom, Na Yung Kim, Sang Hwan Lee, Min Do Huh, Hyun Do, and Joon Ki Chung. (2004). Tissue level of chloramphenicol and haematological changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, orally administered with chloramphenicol. *J. Fish Pathol.*, 17 (2), 113-121.

Jung Soo Seo, So Jung Jung, Sang Hwan Lee, Na Yung Kim, Hye Kyung Eom, Min Do Huh, Hyun Do, and Joon Ki Chung. (2004). Effects of chloramphenicol on chemiluminescence response of leukocyte isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 17 (3), 217-222.

[학회발표: 3건]

Min Do Huh, Hye Jeong Choi, Mu Kun Lee, Na Yeong Song, Joon Ki Chung and Hyun Do Jeong (2005) Pathological effect of carbon tetrachloride (CCl₄) on liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Hye Jeong Choi, Mu Kun Lee, Na Yeong Song, Joon Ki Chung and Hyun Do Jeong and Min Do Huh (2005) Photosensitizational effect of chloramphenicol on the skin of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Spring Meeting of The Korean Society of Fish Pathology

Soon Bum Shin, Lyu Jin Jun, Sin Hoo Park, and Hyun Do Jeong (2004)
Molecular cloning of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen
Edwardsiella tarda. The Sixth Japan-Korea, Korea-Japan Joint Symposium on
Aquaculture.

S U M M A R Y

Distribution and origin of the *tet* genes were analyzed using multi-drug resistant isolates carrying tetracycline resistance gene obtained from various locations in Korea. Frequency of tetracycline resistance bacteria found in *E. tarda* and *Vibrio* sp. as major fish pathogenic isolates from 1993 to 2002 was 15% and 26%, respectively. Specific primer pairs were designed to determine of *tet* A, B, C, D, E and G commonly found in Gram-negative organism by PCR. With the developed multiplex PCR method, it was found that *Edwardsiella tarda* isolates contained diverse *tet* genes, *tet* A, *tet* D, *tet* B, *tet* A · D and *tet* A · G. Additionally, multiplex PCR was developed to analyze the *tet* genes in a single tube with one reaction. This developed multiplex PCR should result in significant savings in terms of labour and cost in analysis of a large number of strains when compared with using an individual PCR for targeting each gene. It may also be a useful method to differentiate the types of tetracycline resistance when used as an additional marker for the purpose of outbreak investigation and surveillance. Most of *tet* genes of the analyzed 18 *E. tarda* isolates found in plasmid, while *tet* B gene of two *E. tarda* isolates was localized on chromosome. The frequency of oxytetracycline resistance in the aquatic environmental bacteria were monitored from the farms in filed. The frequency of Tc resistant bacteria present in the seawater, sediment and net was 6.7%, 24.4% and 30.7%, respectively. The analyzed Tc resistant frequency in intestinal microflora of rockfish treated OTC before 1 week of sampling was 2.83% compared with the 0.25% in rockfish without antibiotics treatment at least before 3 months of sampling. Rockfish were held in experimental tanks and oxytetracycline-HCl was administered at 125mg/kg body weight per day for 10 day via medicated feed. The changes of oxytetracycline resistance was monitored in samples taken from the intestinal contents of the fish. The range of the mean frequencies of resistance of the intestinal flora in the period before medication (6~27%) were lower than the frequency of resistance in the microflora after medication (32~85%). With the Tc, antibiotic materials of quinolone family are also to be used very popularly in aquatic farms. In terms of that, knowing the entire sequence of the DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene of *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) could be very useful for the analysis of quinolone resistance in aquatic microorganisms. Degenerate primers for the amplification of *gyrA* were designed by using consensus nucleotide sequences of *gyrA* from nine different gram negative bacteria including *Escherichia coli* (*E. coli*). With these primers, DNA segments of the predicted size was amplified from the genomic DNA of *E. tarda* and then the flanking sequences were determined by a cassette ligation - mediated polymerase chain reaction (PCR). Determined nucleotide sequence was highly homologous with those of

other bacterial species *gyrA* in both the whole open reading frame (ORF) and quinolone resistance-determining region (QRDR). The 2637bp *gyrA* gene encodes a protein of 878 amino acids, preceded by putative promoter, ribosome binding site, and inverted repeated sequences for cruciform structures of DNA. GyrA of *E. tarda* complemented the GyrA mutated to be sensitive at high temperature *E. coli* KNK453 strain at 43°C. In the analyzed nucleotide sequence of the flanking region, we could not find regions showing homologies with those of other bacterial DNA gyrase subunit B (*gyrB*). It suggested that *E. tarda* contains noncontinuous gyrase genes, *gyrA* and *gyrB*, on the chromosome. In the analysis of changed gene using 12 quinolone-resistant isolates, we found only a single type alteration within the QRDR, Ser-83 to Arg. In contrast, *in vitro* selected quinolone resistant *E. tarda* by exposure to the stepwise increasing concentrations of nalidixic acid and ciprofloxacin showed an alteration within the QRDR, Asp-87 to Gly, different from that of the isolates in environments. Additionally in this study an economical and time-efficient mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR was developed to detect mutations in the *gyrA* gene, and applied to the analysis of mutation occurred in *gyrA* of clinical isolates and *in vitro* mutants of *E. tarda*. Consequently, all these results of clinical isolates and *in vitro* mutants suggested that *E. tarda* resistant to quinolones is primarily related to alteration in *gyrA*. This study was also performed to investigate the pathphysiological and immunological side effects of chloramphenicol (CAP) on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma glutamyl transferase (GGT) were slightly increased during the treatment of CAP and gradually decreased after the treatment of CAP. The levels of blood urea nitrogen (BUN) and creatinine kinase (CK), although not significant, were slightly increased during the treatment of CAP. The level of lactate dehydrogenase (LDH) was not changed during the treatment of CAP but slightly increased after the treatment of CAP. However, no histopathological changes were observed in various organ after the treatment. On the other hand, The CL activity was significantly decreased in a dose-dependent manner during the treatment of CAP *in vitro*. Similarly, a dose-dependent reduction of CL response, although not significant, were observed during the treatment of CAP *in vivo*. Furthermore, the pathphysiological and immunological side effects of CAP on olive flounder were potentiated by ultra violet (UV) irradiation. From these results, it is suggest that CAP can evoke several side effects on haematopoietic organs in olive flounder and reduce the function of flounder phagocytosis *in vivo* and *in vitro*, indicating the immunosuppressive ability of CAP and it's side effects were considerably increased by UV irradiation. Conclusively, CAP itself can not cause a serious mortality. However, CAP has high potential for leading to high mortalities in marine fish when it is used under the UV-irradiated environmental condition. To approach more carefully such findings,

possible photosensitization effects of chloramphenicol (CAP) on the skin of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* was also pursued. Flounders with or without chemically-damaged liver were exposed to respective UV-A and UV-B irradiation following intragastric administration of CAP. After the irradiation, a series of pathological analysis was carried out. CCl₄ injection constantly resulted in various degree of fatty change, atrophic parenchyma and focal inflammation in liver. Any clinical and histological changes were not recognized in the group with healthy liver, irrespective of CAP administration. However, necrotic cells characterized by loss of nucleus and cytoplasmic hyaline inclusions were observed only in the UV-A irradiated epidermis of flounders with damaged liver after the administration of CAP. In UV-B irradiation, all the flounders with or without damaged liver after CAP had similar necrotic cells in morphology to those of UV-A group. These results suggest that CAP may have a photosensitization effect on the skin of flounder, under UV-A or UV-B irradiation, which may be potentiated the effect under hepatic dysfunction.

CONTENT

Chapter 1. Introduction	18
Section 1. Objects of the Research	18
Chapter 2. Current Status and Domestic and Foreign Techniques	20
Section 1. Studies Related to the Resistance of Antibiotics	20
Section 2. Changes of Defence System and Physiological Functions in Fish	21
Section 3. About Toxicity of Antibiotics	22
Chapter 3. Research Contents and Results	25
Section 1. Molecular Characterization of the Antibiotics Resistance Bacteria	25
Section 2. Effects on Defence System and Physiological Functions of Fish	92
Chapter 4. Achievement to the Research Purpose and Contributions to the Related Areas	140
Section 1. Levels of Achievement	140
Section 2. Contributions to the development of Science and Techniques	142
Chapter 5. Application Plans of Research Results	144
Section 1. Expression of Antibiotic Resistance Gene	144
Section 2. Side Effects and Toxicity of Antibiotics	144
Chapter 6. Cited References	146

목 차

제 1 장	서 론	18
제 1 절	연구개발의 목적과 범위 및 필요성	18
제 2 장	국내외 연구개발 현황	20
제 1 절	항생제의 내성에 관한 연구 측면	20
제 2 절	어류의 방어체계 및 생리적 기능에 미치는 영향	21
제 3 절	항생제의 독성에 관하여	22
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	25
제 1 절	어류 병원성 내성 세균의 유전적 특성 분석	25
제 2 절	어류의 방어체계 및 생리적 기능에 미치는 영향	92
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	140
제 1 절	목표 달성도	140
제 2 절	기술적·학문적 발전에의 기여도	142
제 5 장	연구개발 결과의 활용 계획	144
· 제 1 절	세균의 항생제 내성발현에 관한 연구	144
제 2 절	항생제의 생리 및 면역학적 부작용 및 독성에 관한 측면	144
제 6 장	참고문헌	146

본 문

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위 및 필요성

현재 양식어장에서는 어병 발생이 매년 급증하고 있고, 이에 따라 생산비 중 의약품의 사용량 및 그 빈도가 점차 증가 추세에 있다. 약물의 과다 사용으로 인한 양식 어장에서 각종 문제점(어떤 문제?)들이 발생되고 있으며, 이 중 가장 심각한 문제점은 내성균 발생과 어류에 대한 생리적 부작용이라고 할 수 있다.

항생물질의 사용이 어류의 세균성 질병을 치료 할 수 있는 대책의 하나이기는 하지만 학계와 현장에서는 그 사용에 따른 생리적 부작용과 국민의 환경위해성에 대한 예방을 위한 내성 유전자 연구에 대한 중요성이 경시되고 있는 실정이다. 그러므로 어류질병 예방을 위한 효과적인 대처 방안은 항균물질의 효과적 사용, 부작용에 대한 정보의 확보 그리고 내성균생성 방지를 위한 유전자 연구라는 3 분야가 함께 이루어 져야 할 것이다. 즉 금까지의 연구는 항균물질의 효과적인 사용 (약효, 약동력학 등)에 비교적 많은 비중이 두어졌다면 향후는 그 생리적 부작용과 내성 발현의 유전적 특성분석과 같은 연구가 이루어져야 효과적인 어병 관리가 이루어 질 수 있을 것이다.

1. 항생제 내성균 발생과 관련하여:

양식 현장에 항균물질 내성균이 널리 분포하게 되었다. 특히 FDA 허용 항균물질인 tetracycline에 대한 내성균의 급격한 출현으로, 양식현장에서는 최근 fluoroquinolone과 같은 새로운 계열의 항생물질로 급격한 대체가 이루어지고 있다. Tetracycline(Tc) 등에 대한 내성에 대한 분자 생물학적인 보고와 함께, 현재 우리나라 양식현장에서는 새로운 대체 항균물질로 양식현장에서 다량으로 사용되고 있는 fluoroquinolone (FQ) 계에서도 이 물질에 대한 내성 기작 규명 또는 유전자 변화 등에 관하여 아직도 많은 연구가 필요한 실정에 있다. 따라서 내성균 발생의 원인과 대책 마련을 위해서는 관련 유전자의 특성과 변화에 대한 충분한 연구정보의 확보가 필수적이다.

2. 어류의 생리적 부작용 및 독성과 관련하여:

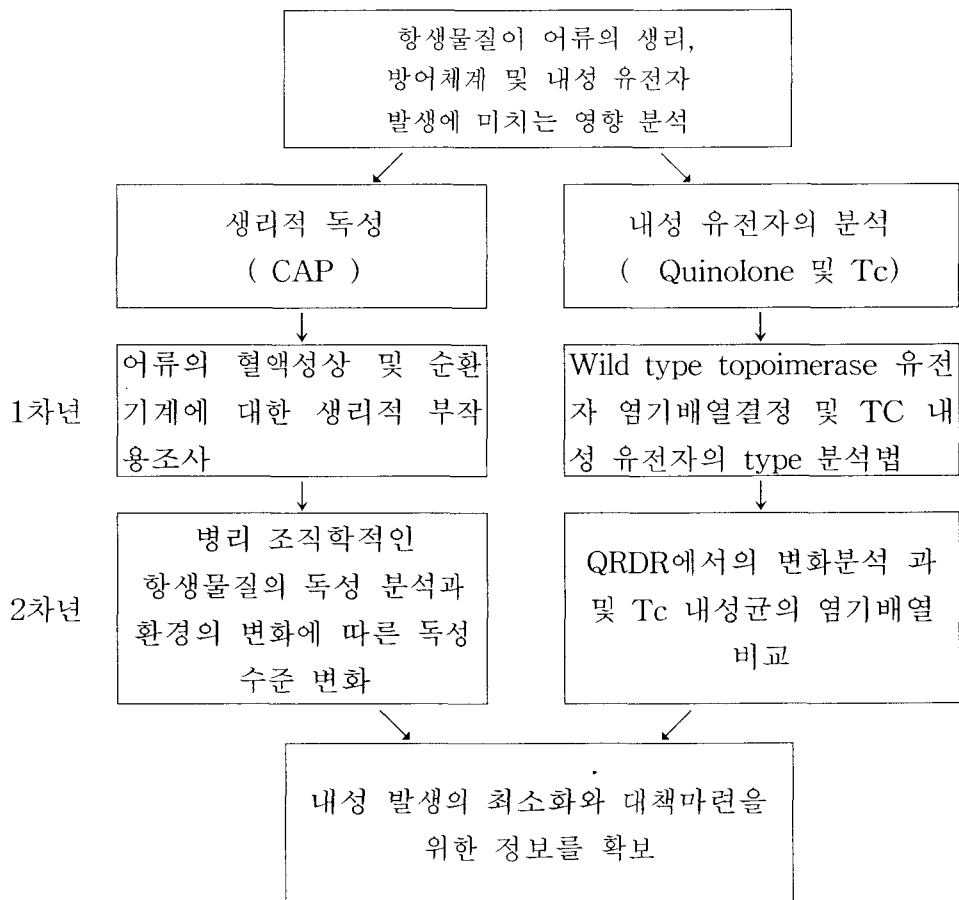
항생물질이 사람 및 가축 등에 대하여 간장 장애, 수평감각 이상, 과민반응 등과 각종 생리적 부작용을 일으킨다는 것에 대해 잘 연구되어져 있으나, 어류에 대한 연구는 현재 전무한 상태에 있다. 최근 chloramphenicol(CAP)계 약물의 투여와 관련하여 대량폐사 상황이 발생하고 있어 아직 그 인과관계에 대한 학문적인 연구가 수행되지 않아 구체적인 대책을 강구하지 못

하고 있다.

따라서 본 연구에서는 병원성 agents가 갖는 항균물질(특히 Tc 및 FQ 계열) 내성의 유전적 특성에 대한 분자생물학적인 분석을 실시함으로써 내성 발생의 최소화과 대책마련을 위한 정보를 확보하고자 한다. 또한, 지속적으로 그 사용이 증가되고 있는 항균물질은 포유류에서 나타나고 있는 생리 및 면역학적 영향과 그 독성 영향 등이 어류에서는 어떠한 형태로 나타나는지 규명함으로써, 양식 산업에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지에 대한 기초정보를 얻고자 하였다. 특히 CAP계 항생제의 생리학적 및 면역학적 부작용과 독성학적 측면을 현장에서 일어나는 임상적 사고 상황을 근거로 하여 조사할 필요성이 있었다.

3. 연구의 범위 :

이러한 목적과 필요성을 실현하기 위한 연구의 범위는 다음과 같이 결정 하고 추진 하였다.



제 2 장 국내·외 연구개발 현황

제 1 절 항생제의 내성에 관한 연구 측면

내성균의 분포와 그 비율에 관한 연구가 1970년대 초부터 Aoki et al. (1972)등에 의해 일본에서는 많은 연구가 이루어져 왔다. 그리고 우리나라에서도 기본적으로 그 심각성에 대하여 대학과 국립수산물과학원 등에서 접근을 하고 있다.

먼저 tetracycline계 약물의 작용기전을 보면 세균 내에서 30S ribosome에 결합함으로써 aminoacyl tRNA가 50S ribosome내 acceptor site와 결합하는 것을 방해하여 단백질 합성의 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다(Roberts, 1996). 현재 우리나라에서는 tetracycline계 약물의 남용으로 Tc에 대해 내성을 가지는 많은 종류의 내성균이 발생하고 있다. 이러한 내성균이 가지는 내성 기작의 특성을 보면, 첫째, 내재성 막 단백질에 의해 일어나는 Tc의 energy-dependent efflux, 둘째 용해성 단백질에 의한 ribosomal protection, 마지막으로 효소에 의한 Tc의 불활성화에 의해 일어나는 세 가지로 분류된다 (Levy, 1992; Taylor&Chau, 1996; Chopra&Roberts, 2001). 이러한 내성 기작의 특성에 따라 Tc 내성 유전자도 그 종류를 달리하는데 efflux 내성 기작을 가지는 *tet* gene으로 *tet* A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L 그리고 Z 등이 있으며, ribosomal protection의 경우는 *tet* M, O, S, W, Q 그리고 T등이 있고 enzymatic은 *tet* X가 있는 것으로 알려져 있다 (Levy et al., 1999). Chopra et al. (2001)은 지금까지 알려진 총 *tet* 유전자의 수는 32가지 이상이지만 그람 음성균에는 *tet* A, B, C, D, E 그리고 G등이 많이 분포한다고 보고하였다.

이러한 *tet* gene 검출을 위하여 이전의 여러 연구에서는 *tet* probes를 제작하여 hybridization으로 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법이 보고되었지만 (DePaola et al., 1988; Marshall et al., 1983; Lee et al., 1993), 이러한 방법은 실험 과정이 복잡하며 시간이 많이 소비된다는 단점이 있어 현재는 대부분 PCR을 활용 하고 있다. 본 연구실에서도 이러한 방법을 사용한 보고를 한 바 있다.

해양 환경에서 oxytetracycline의 내성 빈도에 관한 연구가 있었지만 (Ervik et al., 1994; Kerry et al., 1994; Schmit et al., 2000), 빈약한 점이 많았으며, 대부분의 연구가 담수에서 이루어진 것으로 보고 되었다 (Mcphearson et al., 1991; Spanggard et al., 1993; Vaughan et al., 1996).

Quinolone 계열(특히 fluoroquinolone) 항생제는 의학, 수의학 등 인간과 가축, 그리고 수산양식장에서 널리 사용되고 있으며, 가장 효과적인 약물중 하나로 알려져 있다. 이에 대한 중요 내성 기작은 GyrA와 GyrB라는 소단위로 구성되어 있는 DNA gyrase와 ParC와 ParE라는 소단위로 구성되어 있는 topoisomerase IV (Topo IV)의 quinolone resistance-determining region (QRDR)에서

나타나는 유전적 변이이다 (Nakamura, S.1997; Horii et al., 2003).

*E. coli*를 포함하는 여러 그람 음성균에서 *gyrA*, *gyrB* gene은 각각 *parC*, *parE* gene과 상동성을 보이는 것으로 알려져 있으며 (Peng et al., 1993), 이들은 모두 chromosomal DNA상에 위치하나 *gyrA*와 *gyrB* gene은 다소 떨어져 있는 반면, *parC*와 *parE* gene은 가까운 곳에 위치한다고 알려져 있다 (Ying Wang et al., 1993; Diane and Andrew, 1997).

그러나 어병 세균에서 나타나는 *gyrA*, *gyrB* gene은 각각 *parC*, *parE* gene에 대한 연구, 특히 어병 세균의 하나인 *E. tarda*의 유전적 변이에 대한 연구는 아직 보고된 적이 없어 quinolone 내성에 대한 국가별 변이 특성에 대한 비교가 이루어지지 않고 있다.

항생제를 경구 투여했을 때 장내 세균에 내성 빈도의 변화에 대해 조사하였으며, 여러 종류의 항생제를 이용한 경우가 많았지만 (Kerry et al., 1997), Sugita et al. (1988)은 그 중에서 특히 OTC를 경구 투여했을 때 내성 빈도가 확실히 증가하였다고 보고하였다. 그리고 Depaola (1995)는 OTC를 투여하기 전에는 20~40%의 내성 빈도를 보였고 10일 동안 OTC를 투여한 후에는 내성 빈도가 100%까지 증가한 것을 확인할 수 있었다고 하였으며, Depaola et al. (1995)의 연구에서는 이러한 내성 변화에 계절적 차이를 보고하기도 하였다.

최근의 보고를 보면, Bell et al. (1988)과 Smith et al. (1994)은 양식장에서 사용하는 항생제에 대한 Tc 내성균의 출현, Stamm et al. (1989)은 항생제에 노출되는 시간이 길수록 각종 질병 원인 균의 Minimum Inhibition Concentration (MIC) 값이 증가한다고 하였다. 비록 사람에게 병원성이 있는 *Vibrio parahaemolyticus* 등에서도 새로운 내성균의 출현이 보고되고 있으나 (Twiddly et al., 1994), 어떠한 유전자가 장내 세균에서 어떻게 변화 또는 진화해 가는지에 대한 분석은 이루어지지 않고 있다.

최근 우리나라의 보고를 살펴보면 우리나라에서도 해양 내성균에 대한 중요성을 인식하여 그 분포나 비율에 대하여서는 monitoring을 하고 있으나 아직까지 내성균이 함유하고 있는 유전적 변화 등에 대한 연구는 이루어지지 않고 있는데 반하여 사람과 가축에서 나타나는 *tet*, *bla* gene에 대한 monitoring은 이미 상당히 이루어지고 있다. 결론적으로 현재 우리나라는 양식 산업이 발달되었고 이로 인하여 상당량의 다양한 항생제가 사용되고 있어 새로운 type의 유전자가 나타날 가능성은 매우 높으나 이에 관한 연구가 충분히 이루어지고 있지 않은 실정이다.

제 2 절 어류의 방어체계 및 생리적 기능에 미치는 영향

국내 양식어업은 1990년대 후반부터 국민의 소득향상을 위하여 생산규모가 대형화되고 있으며, 또한 소비자의 기호변화에 따라 부가가치가 높은 어류를 중심으로 양식품목이 다양화, 고급화되는 추세이다. 이와 같은 양식 산업의 생산규모 증대와 더불어 새로운 병원체에 의한 양식현장에서의 어병 발생도 매년 급증하여 그로 인한 경제적 피해가 상당한 비중을 차지하고

있다. 현재 양식 어류에서는 에드워드병, 비브리오병, 연쇄구균병 및 활주세균병등과 같은 다양한 세균성 질병에 기인한 경제적 손실이 막대하며, 대처 방법으로 주로 많은 항생제에 의존하는 것이 현실이다. 그러나 항생제의 다양화 및 사용 빈도 증가로 인해, 항생제의 오용으로 인한 약물의 잔류, 내성균의 증가, 숙주 동물의 생리적 부작용 등의 발생으로 질병치료에 어려움을 겪고 있다. 국내 양어장에서 현재 다양한 질병을 치료하기 위해 인체에 국한적으로 사용되는 chloramphenicol (CAP)을 불법적으로 사용함에 따라 많은 약물사고가 발생하여 많은 피해를 입고 있으나 그 원인에 대하여서는 전혀 규명되지 않고 있다.

CAP는 1947년 *Streptomyces venezuelae*에서 첫 번째로 분리된 항생제이며 70S 리보솜의 50S subunit을 결합하여 세균내의 단백질 합성을 억제시킨다. 이 항생제는 1948년부터 typhus fever 치료제로 사용되어왔고 salmonellosis 와 haemophilus influenza에 의한 여러 가지 감염, 특히 뇌막염이나 호흡계 질환, 신경계 질환을 치료하는데 널리 이용되었으며 지금은 주로 귀나 눈 감염 치료제로도 주로 사용되고 있다 (김, 1997). 게다가, 이 약물은 저렴한 가격과 좋은 약동학적 특성을 가지고 있기 때문에 다른 항생제에 비해 많이 사용되어왔으나, CAP는 다음과 같은 다양한 혈액 독성을 일으킨다고 알려져 있다 (Holt *et al.*, 1993, 1997; Yunis, 1973, 1988; Trevett *et al.*, 1992). 첫 번째로 망상 적혈구 감소증 (reticulocytopenia), 백혈구 감소증 (leucopenia) 및 혈소판 감소증 (thrombocytopenia)을 유발한다고 알려져 있다 (Trevett *et al.*, 1992). 게다가, CAP의 혈액 독성은 골수는 정상시와 같아 보이나, 적혈구 세포 수 감소와 함께 세포질이 감소하여 myeloid: erythroid (M : E ratio) 비율이 증가하는 현상을 보고하였다 (Trevett *et al.*, 1992). 두 번째 중요한 혈액독성은 CAP가 재생불량성 빈혈 (aplastic anaemia)을 일으키는 것으로, CAP는 유전인자가 약물의 대사에 관여하여 독성을 증가시켜 범혈구감소증 (pancytopenia)과 재생불량성 빈혈을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Feder *et al.*, 1981). 세 번째, 사람의 경우 CAP에서 유발된 혈액독성은 흔하진 않지만 재생불량성 빈혈에서 백혈병으로 발전하는 경우가 있는데, 이것은 CAP가 발암원으로서 작용한다는 것을 보여주었다 (Vacha *et al.*, 1981). 이러한 잠재된 독성에 의한 예상치 못한 부작용 때문에 선진국에서는 특수한 경우를 제외하고는 식용 가축 및 가축 사료에 사용을 금지하고 있다. 그럼에도 불구하고 CAP의 그람 음성·양성 세균등에 대한 광범위한 항균효과와 저렴한 가격으로 인한 장점 때문에 전세계적으로 여전히 불법적으로 많이 사용되고 있는 실정이다. 현재, CAP가 유발하는 육상생물의 여러 가지 독성은 알려져 있으나 (Ogutu *et al.*, 2002; Turton *et al.*, 2000, 2002a; Vacha *et al.*, 1981), 국내 양식 어류인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에 대한 연구는 별로 되어져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 금지 항생제임에도 불구하고 현재 불법적으로 국내 양식장에서 널리 사용되고 있는 CAP에 의한 약화사고의 원인을 규명하기 위한 연구의 일환으로 CAP가 어류에 대하여 어떠한 생리적 부작용을 일으키는지 조사하고자 한다.

제 3 절 항생제의 독성에 관하여

일반적으로 어류에 있어서 항생제나 기타 약물의 적용은 사료를 통하여 이루어진다. 따라서 과량으로 투여되거나, 장기에 걸쳐 사용될 때 병리학적인 변화가 있을 수 있다. 어류에서는 항

생제가 일으키는 독성에 관하여 연구된 예가 그렇게 많지 않다. 병리학적 변화를 야기하는 항생제로써 두 가지가 알려져 있다. 하나는 erythromycin 다른 하나는 sulphonamide계 항생제이다. 전자는 근위 신세뇨관에 공포변성을 야기하고, 후자의 것들은 renal cast형성과 괴사를 야기하며, 전자의 것과 달리 국소 간조직 괴사와 동맥경화를 자극하는 것으로 알려져 있다 (Roberts, 2001; Wood and John, 1957).

어류에서 사용되는 항생제는 모두 인의 및 수의분야에서 사용되었거나, 사용되고 있는 것으로 그 독성에 대하여는 크게 문제 삼을 정도로 연구된 것이 없고, 급성독성 개념의 것에 한정되어 있다고 볼 수 있다. 국내에서 CAP계 항생제 등에 의한 대량 폐사피해의 예가 비공식적으로 접할 수 있다. 아직 그 인과관계를 밝혀 줄 수 있는 연구는 없는 실정이다.

본 연구에서 항생제는 문제의 CAP계 항생제에 대한 독성 유무에 대한 것에 초점을 맞추어 진행되었다. 여기서 급성독성의 유무에 대하여 우선 추구할 필요가 있고, history-taking과 병리조직학적 소견에 근거하여 독성발현 기작에 대한 가설이 필요하였다. 사건당시 history-taking으로부터 일광이 조사되는 여름철에 문제가 발생한다는 것, 일광 하에 차광막이 없는 곳에서 투약한 곳에서 발생한다는 것이 가장 단서가 되며, 조직학적으로는 피부의 타락 및 괴사소견과 함께, 간장의 심한 지방변화 소견이 그 병리조직학적 증거로써 확보하였다.

따라서, 가설로써 그 첫째가 1) CAP의 과량투여에 따른 급성 독성, 두 번째가 2) 투여 후 자외선 조사에 따른 광감작, 마지막 세 번째가 3) 간장의 기능 손상 후 CAP 자체의 독성 내지 자외선 조사에 따른 광감작으로 설정하고 실험을 수행할 필요성이 있었다.

이 중 특히 세 번째의 것이 가장 있을 법한 가설로써 생각되었다. 포유류에서는 hemoglobin, cytochrome 또는 myoglobin 등의 물질이 합성되는 과정에서 대사에 관여하는 효소의 일부가 결핍되거나 없게 되면 광흡수활성을 갖는 prophyrin으로 축적되는 중간대사 산물들이 축적되어 혈액으로 순환된다. 이 때 피부가 자외선에 노출되면 피부염을 발생하게 된다. 또한, 정상적으로는 어떤 물질이 간장에서 대사되어 담낭 내로 배설되지만, 간장의 대사기능 손상으로 광감작 활성을 가진 대사산물의 배설이 지연되거나 축적되어 혈액 내를 순환하는 동안에 자외선의 자극을 받아 피부에 염증을 유발할 수 있다. 구충제로 잘 알려진 phenothiazine은 그 대사산물인 phenothiazine sulfoxide가 광흡수활성을 가지고 있다. 간장의 손상 또는 기능불완전으로 이 물질이 혈액을 순환하여, 광감작을 유발할 수 있다 (Jones et al., 1997). 또한 phenothiazine은 연어과 어류 Atlantic salmon에서의 광감작 독성이 알려져 있다 (Hardy, 2001).

게다가 어류의 경우에 phenothiazine 이외에도, 광감작 독성에 관하여 언급한 보고들이 있다. Atlantic salmon 및 sea trout에서의 ulcerative dermal necrosis (UDN)이 광감작 독성의 관여가 의심되고 있다 (Bullock & Roberts, 1979; Roberts, 2001). 또한 잉어과어류가 광흡수활성을 가진 reten을 섭취할 경우, 광감작 반응의 발생할 수 있다고 언급하였다(Bullock et al., 1981, Häkkinen et al., 2003, 2004).

CAP은 그람 양성 및 음성세균에 감수성 있는 광범위 항생제로 사람에서 장티푸스의 치료에 이용되었다. 그러나 이 항생제는 재생불량성 빈혈 (hypoplastic anemia) 및 신생아에 과량으로 투약하면 회색중후군 (gray baby syndrome)을 일으키는 부작용과 내성균 출현으로 사용이 규제되고 있다 (Lee, 2003). 식품안전성검사에서는 잔류허용 기준검사에서 검출되지 않아야 하는, 사실상 어류에 대

한 사용이 금지된 약품이다. CAP는 수산용 약제로 나와 있지 않으나, 어류 세균성 질병치료에 효과가 높으므로 양식현장에서는 사용하고 있는 현실이며, 동일 계열의 약물로서 CAP에 비하여 부작용이 적은 thiamphenicol (수산용 치아페티콜, 이화약품주식회사 등) 및 fluorophenicol (수산용 플로피쉬, 한동제약; 아쿠아 파워콜, 대한 팜 등)이 현재 수산용으로 나와 있다. 넙치에 대한 CAP 급성독성 실험에서 폐사상황이 없었고, 내부 장기에 조직학적 및 생리학적 변화가 없음이 이미 보고된 바 있다 (Jung, 2003). CAP는 물속 H₂O₂에 의하여 광화학적 산화(photochemical oxidation)가 일어난다는 보고가 있다 (Milano et al., 1995). CAP는 주로 간에서 대사되어 신장을 통하여 배설되는 약물로, rainbow trout에서 그 중간 대사산물로 chloramphenicol glucuronide, chloramphenicol alcohol, chloramphenicol base 등이 알려져 있다 (Fig 1., Treves-Brown, 2000). 부작용으로는 oxytetracycline과 함께 투여할 경우, 뱀장어의 적혈구 세포질 공포화, 핵변형, erythroblast의 감소, erythrocyte의 지방대사 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Kreutzmann, 1977).

넙치는 해부학적으로 종편형의 체형을 가지고 있고, 편측 체표 (눈이 있는 등쪽) 거의 전부가 자외선에 노출될 수 있으며, 그 상피층이 3~5개 세포층으로, 다른 어종에 비해 매우 얇기 때문에, 물리화학적인 자극에 쉽게 영향을 받을 수 있다. 어류는 한 여름철 야외 양식하는 경우 태양 광선에 노출되면 급성 피부염이 발생할 수 있다 (Ferguson, 1989). 또한 그러한 피부염은 화상뿐만 아니라 광감작 요인에 의해서도 발생 가능성이 있다 (Bullock & Roberts, 1979, Bullock et al., 1981).

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 어류 병원성 내성 세균의 유전적 특성 분석

1. 연구 방법 및 결과

가. Tc resistant *Edwardsiella tarda* 의 연구

(1) 내성 균주(*Edwardsiella tarda*) 의 확보 및 특성 분석

(가) 표준균주

Escherichia coli C600 R222, *E. coli* HB101 pPT3, *E. coli* C600 pJA8122, 그리고 *E. coli* HB101 pBR322를 분양받아 실험의 표준 균주로 이용하였으며, *Edwardsiella tarda* RE1과 *Aeromonas hydrophila* HA 균주는 부경대학교 해양 식량자원 개발 공동 실습관에 유전자의 염기서열에 대한 분석을 의뢰하여, 이전에 알려진 *tet* gene type과 동일한지를 확인한 후 표준균주로 이용하였다 (Table 1-1). 균의 분리 및 증균용으로는 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)나 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)를 사용하였으며, *E. coli* 균주는 37°C에서 16시간 배양하고, *E. tarda*와 *A. hydrophila*, 병어로부터 분리된 채집 균주는 25°C에서 16시간 배양한 후 균수를 측정하고, spectrophotometer (UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS)를 이용하여 OD₆₀₀값을 구한 후 실험에 사용하였다. 또한, 실험균은 보존을 위해 배양액에 20% glycerol (Sigma)을 첨가한 후, -70°C에서 사용 전까지 보관하였다.

(나) 내성균주의 분리

내성 균주를 screening하기 위해 1993년부터 2002년까지 우리나라 남해안과 동해안의 양식장의 병어로부터 균주를 분리하여 내성균을 찾고자 하였다. 채집 균주의 tetracycline에 대한 내성 정도는 broth dilution method를 사용하여 MIC값으로 나타냈으며, 그 농도의 기준은 16µg/ml로 하였다. 총 185개의 균주를 채집할 수 있었으며 (Table 1-2), 선택 배지와 API 20E kit를 활용하여 균 동정을 실시해 *E. tarda* 127종을 선별하고 그 중에서 Tc에 내성을 나타내는 20균주를 확인하였다. 다른 항생제에 대한 내성정도는 ampicillin(10µg), ciprofloxacin(5µg), chloramphenicol(30µg), gentamycin(10µg), nalidixic acid(30µg), oxolinic acid(2µg), penicillin(10U) 농도로 하여 thick paper disc에 50µl를 떨어뜨린 후 실온에서 overnight 동안 건조시키고 test tube에 담아 보관하였다. 실험은 agar diffusion method를 이용하여 대부분의 균주가 다제 내성균임을 확인할 수 있었다.

Table 1-1. Reference stains used in this study

Strains	Characteristics	<i>tet</i> genes	Accession No. (GenBank)
<i>Edwardsiella tarda</i> RE1	plasmid	<i>tet</i> A	X0006
<i>Escherichia coli</i> C600 R222	plasmid	<i>tet</i> B	J01830
<i>Escherichia coli</i> HB101 pBR322	plasmid	<i>tet</i> C	J01749
<i>Escherichia coli</i> HB101 pPT3	plasmid	<i>tet</i> D	X65876
<i>Aeromonas hydrophila</i> HA	chromosome	<i>tet</i> E	L06940
<i>Escherichia coli</i> C600 pJA8122	R plasmid	<i>tet</i> G	S52437

Table 2-2. Distribution of tetracycline resistance bacteria isolated from diseased fish from 1993 to 2002 in Korea

Area	Proportion of Tc resistance isolates			Total
	1993~1995	1996~1998	1999~2002	
East sea	0 / 4	4 / 15	11 / 48	15 / 67
South sea	8 / 60	4 / 12	12 / 46	24 / 118
Total	8 / 64	8 / 27	23 / 94	39 / 185

(2) Multiplex PCR의 개발

(가) Primer 제작

GenBank (EMBL)로부터 약 1.2kbp 크기의 *tet* gene A, B, C, D, E, 그리고 G의 sequence를 얻었다. Macaw program을 이용하여 6개의 *tet* gene sequence를 비교한 후, 가장 많이 conserve되어있는 148~168bp 부위로부터 sense primer를 제작하였는데 이 sense primer *tet* gene A, B, C, D, E, 그리고 G에 90%정도의 binding 확률을 가지고 있다. 각각의 *tet* gene에 대한 specific antisense primer는 다른 *tet* gene에 binding 될 수 없도록 뒷쪽 부위의 variable region인 301~318bp (*tet* B), 377~393bp (*tet* E), 517~534bp (*tet* A), 613~631bp (*tet* D), 761~778bp (*tet* C) 그리고 933~950bp (*tet* G) 부위를 사용하였으며, PCR product 크기가 171 (*tet* B), 246 (*tet* E), 387 (*tet* A), 489 (*tet* D), 631 (*tet* C) 그리고 803 (*tet* G) bp가 되도록 하여 전기영동시 각각의 type이 size에 의해 구별되도록 제작하였다 (Table 1-3, Fig. 1-1).

(나) Total DNA 분리

균을 TSB에 접종하여 25°C 또는 37°C에서 24시간 배양한 다음, 배양액 1.5ml을 취하여 12,000rpm, 10분간 원심분리하고, TE-buffer (10mM Tris/Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)로 재 현탁 시킨 후 20% SDS와 20mg/ml의 proteinase K를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 위의 lysates에 5M sodium chloride 100 μ l를 첨가한 후, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25: 24: 1)로 3회 추출하여 DNA가 녹아있는 수용액층을 단백질 성분과 분리하였다. 위의 수용액층에 2 volume ethanol과 0.3M sodium acetate를 넣고, vortex로 혼합하여, -70°C에서 1시간동안 침전시켰다. 12,000rpm, 4°C, 10분간 원심분리하여, 상등액을 완전히 제거한 후, 70% ethanol 1 ml을 첨가하여 12,000rpm, 4°C, 10분간 원심분리하였다. 상등액을 완전히 제거한 후, 10분간 상온에서 자연건조 시키고, 50 μ l distilled water에 현탁시켰다. 그리고, UV spectrophotometer(UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS, S.P.A., Milan, Italy)를 사용하여, 260nm에서 흡광도를 측정한 다음 각각의 DNA 농도를 정량하여 사용하였다.

Table 1-3. Primers used in PCR

<i>tet</i> genes	Oligomers name	Primer sequence (5' to 3')	Position* (bp)
	TETF	GCGCTNTATGCGTTGATGCA	148~168
<i>tet A</i>	TAR	ACAGCCCGTCAGGAAATT	534~517
<i>tet B</i>	TBR	TGAAAGCAAACGGCCTAA	318~301
<i>tet C</i>	TCR	CGTGCAAGATTCCGAATA	778~761
<i>tet D</i>	TDR	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	631~613
<i>tet E</i>	TER	ATGTGTCCTGGATTCCT	393~377
<i>tet G</i>	TGR	ATGCCAACACCCCGGCG	950~933

Note : TETF designed from the conserved region of six different *tet* genes and used as a common sense primer for PCR amplification.

* : Based on the sequence of *tet A*, *B*, *C*, *D*, *E* and *G*.

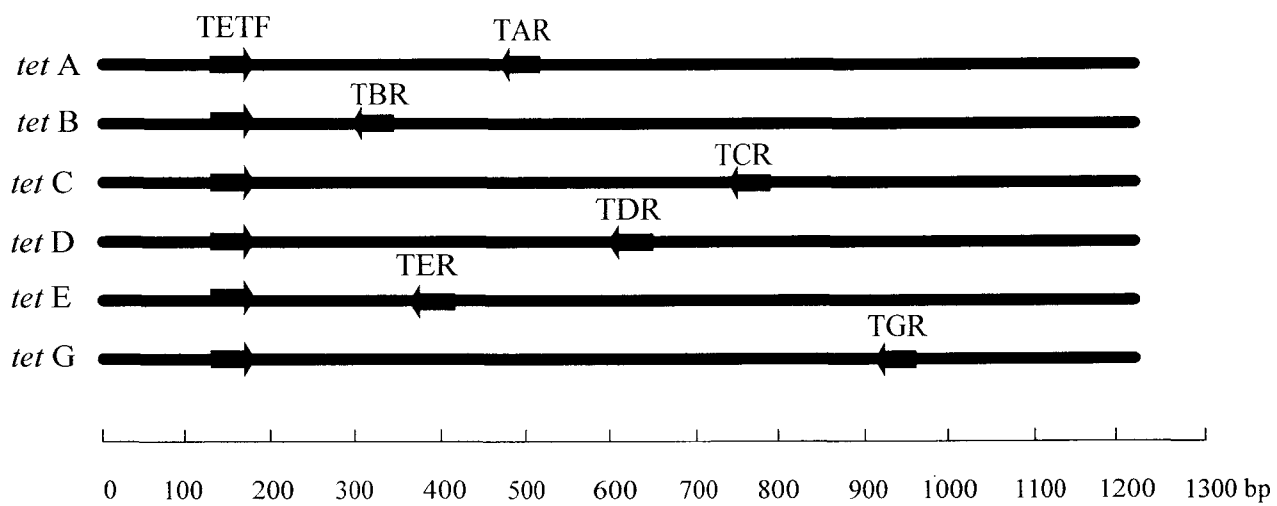


Fig. 1-1. Illustrated positions of primers used to specify the types of *tet* genes.

(\blackrightarrow : sense primer, \blackleftarrow : antisense primers)

(다) Multiplex PCR

PCR 혼합물은 0.2ml 용 microtube에 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% w/v gelatin, 0.5% Tween-20, 200 μ M 각각의 dNTP, 1 μ M 각각의 primer, 1.25U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) 그리고 template DNA로써 추출한 total nucleic acid 1ng을 첨가한 후, distilled water로 최종액 50 μ l가 되게 하였다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 predenaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C-30초, 55 $^{\circ}$ C-30초, 72 $^{\circ}$ C-30초간 반응을 1cycle로 해서 30cycle을 반응시켰다. 그리고, cycle이 끝난 뒤에는 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 extention time을 주었다. Multiplex PCR에서는 6종의 specific primer pairs를 혼합하여 사용하였으며, amplification cycle은 PCR과 동일하게 하였다. PCR 생성물은 0.5 \times TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)에 담겨진, 0.5 μ g/ml EtBr (ethidium bromide)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 후, UV(ultraviolet)하에서 나타나는 band를 관찰하여 증폭 여부를 확인하였다. 표준 균주의 total nucleic acid를 주형으로 PCR을 실시한 결과, 171 (*tet B*), 246 (*tet E*), 387 (*tet A*), 489 (*tet D*), 631 (*tet C*) 그리고 803 (*tet G*)bp의 특이적 PCR산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 PCR산물의 크기에 차이가 나도록하여 어떤 종류의 *tet* gene인지를 명확하게 구별할 수 있었다. multiplex PCR을 실시한 결과, 특이적 PCR 산물을 얻을 수 있었으나, target template의 specific primer를 제외한 5개의 antisense primers를 혼합하여 PCR을 실시했을 때는 PCR산물을 확인할 수 없었다 (Fig. 1-3). 그러므로 특이적 primer의 다른 primer는 PCR 과정시 어떠한 영향도 미치지 않음을 알 수 있었다.

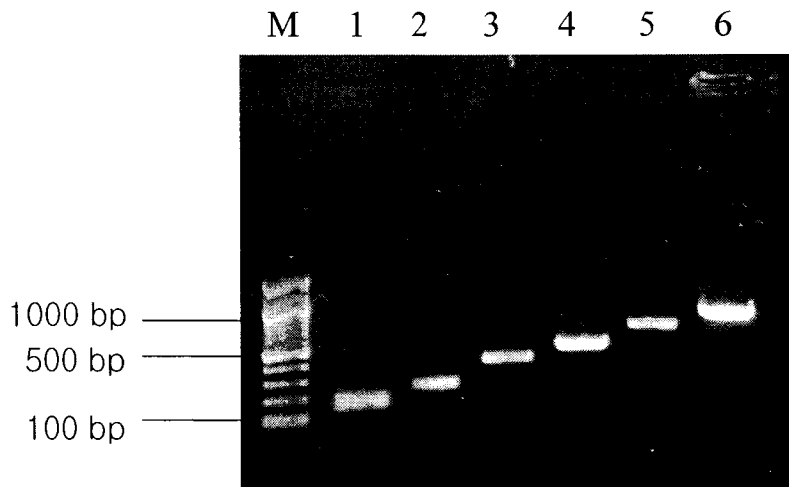


Fig. 1-2. Agarose gel electrophoresis of the products of PCR with specific primers for different *tet* genes and total DNA as templates isolates from standard strains contained different *tet* genes. Lane 1, *Escherichia coli* C600 R222 (*tet* B); lane 2, *Aeromonas hydrophila* HA (*tet* E); lane 3, *Edwardsiella tarda* RE1 (*tet* A); lane 4, *Escherichia coli* HB101 pPT3 (*tet* D); lane5, *Escherichia coli* HB101 pBR322 (*tet* C); lane 6, *Escherichia coli* C600 pJA8122 (*tet* G); M, 100bp DNA ladder.

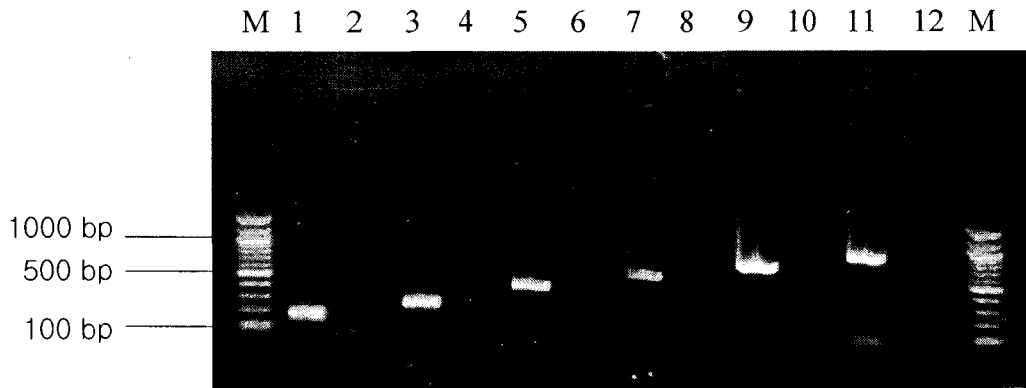


Fig. 1-3. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of standard strains. Lane 1, *Escherichia coli* C600 R222 (*tet B*); lane 3, *Aeromonas hydrophila* HA (*tet E*); lane 5, *Edwardsiella tarda* RE1 (*tet A*); lane 7, *Escherichia coli* HB101 pPT3 (*tet D*); lane 9, *Escherichia coli* HB101 pBR322 (*tet C*); lane 11, *Escherichia coli* C600 pJA8122 (*tet G*); lane 2, 4, 6, 8, 10,12, negative control (contained sense primer and 5 different antisense primers except each one specific primer); M, 100bp DNA ladder.

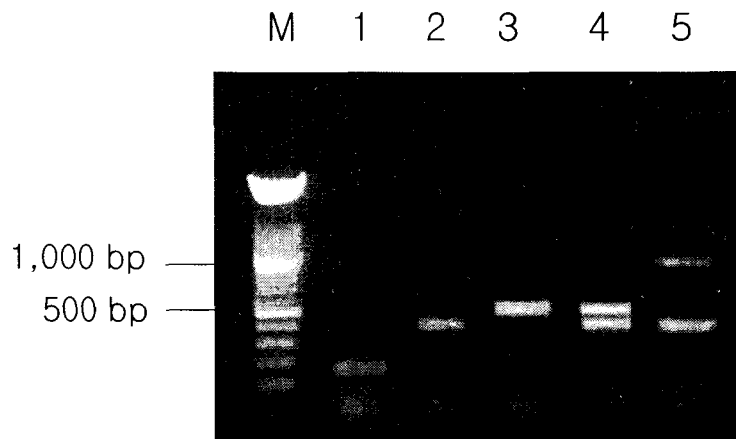


Fig. 1-4. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of the tetracycline resistant isolates in Korea. Lane 1, *Edwardsiella tarda* with *tet A*; lane 2, *Edwardsiella tarda* with *tet D*; lane 3, *Edwardsiella tarda* with *tet B*; lane 4, *Edwardsiella tarda* with *tet A-D*; lane 5, *Edwardsiella tarda* with *tet A-G* M, 100bp DNA ladder.

(3) Multiplex PCR을 활용한 어류 병원균의 내성 유전자 분포

(가) 내성 균주에서의 tet gene 검출

Tc에 대해 내성을 가지는 20종의 *E. tarda*로부터 total nucleic acid를 분리한 후 multiplex PCR을 실시하여 tet gene을 분석한 결과, *E. tarda*에서 tet A가 40%, tet D가 35%, tet B가 10%, 그리고 tet A·D, tet A·G와 같이 두 종류의 gene을 가진 균주가 각각 10%, 5%로 나타났다. 가장 dominant한 tet gene은 tet A, tet D이고 tet B는 적은 수였으나 이전과 다른 분포를 확인할 수 있었으며, tet A·D, tet A·G와 같이 두 종류의 gene이 존재하는 경우 multiplex PCR을 이용하여 한번의 PCR로 확인하는 것이 가능했다 (Table 1-4, Fig. 1-4). 이러한 결과는 이미 보고 되어진 *E. tarda*에서는 tet A, D만이 발견되었던 것과는 차이를 보였다. 그리고, tet G gene의 nucleotide sequence는 *Vibrio anguillarum*에서 처음 보고되어 졌는데, 본 실험의 결과에서는 tet G가 *Vibrio sp.*에서 발견되지 않았고 오히려 *E. tarda*에 존재함을 확인할 수 있었다. 실험에서 사용한 PCR assay법은 최근 들어 여러 연구가들에 의해 항생제 내성 유전자를 검출하는데 많이 이용되어 왔지만 본 연구에서처럼 conserved region으로부터 하나의 sense primer 그리고 PCR 생성물의 크기 차이로 tet genes이 구별되는 6개의 antisense primer를 제작하여 이용한 경우는 없었다.

(4) 해양 환경에서 나타나는 내성 유전자의 특성분석

(가) 채집시료 분석

해양 환경에서의 내성분포 조사를 위해 남해안 일대의 양어장으로부터 양어장 주변의 해수, 저질, net의 부착물, 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)을 채집하여 시료로 이용하였다. 해수, 저질, net의 부착물은 0.15M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 완충용액으로 10배씩 단계 희석한 후 희석액을 0.45 μ m (pore size) membrane filter에 통과시켜 고정하였으며, filter에 고정된 세균을 1% NaCl 첨가 TSA배지와 oxytetracycline (10 μ g/ml)이 첨가된 1% NaCl 첨가 TSA배지의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성 빈도를 백분율로 계산하였다. 조피볼락은 해부하여 장을 분리한 후 중장 0.5g을 5ml의 0.15M PBS 완충용액에 현탁시켜 분쇄하였다. 내성 빈도에 관한 조사는 위와 동일한 방법으로 이행되었다. OTC 10 μ g/ml이 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 순수 분리한 후 colony의 형태, 크기, Gram 염색, oxidase test등으로 분류하여 API 20E로 균을 동정하였다. 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다 (Table 1-5). 그리고, 저질과 net의 부착물질에서 조사된 내성균의 빈도가 24.4%, 30.7%로 각각 높게 나타나 내성균의 reservoir 역할을 할 수 있을 것이라 추정되어졌다.

Table 1-4. Tetracycline resistance determinants in 20 *Edwardsiella tarda* isolates

Strain	<i>tet</i> genes	No. of isolates (%)
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>tet</i> A	8 (40)
	<i>tet</i> D	7 (35)
	<i>tet</i> B	2 (10)
	<i>tet</i> A and D	2 (10)
	<i>tet</i> A and G	1 (5)

Table 1-5. Proportion of OTC resistant bacteria in marine aquactic environment of Korea

Samples	% of OTC resistant isolates
Seawater of farm	6.7
Sediment	24.4
Net	30.7
Intestine of rockfish (A)	2.83
Intestine of rockfish (B)	0.25

* Rockfish (A) : OTC treatment before 1 week of sampling.

* Rockfish (B) : no antibiotics treatment before 3 months of sampling.

(나) PCR 방법을 통한 *tet* gene의 분포조사

OTC가 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 TSB에 접종한 후 25℃에서 18~24시간 배양하였다. 배양액 1ml을 12,000rpm, 10분간 원심 분리하였으며, 상등액을 제거하고 pellet에 0.15M PBS 완충용액 1ml를 첨가하여 vortex한 후 12,000rpm, 10분간 원심 분리한 다음 상등액을 완전히 제거하고 TE buffer 500 μ l에 현탁하여 95℃의 물에서 7분간 heating시켰다. 이렇게 분리된 whole cell은 multiplex PCR을 위한 template로 이용되어졌으며, PCR 산물은 0.5 μ g/ml EtBr이 첨가된 1% agarose gel로 TAE buffer에서 전기영동을 실시한 후 어떤 종류의 *tet* gene이 존재하는지 확인하였다. PCR을 실시한 결과, 양식장 주변의 해수와 저질, 그리고 항생제를 투여하지 않은 조피볼락에서 분리된 내성균에는 *tet* B, *tet* C를 확인할 수 있었으며, net의 부착물질과 항생제를 투여한 조피볼락에서 분리된 내성균에서는 *tet* B가 나타나 대부분이 두 종류의 내성 유전자에 편중됨을 알 수 있었다 (Table 1-6, Fig. 1-5). 이전의 보고에서는 해양 저질에서 분리된 내성균 중 그람 음성균에 존재하는 *tet* 유전자를 조사해본 결과, *tet* A, B, C, D, 그리고 E등의 다양한 분포를 보였다고 보고하였지만 본 실험에서는 *tet* B, C만을 확인할 수 있어 차이를 보였다.

Table 1-6. Distribution of *tet* genes in the isolates of marine aquatic environment

Sample type	Number of isolates tested	<i>tet</i> gene	%
Seawater	100	B	70 %
		C	30 %
Sediment	50	B	98 %
		C	2 %
Net	50	B	100%
Fish (A)	50	B	100%
Fish (B)	100	B	96 %
		C	4 %

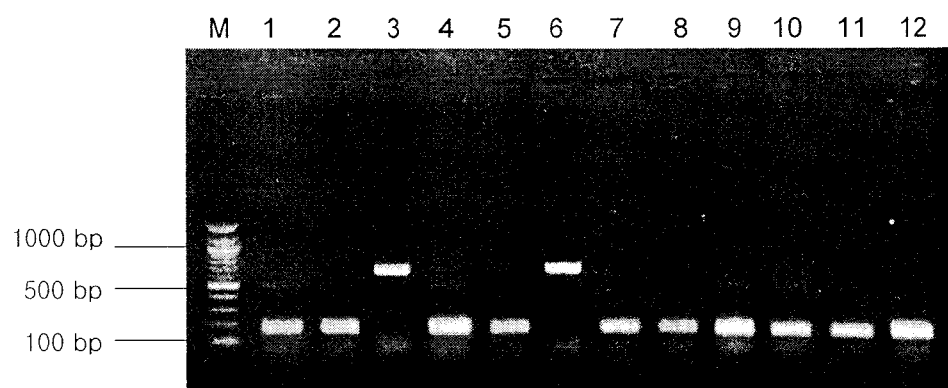


Fig. 1-5. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of oxytetracycline resistance bacterias in marine aquatic environment. Lane 1, 2: *tet B*, lane 3: *tet C*, lane 4, 5: *tet B*, lane 6: *tet C*, lane 7~12: *tet B*, M: 100bp DNA ladder.

(5) 항생제 투여가 어류의 내성균 발생에 미치는 영향과 *tet* 유전자의 분포 분석

(가) 항생제 투여 후 내성 변화 관찰

평균 체장 16cm, 체중 50g의 채집된 시료와 동일 어종인 조피볼락, *S. schlegeli*을 남해의 양어장으로부터 분양 받아서 실험실의 사육 수조에 1주일간 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. OTC농도는 125mg/kg으로 하여 사료에 배합한 후 사료를 어류의 체중당 3.2%씩 10일 동안 매일 투여하였다. 항생제를 투여하기 하루 전에 한번 sampling을 하였으며, 투여를 시작한 후 5일째 되는 날 그리고, 투여가 끝난 후 1, 4, 12, 16, 20일 되는 날 각각 3마리씩 sampling하였다. 3마리의 조피볼락으로부터 장을 분리한 후 증장 0.5g씩을 섞어 위와 동일한 방법으로 내성 빈도를 조사하여 변화 정도를 관찰하였다. 이전의 항생제 투여 후 내성 변화에 대한 연구에 의하면 항생제 투여기간에는 내성균 빈도가 변화하지 않았으며, 투여가 끝난 후에는 증가하는 경향을 보이다가 감소하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 이와 비슷하게 OTC를 투여한 후 조피볼락의 장내 세균에서의 내성 변화를 관찰한 결과 항생제 투여가 끝난 후 1, 4일째까지는 85, 83%로 내성균의 빈도가 증가하다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으며, 실험 마지막 날인 20일에는 항생제를 투여하기 전과 같은 내성균의 빈도를 나타냈다 (Fig. 1-6).

(나) 내성 유전자 확인

검출된 내성균으로부터 whole cell bacteria를 분리하여 어떤 종류의 *tet* gene이 존재하는지 PCR을 실시한 결과, 분리된 내성균의 대부분은 *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*이었고 이들 균주들이 가지는 *tet* 유전자는 *tet* B, *tet* C임을 확인할 수 있었으며, 확인된 *tet* gene의 종류는 환경에서 조사한 결과와 동일하게 나타났다. 정확한 균의 동정이 되지 않았지만 *tet* B gene을 가지는 내성균도 있었으며, Tc 내성균이기는 하나 실험에 이용된 *tet* A, B, C, D, E 그리고 G를 가지지 않는 균도 존재하였다 (Table 1-7). 여러번 PCR을 수행할 경우 시간적, 경제적으로 손실이 많기 때문에, 본 실험에서는 균이 가지고 있는 *tet* gene의 종류를 한번의 PCR로써 구별할 수 있는지에 대해 실험을 하였다.

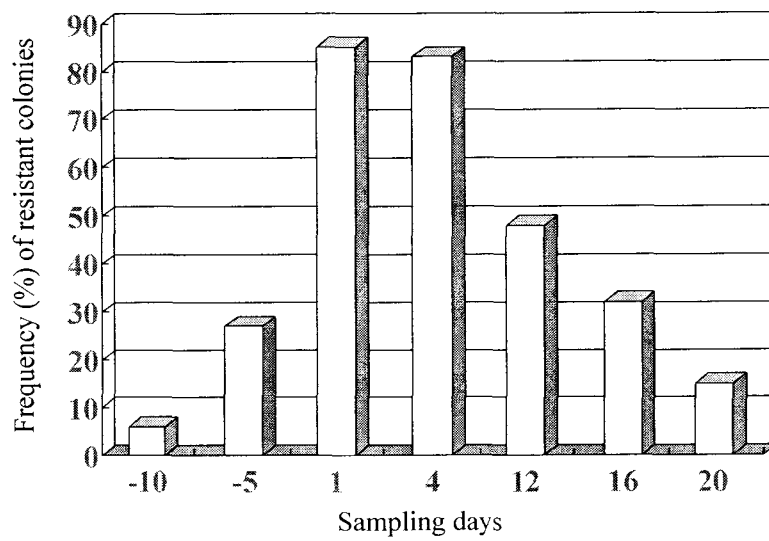


Fig. 1-6. Frequencies of Tc resistant bacteria in microflora cultured on various days and after a 10-days oral administration of oxytetracycline.

Table 1-7. Distribution of *tet* genes in the intestinal flora of rockfish after oral administration of oxytetracycline.

Species	No. of Isolates tested	% of each determinant class	
		<i>tet B</i>	<i>tet C</i>
<i>Vibrio sp.</i>	123	100 %	0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	64	0	100 %
Unidentified (A)	11	100 %	0
(B)	12	0	0
Total	210		

(A) : Unidentified isolates contained an one *tet* genes of the six detectable with multiplex PCR.

(B) : Unidentified isolates do not contained *tet* genes detectable with multiplex PCR of this study.

나. Fluoroquinolone resistant *Edwardsiella tarda* 의 연구

(1) 내성 균주(*Edwardsiella tarda*) 의 확보 및 특성 분석

(가) 실험균주

1994년부터 2003년까지 우리 나라 양식장들의 병어로부터 분리한 *E. tarda* 균을 수집하여 각종 시험 약제에 대한 내성균을 찾는 데 사용하였고, 이 중 다수가 nalidixic acid에 내성을 보이는 것을 알 수 있었다. 이러한 내성을 보이는 균주는 총 136균주 중 52균주로 38%로 나타났으며 이들은 nalidixic acid 뿐만 아니라 다른 quinolones에도 다양한 내성치를 보였다 (Table 1-8).

- *E. tarda* 균은 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하고 세균의 16s rRNA gene의 특이적인 primer를 이용한 PCR 결과, 특이적인 생성물을 증폭하는 균으로 규정하였다. 균의 분리 및 증균을 위해서 Tc resistant *E. tarda*의 연구에서와 같이 제 1절-1-가-(1)-(가) 와 동일한 방법을 사용하였고, -70°C 에서 사용 전까지 보관하였다.

(나) 약제 감수성 시험 및 nalidixic acid 내성균주의 분리

본 실험에서 사용한 항생제는 ampicillin (Am), tetracycline (TC), nalidixic acid (Na), oxolinic acid(OA), norfloxacin(NOR), ciprofloxacin (CIP) 등이며, 모두 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 채집 균주의 항생제에 대한 내성 정도는 Kim. (1997)에 따라 MIC (minimum inhibitory concentration) 값으로 나타내었으며, broth dilution method를 사용하여 측정하였다. Nalidixic acid 내성균은 phosphate-buffered saline (PBS)에 10^5 cell/ml의 농도로 희석한 후 $60\mu\text{l/ml}$ nalidixic acid 가 첨가된 TSA plate 에 접종하여 20개 이상의 집락을 형성하는 균을 선택하였다. 그리고 이러한 내성균으로 quinolone 계열 항생제인 ofloxacin (OF)과 pefloxacin (PEF)에 대한 일부 약제 감수성 시험을 추가 실시하였다.

- Quinolone 내성 획득에 있어 plasmid와의 관계를 알아보기 위해 몇몇의 채집균을 선택하여 plasmid를 분리한 후, transformation 실험을 실시하였다. 결과 test된 모든 *E. tarda*는 plasmid를 가지고 있지 않아 transformation이 되지 않거나, transformation 후 분리된 plasmid는 *gyrA* gene을 가지고 있지 않았다. 그러므로 quinolone의 내성에는 plasmid가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

Table 1-8. Quinolone resistant isolates in Korea

Name	History	MIC ^a (after 1 day)					
		NA	OA	NOR	CIP	AMP	TC
RED7	1994, Yosu	≥ 480	2	0.31	0.08	2.5	-
RED8	1994, Yosu	≥ 480	1	0.31	0.08	5	-
RE1	1995, Kwangju	60	0.5	0.08	0.04	10	15
RE7	1995, Pohang	≥ 480	4	0.31	0.08	2.5	-
RE8	1995, Pohang	≥ 480	4	0.31	0.08	10	-
LE2	1995, Namhae	≥ 480	2	0.31	0.16	1.25	-
LE3	1995, Namhae	240	1	0.63	0.08	0.63	-
JH4	1996, Tongyoung	≥ 480	1	0.16	0.08	2.5	-
CH1	1997, Kujedo	60	0.5	0.31	0.08	5	0.94
DH1	1997, Kujedo	120	1	0.63	0.08	5	0.94
KY1	1997, Kujedo	240	1	0.63	0.08	5	0.94
RE12	1998, Pohang	≥ 480	4	0.31	0.08	-	-
RE23	1998, Pohang	60	0.5	0.08	0.04	2.5	30
JH9	1999, Tongyoung	≥ 480	2	0.16	0.08	5	-
JDE1	2000, Yosu	240	1	0.63	0.08	10	-
JDE2	2000, Yose	240	1	0.63	0.08	10	-
JDE15	2000, Tongyoung	240	1	0.63	0.08	5	30
JDE21	2000, Tongyoung	240	0.5	0.31	0.08	5	-
JDE23	2001, Namhae	240	1	0.63	0.08	10	0.94
JDE27	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	10	15
JDE28	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	5	30
JDE29	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	10	30
JDE30	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	5	60
JDE31	2002, Kuryoungpo	240	1	1.25	0.08	5	60

Table 1-8. Continued

Name	History	MIC ^a (after 1 day)					
		NA	OA	NOR	CIP	AMP	TC
JDE32	2002, Kuryoungpo	≥ 60	2	1.25	0.31	20	60
JDE33	2002, Kuryoungpo	≥ 60	2	1.25	0.31	20	30
JDE34	2002, Kuryoungpo	≥ 60	2	1.25	0.31	10	≥ 60
JDE36	2002, Kuryoungpo	≥ 60	4	-	0.63	20	30
JDE37	2002, Kuryoungpo	≥ 60	4	1.25	0.63	20	≥ 60
CJE1	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE2	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE3	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	32
CJE4	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	32
CJE5	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE6	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE7	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE8	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	8
CJE9	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	8
CJE10	2003, Jejudo	60	1	0.03	0.13	≥ 1024	512
CJE11	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE12	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE13	2003, Jejudo	≥ 480	2	0.5	0.25	8	256
CJE14	2003, Jejudo	60	1	0.06	0.06	≥ 1024	256
CJE15	2003, Jejudo	≥ 480	2	0.5	0.25	8	256
JDE38	2003, Kujedo	≥ 480	2	0.13	0.06	8	16
JDE39	2003, Kujedo	≥ 480	2	0.25	0.13	8	16
JDE40	2003, Kujedo	240	2	0.25	0.13	8	32
JDE41	2003, Kujedo	≥ 480	2	0.5	0.25	8	128

^a NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacin; AMP, ampicillin; TC, tetracycline

(2) *E. tarda*의 DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene 의 cloning과 염기 서열 분석

실험균주는 채집균주 중 quinolones에 감수성을 보이는 *E. tarda* GE1을 사용하였으며 유전자의 염기 서열 결정은 세 단계로 행하였다. 먼저 유전자의 1) QRDRs 염기 서열을 결정하고, 2) 그런 다음 이 서열의 flanking sequence를 찾아나갔으며, 3) 마지막으로 전체 유전자의 염기 서열을 알고자 하였다.

(가) QRDRs의 염기 서열 결정

1) Total DNA 분리

- 위의 제 1절-1-가-(2)-(나)와 동일한 방법으로 실시하였다.

2) Primer 제작 및 PCR

E. tarda GE1의 *gyrA* QRDR을 확인하기 위해 이전에 보고된 논문을 참조하여 degenerate된 4개의 sense primer와 2개의 antisense primer를 제작하였다 (Musso et al., 1996; Okuda et al., 1999). 이러한 primers를 사용하여 *E. tarda* GE1 genomic DNA에 적용한 결과, 기대했던 PCR 생성물은 검출되지 않았다. 그래서 검출을 위한 다른 방법을 시도하고자 하였다. 아미노산 배열의 상동성으로부터 제작되었던 이전의 degenerate primers와는 다르게 *E. coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Erwinia carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus* (GenBank accession number respectively : X57174, L47978, X80798, X16817, U08817, AE006122, L29417, U56906, AB023569)의 *gyrA* gene의 가장 보존된 부위의 염기 서열로부터 다시 primers를 제작하여 (Table 1-9, Fig. 1-8) PCR을 실시한 결과, Fig. 1-7과 같은 PCR 생성물을 검출할 수 있었다. *gyrA* QRDR에 대해서 DGYR-1와 DGYR-4의 primers를 사용한 PCR에서는 623 bp, 그리고 *parC* gene에 대해서 DGYR-1, DGYR-3의 primers를 사용한 PCR에서는 320 bp의 PCR product를 관찰할 수 있었다. *gyrA* gene에 특이적이었던 623 bp PCR 산물의 염기 서열을 분석한 결과, 다른 그람 음성 세균의 *gyrA* gene과 매우 높은 상동성을 보여주었으므로 *E. tarda*의 *gyrA* gene임을 확인할 수 있었으며, 그람 음성 세균의 *gyrA*와 *parC* gene 모두에서 검출 가능했던 320 bp PCR 산물을 cloning하여 염기 서열을 밝힌 결과, clone I에서는 다른 그람 음성 세균의 *gyrA* gene과 매우 높은 상동성을 보여준 반면, clone II에서는 *parC* gene과 매우 높은 상동성을 나타내었다.

3) Cloning 및 염기서열 분석

PCR을 실시하여 얻은 PCR 산물은 vector (pCR 2.1-TOPO, Invitrogen)로 cloning한 다음, Big dye terminator cycle DNA sequencing kit (ABI PRISM, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 automatic sequencer를 사용하여 염기 서열을 밝혔다.

Table 1-9. Oligonucleotide primers used in the determination of QRDR regions

Primer	Direction	Positions ^a	Base Sequence
DGYR-1	Sense	<i>gyrA</i> , 220-236, <i>parC</i> , 211-227	5-AT(GCGGTAA(A/G)TA(CT)CACCG-3
DGYR-2	Sense	<i>gyrA</i> , 316-332	5-CA(A/GCC(CT)AACTTCGG(CT)TC-3
DGYR-3	Antisense	<i>gyrA</i> , 536-517, <i>parC</i> , 511-530	5-CCCAT(A/GCC(GT)CAG(GT)CC(A/G)ATACC-3
DGYR-4	Antisense	<i>gyrA</i> , 842-823	5-ACCA(A/T)CTC(A/GCC(A/G)AT(CT)TT(CT)TC-3
DGYR-5	Antisense	<i>gyrA</i> , 1088-1069	5-GT(A/GGAC(GT)CACTTC(A/GCC(A/G)CCGTG-3

^a The position of DGYR-1 ~ DGYR-5 degenerate primers correspond to nucleotide sequence of *E. coli gyrA* and *parC*.

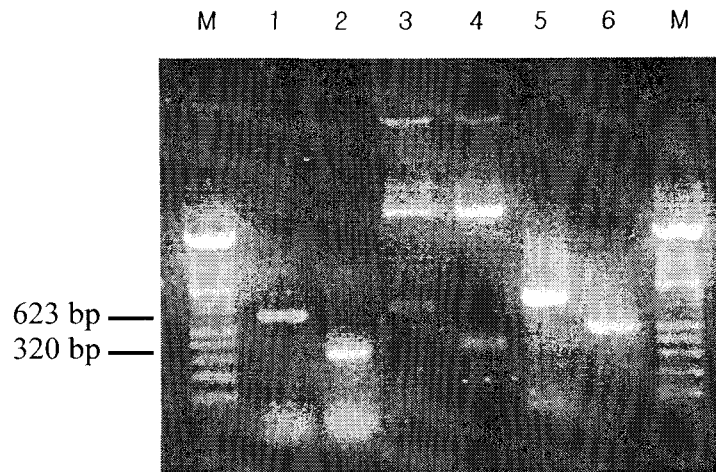


Fig. 1-7. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of *gyrA* and *parC* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, *gyrA* (623 bp); lane 2, *parC* (320 bp); lane 3, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (insert 623 bp); lane 4, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (insert 320 bp); lane 5, *gyrA* with M13 primer; lane 6, *parC* with M13 primer. Lane M, DNA marker (100 bp ladder).

← DGYR-3

A. salmonicida	488: TGCC-CA-ACCTGCTGGTCAACGGTT--CATCC- GGTATCGCGGT-AGGTATGGC -ATGG	540
E. carotovora	489: TCCC--A-ACCTGCTGGTTAACGGTT-C- TT-CCCGTATCGCAGTCGGG-ATGGCA -CG	540
E. coli	488: TTCC-TA-ACCTGCTGGTGAACGGTT-C- TT-CCSGTATCGCGGT-AGGTATGGCAA -CC	540
K. pneumoniae	488: TCCC-GA-ACCTGTTAGTCAACGGTT-CGTT-- CGTATCGCGGT-AGGTATGGCGA -CC	540
N. gonorrhoeae	512: TCCC-CACA-CTGCTCGTCAACGGCT--CGTCC- GGTATCGCGGT-CGGTATGGCGA -CC	564
P. aeruginosa	504: TTCC-CA-ACCTGCTGGTCAACGGTT-CCA-GC- GGTATCGCGGT-GGGCATGGCGA -CC	556
P. multocida	521: T-CCCTGC-GCTTTAGTCAACGG-TTC-- TCCCGTATTGCAGT-CGGTATGGC -AACT	573
S. marcescens	488: TCCC-GA-ACCTGCTGGTCAACGGCT-C-GT- CGGGCATCGCGGT-GGGCATGGTA -CC	540
V. parahaemolyticus	489: T-CCAAAC--CTATTGGTCAACGG-TGC-- TTCTGATCGCGGT-AGGTATGGC -AACC	540

* * * * * * * * * * * * *

← DGYR-4

A. salmonicida	793: CTGCCTTATC-AGGTGAACAAGCGC-GG-TTGATCGA AGATCGCC -GA---G-CT	842
E. carotovora	790: ATCCCATATC-AGGTGAACAAGCGC--GCCTGATCGA AAATTC -CCGA-----GCT	839
E. coli	790: ATCCGTATC-AGGTAAACAAGCGC--GCCTGATCGA AGATTC -CGGA-----ACT	839
K. pneumoniae	790: ATCCGTATC-AGGTGAACAAGCGC--GCCTGATG AGAAATTC -CTGA-----GCT	839
N. gonorrhoeae	817: ATCCCTATC-AGGTCAACAAGC-CAAG-TTGGTCGA AAATTCGGC -----GTTGTTTC-	871
P. aeruginosa	809: CTGCCGTACC-AGTTGAACAAGCGC-GG-TTGATCGA AGATCGCC -GA---G-CT	858
P. multocida	820: ATTCCTTATCAAG-TCAACAAGC-CAAAAT-TAATCGA AAATTC -C-----T-GATCT	869
S. marcescens	790: ATCCCGTATC-AGGTGAACAAGCGC--GTCTGATCGA AGATTC -CCGA-----GCT	839
V. parahaemolyticus	787: ATTCCTTACCAAG-TGAACAAGCTC--GTCTGATCGA AGATTC -C-----T-GAACT	836

* * * * * * * * * * * * * * *

A. salmonicida	843: GGT CAAGAGAAGAA-G-GTCGAGGGCA---TCAGTGC---CCTGCG-CGA-TGAGTCG	891
E. carotovora	840: GTT TAAAGATAA--ACGTATCGAAGGCA---TTAGCCG---ACTGCG-TGA-CGAATCC	888
E. coli	840: GTT AAAAGAAAA--ACGCGTGAAGGCA---TCAGCGC---GCTGCG-TGA-CGAGTCT	888
K. pneumoniae	840: GTT CAAGAAAA--ACGCGTCGAAGGCA---TCAGCGC---GCTGCG-TGA-CGAGTCT	888
N. gonorrhoeae	872: GG-GAAA-A-AA-CA--CTGGAAGGCAT--TTCCGAGC--TCC-GCGACGA---A-TCC	915
P. aeruginosa	859: GTT GAAAGAGAAGAA-G-ATCGAGGGTAT--TTCCGAG---CTGCG-CGA-CGAGTCT	907
P. multocida	870: GTT AAAAGAGAAAAAG--TCGAAGGCAT--T-AGCCCAAT-C-ACG--GATTTA-TCT	918
S. marcescens	840: GTT GAAAGAAAA--ACGCGTGAAGGCA---TCAGCGC---ACTGCG-CGA-CGAGTCC	888
V. parahaemolyticus	837: TGT TAAAGATAAAGAAAG--TTGAAGGCATCAGT--GCGC--T---ACG-TGACGAA-TCT	885

* * * * * * * * * * * * * * *

← DGYR-5

A. salmonicida	1071: -G--- CACCGCGCTGAGGTCGTGACCCGCGGGA -C-CGTGT-TCG-A--GCTG--CGCAA	1118
E. carotovora	1067: -G-- CCACCGCCGCAAGTGGTCA CGCGTCGTA-C-CATTT-TTGAA--CTG--CGTAA	1115
E. coli	1067: -G-- TACCGCCCTGAGTGGTCA CCCGTCGTA-C-TATTT-TCGAA--CTG--CGTAA	1115
K. pneumoniae	1067: -G-- CCACCGCCGCAAGTGGTCA CCCGCCGTA-C-GATTT-TAGCA--CTG--CGTAA	1115
N. gonorrhoeae	1094: -G-- CCACCGCCGCAAGTGGTCA CCCGACGTA-CGCTTTT-CCG---GCTG-AAG-AA	1142
P. aeruginosa	1088: ----- CACCGCCGCAAGTGGTCA CCCGCGTA-C-CGTCT-ACG-A--GCTG--CGCAA	1134
P. multocida	1095: -GTT ACCGCTGCTGAGTGTCA CACAGCCGTACCCT-T-TAT-GAATTGC-GCA---AA	1146
S. marcescens	1067: -G-- CCACCGCCGCAAGTGGTCA CCCGCCGTA-C-CATCT-TCGAA--CTG--CGCAA	1115
V. parahaemolyticus	1062: GGAT- CACCGTCTGAAGTGGTCA CCCGCGTA-C-TATCT-TCGAATTGC-GTA---AA	1113

* * * * * * * * * * * * * * *

Fig. 1-8. Alignment of conserved *gyrA* gene sequences in gram-negative bacteria. An asterisk indicates identical residues. Arrows above the nucleotide sequences correspond to the orientation and positions of DGYR-1 ~ DGYR-5 degenerated primers (Table 1-10) used to amplify the QRDR regions of *E. tarda gyrA*.

A. salmonicida 171:-CGACTGGAA--CAAGCC--CTATAAAAAATCGGCCCGTGTGGTTC---GGTGACGTAATT 222
E. carotovora 171:-CGACTGGAA-CAAA-CCGTATA-AA-AAATCGGCCCG--T-GTCGTCGGGGATGTCATC 222
E. coli 171:-TGACTGGAA-CAAAGCC-TATA-AA-AAATCTGCCCG--T-GTCGTTGGTGACGTAATC 222
K. pneumoniae 171:-TGACTGGAA-CAAAGCC-TATA-AA-AAATCTGCCCG--T-GTCGTTGGTGACGTAATC 222
N. gonorrhoeae 195:-TAACTGGAATGC-CG-C--CTACAAAAATCGGCCGCGCATCGTC---GGCGACGTCATC 246
P. aeruginosa 187:-CGACTGGAA--CAAGCC--CTACAAGAAATCCGCCCGTGTGGTTC---GGCGACGTCATC 238
P. multocida 206:CCTA-T--AA--CAAACC--TTATCGTAAATCCGCTCG--T-ATCGTAGGGATGTAATC 255
S. marcescens 171:-CGACTGGAA-TAAA-CC--ATACAAGAAATCGGCCCG--T-GTCGTCGGGGACGTCATC 222
V. parahaemolyticus 173:-AT--TGGAA--CAAACC--ATATAAAAAATCAGCCCG--T-GTTGTCGGCGACGTAATC 222
* * * * *

DGYR-1 →

A. salmonicida 223:GGTAAATACCA-CCCGCACGGCGA--CA-GTCCGTTGATGACACCA-TTGTCCGCTTGG 277
E. carotovora 223:GGTAAATACCA-CCCGCACGGCGAC---TCTGCCGTTTATGAAACCA-TCGTACGTATGG 277
E. coli 223:GGTAAATACCATCCC-CATGGTGACT--CGGCCGTCTATGACACGA-TCGTCCGCATGG 277
K. pneumoniae 223:GGTAAATACCA-CCCTCATGGTGA-T-A-CTGCCGTTGATGACACCA-TTGTACGTATGG 277
N. gonorrhoeae 247:GGTAAATACCA-CCCCACGGCGATTC--CGCAGTTTACGACACCA-TCGTCCGCTATGG 301
P. aeruginosa 239:GGTAAATACCA-CCCGCACGGCGA--CA-CCGCCGTCTACGACACCA-TCGTCCGCATGG 293
P. multocida 256:GGTAAGTATCA-CCCTCATGGTGA-T-A-GCCGGTCTATGACAC-ACTCGTGCCCATGG 310
S. marcescens 223:GGTAAATATCA-CCCGCACGGTGAC--AGC-GCCGTTTACGACACTA-TCGTCCGCTATGG 277
V. parahaemolyticus 223:GGTAAATATCA-CCCGCACGGTGA-T-A-GTGTGTGTACGACAC-AATCGTACGTATGG 277
* * * * *

DGYR-2 →

A. salmonicida 278:CGCAG--GATTCTC-C-ATGCGTTACATGCT-GGTCGATGGTCAGGGCAACTTCGGTT- 331
E. carotovora 278:CGCAGCC--TTTCTCAC--TGCGTTACATGCT-GGTTGATGGTCAGGGCAACTTCGG-TT 331
E. coli 278:CGCAGCC--ATTCTCGC--TGCGTTATATGCT-GGTAGACGGTCAGGGTAACTTCGG-TT 331
K. pneumoniae 278:CGCAGCC--ATTCTCCC--TGCGTTACATGCT-GGTAGATGGCCAGGGTAACTTCGG-TT 331
N. gonorrhoeae 302:CGCA---AAATT-TCGCTATGCGTTATGTCCT-GATAGACGGCAGGGCAACTTCGGAT- 355
P. aeruginosa 294:CGCAGCCG--TTCTCGC--TGCGTTACATGCT-GGTAGACGGCCAGGGCAACTTCGGTT- 347
P. multocida 311:CTCAGCC--GTTTTCA-T-TACGTTATATGTAG-TAGATGGCCAGGGTAACTTCGGTT- 364
S. marcescens 278:CTCAGCC-GTTT-TCAC--TGCGTTACATGCT-GGTGGACGGTCAGGGTAACTTCGGTCT 332
V. parahaemolyticus 278:CTCAGCC--GTTCTCACT-T-CGTTACATGCTGG-TCGATGGTCAAGGTAACFTTCGGCT- 331
* * * * *

Fig. 1-8. Continued.

(나) QRDR의 upstream과 downstream 염기 서열 구명

QRDR의 upstream과 downstream sequence를 구명하기 위해 cassette ligation-mediated PCR 기법을 이용하였다. 이 PCR법은 염기 서열을 알고 있는 기지의 DNA 영역으로부터 미지 영역의 염기 서열을 증폭해나가는 방법이다.

1) Template DNA 준비

E. tarda DNA (2.5 μ g)를 분리하여 30 unit의 제한효소를 처리하였다. 제한효소로 처리된 DNA는 ethanol로 침전시킨 후 ligation 반응물 (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)을 첨가하였다. ligation을 위한 시약으로는 ligation solution I, 15 μ l, ligation solution II, 7.5 μ l, 그리고 DNA 절단에 사용된 제한효소에 상응하는 cassette가 첨가되었다. 그 후 16 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 ligation된 nucleic acid를 다시 저온의 ethanol 200 μ l에 침전시켰다. 다음으로 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 heating하여 ligase를 inactivation한 다음, cassette ligation-mediated PCR의 template로 사용되었다. 이 실험에서 사용된 제한효소는 *EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *XbaI*, *Sau3A I* 이며, 각각의 제한효소가 처리된 DNA 혼합물을 준비하였다.

2) Cassette ligation-mediated PCR

위의 제 1절-1-나-(2)-(가)-2 실험에서 결정된 623 bp의 염기 서열로부터 upstream의 염기 서열을 분석하기 위하여 GYRS1R과 GYRS2R primer를 제작하였고, 이 primers와 함께 C1과 C2 primer가 PCR에 이용되었다. Cassette primer인 C1 과 C2 (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 는 각 cassette에 포함되는 염기 서열을 가지고 있으며 염기 서열은 다음과 같다.

C1 : (5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3')

C2 : (5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3')

Cassette ligation-mediated PCR은 nested 방식으로 시행하였다. First PCR은 400uM (each) deoxynucleoside triphosphates, template DNA (*EcoRI* cassette-ligated *E. tarda* DNA mixture) 500ng, C1 primer (10pmol/ μ l) 1 μ l, GYRS1R primer (10pmol/ μ l) 1 μ l, Takara LA PCR buffer II (Mg²⁺) 5 μ l와 Takara LA *Taq* polymerase 2.5U이 포함된 50 μ l reaction mix로 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler 에서 실시하였다. PCR 혼합물은 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 predenaturation시킨 후, 94 $^{\circ}$ C-30초, 55 $^{\circ}$ C-30초, 72 $^{\circ}$ C-30초간 반응을 1 cycle로 하여 30 cycle 반응시켰으며, 그 후 72 $^{\circ}$ C에서 4분간 extension time을 주었다. Second PCR은 400uM dNTP, first PCR product 1 μ l, C2 와 GYRS2R primer 각각 1 μ l, Takara LA PCR buffer II (Mg²⁺) 5 μ l와 Takara LA *Taq* polymerase 2.5U이 포함된 50 μ l reaction mix에서 실시되었으며, 특정 크기의 PCR product가 생성되어 염기 서열이 분석되었으며, QRDR의 upstream 염기 서열이 결정되었다.

다음 QRDR의 downstream의 염기 서열을 분석하기 위하여 *PstI*과 *Sall* 처리 후 cassette가 ligation된 DNA template를 준비하였다. 그리고 새로 제작된 primers (GYRS1, GYRS2, GYRS3, GYRS4)를 이용하여 전 단계의 과정과 같이 PCR 후 염기 서열을 분석하였다.

이 방법으로 *EcoRI*, *PstI* and *Sall*에 해당하는 3개의 fragment가 생성되었고 cloning하여 *E. tarda* genome의 미지의 영역을 밝힐 수 있었으며, 전체 *gyrA* gene의 염기 서열을 결정하였다. 이 실험에 사용된 primer는 Table 1-10에 나타내고 있다.

Table 1-10. Primers used in cloning of *gyrA*

Name	Sequence (5' → 3')	Direction	Position	Object
DGYR-1	ATG(C)GGTAATTAC(T)CACCC	sense	220bp-236bp	Screening of <i>gyrA</i>
DGYR-4	ACCAGA(T,C)TCA(G)GCA(G)ATC(T)TTC(T)TC	anti-sense	842bp-825bp	Screening of <i>gyrA</i>
GYRS1	TGGCATGGCGAAGATTGCTCATGAG	sense	374bp-399bp	1 st 3' end walking ^a
GYRS2	CGGCACTGAACAGATCCCCGACG	sense	450bp-472bp	1 st 3' end walking ^a
GYRS1R	GCAGGACGTCCGGGATCTGTTCA	anti-sense	478bp-456bp	1 st 5' end walking ^a
GYRS2R	CTCATGAGCAATCTTCGCCATGCGCA	anti-sense	399bp-374bp	1 st 5' end walking ^a
GYRS3	ACATCGATCCGATCATTGAGCTGATC	sense	1166bp-1191bp	2 nd 3' end walking ^a
GYRS4	TCCGGAGTGGCTGGAGCCGAGTA	sense	1299bp-1322bp	2 nd 3' end walking ^a
SGYR-1	ATCAACTTGCCGGAGGCCA	sense	1813bp-1831bp	Sequencing
SGYR-2	AGAACGGCTACGGCAAACGC	sense	2246bp-2265bp	Sequencing
SGYR-3	TCGCACCACGCTCAAGGT	sense	2860bp-2877bp	Sequencing
SGYR-4	TGTACATTGCCTCGCCG	sense	3468bp-3484bp	Sequencing
SGYR-5	CTGGCTGTTTGAGCGCA	sense	3850bp-3866bp	Sequencing
GYRQ	GATGTTCCGGGATGGCCT	sense	106bp-122bp	Detection of <i>gyrA</i> QRDR
GYRQR	GCCAACAGCTCATGAGCAAT	anti-sense	407bp-388bp	Detection of <i>gyrA</i> QRDR
WGYRS	CGTGAGGCGACGGCTTCAAACCTG	sense	(-)298bp-(-)274bp	Cloning of Whole <i>gyrA</i>
WGYRR	AGACGAAGTATTTCAACGTGGCGC	anti-sense	2855bp-2832bp	Cloning of Whole <i>gyrA</i>

^a Cassette ligation-mediated PCR.

(다) *E. tarda gyrA* gene 전체 유전자의 염기 서열 분석

1) QRDR의 upstream과 downstream 염기 서열 결정

EcoR I 을 사용하여 밝힌 QRDR의 upstream sequence에서는 721 bp의 염기서열을 밝혔고, *Pst* I 을 사용한 downstream sequence에서는 943 bp의 염기 서열을 결정하였다. *Pst* I fragment의 염기 서열을 가지고 primers (GYRS3, GYRS4)를 제작하여 PCR한 결과 *Sal* I digest에서 2885 bp의 PCR product를 더 얻을 수 있었으며, 여기서 밝힌 결과들은 *gyrA* gene의 전체 염기 서열을 포함하고 있었다 (Fig. 1-9). 또한 본 연구의 결과물이 *gyrA* gene에서 증폭되었는지를 확인하기 위해 QRDR 부위와 전체 gene을 nucleotide와 deduced amino acid 서열로 지금까지 보고된 다른 세균 종의 *gyrA*, *parC* 와 비교한 결과, *gyrA* gene은 그람 음성균의 *gyrA* gene과 매우 높은 상동성을 나타내었다 (Table 1-11, Fig. 1-10). 320 bp의 *parC* gene 역시 다른 균과의 상동성을 비교한 결과, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Serratia marcescens*에 각각 81, 84, 83, 82, 72, 43, 87%의 높은 상동성을 보였다.

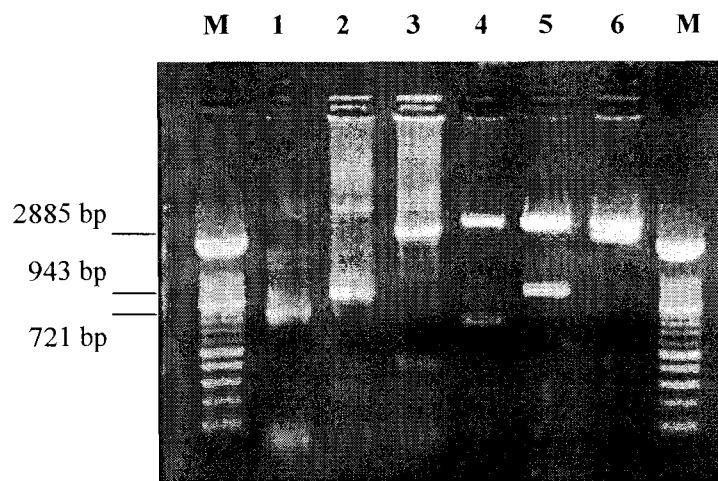


Fig. 1-9. Electrophoretic analysis of LA PCR products obtained by the amplification of upstream and downstream of *gyrA* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, EcoRI digest (second PCR, 721 bp); lane 2, PstI digest (second PCR, 943 bp); lane 3, Sal I digest (second PCR, 2885 bp); lane 4~6, pCR 2.1-TOPO vector digested with EcoRI (lane 1, 2, 3, respectively). Lane M, DNA marker (100 bp ladder).

Table 1-11. Identity of the nucleotide and deduced amino acid sequence of the *gyrA* in *E. tarda* compared with those in other bacterial strains

	Organisms	Accession number ^a	Nucleotide sequence		Deduced amino acid sequence	
			Whole <i>gyrA</i>	QRDR	Whole <i>gyrA</i>	QRDR
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	X57174	78(49) ^b	84	85(30)	100
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	L47978	71	83	71	93
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	X80798	78	83	85	97
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X16817	80	84	86	97
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	U08817	59(49)	77	51(29)	85
	<i>Pasteurella multocida</i>	AE006122	64	88	72	95
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L29417	68(52)	78	63(32)	97
	<i>Serratia marcescens</i>	U56906	83(53)	91	86(31)	100
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AB023569	70(50)	85	77(31)	100
Gram (+)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AY157689	52(49)	65	46(34)	68
	<i>Campylobacter jejuni</i>	LO4566	48	63	45	70
	<i>Mycoplasma hominis</i>	U59880	45	65	39	75

^aThe nucleotide sequence has been assigned accession number in the GenBank EMBL database.

^bThe numbers in parentheses indicate the identity to *parC* gene.

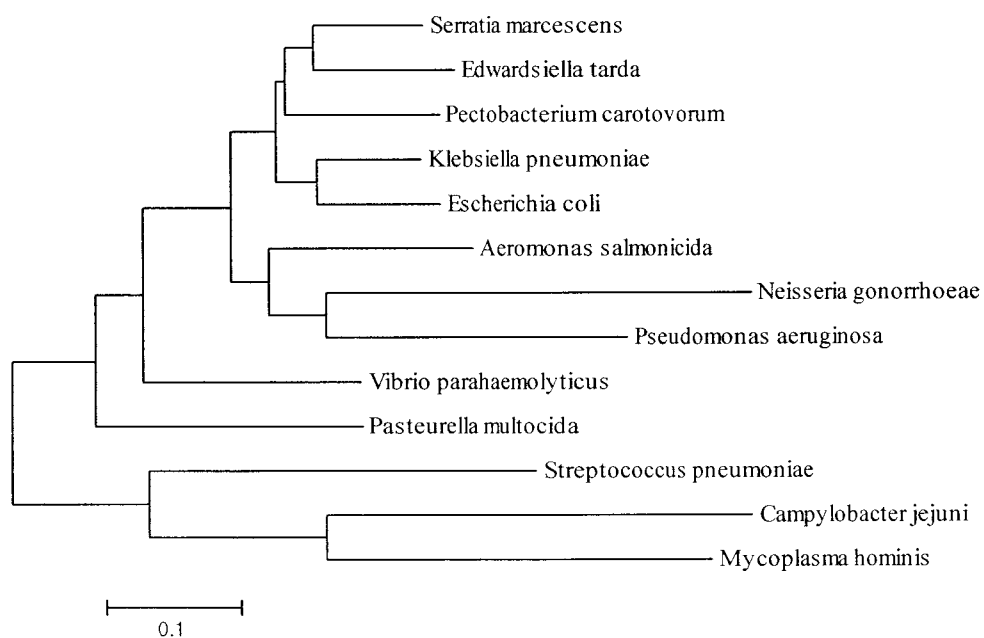


Fig. 1-10. Phylogenetic tree showing the relationship between the *E. tarda gyrA* gene with other known *gyrA* sequences. The accession numbers of the *gyrA* sequence are as follows: *Serratia marcescens*, U56906; *Pectobacterium carotovorum*, X80798; *Klebsiella pneumoniae*, X16817; *Escherichia coli*, X57174; *Aeromonas salmonicida*, L47978; *Neisseria gonorrhoeae*, U08817; *Pseudomonas aeruginosa*, L29417; *Vibrio parahaemolyticus*, AB023569; *Pasteurella multocida*, AE006122; *Streptococcus pneumoniae*, AY157689; *Campylobacter jejuni*, L04566; *Mycoplasma hominis*, U59880.

2) *E. tarda* *gyrA* gene의 염기 서열에 대한 해석

Complete gene을 분석한 결과 *gyrA* gene은 878개의 아미노산을 암호화하는 ORF (open reading frame)를 가지고 있었다 (Fig. 1-11, 1-12). ATG start codon으로부터 16 bp 앞쪽으로 *E. coli*의 Shine-Dalgarno consensus sequence (GAGGG)와 유사한 ribosome-binding site가 나타났으며 이 site는 ribosome 30S subunit의 16S rRNA와 결합하여 단백질 생합성 개시에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ribosome-binding site의 8 bp 앞에는 *E. coli*의 -10 promoter (TATAAT)와는 다소 차이가 있지만 *A. salmonicida*의 -10 promoter와는 같은 TAATTA의 염기가 나타났다. 더 앞쪽으로 정확하지는 않지만 *H. pylori*의 -35 promoter (TTGATT) (Moore et al., 1995)와 유사한 TGTATT 염기를 관찰할 수 있었다. 하지만 *E. coli*, (Swanberg and Wang, 1987), *K. pneumoniae* (Dimri and Das, 1990)와 *Bacillus subtilis* (Moriya et al., 1985)의 -35 promoter (GTTACC)나 ATTTTCC (*Serratia marcescens*), GTTTGCC (*P. aeruginosa*), GTTTCCC (*E. carotovora*), GTTTAAG (*A. salmonicida*)와 같은 염기는 관찰할 수 없었다 (Kim et al., 1998; Kureishi et al., 1994; Rosanas et al., 1995; Oppegaard et al., 1996).

E. tarda *gyrA* gene의 앞 쪽으로 전사 과정 중 십자형의 구조를 형성하는 inverted repeated sequence 또한 2쌍이 발견되었다. 이들은 ATG start codon의 앞 쪽으로 -203/-85 위치에 해당하는 AAAGAC/GTCTTT 와 -199/-16 위치의 ACCCTC/GAGGGT의 염기로 각각 118과 183의 염기의 unpaired loop를 가지는 십자형의 구조를 형성하게 된다. 이들 inverted repeated sequences의 존재는 *E. coli* (Horowitz and Loeb, 1988)에서 추측할 수 있듯이 *gyrA* 전사의 supercoiling-dependent regulation이 *E. tarda*에서도 일어남을 나타내며 이는 *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*의 *gyrA* promoter에서도 증명되었다 (Oppegaard et al., 1996; Kureishi et al., 1994; Dimri and Das, 1990). 또 한 쌍의 inverted repeated sequence인 AAGGGC/GCCCTT 가 TAA stop codon의 뒤 46/63 위치에 나타났으며 이는 17개의 unpaired loop를 형성함으로써 전사의 종료 신호로써 작용한다고 알려져 있다 (Oppegaard et al., 1996).

이 실험 결과 *gyrA* gene에 해당하는 ORF 이외에 또 다른 ORF가 발견되었는데 이는 *gyrA* gene의 3' end 방향으로 *E. coli*의 RCSC gene과 49% 일치함을 알 수 있었다.

E. tarda GyrA의 아미노산 서열을 비교한 결과 *E. coli* 보다 3개의 아미노산 잔기를 더 가지고 있었으나, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* 등에서 발견되는 intragenic stretches (유전자내의 연속)는 없었으며, *E. coli* 등의 다른 세균 (Horowitz and Wang, 1987)에서와 같이 DNA 손상이나 재결합에 관계하는 catalytic Tyr-122 또한 발견할 수 있었다.

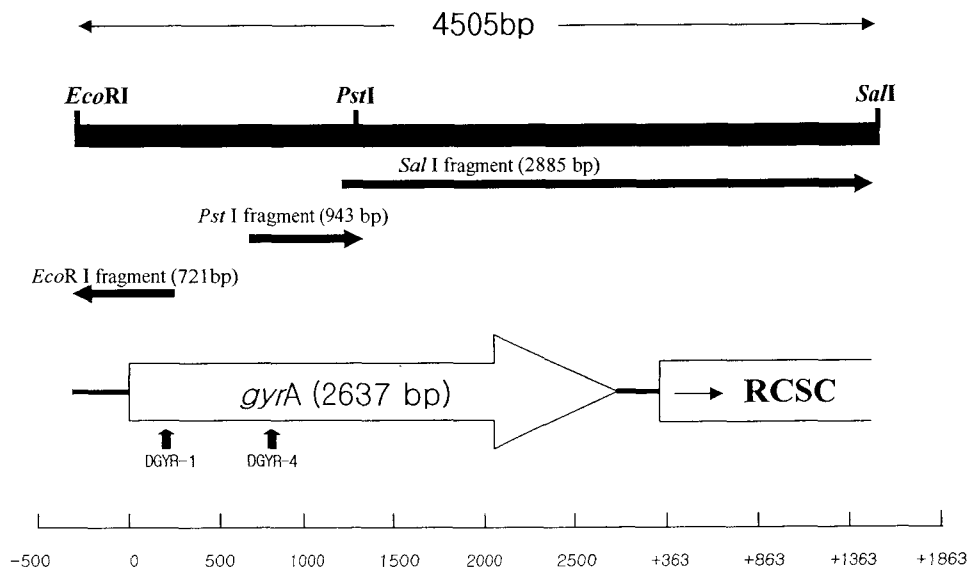


Fig. 1-11. Restriction map and organization of the *E. tarda gyrA* locus. Vertical arrows indicate positions of the degenerated primers (DGAR-1 and DGAR-4) used for the cloning of *gyrA* gene. Thick horizontal arrows indicate the produced DNA fragment with the used restriction enzyme and the walking direction.

GYRS4 →

GCGGCGATGCTGGCACGCGCCGGCGACGACGCCGGCGG TCCGAGTCCCTGCAGCCGAGT TGGCATTCCGCACGGCCATTATCACCTG 1350
 A A M L A R A G D D A A R P E W L E P Q Y G I R D G H Y H L

psII

ACGGAGCAGCAGGCGCAGGCGATCCTGGATCGCGT CTGCAG AAGCTGACCGGCCTGGAGCACGAGAAGCTGCTGGATGAGTACAAGGCG 1440
 T E Q Q A Q A I L D L R L Q K L T G L E H E K L L D E Y K A

CTGTTAGAGCAGATCGCCGCGCTGATCTTCATCCTGCAGAGCCCGAGCGCCTGATGGAGGTGATCCGCGAAGAGCTGATCGCCATCCGC 1530
 L L E Q I A A L I F I L Q S P E R L M E V I R E E L I A I R

GAGCAGTTTGGCGATCGCGCCGACCCAGATCACCGCAACACGGCGGATATCAATATCGAAGATCTGATCGAGCAGGAAGACGTCGTG 1620
 E Q F G D A R R T E I T A N T A D I N I E D L I E Q E D V V

GTGACCCCTGTCGCATCAGGCTACGTGAAGTACCAACCGCTGAGCGACTATGAGGCTCAGCGTCGCGGGCGTAAGGGTAAGTCCGCGCG 1710
 V T L S H Q G Y V K Y Q P L S D Y E A Q R R G G K G K S A A

CGAATTAAGAAGAGGACCTTATCGATCGGCTGCTGGTGGCCAAATACCCACGACACGATCCTGTGTTCTTCAGCCGGGGCGCATGTAC 1800
 R I K E E D L I D R L L V A N T H D T I L C F F S R G R M Y

TGGATGAAGATGATCAACTTGCCTGGAGCCAGCCGCGGTGCCCGGGTCTCCGATCATCAACCTGCTGCCGCTGGAGCCGACGAGCGC 1890
 W M K M Y Q L A G A S R G A R G R P I I N L L P L E A D E R

ATCACCGCTATCCTGCCGGTGCCTGAGTATGCCAAGGGGTCAACGTGTTTATGGCGACCGCCAGCGGTACGGTGAAGAAGACGGCGCTG 1980
 I T A I L P V R E Y A E G V N V F M A T A S G T V K K T A L

ACCGAGTTCAGCCGTCGCGCGCCGCGGGATTATCGCCGTGAACCCCACTACGGCGATGAGCTGATCGGGGTGATCTGACCGATGGC 2070
 T E F S R P R A A G I I A V N P N Y G D E L I G V D L T D G

AACGACGAGGTGATGCTGTTCTCCGTCGCGGTAAAGTGGTCCGCTCAAGGAGGACGCGGTGCGTCCATGGGGGTACCGCGACCGGG 2160
 N D E V M L F S V A G K V V R F K E D A V R A M G R T A T G

GTGCGAGGCATCAAGCTGGCCGGAGAGGATCGCGTGGTATCGCTGATCGTACCGCACGGCGAAGGCGCTATCCTGACCGTGACCCAGAAC 2250
 V R G I K L A G E D R V V S L I V P H G E G A I L T V T Q N

GGCTACGGCAACGACGCGCGGTGGCCGAGTATCCGACCAAGTACGCGCGACCCAGGGGGTTATCTCCATCAAGGTGACCGAGCGTAAC 2340
 G Y G K R S G V A E Y P T K S R A T Q G V I S I K V T E R N

GGCAGCGTCTGCGCGCGGTGACGGTCCGAGACTCGGACAGATCATGATGATCACCGATGCCCGTACCCTGGTGGCACCCGAGTATCC 2430
 G S V V G A V Q V E D C D Q I M M I T D A G T L V R T R V S

GAGGTCAGCATCGTCCGGTGAATACGACGGGGTTATCCTGATCCGTACCGCCGAAGACGAGCACGTGGTGGGGTGCAGCGGGTCTGTC 2520
 E V S I V G C N T Q G V I L I R T A E D E H V V G L Q R V V

GAGCCGGTTGACGACGAAGATCTGGACAGCATCGACGGCAGCGCCGCGGAGGGTGACGATGAGATCGTCCGGAAGTGGAGAGCGATGAC 2610
 E P V D D E D L D S I D G S A A E G D D E I V P E V E S D D

GATGCCCGGAGGACGACCGGAA TAA GAGCGATGACGATGCCCGGAGGACGACCGGAATAAGCGTTGACGCAGCGTCACAAGGGCC +53
 D A A E D D A E >>>>>

GGTTACTCCGGCCCTTTTATGCCGCTGACGTGCCCGCTATCGGTTGACGCGCTGATGCCGCCCGGGCTGAATCGCGCTGACGCGC +143
 <<<<<

Fig. 1-12. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *E. tarda gyrA* gene. Potential hairpin loops upstream and downstream of the open reading frame are indicated by the symbols > and < in inverted repeats. Nucleotide position for the restriction enzymes (underlined) and primer (shadowed) used for the preparation of cassette-ligated *E. tarda* DNA and the cloning with cassette ligation-mediated PCR method, and stop codon (boxed) respectively also shown.

```

>>>>>
TTTCCTGCAGATCAACGTTTTGTGACACCTCTGACTCCTTTAATCCAGCGCGCGCGCGCAAAAAAAGACCTCTGAGGCGATTATA -270
>>>>>

CCCGTTGTTCCGCGATGGCAAAGGGCAGTCCGGCTAAGGCTACGATGGCGCTGTGCATTTGCACAACCCCGGCTTTGTGGTATCAT -180

<<<<<<
TATCGTCTTTGTCATCGTGTATGCGCCTGGTTCTACTCGATGTATTGAGGGTAGCGGCAGATGAATAATTAGTAGAGGGATAGCAGCTCC -90
<<<<<<

ATGAGCGACCTTGCCAGAGAGATTACGCCGGTCAATATCGAAGAAGAGTTGAAAACTCATATCTGGATTACGCCATGTCCGTTATCGTC 90
M S D L A R E I T P V N I E E E L K N S Y L D Y A M S V I V

GGTCGTGCGCTGCCGGATGTTCCGGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTCCTGTTTGGCATGAACGTACTGGGCAATGACTGGAAC 180
G R A L P D V R D G L K P V H R R V L F A M N V L G N D W N

AAACCATACAAAAATCGGCCCGTGGTTCGGTACGTTATCGGTAAATACCCACACGGTGACAGCGCGGTTTATGACTATCGTG 270
K P Y K K S A R V V G D V I G K Y H P H G D S A V Y D T I V
          DGYS-1 →

CGTATGGCGACCGTTCCTCCGCTATATGCTGGTCGACGGCCACGGTAACTTTGGCTCCATCGACGGCGACTCCGCGCGCGCATG 360
R M A Q P F S L R Y M L V D G Q G N F G S I D G D S A A A M

CGTTACCCGAAGTGGCATGGCAAGATTGGTCATGAG 450
R Y T E V R M A K I A H E L L A D L D K E T V D Y V P N Y D
          ← GYS2R   GYS1 →

GGCACTGAACAGATCCCGGACCTGGCGACCAAGGTGCCAACCTGCTGGTCAACGGCTCTGCCGGTATCGCGTGGGGATGGCGACC 540
G T E Q I P D V L P T K V P N L L V N G S A G I A V G M A T
GYS2 →          ← GYS1R

AACATTCCTCCCATACCTGACCGAGGTGATCAACGGCTGCCTGGCTATATCGATGATGAGAACATCACCATCGAAGGGCTGATGGAG 630
N I P P H N L T E V I N G C L A Y I D D E N I T I E G L M E

CATATCCCGGGCCGACTTCCCGACGGCGCGCATCAACGGCCCGCGGCATTGAAGAGGCTTACCGTACTGGGCGCGCAAGATC 720
H I P G P D F P T A A I I N G R R R G I E E A Y R T G R G K I

TAGTGCGCGCGCGCGCGAGATCGAGGTTGACGATAAAAAATGGCCGCAAAACCATCGTGGTGCATGAGATCCCCTATCAGGTCAACAAG 810
Y V R A R A E I E V D D K N G R E T I V V H E I P Y Q V N K

GCGCGTCTGATCCAGAAATCCCGAGCTGGTGAAGAGAAGCGCGTCAAGGGCATCAGCGCCCTGCGCGATGAGTCCGATAAGGACGGG 900
A R L I E K I A E L V K E K R V E G I S A L R D E S D K D G
          ← DGYS-4

ATGCGCATCGTTATCGAAGTCAAGCGCGACCGGTGGCCGAGGTGTGCTGAATAACCTCTACACCCAGACGAGATGCAGGTCTCCTTC 990
M R I V I E V K R D A V G R G V L N N L Y T Q T Q M Q V S F

GGTATCAACATGGTGGCGTTCACCAGGGACAGCCGAAGCTGCTTGACCTGAAAGAGTGCCTGGAAGCCTTGTGCGCCACCGCGTGAG 1080
G I N M V A L H Q G Q P K L L D L K E C L E A F V R H R R E

GTAGTGACCCGCGCACCATCTTTGAACTGCCAAAGCGCGGAGCGTGCCACATATTGGAAGCCTGGCCATTGCGTGGTCAACATG 1170
V V T R R T I F E L R K A R E R A H I L E G L A I A L V N I
          GYS3 →
GATCCGATCATGAGCTGATCGCCGTGCGCCGACGCCCGCGAGGCCAAGGCTGCGCTGGTTCCCAAGCCTGGGCGCTGGGCAACGTG 1260
D P I I E L I R R A P T P A E A K A A L V S Q A W A L G N V

```

Fig. 1-12. - Continued.

(라) Temperature sensitive *E. coli* mutant (*E. coli* KNK453)을 이용한 *E. tarda gyrA* gene 발현 분석

Table 1-10의 WGYRS/WGYRR primer set를 이용한 PCR로 *gyrA* gene의 전체 염기 서열을 증폭하고 vector에 cloning하였다. 이 plasmid를 temperature-sensitive *gyrA* mutant, *E. coli* KNK453 (Kreuzer and Cozzarelli, 1979)에 transformation시켰다.

1) Transformation

- Calcium chloride 법을 이용하여 실시하였다 (Kim, 1993). *E. coli* KNK453을 5ml LB배지에 접종하여 24시간 배양한 것을 접종량이 1% 되도록 5ml LB배지에 다시 접종하여 OD₅₅₀에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때까지 2~3시간 배양한 다음 ice에 10분간 냉각시켰다. 1.5ml을 취하여 미리 냉각시킨 microtube에 옮긴 후 5,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상정액을 제거하고, 침전물에 50mM CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH 8.0)용액 750 μ l을 가한 다음 ice에서 15분간 냉각시켰다. 5,000 rpm, 5분 동안 원심 분리하여 침전물을 얻고, 여기에 다시 50mM CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH 8.0)용액 100 μ l 넣은 후 4 $^{\circ}$ C에서 12~24시간 방치하여 competent cell을 제조하였다. Competent cell에 목적하는 plasmid DNA를 넣고 잘 섞어준 다음 ice에 30분간 방치한 후 42 $^{\circ}$ C의 water bath로 옮겨 2분 동안 처리하였다. 그 다음 1ml의 SOC배지를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양시킨 후 ampicillin 50 μ g/ml이 들어 있는 LB plate에 200 μ l 도말하였다. 37 $^{\circ}$ C와 42 $^{\circ}$ C에 각각 12~24시간 배양 후 transformant를 선별하였다.

2) Mutant *E. coli*에서의 *E. tarda GyrA* 발현 및 보상 확인

E. coli KNK 453균주는 temperature-sensitive *gyrA* mutant로 43 $^{\circ}$ C 이상에서는 *gyrA* gene이 기능을 잃어 균이 자라지 않게 된다. 이 실험에서는 *E. tarda*의 *gyrA* gene을 포함하고 있는 plasmid를 transformation시킴으로써 *E. tarda gyrA* gene의 *E. coli*에서의 보상 여부를 관찰하였고, 그 결과 transformation된 *E. coli*는 30 $^{\circ}$ C뿐만 아니라 43 $^{\circ}$ C에서도 그 균이 자라는 것이 관찰되었다. 이와는 대조적으로 control인 TOPO vector만을 transformation 시킨 KNK 453균주는 43 $^{\circ}$ C에서는 자라지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-13).

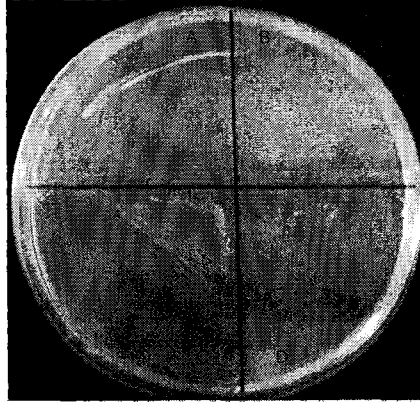


Fig. 1-13. Agar plate growth at 43°C of *E. coli* KNK453 transformed with the following untransformed (A), Topo vector (B), Topo vector (Inserted *E.coli gyrA*) (C), TOPO vector (Inserted *E. tarda gyrA*) (D).

(3) 해양 환경에서 분리한 quinolones 내성균에서 나타나는 *gyrA* 유전자의 mutation 분석

실험에서 분리된 nalidixic acid 내성균 중 일부 균을 임의적으로 선택하였다. 앞에서 결정된 *gyrA* gene의 염기 서열을 바탕으로 QRDR 및 일부의 염기 서열을 분석함으로써 내성 획득과 gene의 mutation 특성을 분석하였다. 그 결과 선택된 모든 균주에서 GyrA의 83번 아미노산이 전체적으로 변한 것을 관찰할 수 있었다 (Table 1-12). 선택된 모든 균은 83번 아미노산인 serine이 arginine으로 변이가 일어난 것을 알 수 있었으며 nucleotide는 AGC가 AGA나 CAC로 변한 것을 확인할 수 있었다.

Table 1-12. Susceptibility to quinolones and mutations in the QRDR of *gyrA* genes of *E. tarda* isolates

Strain	Isolation	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a				Mutation in <i>gyrA</i>	
		NA	OA	NOR	CIP	amino acid	base change
GE1	1994, Kujedo	2	0.13	0.03	0.008	83(Ser)	AGC
RED7	1994, Yosu	≥ 512	2	0.31	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
RE1	1995, Kwangju	64	0.5	0.08	0.03	83(Ser→Arg)	CAC
RE8	1995, Pohang	≥ 512	4	0.31	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
LE2	1995, Namhae	≥ 512	2	0.31	0.13	83(Ser→Arg)	AGA
JH4	1996, Tongyoung	≥ 512	1	0.16	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
KFE	1997, Gampo	64	2	0.13	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JH9	1999, Tongyoung	≥ 512	2	0.16	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JDE2	2000, Yosu	256	1	0.63	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JDE30	2001, Namhae	256	1	1.25	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JDE37	2002, Kuryongpo	≥ 512	4	1.25	1.25	83(Ser→Arg)	AGA
CJE13	2003, Jejudo	≥ 512	2	0.5	0.25	83(Ser→Arg)	AGA
JDE45	2003, Kujedo	≥ 512	4	0.5	0.13	83(Ser→Arg)	AGA

^aNA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacin.

(4) DNA gyrase 및 Topoisomerase IV genes 의 cloning과 염기서열 분석

gyrA gene의 염기 서열 분석 방식과 같은 방식으로 실시하였다. 우선 부분적인 gene의 염기 서열을 결정하였으며, cassette ligation-mediated PCR법으로 전체 염기 서열을 결정하였다.

(가) DNA gyrase 및 Topoisomerase IV genes의 부분 염기 서열 결정

gyrA gene의 QRDR의 염기 서열을 분석하기 위한 degenerate primer중에서 DGYR-1, DGYR-3은 *parC* gene과도 보존되어 있었으며 PCR과 cloning과정을 거쳐 *parC* gene의 일부 염기 서열을 결정하였다.

여러 그람 음성균에서 *parE* gene은 *parC* gene과 가까운 위치에 존재한다는 보고가 있었으며, *E. tarda* 역시 이와 유사할 것이라 추정하였다. 본 실험의 *parC* gene의 염기서열 분석결과 이 gene의 앞부분이 다른 균의 *parE* gene과 상당히 유사함을 알 수 있었으며 이 부위를 *E. tarda*의 *parE* gene중 일부임을 확인 할 수 있었다.

gyrB gene은 이전에 보고된 primer (UP1, UP2R) (Yamamoto and Harayama, 1995)를 적용하여 PCR하였으며 PCR 산물을 cloning하여 일부의 염기 서열을 결정하였다.

본 실험의 PCR, cloning, 염기 서열 분석 과정은 앞의 *gyrA* gene에서와 같다.

(나) *parC* gene의 염기 서열 분석

위의 B-2-4)-(1) 결과, *parC*에 대해 320 bp의 염기 서열을 결정할 수 있었다. 이 염기 서열을 바탕으로 cassette ligation-mediated PCR을 실시하였으며, 결과 upstream에서는 *EcoR* I fragment, downstream에서는 *Xba* I, *Sal* I 에 해당하는 fragment를 얻을 수 있었다. 이러한 fragment를 cloning하고 염기 서열을 분석하였으며 전체 *parC* gene을 결정하였다 (Fig. 1-14).

1607 bp, 686 bp, 2087 bp 에 해당하는 각각의 fragment를 분석한 결과 *E. tarda parC* gene은 701개의 아미노산을 암호화하는 2106 bp의 ORF를 나타내었다 (Fig. 1-15, 1-16). 본 연구의 결과물이 *parC* gene에서 증폭되었는지를 확인하기 위해 QRDR 부위와 gene 전체를 nucleotide와 deduced amino acid 서열로 지금까지 보고된 다른 세균 종의 *parC* gene들과 비교하였으며 결과 *E. tarda*의 *parC* gene을 확증 할 수 있었다 (Table 1-13).

Start codon 앞부분에서 putative promoter 및 ribosome binding site, inverted repeating sequence 또한 확인 할 수 있었으며, stop codon 뒤로도 inverted repeating sequence를 확인할 수 있었다. *E. coli* ParC의 Tyr-120, *P. aeruginosa* ParC의 Tyr-127를 포함하는 AAMRYTE 아미노산 서열이 *E. tarda*의 Tyr-98 부위에서도 발견되었다 (Bébéar et al, 1998; Akasaka et al, 1999).

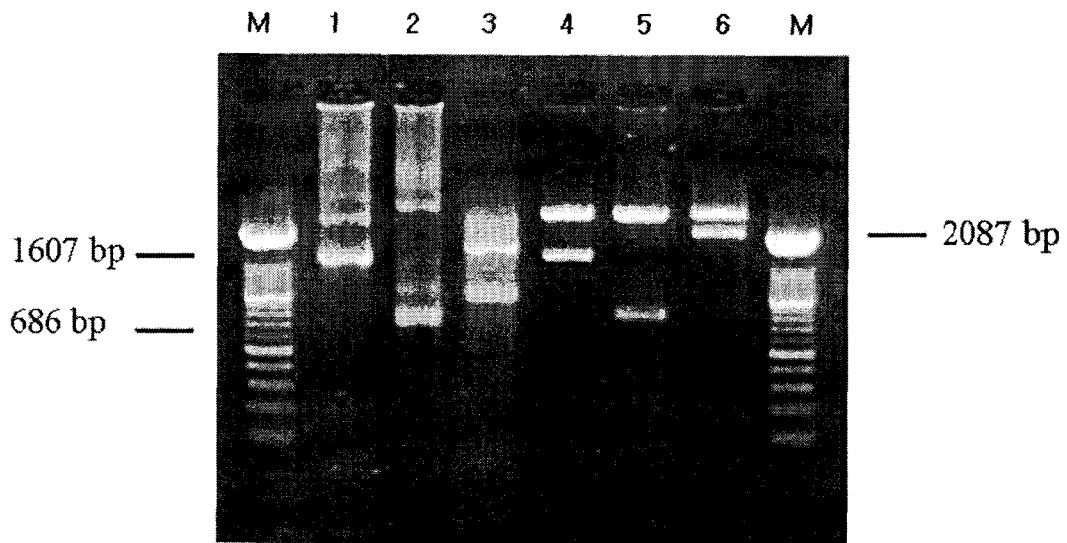


Fig. 1-14. Electrophoretic analysis of LA PCR products obtained by the amplification of up stream and down stream of *parC* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, *EcoRI* digest (nested PCR); lane 2, *XbaI* digest (nested PCR); lane 3, *Sal I* digest (nested PCR); lane 4, 5, 6, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (respectively, insert line 1, 2, 3 fragment). lane M, DNA marker (100bp ladder).

Table 1-13. Identity of the nucleotide and deduced amino acid sequence of the *parC* in *E. tarda* compared with those in other bacterial strains

Organisms	Accession number ^a	Nucleotide sequence		Deduced amino acid sequence	
		Whole <i>parC</i>	QRDR	Whole <i>ParC</i>	QRDR
<i>Escherichia coli</i>	M58408	73.5	81.2	77.0	92.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB003428	68.2	83.1	64.1	89.3
<i>Sfnigella flexneri</i>	AEO15318	71.2	81.5	74.7	92.4
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AB023570	62.9	73.9	63.8	84.8
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	U08907	56.9	68.2	41.5	64.1
<i>Serratia marcescens</i>	AF227958	75.5	85.6	77.3	93.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	M68936	72.9	82.6	74.2	92.4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z67739	50.6	59.4	28.8	51.9
<i>Mycoplasma hominis</i>	AF036961	44.1	54.3	25.8	54.2

^a The nucleotide sequence has been assigned accession number in the GenBank EMBL database.

```

>>>>>
ACGTGTGACGCATCCCGCCATACATCCGACAGGCTGCCCGCGGGTGGCCTGTTCTGTTTTCTCCTTAAACGGCGCCGCCCTGCCGACGCG -270

<<<<<<
GCTGTGACAGTCGGACAAAAAATACGTTACTATCGCGGCCATTGCGATGATTTTACTGCGATCGTCTGTCTDCTGCGGGACAGCGGCCGCGTC -180
>>>>>> <<<<<<<

SD
CAGAGGATGACCAATGAGCGATCTGACTCATGACAACAGTGAGCGTGAGCGCTCCATGCGTTTACTGAAGACGCTATCTGCAATACTCC -90

ATG TACGTCATCATGGATCGCGCGTTGCCCTTTATCGCGGACGGGCTGAAAGCCGGTTCAGCGCCGCATCGTGTATGCGATGCTGAGCTG 90
M Y V I M D R A L P F I G D G L K P Y Q R R I V Y A M S E L

GGGCTATCCGCAGCGCAAAAATTTAAAAAGTCGCGCGCACCGTCCGTGACGTCGTGGTAACTACAGCCACCGCCAGCGCTCAGCGCCTGC 180
G L S A S A K F K K S A R T V G D V L G K Y H P H G V S A C
DGYR-1 →

TATGAGGCGATGGTGTGATGCGCGACCCCTTCTCCTATCGCTATCCGCTGGTGGATGGGCAGGGGAACTGGGGGGCGCCGGACGATCCG 270
Y E A M V L M A Q P F S Y R Y P L V D G Q G N W G A P D D P

AAATCGTTCCGCGGATGCGTTATACCGAGTCCAGTCTGATCGCTACCGCGAGATTGCTCAGCGAACTGGGTGAGGGCACGGTGGAC 360
K S F A A M R Y T E S R L S R Y A E I L L S E L G Q G T Y D
← PARS2-R PARS1 →

TATGTCCGCAACTTCGACCGGACGCTGAGGAGCCGAAATTCCTGCGCGCGCTGCCAACATCCTGCTGAACGGCACGACCGCCATG 450
Y V A N F D G T L Q E P K F L P A R L P N I L L N G T T G I
← PARS2 → ← PARS1-R ← DGYR-3

GGGTCGGCATGGCGACGGATATTCGCGCCGACAAACGCGCGTGAGGTGCGCGCGCGCTGGTGGCTCTGCTGGACAAATCCGACGAGCTCG 540
A V G M A T D I P P H N A R E V A A A L Y A L L D N P Q S S

CTGGACGATCTGCTGACGCACATTTCAGGGCCGGATTTCCGACCGAGCCAGAAATCATCACGCGCGTGAACGAGATCCGTAAGATCTAC 630
L D D L L T H I Q G P D F P T E A E I I T P R D E I R K I Y

CGCACCGGTGCGGGATCGGTACGCATGCGGGCGGTATGGCGCAAGAAGAGAGCGAGATCGTGATCAGCGCGCTGCCGCATCAGACCTCC 720
R T G R G S V R M R A Y W R K E E S E I V I S A L P H Q T S

GGCGCCAGGTTGCTGGAGCAGATAGCCAGCGAGTGCGCGCGAGAAGCTGCTCGATGGTGCAGATTTGCGCGATGAGTCGGATCATGAA 810
G A K Y L E Q I A S Q M R A R S C S M Y D D L R D E S D H E

AAGCCGACCGTCTGGTGTGATACCGCGCTCGAACCAGTGCATCTCGATCAGCTGATGAATCACCTGTTCCGCCACCCGATCTGGAA 900
N P T R L V I Y P R S N R Y D L D Q L M N H L F A T T D L E

AAAAGCTACCGTATCAACATGAACATGATCGGTCTGGAATCGCGCTCCGGCGGTGAAAAGATCTGCGTGCAGATCGTACCGAGTGGCTGAGC 990
K S Y R I N M N M I G L D R R P A Y K D L R E I L S E W L S
PARS3 →

TACCGCGTGAAGCGGTGCGTCCGCGCCTGAACTACCGTCTGAGAGGTTGCTGAAGCGCCTGCATATCTAGAGGGTCTGCTGTGCGCG 1080
Y R R E T V R R R L N Y R L E K V L K R L H I L E G L L C A
PARS4 → XbaI

TTTTTGAATATCGACGAGGTTGATCCACATCATCCGACGCGAGGATGAGCCCAAGCCGGTGGTGGCGCGCTTTGGCCTCAGCGATACC 1170
F L N I D E Y I H I I R S E D E P K P Y L Y A R F G L S D T

```

Fig. 1-15. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *E. tarda parC* gene. Potential hairpin loops upstream and downstream of the open reading frame are indicated by the symbols > and < in inverted repeats. Nucleotide position for the restriction enzymes (underlined) and primer (shadowed) used for the preparation of cassette-ligated *E. tarda* DNA and the cloning with cassette ligation-mediated PCR method, and start and stop codon (boxed) respectively also shown.

CAGGCTGAGGCGATTCTGGAGCTCAAGCTGCGTCACTGGCCGCTCTGGAAGAGGTGAAGATCCGGGGCAACAGGACGCGCTGGCGCAG 1260
 Q A E A I L E L K L R H L A R L E E V K I R G E Q D A L A Q

GAGCGGGATCGCCTGCAGACGCTGCTGGCCCTCCGAGCGTAAGCTGGGCACGCTGATCAAGGAAGAGATCATGGCGGATGCCGAAACGTAC 1350
 E R D R L Q T L L A S E R K L G T L I K E E I M A D A E T Y

GGCAGCGACGGCGTTCCGCCGCTGCAAGAGCGTTCGAAAGCGCGGGCGATGAGCGAGCACGACTTTGTCCCGAGCGAAACCGGTGACCATC 1440
 G D A R R S P L Q E R S E A R A M S E H D F V P S E P Y T I

GTCCGTGCCGAAGGGGGCTGGGTGCGCAGCGCCAAAGGGGCATGATATTGATCCGAGCGGGCTGAACATAAGGCCGGCGACGCTTTCCGC 1530
 V L S E G G W V R S A K G H D I D P S G L N Y K A G D A F R

GCCGCCGCGCGGGCAAGAGCAACCAGCCGGTGGTCTTTATCGACTCCAGCGACGCGCTATGCCCTCGATCCGCTGACGCTGCCGTCG 1620
 A A A R G K S N Q P V Y F I D S S G R S Y A L D P L T L P S

GCGCGCGGGCAGGGTGAGCCGCTGACCGTTAAGCTGACGCCGCCCGCGGGGGCAACCATCGAACACGTGCTGATGGCTGCGGACAATCAG 1710
 A R G Q G E P L T G K L T P P P G A T I E H Y L M A A D N Q

AAGCTGCTGATGGCCCTCCGACGCGCGCTATGGCTTGTCTGCACCTTTAGCGATCTGGTCGCGTGCAACCGCGCAGGCAAGGCCATGCTG 1800
 K L L M A S D A G Y G F Y C T F S D L V A C N R A G K A M L

ACGCTGCCGAAAAATGCCAAGGTGCTGACGCCGCTGGAGATTAACGGTGACGATGACATGCTATTGGCCATTACCGAGGCCGGACGGATG 1890
 T L P E N A K Y L T P L E I N G D D D M L L A I T E A G R M

CTGATGTTCCGGTGACGATCTGCCGCACTCTCCAAGGGCAAGGGGAATAAGATCGTCTCCATCCCGCGGCACAGGCCGCCGCCGTT 1980
 L M F P Y H D L P Q L S K G K G N K I Y S I P A A Q A A A G

GAGGATACGCTGAAAATGGCTGCTGGTGGTGGCGCCGCGAGACATCGCTGACGCTGCAATGCGGTAAAGCGTAAACTGGTGATGAAGCCCACA 2070
 E D T L K W L L V L A P Q T S L T L H V G K R K L Y M K P A

GGATTTGCAGAAGTTCGCGCGCAACGCGGGCCGTTAAGGGAACTGCTGCCCGCGGGGGCTGCGAGCGCATTGAGCGGGTGGATGTGGATG +54
 G F A E V P R E R G P

CGCCCGCAGTCGCTGCGTCTGGACGCCGACGGCGACGCGTAATTCCAAGGCCGCCAGCGCGCGCCGAAAGAGGGCCTGCGCCGCCGCGAC +144
 >>>>>> <<<<<<<

CGCGCCGGGGTGTGGCCCGTATCTGTTTATGAGGTTGTTATGCTATTCATTTCCGGGTCATACTGATCACGCTGCTGTGCTCTCGTC +234

Fig. 1-15. Continued.

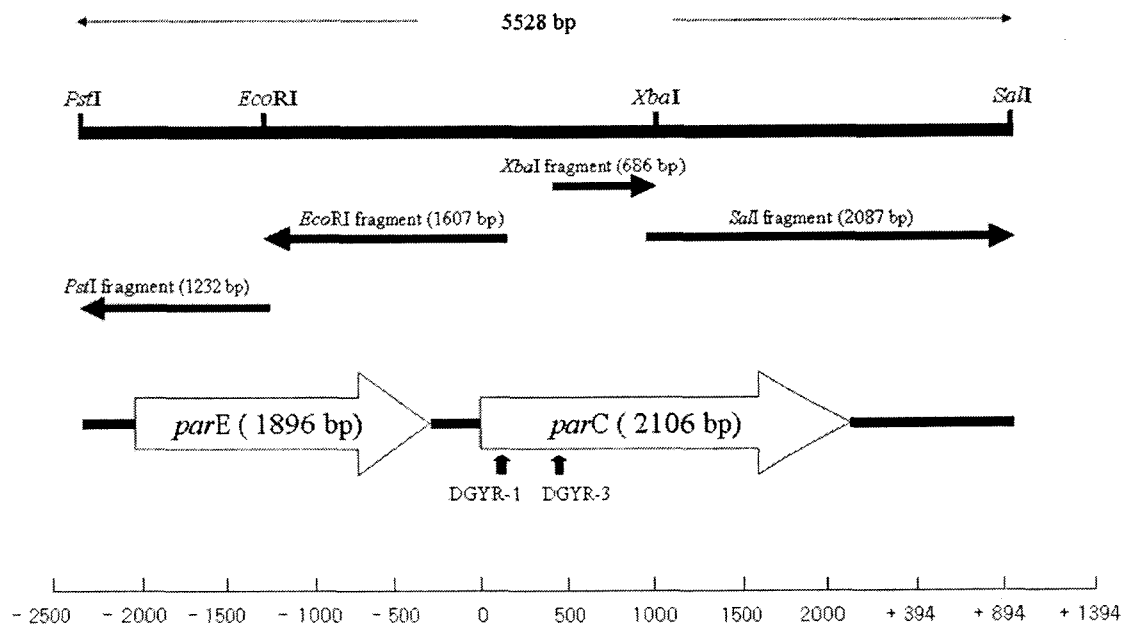


Fig. 1-16. Restriction map and organization of the *E. tarda parC* and *parE* locus. Vertical arrows indicate positions of the degenerated primers (DGYR-1 and DGYR-3) used for the cloning of *parC* gene. Thick horizontal arrows indicate the produced DNA fragment with the used restriction enzyme and the walking direction.

(다) *parE* gene 염기 서열 분석

parC gene의 염기 서열 분석 결과 *parC* gene의 upstream에 *parE* gene의 염기 서열을 확인 할 수 있었다. 이렇게 결정된 부분적인 염기서열을 바탕으로 cassette ligation mediated-PCR을 실시하였으며, *Pst*I의 fragment를 얻을 수 있었다. 다음으로 cloning과 염기 서열 분석을 통하여 *parE* gene의 전체 염기 서열을 결정하였다.

- Complete gene을 분석한 결과 *parE* gene은 631개의 아미노산을 암호화하는 1896 bp의 ORF를 가지고 있었으며, 그 앞 부위에 putative promoter와 ribosome binding sequence를 확인할 수 있었다 (Fig 1-16, 1-17). 이 아미노산을 다른 균들과 비교한 결과 *E. coli*의 ParE와는 77.1%의 상동성을 보였다. 그리고 *E. coli*와 *E. tarda*의 GyrB와는 각각 17.7%, 1%의 상동성을 나타내었다. 이 밖에 *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* 그리고 *Streptococcus pneumoniae* 의 ParE와는 각각 76.2, 57.9, 19.5 그리고 20.8%의 상동성을 보였다. 이러한 아미노산의 비교로 *E. tarda*의 ParE를 보다 확증할 수 있었으며, *Pseudomonas aeruginosa*에서와 같이 G-loop ATP-binding moiety를 포함하는 N-terminal 염기서열 및 아미노산 EGDSA가 상당히 유사함을 알 수 있었다 (Bébéar et al, 1998; Akasaka et al, 1999).

← PARS4R

```

GGCCGCGGGGTCAAAGCTGACCGCCGACGACATCTGGAGCGCGTGGCCCTATGTCCTCTCGGTAAAAATGCAAGATCCGCAGTTCGCCGG 995
P R G V K L T A D D I W E R C A Y V L S V K M Q D P Q F A G

GCAAGCAAAAGACGGTCTCTCCTCACGCCAATGGCGTGCCTTGTCTCCGGGGTGGTCAAAGATGCCTTTAGCCTGTGCCTGAACCAAAA 1085
Q T K E R L S S R Q C A A F V S G V V K D A F S L W L N Q N

CGTGCAGTCGGCCGAGCTGCTGGCCGAGCTGGCGATAAACAAGGCCAAGCGCCGCAATGGCGCGGCAAAAGAAGGTGGTGGCTAAGAAGCT 1175
V Q S A E L L A E L A I N S A Q R R M R A A K K V V R K K L

GACCAAGCGGGCCCGGTGCCGGTAAGCTGGCGGACTGCAAGCGCTCAAGATCTGAACCGCACCGAGCTGTTCTGGTGGAGGGGATTC 1265
T S G P A L P G K L A D C S A Q D L N R T E L F L V E G D S

GGCGGGGGCTCGGCTAAGCAAGCGCGGATCGTGAATATCAAGCGATCATGCCCGTGAAGGAAAGAATCCTGAATACCTGGGAGGTCTC 1355
A G G S A K Q A R D R E Y Q A I M P L K G K I L N T W E V S

TTCCGATGAGGTGCTGGCGTGGCAAGAGGTGCAAGATATTTCCGTGGCTATCGGATCGATCCCGCAAGCGATGAGCTCAAGCCAGCTGG 1445
S D E V L A S Q E Y H D I S V A I G I D P D S D D L S Q L R

CTAAGCAAAATCTGTATCCTGGCCGATGGGATTCGGATGGACTGCATATCGCCACGCTGCTGTGGCGCTGTGGTTCGCCATTTCCG 1535
Y G K I C I L A D A D S D G L H I A T L L C A L F V R H F R

CCCCTGGTGCAGCGGGGCCAGTCTATGTGGCGATGCCCGCGCTGTACCGTATCGATCTCGCAAGAAGAGGTGTTCTAAGCCCTGAAGCA 1625
P L V Q A G H V Y V A M P P L Y R I D L G K E V F V A L S E

GGAAGACAAAGCGGGGTGCTGGAGCAGCTGAACCGCAAGAAAGGCAACCCCAACGTACAAGCGCTTTAAAGGGCTGGGGAGATGAACCC 1715
E E K A G V L E Q L K R K K G K P N V Q R F K G L G E M N P

GCTGCAAGTGGTGAACCAAGCTGATCCCAATACTCGCGTCTGGTACAAGTGAACCATGAGGATGAGGATATGAGCGTACCGTGGC 1805
L Q L R E T T L D P N T R R L V Q L T I E D E D M E R T V A

CGTCAATGGATATGCTGCTGGCCAAAAAGCGCGCGAAGATCGCCGCAACTGGCTGCAAGAAAAAGCAATCTGGCTGAGCTGGAAGTCTGA 1896
Y M D M L L A K K R A E D R R N W L Q E N G N L A E L D V *

```

>>>>>

```

CGCATCCCGCATACATCGACAGGCTGCCCGGGGTGGCCTGTTCTGTTTCTCTTAAACGGCGCGCCCTGGCGAGCGCTGTGAC

```

<<<<<

```

AGTGGACAAAAAATACGTTACTATCGCGGCAATTGCATGATTTACTGGGATCGTCTGTCCTGGGACAAGCGCGGGTCCAGAGGAT

```

>>>>><<<<<<

```

GACCAATGAGCGATCTGACTCATGACAACAAGTGGCGTGGCGCTCCATGCGTTTACTGAAGAAGCCTATCTGCAATACTCC

```

Fig. 1-17. Continued.

(라) *gyrB* gene의 염기서열 분석

Nucleotide 수준에서 이전에 제작된 primer (Yamamoto and Harayama 1995) (UP1, UP2R)를 이용하여 *gyrB*에 대해선 1255 bp의 PCR product를 얻을 수 있었다. PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, 다른 그람 음성 세균의 *gyrB* gene과 *parE* gene에 매우 높은 상동성을 보여주었으므로 *E. tarda*의 *gyrB* gene임을 확인할 수 있었다. 일부분의 염기서열 결정 후, upstream and downstream sequence를 결정하였다 (Fig. 1-18). Upstream sequence에서 922 bp의 *Pst*I fragment, downstream sequence에서는 digest에서만 1172 bp의 *Sal* I fragment을 얻을 수 있었으며, cloning과 염기 서열 분석을 통하여 전체 *gyrB* gene을 결정하였다.

- Complete gene을 분석한 결과 *gyrB* gene은 804개의 아미노산을 암호화하는 2415 bp의 ORF를 가지고 있었으며 그 앞 부위에 putative promoter와 ribosome binding sequence를 확인할 수 있었다 (Fig. 1-19, 1-20). 또한 다른 균과의 아미노산을 비교한 결과 *E. coli*의 ParE와는 74.0%의 상동성을 보였다. 그리고 *E. coli*와 *E. tarda*의 GyrB와는 각각 20.3%, 1%의 상동성을 나타내었다. 이 밖에 *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni* 그리고 *Streptococcus pneumoniae* ParE와는 각각 47.2, 37.1, 30.4 그리고 14.9%의 상동성을 보였다. 이러한 아미노산의 비교로 *E. tarda*의 GyrB를 보다 확증할 수 있었으며, *Streptococcus pneumoniae*에서와 같이 G-loop ATP-binding moiety를 포함하는 N-terminal 염기서열 및 아미노산 EGDSA, YKGL가 상당히 유사함을 알 수 있었다 (Pan and Fisher 1996).

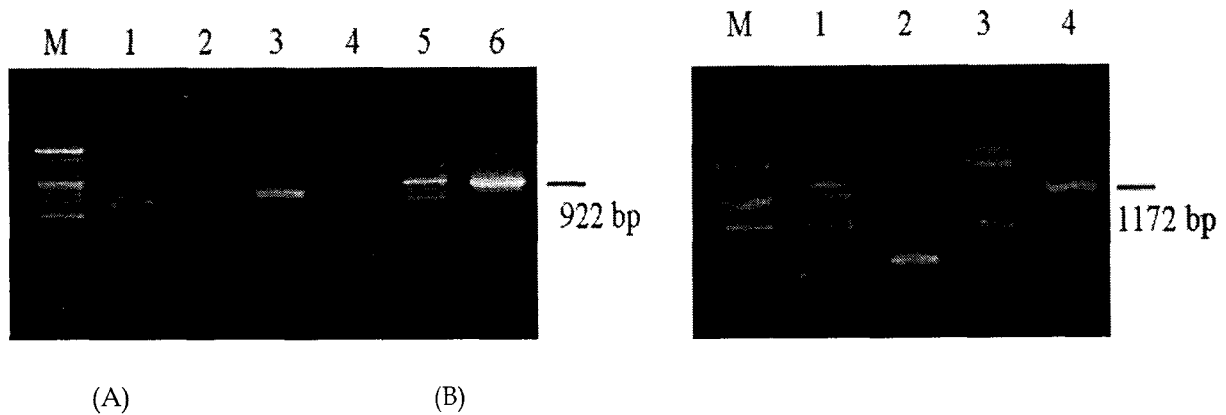


Fig. 1-18. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of up stream and downstream of *gyrB* partial regions in *E. tarda*. (A), Amplification of upstream *gyrB* partial regions. Lane 1, 2, *EcoRI* digest (first and nested PCR respectively); lane 3, 4, *XbaI* digest (first and nested PCR respectively); lane 5, 6, *Pst I* digest (first and nested PCR respectively); (B), Amplification of downstream *gyrB* partial regions. lane 1, 2 *Pst I* digest (first and nested PCR respectively); lane 3, 4, *Sal I* digest (first and nested PCR respectively). Lane M, DNA marker (100bp ladder).

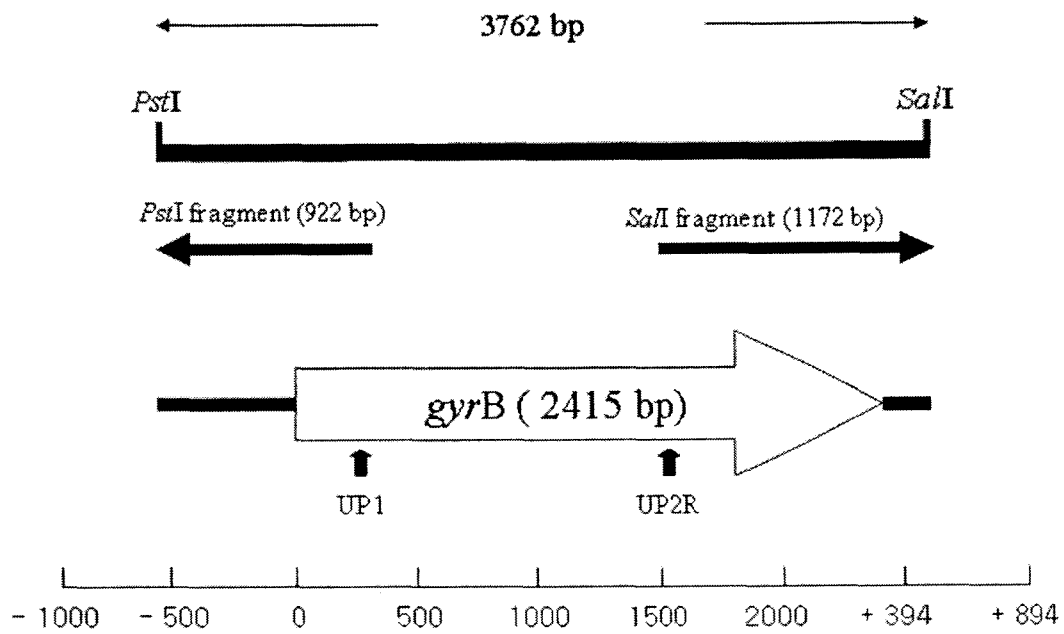


Fig 1-19. Restriction map and organization of the *E. tarda gyrB* locus. Vertical arrows indicate positions of the degenerated primers UP1 and UP2R) used for the cloning of *gyrB* gene. Thick horizontal arrows indicate the produced DNA fragment with the used restriction enzyme and the walking direction.

*Pst*I

CTGCAGGGCATCAACCCTGCCGTGTGAAACAGGGCCGTACCAGGGCATCCTGCTGCTGCAGCCAGTTTTTACCGGAGTATGCGCT -560

ATCCTTTTCGTTTATGCGCGGCTGGGATCGCGAAAGCGACTATGCGCGCTGCTGGAGCGTCACTTTGAGCGCGATCGGGCGCTGACCTA -470

TACCGCGCAGGGGCCGACAAAGCGGACTCCGCATCCGCGCCGACGGTACGCCGGTTGAGGATTTGCTGTCGCGCGGCGCAGCTAAAAC -380

GTTGATGTGCGGCTGCGCCTCGCACAGGAGAAATACCTGACGCGCCACAGCGGCCGTCAGTGTCTGTATCTGATCGATGACTTCGCCTC -290

TGAGCTGGATGCCGGGCGGCGCGTTTGGCTGCCAAGCGCTGAAAGCCACCGGTGCACAGGTGTTTGTGAGCGCAGTCAACGCCGATCA -200

GGTCGGCGACATGGTTGATGAAAAGGGCAAGATGTTCCGCGTGGAAACAGGGTAAAAATAGCCGTTAGATTCGATTTATTACGATAGTTA -110

CCAATGGGCGAGAAAGGCTGATGTC^{SD}CAAAATACGTATGACTCCTCAAGTATCAAGGTATTAAGGGCTGGATGCCGTTCTGTAAGCGCCCGG 70

M S N T Y D S S S I K Y L K G L D A Y R K R P G

GCATGTACATCGGGGATACCGATGATGGTACGGGTGCGACCCACATGGGTGTTGAGGTGGTGGATAACCGGATTGACGAAAGCGCTCGCTG 160

M Y I G D T D D G T G L H H M Y F E Y Y D N A I D E A L A G

GTTATTGCAAGATATCATCGTACCATTACAGTGACAACCTCCGCTCCGTACAGGATGACGGCCGCGGCATCCCAACCGGCATTACCC 250

Y C K D I I Y T I H S D N S Y S Y Q D D G R G I P T G I H P

CGGAGGAGGCGTCTCTGCCCGGAGGTCATCATGACCGTCTGACCGCCGCGGTAAGTTGACGATAACTCCTATAAGGTCTCCGGCG 340

E E G V S A A E V I M T V L H A G G K F D D N S Y K V S G G

← GYRS2R UPI → GYRS1R

GCCTGACCGCGTGGGGTTTCGTTGGTGAACCGCTCTCTGAAAGCTGGAGCTGGTATCCGTGCGACGGCCATGTCATGAGCAAA 430

L H G Y G V S Y V N A L S E K L E L V I R R D G H Y H E Q I

TCTACCGACCGGTGTGCCGCGGCGCGCTGAAAGTGGTTGGCGACCCGAGCAGACCGGTAATCCTGCGTGCCTTTCTGGCCGAGCATGG 520

Y R H G V P A A P L K V Y G D T E Q T G T R Y R F W P S M E

AGACCTTCAGCAATGTGGTGAATTCAGTATGACATTCTGGCTAAGCGCTGCGCGAACTCTCTTTCTGAAACTCCGGCGTCTCCATCC 610

T F S N V Y E F Q Y D I L A K R L R E L S F L N S G Y S I R

GCCTGCGCGATAAACCGCAACGATCGCGAAGATCATTCCACTATGAGGGTGGGATTAAAGCGTTTGTGCGATCTGAAACAAGAACAAAA 700

L R D K R N D R E D H F H Y E G G I K A F Y E Y L N K N K T

CGCCAATCCATCCGAACGTTTACTTTTCGACCATGAAGGATGATATCGCGGTAGAAGTGGCGCTGCGAGTGAACGATGGCTCCAGG 790

P I H P N V F Y F S T M K D D I G Y E Y A L Q W N D G F Q E

AGAATATCTACTGCTTTACCAATAACATCCCGCAGCGGACGGCGGGACCCATCTGGCCGGTTTCCGTGCGCGATGACCCGTACGCTGA 880

N I Y C F T N N I P Q R D G G T H L A G F R A A M T R T L N

ACGCTACATGGAAAACGAAAGGCTATACCAAGAAGAGCAAAATCTCCGCTACCGGTGACGACGCGCGTGAAGGGGCTAATTGCCGTGGTGT 970

S Y M E N E G Y T K K S K I S A T G D D A R E G L I A V Y S

CCGTGAAGGTGCCGATCCCAAGTTCTCCTCTCAGACCAAGGATAGCTGGTCTCTTCGGAGGTGAAATCCGCGGTTGAGTCCGTGATGA 1060

V K V P D P K F S S Q T K D K L Y S S E V K S A V E S L H N

Fig. 1-20. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *E. tarda gyrB* gene. Potential hairpin loops upstream and downstream of the open reading frame are indicated by the symbols > and < in inverted repeats. Nucleotide position for the restriction enzymes (underlined) and primer (shadowed) used for the preparation of cassette-ligated *E. tarda* DNA and the cloning with cassette ligation-mediated PCR method, and start and stop codon(boxed) respectively also shown.

ACGAGCGCTGGCTGAATACCTGCTGGAAAACCCAGCGATGCCAAAATCGTCGTCGGCAAAATCATCGACGCGGCCCGCCACGTGAAG 1150
 E R L A E Y L L E N P S D A K I V Y G K I I D A A R A R E A

CTGCGCGTAAGGCCBGTGAGATGACCCGCCGCAAGGGTGCCTGGATCTGGCCGGCTGCGGGCAAGCTGGCGGACTGCCAGGAGCGCG 1240
 A R K A R E M T R R K G A L D L A G L P G K L A D C Q E R D

ACCCGGCCACTCAGAGCTTTACTTAGTGAAGGGGACTCCGCGGGCGGCTGCCAAAGCAGGGACGTAACCGTAAGAATCAGGCCATCC 1330
 P A H S E L Y L V E G D S A G G S A K Q G R N R K N Q A I L

TGCCGCTGAAGGGAAAACTCTCAACGTCGAGAAGGCGCGCTTGGACAAGATGCTCTCTCCAGGAGGTCGCGACCCGTGATCACCGCGC 1420
 P L K G K I L N V E K A R F D K M L S S Q E V A T L I T A L
 GYFES1 →

TGGGCTGCGGCATTGGCCGGGATGAGTACAACCGGATAAGCTGGCGCTACCACAGCATTATCATCATGACCGATGCGGACGTCGACGGCT 1510
 G C G I G R D E Y N P D K L R Y H S I I I M T D A D V D G S
 GYFES2 → ← LP2R

CCGACATCCGTAACGCTGGTGTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGAAATATCGAGCGCGGCCATGTATATATTGCTCAGCCCGCCG 1600
 H I R T L L L T F F Y R Q M P E I I E R G H V Y I A Q P P L

TGTACAAGGTGAAAAAGGCAAGCAGGAGCAGTACATTAAGACGATGAGGCGATGGATCAGTATCAGATGTCATCGCGCTGGACGGCG 1690
 Y K V K K G K Q E Q Y I K D D E A M D Q Y Q M S I A L D G A

CCGCCCTGCATATCAACGCTGCCGCGCCCGCGTGGCCGGTGAAGCGCTGGAAAACTGGTGGCGGAGCATTATCAGGTGCGAGAAGCTGA 1780
 A L H I N A A A P A L A G E P L E K L V A E H Y Q V Q K L I

TCGGTCGCATGGAGCGTCGCTATCCCAAGGCGGTGCTGAATCAGCTTATCTATCAGCCGACCCCTTAGCGAAGCCGATCTGGGGAACCG 1870
 G R M E R R Y P K A V L N Q L I Y Q P T L S E A D L G N Q A

CGCAGGTTGAGCAGTGGATTAACCTCGCTGGTGGCAACGCTGAACGAGAAAAGCAGCACGGTAGCGTCTATAGCGCCCGCGTTCTGGAGA 1960
 Q Y E Q W I N S L Y A T L N E K E Q H G S V Y S A R V L E N

ATCGCGAGCGTCAGATGTTTGAAGCCGCTGGTGGCGGTGCGTACCCACGGCGTGGATACCGACTACGCGTGTGACTTTGACTTTGTTCC 2050
 R E R Q M F E P L V R Y R T H G V D T D Y A F D F D F V H G

GCGCCGAAATATCGCCGATCTGCGCGCTGGGCGAAAAGCTACGCGACCTGCTGGAAAGAGAGCGCTTTCGTGGAGCGTGGCGAACGTCGTC 2140
 A E Y R R I C A L G E K L R D L L E E S A F V E R G E R R Q

AGCCGGTGGCCAGCTTTGAGCAGGCGTGGACTGGCTGGTGAAGGAGTCCGCTCGTGGCCCTGGCCATTCAGCGCTACAAGGGCTGGGTG 2230
 P Y A S F E Q A L D W L Y K E S R R G L A I Q R Y K G L G E

AAATGAACCCGGAGCAGTGTGGGAAACCATGGATCCGGAAGGGCGCCGTATGCTGCGCGTGACCATCAAGGATGCGGTGGCGGCCG 2320
 M N P E Q L W E T T M D P E G R R M L R V T I K D A V A A D

ATCAGCTGTTCCACCACCTGATGGGGGATGCGGTAGAGCCGCGCCGGCCTTTATTGAAGAGAACGCGCTTAAAGCGTCCAATCTGGACT 2410
 Q L F T T L M G D A Y E P R R A F I E E N A L K A S N L D F

TTAAATTGCGCCGATATAAGTGGTTTAAAAGGACGGAAACGTCCTTTTTGCTGTGGGTTAATCTGCACTGACCAAGCGTGTATTGAAT +85
 AAGGGAGCCAATCATGCCAATTAAGTATGATCGCTATCGATTTGGATGGAACGCTGCTGAACGAGGCGCGGGAATAACACCAAGCGGTGAA +175
 AGCCGCTATCGCTGACGCGCTGCGAC +201
 Sal I

Fig. 1-20. Continued.

(5) *In vitro* 변이주의 *gyrA* mutation 특성

앞에서 결정된 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* gene의 염기 서열을 바탕으로 mutation 특성을 분석하기 위하여 각 gene의 QRDR 및 일부의 염기 서열을 확인하고 감수성을 보이는 균들과 비교하였다.

(가) Quinolones 내성 *E. tarda* 변이주 제작 (*In vitro*)

실험 균주로는 *E. tarda* PPD 130/91 (Ling et al., 2000) 균주를 사용하였으며 항생제가 첨가된 Mueller Hinton (MH, Difco) agar 배지에 단계별로 실험하였다. 첫 번째 단계에서는 wild type의 균주를 MH broth에서 16~18시간 배양 후 각 plate당 MIC 농도의 1~16배의 nalidixic acid가 첨가된 MH plate에 도말하였다. colony를 보이는 최고 농도의 항생제 배지에서 균을 선택 분리하고 그 중 하나의 균주를 MH broth에 배양 후 다음 단계를 실시하였다. MH broth에서의 배양은 균이 충분히 활성을 가질 수 있도록 2~3회 계대배양을 하였으며, broth 배지는 agar에서의 균 선택 시 항생제 농도와 같은 농도의 항생제를 첨가하였다. 두 번째 단계부터는 MIC 농도의 2~32배의 ciprofloxacin이 첨가된 MH plate에 균을 도말하였으며 역시 최고농도의 항생제 배지에서 자란 colony를 선택 분리하였다. 실험에 사용된 모든 균은 OD₆₀₀에서의 흡광도를 측정하고, colony의 수를 counting하여 mutation frequency를 측정하였다 (Table 1-14). 그 후 단계별로 분리된 균에서 *gyrA* 및 *gyrB*, *parC*, *parE* gene의 QRDR 염기 서열을 결정한 후 wild type 및 quinolone 내성균과 비교 분석하였다.

(나) *In vitro* 변이주의 *gyrA* mutation 특성 분석

Wild type의 *E. tarda*는 nalidixic acid 및 ciprofloxacin에 총 6단계를 거쳐 내성이 유도되었으며 많은 수의 mutant를 분리할 수 있었다 (Fig. 1-21). 항생제가 첨가된 MH agar에서 단계별로 선택된 균들은 MIC test 및 QRDR의 염기 서열이 분석되었고 모든 단계의 변이주들이 GyrA의 87번 아미노산이 Asp에서 Gly로의 변이를 보임을 알 수 있었다 (Table 1-15).

Table 1-14. Stepwise selection of quinolone resistant mutants

Step	No. of cells plated	Selecting agent ^b ([$\mu\text{g}/\text{ml}$])	No. of colonies	Mutation frequency ^a
I	1.91×10^{11}	NA (16)	2	1.05×10^{-11}
	2.77×10^{11}	NA (16)	7	2.53×10^{-11}
II	1.13×10^{11}	CIP (0.06)	242	2.14×10^{-9}
III	1.57×10^{11}	CIP (0.2)	110	0.70×10^{-9}
	1.55×10^{11}	CIP (0.2)	224	1.45×10^{-9}
IV	1.53×10^{11}	CIP (1)	29	1.89×10^{-9}
V	1.42×10^9	CIP (4)	7	4.93×10^{-9}
		CIP (6)	6	4.22×10^{-9}
VI	1.30×10^{11}	CIP (16)	230	1.77×10^{-9}

^a The mutation frequencies were calculated by dividing the number of CFU per milliliter selected on agar plates containing the respective selecting agent in the concentration indicated by number of CFU per milliliter plated in total.

^b NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

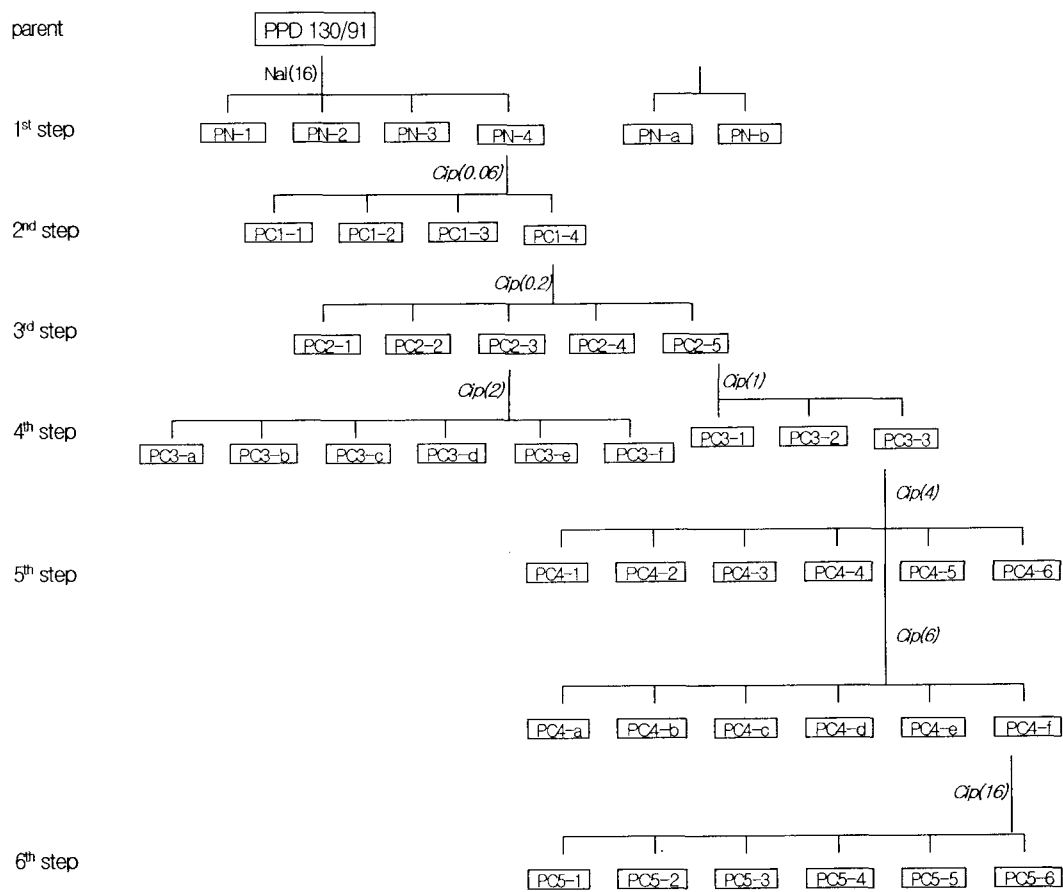


Fig. 1-21. Relationships between *E. tarda* PPD 130/91 and quinolone-resistant mutants PN1 to PC5-6 selected stepwise expose to nalidixic acid (NA) and ciprofloxacin (CIP). The number outside a parenthesis indicate the concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) used in the selection steps.

Table 1-15. Characteristics of quinolone-selected mutants of *E. tarda*

Strain	MIC ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$) ^a						Mutations			
	NA	OA	NOR	CIP	OF	PEF	GyrA		ParC	GyrB
							83	87	58	464
Wild type	2	0.13	0.03	0.02	- ^b	-	Ser	Asp	Ser	Ser
PN-4	64	1	0.13	-	0.25	2	Ser	Gly	Ser	-
PN-B	64	1	0.13	-	0.25	2	Ser	Gly	Ser	-
PC1-2	64	1	0.5	0.13	0.5	4	Ser	Gly	Ser	Ser
PC1-4	64	1	0.5	0.13	0.5	4	Ser	Gly	Ser	-
PC2-3	128	2	2	0.5	2	8	Ser	Gly	Ser	Ser
PC2-5	128	2	2	0.5	2	8	Ser	Gly	Ser	-
PC3-1	128	2	2	0.5	2	8	Ser	Gly	Ser	Trp
PC4-4	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	Trp
PC4-6	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	-
PC4-B	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	-
PC4-F	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	-

^a NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacin; OF, ofloxacin; PEF, pefloxacin.

^b Not determined.

(6) Mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR을 이용한 GyrA의 변이 검출

(가) MAMA primers 제작

일부의 채집균과 *in vitro* 변이주의 *gyrA* gene의 염기 서열을 분석한 결과 일괄적인 변이를 관찰할 수 있었다. 83번이나 87번의 아미노산의 변이가 관찰된 반면 83, 87번 아미노산이 모두 변한 것은 관찰 할 수 없었다. 이런 변이를 찾기 위해서는 각 균주마다의 염기 서열 분석이 필요하고 채집균과 변이주 전부의 염기 서열을 분석하기에는 시간적으로나 비용 부담이 따른다. 그래서 이 실험에서는 mismatch amplification mutation assay (MAMA) primer를 이용한 PCR 방법으로 간단하고 정확하게 GyrA의 아미노산 변이를 찾고자 하였다.

Wild type의 *gyrA* gene의 염기 서열과 비교하여 하나의 염기를 mismatch시킨 reverse primer를 제작하였다 (Qiang et al., 2002). 83번째 아미노산은 그 염기가 감수성균은 AGC이지만 대부분의 내성균에서는 CGC나 AGA로 변한다는 것을 앞의 실험 결과 확인하였다. 이를 이용하여 primer의 염기를 TCG로 하고 그 다음에 오는 염기를 하나 바꾸어 reverse primer를 제작하였다 (Fig. 1-22). 이렇게 제작된 primer는 83번 아미노산의 염기가 AGC인 감수성 균은 염기가 하나만 바뀌어 있으므로 PCR 결과 그 primer에 상응하는 product를 형성하고 CGC나 AGA로 그 염기의 변이가 있는 내성균 들은 결국 2개의 염기가 바뀌어 있어 product를 형성하지 않게 된다. 87번 아미노산 염기의 변이는 GAC에서 GGC로의 변이가 관찰되었으며 primer는 GAC 바로 다음의 염기인 A를 T로 바꾸어 주고, 87번 아미노산의 염기인 GAC 중 AC에 상보적인 TC의 염기를 가지게 제작하였다.

(나) MAMA PCR

PCR은 Table 1-10의 WGYRS와 GYRS1 그리고 여기서 제작된 각각의 MAMA primer를 함께 사용 하였으며, annealing 온도를 59℃로 조절하여 실시하였다.

WGYRS, MAMAGYR83, GYRS1R primer을 이용한 PCR에서 감수성 균인 GE1은 776 bp의 product와 함께 484 bp의 product를 생성하였다. 이에 비해 83번째 아미노산 잔기에 변이가 있는 내성균인 KFE, RE1인 484 bp의 product를 생성하지 않아 83번 아미노산 잔기의 변이 유무를 관찰할 수 있었다. WGYRS, MAMAGYR87, GYRS1R primer을 이용한 PCR에서도 감수성 균인 PPD 130/91은 776 bp의 product와 함께 497 bp의 product를 생성하였지만 87번째 아미노산 잔기의 변이가 있는 *E. tarda* 변이주는 497 bp의 product를 형성하지 않았다 (Fig. 1-23).

이 결과를 바탕으로 앞에서 분석하지 못한 채집균 및 *in vitro* 변이주를 test한 결과 90%이상의 정확성을 나타내었으며, test한 모든 채집균 중 내성균은 83번째 아미노산, *in vitro*상의 변이주들은 87번째 아미노산의 변이가 확인되었다 (Fig. 1-24). 하지만 83, 87번 아미노산이 같이 변한 균주는 발견할 수 없었으며 그 원인을 알아보기 위하여 채집 균주 중 하나인 KFE도 같은 방법으로 ciprofloxacin에 노출시켜 83번에 이은 87번 아미노산의 변이 유무를 알아보고자 하였다. 실험 결과 KFE는 2단계에 걸쳐서 변이가 유도 되었으며, MAMA PCR결과 83번에 이어 87번의 아미노산 역시 변이가 관찰되었다 (Fig. 1-24).

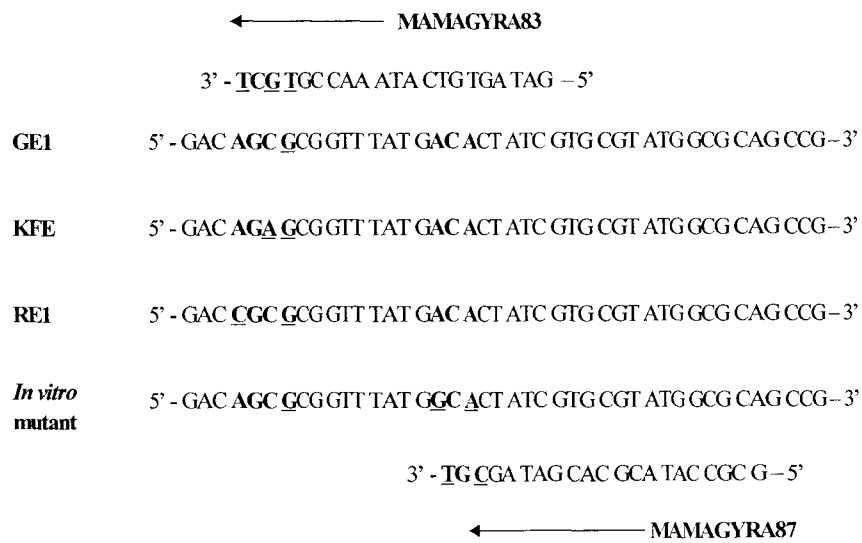


Fig. 1-22. Comparison of DNA sequence around the codons for amino acids of insult in GyrA in quinolone susceptible and resistant isolates.

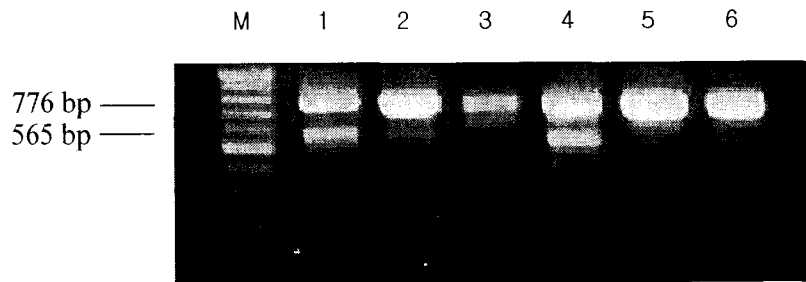
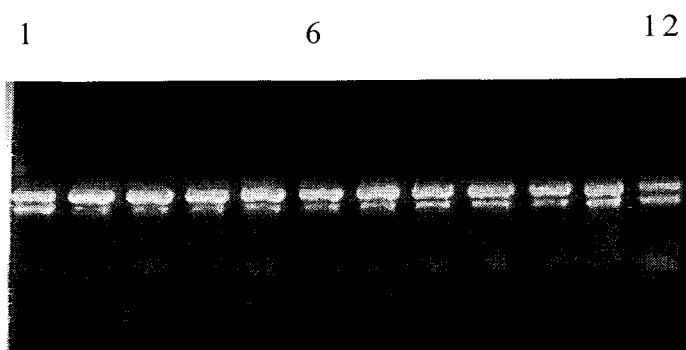
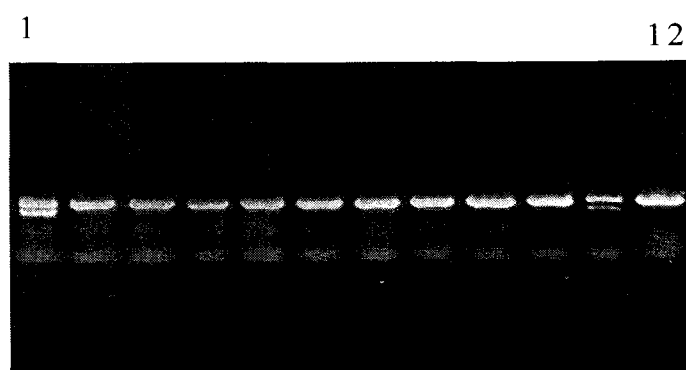


Fig. 1-23. Agarose gel of *E. tarda* MAMA PCR products. Lane 2, 3 ,5 ,6 indicate the 776 bp PCR products obtained from strains with mutation in *gyrA*, respectively (RE1, KFE, PN1-4, PC1-4 respectively). Lanes 1, 4 indicate that strains without corresponding mutations generate two fragments (GE1 776/484 bp, PPD 130/91 776/497 bp, respectively). Lane M, DNA marker (100 bp ladder).



(A)



(B)

Fig. 1-24. Agarose gel of *E. tarda* MAMA PCR products. (A), Products tested with MAMA primers from clinical isolates (quinolone resistance isolates) and *in vitro* mutants. Lane 1~6 indicate clinical isolates. Lane 7~12 indicate *in vitro* mutants. (B), Products tested with MAMAGYR87 primers from *in vitro* mutants (KFE Mutants). Lane 1 indicate KFE. Lane 2~12 indicate KFE mutant.

2. 결과에 대한 고찰 및 응용을 위한 해석

양식 산업에서 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella piscicida*, *Streptococcus* sp. 등 세균성 질병으로 인한 경제적 손실은 심각하며, 대처 방법은 주로 항생제에 의존하는 것이 현 실정이다. 하지만 항생제의 남용 및 오용으로 인한 약제의 잔류문제, 세균의 내성증가, 다른 세균으로의 내성전이, 다제 내성의 획득으로 질병 치료에 어려움을 겪고 있다.

이러한 내성균의 분포와 그 원인에 관한 연구가 일본의 경우 오래 전부터 주요 어류질병세균의 약제내성 경향을 주기적으로 파악하여 효과적인 약제를 사전에 제시해 주거나 내성균주가 출현하고 있는 약제를 사전에 파악해 둠으로써 어민 지도 자료로 활용하고 있다 (Kim & Aoki, 1993; Kusuda et al., 1990). 뿐만 아니라 어병 세균의 약제내성 전달 plasmid 및 내성 유전자에 관한 연구도 어류병원 균주 별로 다양하게 이루어져 있다 (Aoki, 1992; Depaola et al., 1988; Sourm et al., 1992; Toranzo et al., 1991). 우리나라에서는 *E. tarda*의 약제감수성에 관하여는 몇몇 보고가 있지만 (최 & 김, 1994, 1996), 이렇게 체계적인 조사 연구가 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다. 그래서 우선, 우리나라 양식 현장의 병어로부터 어병 세균을 분리하여 그 중에 tetracycline 내성균의 비율이 어느 정도로 높게 나타나는지를 분석하였고, 그러한 내성균의 다른 항생제에 대한 내성을 조사하였다.

1993년부터 2002년까지 우리나라 동해안과 남해안의 양어장에서 *Edwardsiella tarda* 127균주, *Vibrio* sp. 50균주, *Aeromonas hydrophila* 4균주, *Proteus mirabilis* 3균주, *Acinetobacter lwoffii* 한 균주를 병어로부터 분리하였으며, 분리된 균들은 대부분 *E. tarda*와 *Vibrio* 계열의 세균으로 확인되었다. 이들 균주의 tetracycline에 대한 내성정도를 MIC값으로 나타낸 결과, Table 3에서와 같이, *E. tarda*는 20균주, *Vibrio* sp.는 14균주, *Aeromonas hydrophila*는 2균주, *Proteus mirabilis*는 2균주 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 한 균주가 내성균으로 동정되었다. 그 중 *E. tarda* 127균주의 내성분포를 살펴보면, 54.3%는 $1.56\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 MIC값을 나타내어 Tc에 감수성을 보였으며 30%는 $1.56\sim 6.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 Tc에 대해 중간정도의 내성을 보였다. 그리고 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC값을 가진 15.7%는 Tc에 대한 내성균으로 정의할 수 있었다. 그것은 *tet* gene을 확인한 결과, $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC값을 가진 모든 *E. tarda*는 *tet* gene을 가지고 있었으나 그 이하의 MIC값을 가진 균들은 내성 유전자를 가지고 있지 않았으므로 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC값을 가진 *E. tarda*를 Tc 내성균으로 보는 것이 타당하였다. 결과에서 우리나라 양식장에서 나타난 어병 세균 중 tetracycline에 대하여 내성을 나타내는 세균은 약 20%를 보여 1973년부터 1983년까지 조사된 은어 양식장의 병어에서 분리된 *Vibrio anguillarum*의 내성 비율은 90%이상에 달한다고 보고한 Aoki et al. (1988)의 연구와는 차이를 보였다. 이러한 차이를 보인 것은 내성균의 직접적 검출을 위해 매년 실시된 Aoki의 연구와는 달리 병어로부터 분리된 균 중에서 내성 test를 실시하였기 때문에 낮은 비율로 나타난 것으로 여겨진다. Tc 이외에 이들 39균주가 갖는 또 다른 내성 분포를 조사해본 결과, Ampicillin(Am), Ciprofloxacin(Ci), Chloramphenicol(CAP), Gentamycin(G), Nalidixic acid(Na), Oxolinic acid(Oa), Penicillin(Pe) 등 여러 종류의 항생제에 대해서도 내성을 나타내어 본 실험에서 분리한 대부분의 균이 다제 내성균임을 확인할 수 있었다 (Table 1-5). Tetracycline계 약물은 교차내성을 가지므로 한 가지 tetracycline 항생물질에 내성이 생기면 다른 tetracycline에 대해서도 저항성을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나, Mendez et al. (1980)과 Chpora et al. (1993)의 연구에 따르면, tetracycline계 약물중

minocycline에 높은 MIC값을 보이는 내성유전자는 *tet B*, *tet M*뿐이며 나머지 *tet* 유전자는 낮은 MIC값을 보인다고 보고하였다. 본 실험에서 다양한 *tet* 유전자의 minocycline에 대한 MIC값을 조사해본 결과, 이전의 보고와는 달리 모든 내성 유전자에서 높은 MIC값을 나타내 차이를 보였다 (data not shown).

Edwardsiella tarda RE1과 *Aeromonas hydrophila* HA를 표준 균주로 이용하기 위하여 염기 서열을 분석하고 GenBank에서 X0006와 L06940 (Guillaume et al., 2000)의 accession no.로 등록된 *tet A*와 *tet E*의 nucleotides와 비교하였더니 각각 99.7, 98.5%의 homology를 보였으며, amino acid의 비교에서 *tet A*의 경우는 99.2%로 비슷한 %를 나타냈으나 *tet E*의 경우는 99.5%로 nucleotides와 비교했을 때 보다 증가된 homology를 보여 실험의 표준 균주로서 이용이 가능하였다.

본 연구에서는 specific하게 제작한 *tet gene*의 primer를 이용한 PCR기법으로 우리나라 양어장의 어병 세균의 Tc 내성 유전자의 분포와 그 기원을 추적하였다. *tet A*, *B*, *C*, *D*, *E*, 그리고 *G genes*의 conserved region을 sense primer, variable region을 각 type에 대해 특이적 primer로 PCR을 실시하여 PCR 생성물의 크기에 차이를 두어 어떤 종류의 *tet gene*이 검출되는지 명확하게 구별하였다 (Fig. 1-2). 또, 공통적인 1개의 sense primer와 6개의 antisense primer를 이용한 multiplex PCR을 실시하여 single PCR때와 동일한 band를 얻을 수 있어 본 방법의 특이적 반응을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-3).

분리된 tetracycline 내성균에서 *tet gene*을 검출하기 위해 20균주의 total nucleic acid를 주형으로 multiplex PCR을 실시한 결과 *E. tarda*에서 *tet A*가 40%, *tet D*가 35%, *tet B*가 10%, 그리고 *tet A · D*, *tet A · G*와 같이 두 종류의 gene을 가진 균주가 각각 10%, 5%로 나타났다. 가장 dominant한 *tet gene*은 *tet A*, *tet D*이고 *tet B*는 적은 수였으나 이전과 다른 분포를 확인할 수 있었으며 *tet A · D*, *tet A · G*와 같이 두 종류의 gene이 존재하는 경우 multiplex PCR을 이용하여 한번의 PCR로 확인하는 것이 가능했다. 이러한 결과는 Roberts (1996)에 의해 이미 보고되어진 *E. tarda*에서는 *tet A*, *D*만이 발견되었던 것과는 차이를 보였다. 그리고, *tet G gene*의 nucleotide sequence는 *Vibrio anguillarum*에서 처음 보고되어 졌는데 (Zhao et al. 1992), 본 실험의 결과에서는 *tet G*가 *Vibrio sp.*에서 발견되지 않았고 오히려 *E. tarda*에 존재함을 확인할 수 있었다. 실험에서 사용한 PCR assay법은 최근 들어 Warsa et al. (1996), Hanse et al. (1996)등 여러 연구가들에 의해 항생제 내성 유전자를 검출하는데 많이 이용되어 왔지만 본 연구에서처럼 conserved region으로부터 하나의 sense primer 그리고 PCR 생성물의 크기 차이로 *tet genes*이 구별되는 6개의 antisense primer를 제작하여 이용한 경우는 없었다.

Table 1-5에서 보듯이 양어장 환경에서 채집된 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. Kerry et al. (1995)의 조사에 따르면 저질에서의 OTC에 대한 내성 비율이 $26 \pm 8.7\%$ 로 나타나 본 실험 결과와 유사함을 확인할 수 있었으며, 해양 환경의 경우 해수에 존재하는 이가 양이온이 항생제와 불활성 복합체를 형성하여 저질 등에 축적된다는 보고도 있다 (Pusell et al. 1996). 그리고, 저질과 net의 부착물질에서 조사된 내성균의 빈도가 24.4%,

30.7%로 각각 높게 나타나 내성균의 reservoir 역할을 할 수 있을 것이라 추정되어졌다. 양식장 주변 환경에서 내성분포를 조사하여 분리되어진 균을 동정해본 결과, 해수와 저질, 조피볼락의 장에서는 *Enterobacter* sp.가 50~80%, net의 부착물질에서는 40%로 나타나 분리된 대부분의 내성균이 *Enterobacter* sp.임을 확인할 수 있었으며, net의 경우는 *Vibrio* sp.가 60%로 나타나 다른 결과를 보였다. *A. hydrophila*균은 해수, 저질, net의 부착물질 그리고 조피볼락의 장에서 5%이하로 동정되었으며 (data not shown), 이러한 내성균에는 어떤 종류의 *tet* gene이 검출되는지 multiplex PCR 방법을 이용하였다. Andersen et al. (1994)은 해양 저질에서 분리된 내성균 중 그람 음성균에 존재하는 *tet* 유전자를 조사해본 결과, *tet* A, B, C, D, 그리고 E등의 다양한 분포를 보였다고 보고하였지만 본 실험에서는 *tet* B, C만을 확인할 수 있었으며 *Vibrio* sp.는 *tet* B, *A. hydrophila*는 *tet* C만이 나타나 이 두 종류의 내성 유전자에 편중됨을 알 수 있었다 (Fig. 1-5, Table 1-6). Kerry et al. (1997)의 항생제 투여 후 내성 변화에 대한 연구에 의하면 항생제 투여기간에는 내성균 빈도가 변화하지 않았으며, 투여가 끝난 후에는 증가하는 경향을 보이다가 감소하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 이와 비슷하게 OTC를 투여한 후 조피볼락의 장내 세균에서의 내성 변화를 관찰한 결과 항생제 투여가 끝난 후 1, 4일째까지는 85, 83%로 내성균의 빈도가 증가하다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으며, 실험 마지막 날인 20일에는 항생제를 투여하기 전과 같은 내성균의 빈도를 나타냈다 (Fig 1-6). 분리된 내성균의 대부분은 *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*이었고 이들 균주들이 가지는 *tet* 유전자는 *tet* B, *tet* C임을 확인할 수 있었으며, 확인된 *tet* gene의 종류는 환경에서 조사한 결과와 동일하게 나타났다. 정확한 균의 동정이 되지 않았지만 *tet* B gene을 가지는 내성균도 있었으며, Tc 내성균이기는 하나 실험에 이용된 *tet* A, B, C, D, E 그리고 G를 가지지 않는 균도 존재하였다 (Table 1-7).

여러번 PCR을 수행할 경우 시간적, 경제적으로 손실이 많기 때문에, 본 실험에서는 균이 가지고 있는 *tet* gene의 종류를 한번의 PCR로써 구별할 수 있는지에 대해 실험을 하였다. 어느 한 template에 multiprimer 즉 *tet* A, B, C, D, E, 그리고 G에 대한 specific primer를 모두 적용시켰을 때 원하는 하나의 PCR product가 생성되는지 확인하였고, 이러한 multiprimer를 multitemplate에 적용했을 때, 즉 6종의 primer에 대해 6종의 specific template을 반응시켰을 경우 6개의 size가 구별되는 PCR 생성물이 형성되는지를 확인하였다. 이러한 결과들은 우리나라의 tetracycline 내성 유전자 분포가 이전의 보고와 다르다는 것을 보이고 있으며, 내성기작 중 efflux를 제외한 ribosomal protection이나 enzymatic 기능을 가진 *tet* genes에 관한 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

위에서 언급한 여러 가지 세균성 질병들은 우리 나라 양식산업에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있으며, 그 중에 *Edwardsiella tarda*는 특히 해수 및 담수에서 발병하여 해마다 심각한 피해를 주고 있다. *Edwardsiella tarda*를 비롯한 세균성 질병에 대한 대처 방법으로 앞에서의 tetracycline을 포함한 여러 항생제가 주로 사용되어 왔는데, 최근 분자의 화학적 변형에 의한 항생제가 많이 개발되고 있다. 이러한 항생제들 중 하나인 quinolones는 nalidixic acid의 개발을 시작으로 여러 세대의 항생제가 개발되었으며 일부는 진행 중에 있다. 현재 우리 나라 수산업에 사용되는 quinolones는 nalidixic acid, oxolinic acid, norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin등이 있으며, *E. tarda*를 포함하는 세균성 질병의 치료에 사용되고 있다. 하지만 우리

나라에서는 다른 선진국에 비해 항생제에 대한 규제 및 내성균의 원인에 대한 연구가 부족한 실정이다. 특히 *E. tarda*의 약제 감수성에 관여하는 몇몇의 보고가 있었지만 (최와 김, 1994, 1996), quinolone 계열 항생제의 내성균에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 그래서 우리나라 양어장의 병어로부터 분리한 *E. tarda*로부터 quinolones의 내성 정도를 조사하고 내성 획득의 원인을 구명하고자 하였다.

1994~2003년까지 우리 나라 연안의 양어장의 병어로부터 136개의 *E. tarda* 균주를 구해서, 이들 균주 중 nalidixic acid에 대한 내성을 보이는 균들을 선택하여 quinolone 내성 정도를 MIC값으로 나타낸 결과 2003년으로 갈수록 내성균이 증가함을 알 수 있었으며, 다른 quinolones에 대해서도 다양한 MIC값을 보임을 알 수 있었다 (Table 1-8).

Quinolone에 대한 내성의 원인을 분석하기 위하여 quinolone 내성에 관여하는 유전자의 하나인 *gyrA* gene의 염기 서열을 구명하고 변이 정도를 파악하고자 하였다. 9종의 그람 음성균에서 *gyrA* gene을 비교하여 제작된 degenerate primer로 623 bp의 염기 서열을 결정할 수 있었으며, cassette ligation-mediated PCR로 전체 염기 서열을 결정할 수 있었다. 여기서 결정된 *E. tarda*의 *gyrA* gene은 다른 내성 세균들의 *gyrA* gene 및 *parC* gene과 상동성을 보였으며 이 결과로 여기서 밝힌 gene이 *gyrA* gene임을 확인할 수 있었다 (Table 1-11).

gyrA gene의 upstream 과 downstream의 염기 서열을 분석한 결과 어떤 다른 균의 *gyrB* gene과도 상동성을 보이지 않았다. 이러한 분석으로 *gyrA* gene과 *gyrB* gene은 근접하지 않음을 알 수 있었고, 이와 같은 Noncontiguous gyrase genes는 많은 수의 그람 음성균에서 발견된 바 있다 (Dimri and Das, 1990; Kureishi et al., 1994; Wang et al., 1993). 반면 *gyrB-gyrA*로 근접한 gyrase genes는 *Mycoplasma pneumoniae* 등과 같은 일부의 그람 양성 세균에서 보고되었다 (Colman et al., 1990; Moriya et al., 1985).

GyrA gene의 complementation 실험을 위하여, promoter 부위를 포함하는 *E. tarda gyrA* gene의 전체를 plasmid에 cloning하여 temperature-sensitive *gyrA* mutant인 *E. coli* KNK453에 transformation시켰다. Transformation된 plasmid는 *E. coli* KNK453이 43°C에서 자랄 수 있게 하였으며 이 결과는 1) 완전한 *gyrA* gene이 성공적으로 복제되었다는 것 2) *E. tarda gyrA* gene의 promoter 부위가 *E. coli* system에서도 작용을 한다는 것 3) *E. tarda GyrA-E. coli GyrB* holoenzyme 복합체가 기능적으로 작용한다는 것을 나타내는 결과라 할 수 있다.

다음으로 Quinolone 내성에 따른 *gyrA* gene의 변이 특성 및 정도를 알아보기 위하여 각 gene들의 QRDR의 염기 서열을 분석하였다.

*E. coli*의 경우 *GyrA*의 Ser-83과 Glu-87의 아미노산의 변이가 quinolone 내성의 가장 주요한 변이로 알려져 있으며 (Vila et al., 1994; Yolanda et al., 2003), 이러한 보고를 바탕으로 우선적으로 *GyrA*의 QRDR을 분석한 결과 모든 내성균에서 83번 아미노산 Ser의 Arg로의 변화가 관찰되었다 (Table 1-12). 이외의 *GyrA*에서의 다른 변이가 관찰되지 않았지만, 이들 내성균은 여러 quinolone 항생제에 다양한 MIC값을 보였다. 이는 *GyrA*의 변이에 의한 내성 획득이 아닌 다른 원인으로 생각할 수 있으며, *ParC*, *GyrB*, *ParE*의 아미노산 변이가 그 원인 중 하나로 추정할 수 있다.

그래서 본 실험에서는 이러한 gene들의 염기 서열 또한 결정하였다. *ParC* gene은 701개의 아미노산을 암호화하는 2106 bp의 ORF를 가지고 있었으며 이미 알려져 있는 여러 다른 균들과 상동성을 비교함으로써 확인될 수 있었다. 그리고 *parC* gene의 upstream을 분석한 결과 *E. coli*등 다

큰 균들의 *parE* gene과 상동성을 보임을 알 수 있었다. Noncontiguous gyrase genes과는 대조적으로 contiguous TopoIV genes가 여러 그람음성균에서 보고가 되었으며 *E. tarda* 역시 이 같은 특징을 보임을 알 수 있었다. *parE* gene은 631개의 아미노산을 암호화하는 1896 bp의 ORF를 가지고 있었다. *gyrB* gene 역시 염기 서열이 결정되었고 804개의 아미노산을 암호화하는 2415 bp의 ORF를 확인 할 수 있었다. 이러한 gene 역시 대표적인 그람음성균인 *E. coli*와 매우 높은 상동성을 보였고 promoter 부위와 inverted repeating sequence 등을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-15, 1-16, 1-17, 1-19, 1-20).

Quinolone 내성에 따른 DNA gyrase 및 TopoIV gene들의 변이 특성 및 정도를 알아보기 위하여 각 gene들의 QRDR의 염기 서열을 분석하였다. 결과 GyrA의 Ser-83 이외의 ParC의 57-D, 89-D, 107-A 150-I 아미노산의 변이를 보이는 균이 확인되었다 (Data not shown). 하지만 이들은 일부의 균에서만 발견되었으므로 내성 획득과의 어떤 연관관계를 설명하기에는 부족함이 있다. 그래서 다음으로 Wild type의 *E.tarda* 균을 *In vitro* 상에서 Mutation을 유도하는 실험을 실시하였다.

이 실험은 항생제가 첨가된 MH agar에 균을 노출시킴으로써 실험적으로 gene들의 변이를 유도하는 실험으로 총 6단계로 실행하였다. 각 단계의 균들을 임의적으로 선택하여 GyrA, ParC, GyrB, ParE 의 아미노산 변이를 분석하였다 (Fig. 1-21, Table 1-15). 결과 GyrA 에서는 모든 단계에서 87-Asp가 Gly로 변이를 보였다. 이는 앞에서 분석한 내성균과는 다른 변이로 *E. coli*에서와 같이 아미노산 83번과 함께 87번 또한 내성의 획득에 관여됨을 알 수 있었다. 하지만 83, 87번의 아미노산이 같이 변이를 보이는 균주는 관찰할 수 없었는데, 이는 그 내성치가 다른 균에서처럼 그렇게 급격하게 높지 않기 때문일 것이라 추정된다. 추가적으로 83번 아미노산의 변이를 보이는 채집균을 다시 *in vitro* 상에서 변이를 유도했을때 83번과 87번의 아미노산이 같이 변하는 것을 확인하였으며 *In vitro* mutant를 계속적으로 높은 항생제에 노출시키면 같은 결과를 보일 것이라고 추측된다.

또한 본 연구에서는 GyrA의 83, 87번의 아미노산의 염기 서열을 바탕으로 MAMA primer를 제작하였다. 이는 앞에서의 실험 결과 그 부분의 염기가 특징적으로 변한 것을 바탕으로 제작되었으며, 변이를 보이는 균의 염기 서열과는 2개의 염기를 바꾸어 줌으로 변이가 있는 균에서는 특이적인 product를 형성하지 못하게 한다. 이 primer는 test한 거의 모든 균에서 정확한 결과를 보여주었다 (Fig. 1-23, 1-24). 많은 수의 sample을 cloning하여 QRDR의 염기 서열을 분석하기에는 무리가 따르며, 이러한 PCR법은 이러한 과정 없이 PCR 결과만으로 GyrA의 변이 정도를 파악할 수 있으므로 간단하고 편리한 방법이라 할 수 있다.

본 연구에서는 처음으로 *E. tarda*의 quinolone 내성 획득에 관여하는 DNA gyrase 및 TopoIV gene들의 염기 서열을 결정하였으며 quinolone의 내성 획득과 이러한 gene들의 변이와의 관계를 설명하였다. 앞으로 이러한 gene의 변이 이외에도 quinolone 내성 획득의 원인이 되는 efflux system에 관여하는 gene에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다. 또한 *in vitro* 실험 외에도 *E. tarda* 균을 어류에 감염시키고 항생제를 투여하여 실험 시 분리되는 *E. tarda*의 내성 획득의 정도와, 내성 획득에 관여하는 gene의 변이를 분석하는 *in vivo* 실험 또한 추가되어야 하겠다.

제 2 절 어류의 방어체계 및 생리적 기능에 미치는 영향

1. Chloramphenicol의 경구투여에 따른 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 생리적 기능 및 혈액학적 변화

가. 연구 방법

(1) CAP의 투여 및 시료의 채취

실험어는 동해 소재 양어장에서 육성 중인 평균 체중 88.7 g 넙치, *P. olivaceus*를 분양 받아 절식하면서 2주 동안 순치시켰다.

Chloramphenicol (CAP; 헤로세친/ 중근당)을 Phosphate buffer saline (PBS)에 녹여 보존액을 만들어 희석하여 사용하였다. CAP는 넙치 28마리를 MS-222로 마취시켜, 어체 무게 당 150 mg/kg을 강제로 4일 동안 매일 하루에 한번 씩 강제 투여하였으며, 대조구는 동량을 PBS로 경구 투여하였다. CAP 투여 후 실험어는 20°C의 정수식 수조 (크기: 288 L)에 수용하였으며, 수조의 물은 수질의 악변을 방지하기 위하여 미리 20°C로 정정한 여과해수로 매일 전부 또는 반씩 교환하여 주었다. 4회의 CAP 경구 투여 후, 실험어는 사료 투여를 중지하였으며, 총 10일 동안 반응을 조사하였다.

CAP의 강제 투여 1일 후와 그 후는 추가 투여 직전에 실험어를 채포하여 별도로 수용하고 (1 DT, 2 DT, 3 DT, 4 DT), 남은 실험어는 투여 스케줄에 따라 3일간 연속적으로 강제 투여하였다. 4회의 강제 투여가 완료된 실험구 및 대조구 어류는 투여 종료 1, 3일 및 6일 (1 AT, 3 AT, 6 AT)에 각 4미씩을 채포하여 시료로 사용하였다. 실험어는 먼저 MS-222로 마취시킨 후, 미부 혈관으로부터 채혈하고 나서 해부하여 간, 신장, 위, 장, 두신 및 비장 조직을 적출하였다.

(2) 조직내 CAP 잔류량 분석

CAP의 잔류량 분석은 Cravedi *et al.* (1985)의 방법에 따라 HPLC system (HP1100 Series; Hewlett-Packard)을 이용하였다. 먼저, CAP (150 mg/kg)을 강제 투여한 넙치의 간, 신장 조직을 분리 후, 조직 (0.2 g)은 70 % 초산 (1.8 ml)으로, 1분 동안 균질화하였다 (polytron, PT). 균질화한 조직은 원심분리하여 (15,000 rpm, 15 min) 상층액을 회수하였다. 상층액은 다시 증발시킨 후, 남은 잔기는 HPLC 분석용매 (2 ml)에 녹여, 0.45 μ m syringe filter (Nalgene)로 여과 후, 각 샘플 당 100 μ l씩 분석하였다. 분석을 위해 사용한 칼럼은 Spherisorb ODS C18 (5 μ m, 125 \times 4 mm Hewlett-Packard)을 사용하였으며, 분석조건은 유속이 1 ml/min이며, column oven은 30°C로 고정하였고, 검출과장은 280 nm의 흡수율에서 수행하였다. 분석에 사용된 이동상은 methanol과 heptane sulphonic acid sodium salt를 3:7의 비율로 혼합한 후, pH를 3.3에 맞추어서 사용하였다.

(3) 조직학적 영향 분석

적출한 간, 신장, 위, 장, 두신 및 비장을 절취하여 Bouin액에 고정한 다음 상법에 따라 포매

하여 조직절편을 만들었다. 각각의 조직절편은 hematoxylin-eosin (H&E)법으로 이중 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

(4) 생리적 기능 분석

(가) CAP 투여의 순환기계통에 미치는 영향

CAP 투여에 따른 넙치의 순환기계통에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Physiography (Narco)를 이용하여 넙치의 혈압변동에 미치는 영향을 조사하였다. 어류의복대동맥에 cannulation 관을 삽입하여 어류의 혈압변동을 physiography로 측정하면서 CAP을 농도별로 투여하였다. 어류 혈관 및 심장조직에 대한 영향을 분석하기 위하여 어류의 관 및 심장조직을 절취하여 Krebs's ringer solution하에서 항균물질이 각 조직의 수축, 이완 및 심박수 등의 변화에 대한 영향을 측정하였다.

(나) CAP 투여에 따른 소화기 계통에 미치는 영향

CAP 투여에 따른 넙치의 소화기계통에 미치는 영향을 조사하기 위하여 상기와 마찬가지로 어류의 소화기계 조직(전장, 중장, 후장부위)을 절편하여 이것을 생체반응측정기에 설치한 후, Carbachol HCl (CCH)에 대한 운동성을 100%로 결정하였을 때에 CAP의 농도 존재 하에서 근육의 수축 및 이완, 소화기계의 흡수력 등을 분석하였다.

(다) CAP 투여에 따른 넙치의 호흡기에 대한 영향

넙치에 CAP를 고농도로 침치시킨 후, 24, 48 시간 후에 넙치의 아가미 조직의 조직학적 변화를 상기와 같이 조직전처리 후 H&E 염색으로 광학현미경하에서 관찰하였다.

(5) 혈액학적 영향 분석

각 어류로부터 혈액학적 영향을 분석하기 위해 어류의 미부혈관으로부터 채혈 후, Ht 수치, 적혈구 및 백혈구 수치를 측정하였다. 혈청성분은 원심분리로 분리하여, 분석하기 전까지 -75℃ 초저온 냉동고에 보관하였다. 분리한 혈청내의 성분 분석 [alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), γ -glutamyltranspeptidase (GGT), blood urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH), uric acid (UA)]은 혈액 분석기 (CHIRON /PIGNOSTICS - Express p/vs)를 이용하여 상기의 항목을 분석하였다.

(6) 통계학적 분석

결과의 통계적 처리는 Sigma plot을 이용하여 students's t-test 로 실시하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

나. 연구 결과

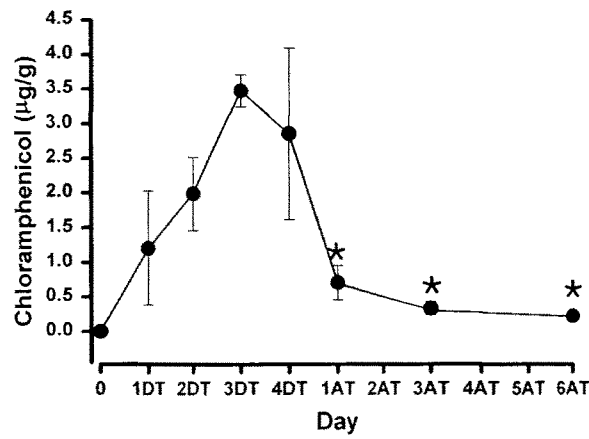
(1) 조직 내 CAP 잔류량 및 조직학적 영향

넙치의 간 및 신장 내의 CAP 잔류량은 HPLC 분석법을 이용하여 분석하였다. 분석한 결과 넙치 간 내의 CAP 잔류량은 CAP를 투약한 실험구에서 투약기간 동안 일정하게 증가하는 경향을 보였으며, 투약 종료 후 3 DT와 비교할 때 1, 3, 6 AT에서 유의적인 감소가 관찰되었다 (Fig. 2-1A). 신장 내의 CAP 잔류량은 간과 마찬가지로 투약기간 중에 실험구에서 증가하는 경향을 보였고 투약종료 후 감소했다. 또한 1 DT와 2 DT사이에 유의적인 증가와 1 AT와 3 AT사이에 유의적인 감소가 나타났다 (Fig. 2-1B). 실험결과 넙치의 CAP 잔류량은 신장에서 보다 간에서 잔류하는 양이 더 많았으나, 약물투여 종료 후 CAP 소멸은 신장보다는 간에서 더 빨리 일어났다. 조직내의 CAP가 잔류함에도 불구하고, 어류의 CAP 투여에 따른 각종 장기 (간, 신장, 장, 위)의 조직학적 영향을 광학현미경하에서 관찰시 약물에 의한 조직학적인 변화는 관찰할 수 없었다.

(2) 생리적 기능 변화

넙치의 혈압변동에 있어서 CAP의 투약은 physiography로 측정시에 고농도로 투약을 함에 따라 약간의 영향을 미쳤다. 동시에 혈관 및 심장조직을 적출하여 이것에 CAP의 영향을 측정시에 Carbachol에 대한 수축력에 약간의 감소를 나타냄을 알 수 있었다. 넙치의 위, 장관 조직을 절편하여 이것을 생체반응측정기에 설치한 후, Carbachol HCl (CCH)에 대한 운동성을 100%로 결정하였을시에 CAP의 농도 존재하에서 근육의 수축 및 이완, 소화기계의 흡수력등에는 아무런 변화가 관찰되지 않았다 (data not shown). 넙치에 CAP를 다양한 농도로 침지시켜 넙치의 호흡기인 아가미 조직의 변화를 고정하여 광학현미경하에서 염색후 관찰시에, 고농도에서 조차도 유의적인 변화는 나타나지 않았다 (data not shown).

(A)



(B)

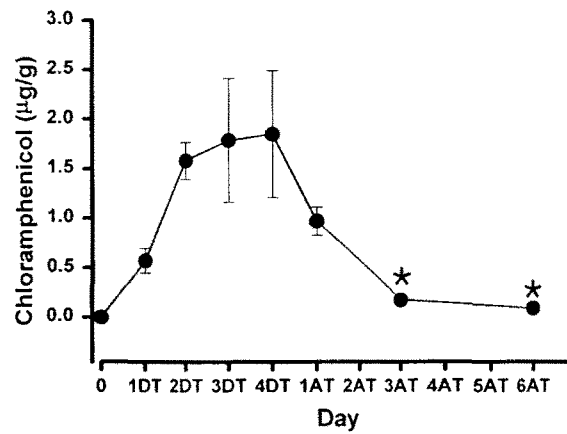


Fig. 2-1. Concentration of chloramphenicol in the liver (A) and kidney (B) of olive flounder orally administrated at a dose of 150 mg/kg (B.W./day) for 4 days. The concentrations were monitored during the administration and followed 6 days after the administration. (mean±S.D.; n=4). * indicates $p \leq 0.05$

(3) 혈액학적 영향

넙치의 CAP 투여 후 혈액 내의 효소 활성의 변화를 관찰 하고자 혈액분석기를 이용하여 alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), γ -glutamyltranspeptidase (GGT), blood urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH), uric acid (UA) 등의 항목을 분석하였다 (Table 2-1). ALT 수치는 실험 기간 중에는 실험구와 대조구를 비교하였을 때 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 실험구는 최종 투약 후 6 AT에서 대조구와 유의적인 차이를 나타내었다. AST와 ALP 수치는 투약 기간 동안 실험구의 수치는 증가하는 경향을 나타내었으며, 투약종료 후 AST 수치는 감소되는 추세가 나타났고, ALP 수치는 유의적으로 투약종료 후 감소하였다. 그러나, 실험구는 대조구와 비교하였을 때, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. GGT와 LDH 수치는 CAP 투약기간과 투약종료 후 실험구와 대조구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 투약종료 후 실험구에서 GGT 수치는 감소하는 경향이 있었고 LDH 수치는 약간 증가하는 경향을 보였다. CK 수치는 투약기간 동안 실험구에서 유의적으로 증가하였고, 투약종료 후 6 AT에서 유의적으로 감소하였다. 그리고 2 DT까지는 대조구와 실험구가 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 투약종료 후 1 AT에서 대조구와 실험구에서 유의적인 차이가 나타났다 ($p < 0.05$). BUN 수치는 실험구와 대조구간의 전반적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나, 실험구는 투약기간 동안 증가추세를 보이다 투약종료 후 감소하는 경향을 보였고, 3 AT에서 6 AT동안 실험구는 BUN 수치가 증가하는 경향을 나타내었으나, 대조구와는 유의적 차이가 없었다. UA 수치는 BUN 수치와 같이 실험구와 대조구사이의 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 실험구에서 1 AT까지 대조구와 차이가 나지 않으나, 3 AT에서부터는 UA 수치가 증가하는 경향을 나타내었다.

CAP 투여에 따른 혈액 성상의 변화를 알아보기 위하여 hematocrit (Ht) 수치, 적혈구와 백혈구 숫자를 측정하였다. Ht 수치는 시간이 경과함에 따라 대체적으로 감소하는 경향이 있었고 실험구와 대조구를 비교하였을 때 실험구의 수치가 현저하게 감소하는 경향을 보였으며 (Fig. 2-2), 더불어, 적혈구의 수도 감소하였다. 그러나 본 실험의 농도구에서는 백혈구의 수는 다소 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 나타나지 않았다.

Table 2-1. Results of serum biochemistry analysis from olive flounder orally administered at a dose of 150 mg/kg (B.W/day) chloramphenicol for 4 days. Samples were taken at 1, 2, 3, 4 days during the treatment and 1, 3, 6 days after the treatment. All control fish are treated with PBS. Abbreviations and units ALP, alkaline phosphatase, IU/ ℓ ; ALT, alanine aminotransferase, IU/ ℓ ; AST, aspartate aminotransferase, IU/ ℓ ; CK, Creatine kinase, IU/ ℓ ; GGT, γ -glutamyltranspeptidase, IU/ ℓ ; BUN, blood urea nitrogen, IU/ ℓ ; LDH, lactate dehydrogenase, IU/ ℓ ; UA, uric acid, IU/ ℓ . Values are means \pm S.E.M. * indicates $p \leq 0.05$.

Group	concentration	1DT	2DT	3DT	4DT	1AT	3AT	6AT
AST	0	30.27 (4.38)	33.85 (3.95)			24.65(7.25)		14 (2.2)
	150	9.7 (0.2)	13.9 (1.87)	23.9 (3.1)	42.3 (12.3)	15.5 (3)	5.85 (3.55)	15.9 (1.2)
ALT	0	2.09 (0.14)	2.03 (0.7)			1.4 (0.15)		0.43 (0.13)
	150	2.5 (0)	2.45 (1.45)	1.45 (0.25)	2.63 (0.49)	2.05 (0.58)	2.81 (1.1)	3.4 (0.12)
ALP	0	76 (3.98)	75.5 (23.5)			59 (12)		59.5 (1.5)
	150	67.5 (10.5)	75.7 (1.3)	91.5 (12.5)	109.5 (2.5)	58 (3)	65.5 (95.5)	53 (0)
GGT	0	3.5 (0.5)	4 (2)			3 (0)		4 (0)
	150	2.25 (1.25)	4 (0.91)	5 (0)	6.67 (1.86)	4.67 (1.67)	3.33 (1.45)	3.67 (1.2)
LDH	0	21.67 (5.84)	31.5 (12.5)			5.5 (3.5)		28.33 (15.45)
	150	12.5 (4.5)	6.2 (0.2)	8.5 (0.6)	2.5 (0.5)	6.5 (2.5)	15 (0)	15.5 (5)
UA	0	0.38 (0.05)	0.5 (0)			0.33 (0.09)		0.3 (0.06)
	150	0.55 (0.87)	0.52 (0.07)	0.6 (0.1)	0.53 (0.09)	0.5 (0)	0.067 (0.03)	0.57 (0.09)
BUN	0	3.68 (0.58)	4.35 (0.55)			4.47 (0.72)		3.4 (0.63)
	150	3.5 (0.96)	4.88 (0.78)	5.33 (0.88)	7.2 (1.5)	4.74 (1.07)	3.03 (0.15)	4.93 (0.35)
CK	0	1024 (295.5)	1975 (704.5)			1159 (99.5)		1771 (242.5)
	150	229.5 (51.5)	353.7 (128.7)	1240 (20)	5332 (983)	3418 (510.5)	3037 (410.5)	861 (182)

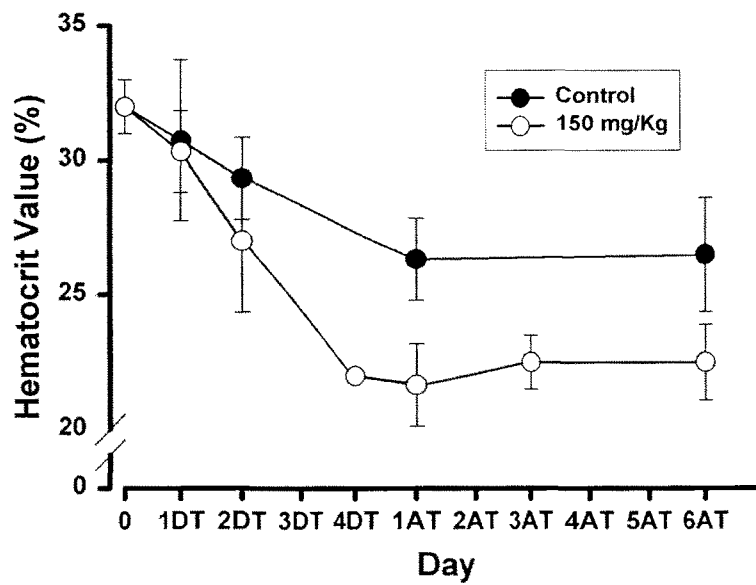


Fig. 2-2. Hematocrit results from olive flounder orally administered at a dose of 150 mg/kg (B.W./day) chloramphenicol for 4 days, and sampled at 1, 2, 3, 4 days during treatment and 1, 3, 6 after treatment. (mean±S.D.; n=4).

다. 고찰

Chloramphenicol (CAP)은 광범위 항생제로 동물 질병을 치료하는 데 있어 효과적인 약물이며, 양식어류에서는 CAP가 세균성 질병을 치료하는 데 효과적이라고 알려져 있다 (Feder *et al.*, 1981).

현재 국내외에서 CAP 대신에 같은 종류인 thiamphenicol (TAP)이 다양한 양식어종에서 질병 치료용으로 사용되어 지고 있다. 이 TAP를 15, 30 mg/kg/bw/day으로 농어에 단일 강제 투여하였을 때 어체 내에 약물이 잔류하며, 저 농도에서는 투약 후 6시간째 TAP 잔류량이 최고치로 나타나며, 고농도에서는 8시간이 지난 후에 최고치로 관찰되며, TAP 잔류량이 근육, 피부, 척추 보다 내부 장기인 간에서 더 많다는 사실을 보고하였다 (Castells *et al.*, 2000; Malvisi *et al.*, 2002). 또한, 30 mg/kg TAP를 단일 강제 투여했을 때 어병 세균에 대한 MIC (Minimum inhibitory concentration) 50의 2-3배 이상 높은 양이 혈청에 잔류하며, 저농도로 TAP를 투약했을 때 최고 잔류가 5일 이었고, 고농도 투약 때에는 6일로 나타난다고 보고하였다 (Intorre *et al.*, 2002). 그리고 CAP를 대하 (*Penaeus chinensis*)에게 3일간 2,000 mg/kg를 사료에 혼합하여 투여하였을 때 약물의 반감기는 10.04 시간으로 보고하였으며 (Weifen *et al.*, 2004), 사람에게서 세균성 질병을 치료하기 위해 어린이에게 fosphenytoin을 단일 근육 주사하고 CAP sodium succinate을 25 mg/kg으로 72시간 동안 6시간마다 정맥 주사하여 얻은 자료에서 처음 투약 후, CAP 잔류량이 점차 증가하다가 투약 종료 후 감소하는 것을 보고하였다 (Ogutu *et al.*, 2002). 이와 같은 자료를 바탕으로 본 연구에서는 생리적 독성을 측정하기 위하여 양식 어류 내부 장기인 간과 신장의 CAP 잔류량을 HPLC로 분석하여 보았다. CAP 투여한 양식 넙치의 간과 신장 모두에서 투약기간이 늘어날수록 잔류량이 증가하는 것과 투약이 끝난 다음 급속히 줄어드는 경향을 볼 수 있었고 신장과 비교할 때 간에서 더 많이 잔류함을 관찰할 수 있었으며, 이는 TAP의 농어에 대한 잔류량을 조사한 결과와 유사하였다.

동물에 대한 항생제의 생리적 독성의 평가 지표로 혈청학적 분석이 많이 이용되어지고 있으며, CAP의 동종 약물인 TAP를 쥐에게 250과 375 mg/kg를 위장관에 직접 투약했을 때 RBC, Ht와 hemoglobin (Hb) 수치가 증가하였고 특히, 375 mg/kg 투약 시에 Hb 수치가 크게 증가한다고 보고하였다 (Turton *et al.*, 2002). 게다가, 실험 동물에 사료 및 물 섭취 감소에 따른 탈수에 의해서도 RBC, Ht와 Hb 수치가 영향을 받을 수 있다고 보고하였다 (Maejima and Nagase, 1991). 본 연구에서 전체적으로 투약구가 대조구에 비해 낮은 Ht 수치를 나타내었으므로 잠재적으로 적혈구 생성에 CAP가 영향을 끼친다는 것을 추정할 수 있었다. TAP와 CAP를 1,750, 3,500 mg/kg으로 각각 마우스에 투약하여 16시간째 혈청의 생화학적 검사를 수행하였을 때 AST, ALT 및 GLDH의 상승에 의해서 간 손상을 확인하였다 (Turton *et al.*, 2000b). 그러나, TAP와 CAP 4,000 mg/kg을 각각 마우스에 투약하고 36시간째 검사하였을 때는 GLDH는 상승하였지만, AST, ALT는 변화가 없으며, TAP와 CAP를 각각 4,000, 6,000 mg/kg을 쥐에 투약하였을 경우 ALP만 상승하였을 뿐 ALT, AST 및 GLDH에서는 커다란 증가가 없었으며, ALP 증가는 쥐에서 TAP가 유도한 장관 변화와 관계가 있을 것으로 보고하였다. 본 연구에서 CAP 투여에 따른 간 경변과 신장 조직 이상을 알아보기 위하여 혈청내 다양한 효소를 측정하였을 때, AST는 CAP 투약구에서 투약기간 동안 증가하였고 투약종료 후 감소하는

경향을 보였지만 대조구와는 유의적인 차이가 없었기 때문에 AST가 증가하였다고 해서 이것이 CAP에 의한 간 질환인지를 감별하는 자료가 될 수는 없었다. 그리고 ALT의 변화도 수치 차이가 적기 때문에 유의적인 차이가 나타나도 커다란 영향을 받았다고 볼 수 없었다. 그리고 ALP와 GGT의 모든 투약구의 수치가 투약기간 중에 상승하고 투약종료 후 감소하는 경향을 나타내었으나 투약구와 대조구간의 유의적인 차이가 없었으므로, CAP에 의한 간경변에 의한 것이라고는 추정할 수 없었다. LDH 검사는 다양한 심장질환, 간 질환, 신장질환, 악성 종양 백혈병, 악성빈혈 등의 진단의 지표가 되며, UA는 단백질의 대사 이상이나 신장 기능 장애의 진단을 위해 중요한 수치로 알려져 있다 (金井, 金井, 1983). 그러나 본 연구에서 LDH와 UA는 신장 이상의 지표로 삼을만한 유의적인 변화가 나타나지 않았다. BUN과 CK 수치는 만성 신부전증, 근 영양실조, 말초순환부전 등의 진단의 지표가 된다고 알려져 있는데 (金井, 金井, 1983), 본 연구에서 CK와 BUN이 투약기간 동안 실험구가 유의적으로 증가하였거나 증가하는 경향을 보였으나, 대조구와의 유의한 차이를 보이지 않았기 때문에 신장 기능에는 이상이 없는 것으로 추정되었다. 한편, 다양한 동물에서 CAP에 의한 독성의 특징은 조직학적 영향으로 마우스의 골수조직을 분리하여 관찰하였을 때, 세포질에서 백혈구와 myeloid, monocytic cell precursors 내에 공포가 발견되거나 (Turton *et al.*, 2002b), 어류에서는 혈청내의 공포, 핵의 변화, 적혈구의 감소, 적혈구의 지방대사의 장애등이 나타난다고 보고하였으나 (Kreutzmann, 1977), 본 연구에서 다양한 조직에 대하여 광학현미경하에서의 조직학적 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 어류 내부 장기 중 간 및 신장 조직등의 전자현미경적 관찰이 필요하지 않는가 추정되었다.

본 연구를 종합하여 보면, CAP를 150 mg/kg으로 4일 동안 양식 넙치에 투여했을 때, 간과 신장에서 약물이 잔류함에도 불구하고 병리조직학적 변화는 없고 생리적 기능 분석 및 혈청학적 분석을 통하여 CAP 차체는 어류의 순환기 및 호흡기 기능과 간, 신장 조직에는 손상을 입히지 않는다고 추정되었다. 그러나 Ht 수치 및 적혈구 수의 감소로 CAP가 적혈구 생성에 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다. CAP를 본 실험에 사용된 농도로 양식 넙치에 투여했을 때, 실험기간 중 약물에 의한 폐사는 일어나지 않았으나, 현장에서 불법적으로 사용된 CAP에 의한 약물사고가 본 농도에서도 발생하고 있다. 이것은 몇몇 연구들에서 CAP가 홀로 동물에 대한 부작용을 일으키기보다 다양한 환경인자들과의 상호 작용등에 의하여 부작용이 발생한다고 보고되었다 (Vacha *et al.*, 1981). 특히, CAP가 자외선과 함께 작용하면 독성이 증가하고, 하루 중 자외선을 4시간 보다 6시간 쬐었을 때 2.5배 이상 독성이 증가한다고 보고되었다 (Vacha *et al.*, 1981). 따라서, 향후 CAP와 다양한 환경인자들에 의한 양식 어류의 부작용에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

2. Chloramphenicol의 경구투여에 따른 양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 방어 체계의 영향

가. 재료 및 방법

(1) 실험어 및 약물 처리

실험어는 동해안 소재 양어장에서 육성 중인 평균 체중 60 g 정도인 넙치를 분양받아 절식 하면서 2주 동안 순치시켰다.

Chloramphenicol (CAP; 헤로세친/ 종근당)은 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 보존액을 만들어 희석하여 사용하였다. 양식넙치의 식세포에 대한 *in vitro* 상의 CL 반응에 대한 영향을 측정하기 위하여 2주간 순치시킨 넙치의 두신 (head kidney)을 분리하여 아래와 같은 CL 반응의 영향을 측정하였다. *In vivo* 상태의 양식넙치에 대한 CAP 투여에 따른 CL 반응의 영향을 측정하기 위하여, 넙치 28마리를 MS-222로 마취시켜, 어체 무게 당 150, 300, 500 mg/kg/B.W./day을 4일 동안 매일 하루에 한번 씩 존대를 통하여 경구 투여 (orally administrated)하였으며, 대조구는 동량의 PBS를 경구 투여하였다. CAP 투여 후 실험어는 20°C의 정수식 수조 (크기: 288 L)에 수용하였으며, 수조의 물은 수질의 악변을 방지하기 위하여 미리 20°C로 유지한 여과해수로 매일 전부 또는 반씩 교환하여 주었다. 4회의 CAP 경구 투여 후, 실험어는 사료 투여를 중지하였으며, 3주일 후에 두신을 절취하여 CL 반응을 측정하였다.

(2) 어류의 leucocyte 분리 및 cell 제작 과정

실험어를 MS-222로 마취 후 두신을 분리하여 heparin (10 U/ml), streptomycin (100 U/ml) 과 penicillin G (100 µg/ml)를 첨가한 HBSS (Hanks balanced salt solution × 1) 2 ml을 넣은 다음 steel mesh에 놓고 균질화하였다. 준비한 40% percoll gradient를 3 ml을 넣은 멸균 test tube에 균질화한 두신을 혼합하여 percoll gradient로 상정하였다. 그런 다음 2,000 rpm 4°C에서 30분간 원심 분리하여 leukocytes band를 추출하였다. 추출한 leukocytes는 HBSS를 이용한 원심분리 (3,000 rpm, 4°C, 5 min)로 2번 세척하였다.

이렇게 분리한 세포를 trypan blue로 염색 (1:1) 한 후, 희석하여 2×10^6 /ml로 세포수를 맞추었다. 분리한 세포에 대한 CAP의 영향을 조사하기 위해 1.5 g/ml으로 stock된 약물을 실험구에 각각 15, 30, 50 mg/test tube이 되도록 세포에 첨가하고, 대조구는 methanol만 넣은 것을 사용하여 28°C 배양기에서 각각 2 시간 배양한 다음 4°C에서 30분간 배양하여 CL 반응을 측정하였다.

(3) Luminol 및 zymosan 제작

Luminol stock 용액 (100 ml)은 KOH 0.78 g, boric acid 0.618 g, luminol 0.014 g 을 멸균 증류수 10 ml에 녹인 다음 PBS를 첨가하여 만들었다. CL을 측정하기 전에 PBS로 10배 희석하여 사용하였다.

Zymosan은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라, 멸균된 시험관에 zymosan 50 mg과 PBS 5 ml을 넣어 boiling water bath에서 30분간 녹인 후 600 g 5분간 원심 분리하여 pellet을 만들

었다. 이 pellet에 10 ml 넘치 혈청을 넣어 25°C에서 30분간 배양하여 옵소닌 (opsonin) 작용이 일어나도록 유도하였다. 이 현탁액을 원심 분리하여 5 ml의 PBS로 두 번 세척하고 25 ml PBS에 재부유시켜 zymosan 1 mg/ml PBS가 되도록 자극물을 제작하여 CL 측정에 사용하였다.

(4) Chemiluminescence (CL) 반응 측정

CL 반응 측정을 위해 test cuvette에 zymosan 0.3 ml, luminol 0.7 ml, leukocytes 0.4 ml을 각각 첨가하여 잘 혼합한 후 automatic photoluminometer (Bio-orbit 1251, Sweden)를 사용하여 활성화된 식세포에서 생산되는 reactive oxygen intermediates (ROIs)를 측정하였다.

(5) 통계학적 분석

결과의 통계적 처리는 Sigma plot을 이용하여 student's t-test 로 실시하였으며, $p < 0.05$ 일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

나. 연구 결과 및 고찰

넙치로부터 분리한 leukocyte 세포 (2×10^6 cell)에 대한 *in vitro* 상의 CAP의 영향은 CAP를 0, 15, 30, 50 mg/test tube 농도별로 현탁하여 28°C 배양기에 2시간 배양한 후, 다시 4°C에서 30분 배양하여 chemiluminescence (CL) 활성을 측정하였다. 실험구와 대조구간에는 15 mg/test tube의 적정 농도에서는 유의한 차이가 없었으나, 높은 농도인 30, 50 mg/test tube에서는 대조구와 유의하게 낮아졌지만 ($p < 0.05$), 서로 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 2-3).

양식 넙치에 있어 *in vivo* 상으로 CAP 투여에 따른 면역세포의 활성의 변화를 측정하기 위하여 CAP를 각각 0, 150, 300, 500 mg/kg/B.W./day로 4일간 강제 투여하였다. 실험 3주후에 leucocyte를 분리하여 CL 활성을 측정하였을 시에 300, 500 mg/kg/B.W./day로 투여한 실험구에서는 CL 활성도가 낮아지는 경향을 보였으나, 150 mg/kg을 투여한 실험구에서는 CL 활성도가 증가하는 경향이 나타났다 (Fig. 2-4).

현재 다양한 동물에 있어 항생제 투여가 동물 면역 시스템에 어떠한 영향을 주는지를 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 다양하게 수행하고 있다. 소의 백혈구에 대하여 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 다양한 항생제 투여 시에 *Staphylococcus aureus*에 대한 다핵백혈구 (PMNL)의 식작용이 감소한다고 보고되었다 (Hoeben *et al.*, 1997a, 1997b; Paape and Miller, 1990; Pappe *et al.*, 1990). 게다가, sulphadiazine, CAP, danofloxacin, erythromycin, oxytetracycline, spiramycin, enrofloxacin 등과 분리된 소의 백혈구를 *in vitro* 상에서 함께 배양하였을 때, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 모든 항생제가 CL 활성을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다 (Hoeben *et al.*, 1997b). 또, *in vitro* 상에서 chloramphenicol, tetracycline 그리고 gentamicin 투여 시 *Staphylococcus aureus*에 대한 소에서 분리된 다핵백혈구 (PMNL)의 식작용이 감소한다고 조사하였다 (Ziv *et al.*, 1983, Nickerson *et al.*, 1986). 현재 연구의 *in vitro* 상에서 실시한 실험에서는 약물농도가 증가할수록 활성도가 감소하는 경향이 나타났다. 이것은 두신에서 분리된 leukocyte가 항생제와 함께 배양되었을 때 CAP에 의해서 질병 저항에 중요한 역할을 하는 식세포의 활성감소 뿐만 아니라 병

원체 침입에 대한 숙주의 비특이적 면역에도 영향을 미치는 것을 의미한다. 생체 내 침입한 세균 치료를 위해 항생제를 투약하는 동안 이 항생제와 숙주 방어 기작 사이에서 중요한 상호작용이 일어난다. 이러한 항생제와 다핵백혈구 사이의 영향이 많이 연구되어 왔음에도 불구하고 수의학 분야에서는 항생제와 숙주 방어 기작사이의 상호관계에 관해 아직까지 많이 무시되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 녀치에 직접 4일간 CAP를 투여한 후 3주 후에 CL 활성도를 측정하여 보았다. *In vivo*에서는 3주째에 300, 500 mg/kg 실험구에서 감소하는 경향을 보였다. 녀치의 면역학적 변화를 관찰한 실험에서 사용한 농도인 150 mg/kg 보다 300, 500 mg/kg에서 시간이 지남에 따라 농도 의존적으로 CL 활성도가 감소하는 경향을 나타내었다. 그러므로 CAP와 같은 항생제가 녀치의 생체내에서 식세포가 활성화 되었을 때에 나타내는 지표인 reactive oxygen intermediates (ROIs)를 생산하는 비특이적 면역기작을 억제시킨다고 할 수 있다. Hoeben 등 (1997b)은 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 sulphadiazine, chloramphenicol, danofloxacin, erythromycin, oxytetracycline, spiramycin, enrofloxacin 그리고 oxytetracycline과 분리된 소의 백혈구를 함께 배양하여 본 결과 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 모든 항생제가 CL 활성을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다. 그리고 낮은 약물 농도에서는 유의적인 변화를 관찰 할 수 없었지만, enrofloxacin은 이와 반대로 낮은 농도에서 CL 반응을 자극하여 활성이 증가하였다. Enrofloxacin의 CL 자극 효과는 membrane bound NADPH-oxidase 또는 hexose monophosphate shunt activity의 자극에 의한 O_2^- 의 생성 때문에 의한 것이거나 CL 반응은 luminol의 확산에 매우 민감하기 때문에 luminol의 침투성 의한 것으로 설명할 수 있다. 또한 이 항균제는 세포질에 존재하는 free Ca^{2+} 이 증가함에 따라 phorbol myristate acetate (PMA) 활성을 증가시킬 수 있기 때문에 이와 같은 자극 효과를 나타내기도 한다 (Hoeben et al., 1997a; 1997b). 이와 같은 자료들은 150 mg/kg 실험구가 3주가 지난 다음에 면역 반응이 증가한 사실을 설명할 수 있다.

전보 (Jung et al., 2004)에 따르면, CAP를 4 일 동안 150 mg/kg으로 녀치에 강제 투여했을 때, 간과 신장에서 약물이 잔류하나, 조직학적 관찰 등을 통하여 CAP가 녀치의 간, 신장에는 이 농도하에서는 손상을 입히지 않는다고 보고되었다. 그러나, 전보 (Jung et al., 2004)의 혈액학적 분석 시 몇몇 적혈구 수치와 hematocrit 수치가 실험기간 동안 감소하는 것으로 보아 CAP가 혈구 생성에 있어 영향을 미친다고 보고하였다. 본 논문에서는 *in vitro*와 *in vivo*에서 CL 반응 관찰 시 고농도에서 활성이 감소했기 때문에, 녀치에 있어 고농도의 CAP 투여는 숙주의 혈구의 면역체계에 손상을 미친다고 추정되었다. 본 실험에 사용된 농도를 투약했을 때 실험기간 중 약물에 의한 폐사는 일어나지 않았으나 현재 사용되고 있는 CAP에 대한 약화사고가 현장에서 많이 발생되고 있는 실정이다. 따라서, 본 실험 결과로 미루어볼 때 CAP 자체의 독성 영향이라기보다 이 약물과 다양한 환경 인자들이 함께 작용했을 때 사고가 발생한다고 추정할 수 있었다. Vacha 등 (1981)은 CAP가 자외선과 함께 작용하면 독성이 증가하고 하루 중 자외선을 4시간 보다 6시간 쬐었을 때 2.5배 이상 증가한다는 보고가 있었으므로, 차후에 다양한 환경 인자들과 항생제의 복합이 어류의 생리에 어떠한 영향을 미치는지 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

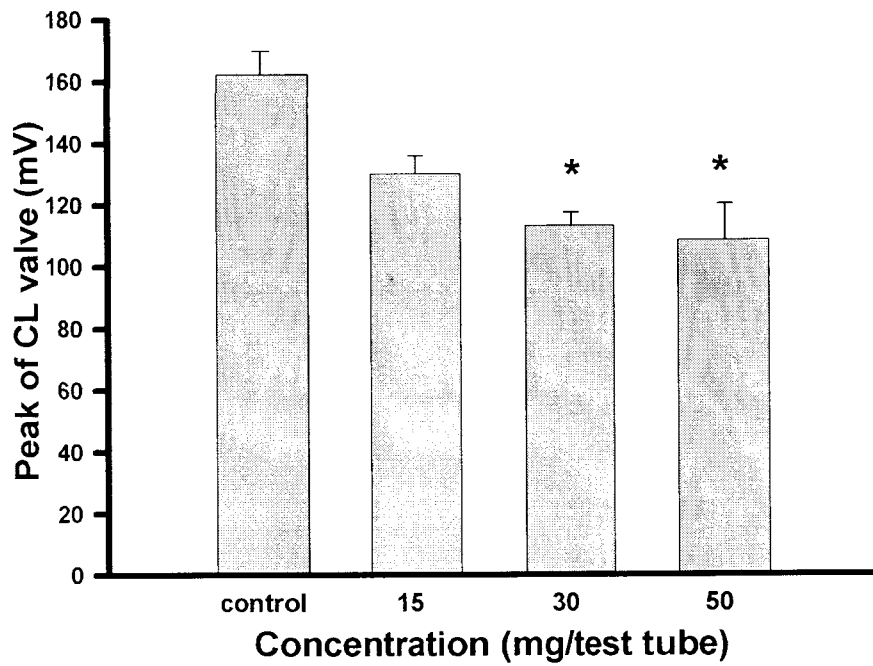


Fig. 2-3. Effect of respiratory burst activity on different dose with chloramphenicol from head kidney phagocytes of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) *in vitro*. (mean±S.D.; n=4) * indicates $p \leq 0.05$.

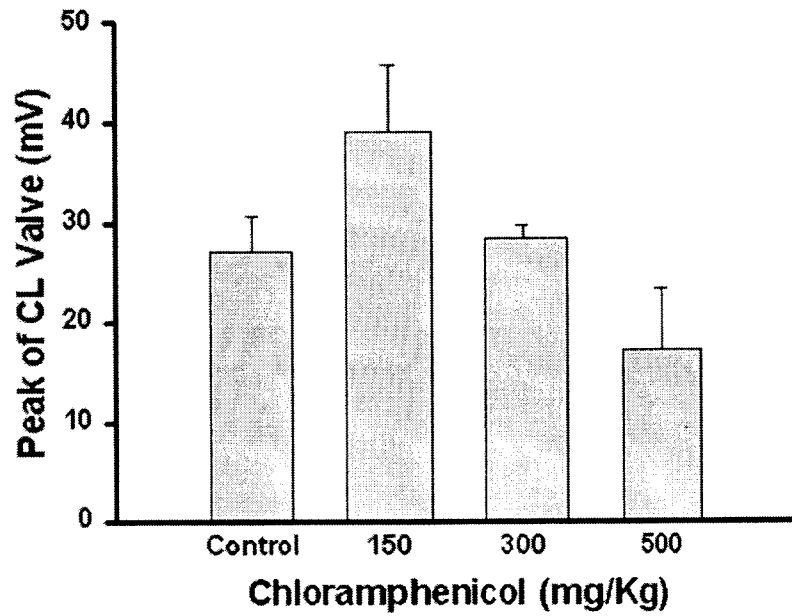


Fig. 2-4. Respiratory burst activity of head kidney phagocytes from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) orally-administrated with chloramphenicol 150, 300, 500 mg/kg and control (administered with diluted methanol). The respiratory burst activity was measured by chemiluminescence response (CL) and analyzed at 3 weeks post final dosing *in vivo*. (mean±S.D.; n=4)

3. UV-A(파장 320~400nm) 조사 하에 넙치에 대한 chloramphenicol의 경구 투여가 혈액조성과 면역반응, 장기조직에 미치는 영향

가. 재료 및 방법

(1) 실험어의 유지 및 CAP의 투여

평균체중 257g의 넙치, *Paralichthys olicaceus*를 국립 수산 과학원으로부터 분양받았으며 외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 개체들로서 절식하면서 2주간 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

순환 여과식 수조(288L)의 여과조 상부에 CORALIFE사의 UV-C (253.7nm, 15W/T8, BP) lamp를 설치하여 1일 12시간씩 수표면 바로 위에서 조사되도록 하였다. UV-C 광선이 실험어에 직접적인 영향을 미치지 않도록 하기 위하여 수조마다 차광막을 씌웠다.

MS-222로 마취시킨 넙치에 Phosphate buffer saline (PBS)에 녹인 Chloramphenicol (CAP ; 헤로세친/종근당)을 어체 무게당 150mg/kg을 4일 동안 매일 강제투여 하였으며 대조구는 PBS를 투여하였다. 실험어는 CAP의 강제투여 1일째, 4일째와 강제투여 종료 후 2일째와 4일째에 각 5마리씩을 채포하여 사료로 사용하였다.

실험어는 먼저 MS-222로 마취시킨 후, 미부 혈관으로부터 채혈하고 해부하여 식세포 활성화 산소 측정용을 위한 두신을 무균적으로 분리해두고 간, 두신, 체신, 비장 조직을 적출하였다.

(2) 혈액학적 조사

채혈한 혈액의 일부는 항응고제인 heparine-Na(25,000 IU, 중외제약)를 첨가하여 적혈구 수(RBC counting), 혈색소 농도 (Hemoglobin concentration), 상대혈구용적 (Hematocrit)를 도사하였다. 적혈구 수는 혈액을 hendrick's diluting solution으로 1:200으로 희석한 후에 hemocytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학 현미경 하에서 계수하였다. 혈색소 농도는 시판되고 있는 임상용 Kit(Asan Pharm. Co., Ltd)를 사용하여 cyan-methemoglobin 법으로 측정하였고 상대 혈구 용적 (Ht) 값은 microhematocrit centrifuge (Hawksly & Sons Ltd)에서 12000rpm으로 5분간 원심 침적시켜 판독판으로 측정 하였다.

(3) 병리조직학적 관찰

적출한 간, 두신, 체신, 비장을 부완액(Bouin's solution)에 24시간동안 고정하고 동일 고정액에 24시간 동안 2차 고정 후 수세하였다. 70% Alcohol에서 100% 순차 농도 알코올에 탈수, Xylene 투명화 및 파라핀 친화, 파라핀 포대의 과정을 거친 후 microtome (Reichert-jung 820, Leica, Germany)으로 4 μ m두께의 조직절편을 만들었다. 각각의 조직절편은 Hematoxylin-eosin(H&E)법으로 염색하여 광학현미경으로 관찰 하였다.

(4) 어류 두신 식세포의 활성화 산소 측정

넙치의 두신을 무균적으로 분리하여 2% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin/streptomycin 및 0.2% heparin이 함유된 MEM 배지에서 nylon mesh를 통과시켜 세

포 현탁액을 준비한다. 준비된 세포 현탁액을 43% 농도의 percoll에 띄운 후 600g에서 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리하여 MEM으로 두 번 세척한 백혈구를 tryphan blue 로 염색한 후 1×10^6 cell/ml 농도로 조정하였다. test cuvette에 luminol 0.7ml, zymosan 0.3ml, macrophages 0.4ml을 각각 첨가하여 up & down 한 후 automatic photoluminometer(Bio-orbit 1251, Sweden)을 사용하여 활성화된 식세포에서 생산되는 reactive oxygen intermediates를 측정하였다

나. 결과 및 고찰

(1) 혈액조성

(가) RBC counting

적혈구의 수는 1DT 때 4.55×10^6 개 이고 2AT때 4.13×10^6 개로 약간 줄었으나 4AT 때 4.74×10^6 개로 sampling 첫날인 1DT와 비슷한 수준이었다. Chloramphenicol 처리구의 RBC 숫자는 4.84×10^6 개로 control 보다 다소 많았으나 sampling 마지막 날인 4AT 때는 3.54×10^6 개로 현저히 줄었다. UV 처리구의 1DT, 4DT, 2AT 각각의 RBC 수는 control 과 CAP처리구의 RBC의 수와 비슷한 경향성을 나타내었으나 4AT에는 3.99×10^6 으로 control과 CAP처리구 보다 다소 많았다. CAP와 UV를 함께 처리한 group에서 4DT의 RBC 수가 6.08×10^6 으로 급격히 증가 한 것을 알 수 있으며 2AT때는 3.25×10^6 으로 다른 어떤 group보다 적은 수로 조사 되었다 (Table 2-2).

(나) Hemoglobin concentration

Control group의 1DT Hb concentration은 0.122g/dl로 다른 실험구에 비해 약간 낮은 수준이었으나 4DT에는 0.41g/dl로 증가하다가 2AT, 4AT로 가면서 조금씩 줄어드는 경향을 나타내었다. CAP 처리구의 Hb concentration은 1DT 때 0.14g/dl였으나 4DT, 2AT, 4DT로 가면서 점차 감소해 sampling 마지막 날인 4DT에는 0.122g/dl의 수치를 기록했다. UV처리구의 1DT Hb concentration과 CAP와 UV를 함께 처리한 실험구의 그것은 각각 0.153g/dl과 0.15g/dl로 비슷한 수준이었으며 UV 처리구의 4DT 값은 0.120/dl로 급격히 감소하였다가 2AT때 증가, 4AT때 다시 급격히 감소하는 폭넓은 변화를 보였고 CAP+UV 처리구에서는 4DT 때 약간 증가하다가 4AT 때 0.122/dl로 급격히 감소하는 것으로 나타났다 (Table 2-3).

(다) Ht value

Control group의 1DT Hematocrit value는 32로 sampling 마지막 날인 4AT의 31.4와 큰 차이를 보이지 않았으며 실험기간 중의 수치 변화가 적었다 반면 CAP처리 group의 Ht 치는 368로 control 보다 월등히 높았으며 2AT까지 23.8로 급격히 감소하다가 4AT에는 23.2로 나타났다. UV처리구는 control과 비슷한 경향의 그래프를 나타내었지만 4DT, 2AT, 4AT의 수치가 각각 28.5, 27.2, 28.8로 control group 보다는 그 값이 다소 낮았다. UV와 CAP를 같이 처리한 구의 Ht value는 1DT때는 335로 control과 별 차이가 없었지만 4DT에는 약간 증가하다가 2AT에 25로 급격히 감소해 변화의 폭이 큰 것으로 조사 되었다 (Table 2-4).

Table 2-2. Result of RBC counting from olive flounder -administrated chloramphenicol 150 mg/kg with UV-A irradiation and sampled at 1,4 days during treatment and 2,4 days after treatment.

	1DT	4DT	2AT	4AT
Control	4.55 ± 0.73	4.65 ± 0.29	4.13 ± 1.31	4.74 ± 0.80
CAP	4.84 ± 0.23	5.06 ± 0.71	4.36 ± 0.88	3.54 ± 0.84
UV-A	4.63 ± 0.83	4.83 ± 0.56	4.14 ± 0.68	3.99 ± 0.75
UV-A +CAP	4.48 ± 0.29	6.08 ± 0.57	4.37 ± 0.31	3.25 ± 0.71

Values represent means ± S.E.

Table 2-3. Result of Hemoglobin concentration from olive flounder -administrated chloramphenicol 150 mg/kg with UV-A irradiation and sampled at 1,4 days during treatment and 2,4 days after treatment.

	1DT	4DT	2AT	4AT
Control	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.03
CAP	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02
UV-A	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.01
UV-A +CAP	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.02

Values represent means ± S.E.

Table 2-4. Result of Hematocrit value from olive flounder -administrated chloramphenicol 150 mg/kg with UV-A irradiation and sampled at 1,4 days during treatment and 2,4 days after treatment.

	1DT	4DT	2AT	4AT
Control	39.4 ± 12.3	32.1 ± 5.8	27.2 ± 5.3	31.4 ± 7.7
CAP	36.8 ± 3.3	31.2 ± 8.3	23.8 ± 2.9	23.2 ± 6.8
UV-A	32.9 ± 5.4	27 ± 4.9	27.2 ± 3.9	26.6 ± 5.7
UV-A +CAP	33.5 ± 2.2	34 ± 6.0	25 ± 1.4	25.6 ± 2.9

Values represent means ± S.E.

(2) 면역반응 (CL)

CL 반응은 unit단위로 나타내었으며 1DT control은 0.623으로 실험기간 끝인 4AT까지 0.654로 커다란 변화가 없었다. CAP와 UV를 처리한 group의 CL값은 각각 0.611, 0.652로 control과 비슷했으나 이 둘 모두 4DT에는 1.00정도 까지 급격히 증가하다가 CAP처리구는 2AT때 다시 0.78로 급격히 감소했으며 UV처리구의 CL 수치는 2AT때 약간 증가했다가 4AT때 0.922로 다시 감소하는 경향을 나타내었다. CAP와 UV를 동시에 처리한 group의 CL 수치는 다른 실험구와는 달리 1DT부터 0.709로 약간 높은 수치를 기록 했으며 4DT때 0.98로 증가했다가 4AT까지 비슷한 수치를 유지했다 (Table 2-5).

(3) 장기조직(간)

아래의 그림은 간 조직의 현미경 사진이다 (Fig. 2-5). 1DT에 CAP 처리한 개체와 4AT에 CAP를 처리한 두 개체를 제외한 모든 개체에서 지방 변성이나 위축이 관찰 되었다. control group이나 UV처리구, Chloramphenicol 처리구 그리고 Chloramphenicol과 UV를 함께 처리한 실험구 간에 구별되는 병변 없이 모든 처리구의 모든 날짜에 위축이나 지방 변성이 일관되게 나타났으므로 이 병변은 약물이나 UV의 처리에 영향을 받은 것이라 단정 지을 수 없다. 정상 세포는 Fig. 2-5의 ①, ②에서 보듯이 간세포의 핵이 거의 세포질 중심부에 위치하며 세포들 간의 간격이 일정하고 세포질 내부가 깨끗하나 위축된 조직은 ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦에서 보듯이 전체적으로 세포질 부분이 정상세포에 비해 적고 핵과 핵 사이의 간격이 아주 좁아 조직의 전체적인 색깔이 정상조직보다 어둡게 나타난다. ⑧, ⑨에서 보이는 foamy appearance란 세포질 내부가 작은 공기방울로 가득 차 있는 것처럼 보이는 것을 말하며 지방간의 전 단계로 알려져 있기도 하다. ⑩, ⑪, ⑫ 등은 심한 지방변성이 일어난 것으로 foamy 에 비해 커다란 지방방울이 곳곳에서 관찰 된다.

Table 2-5. Results of Chemiluminescence(CL) from olive flounder-administered CAP (150mg/kg) with UV-A irradiation and sampled at 1,4 days during treatment and 24 after treatment.

	1DT	4DT	2AT	4AT
Control	0.623 ± 0.076	0.642 ± 0.435	0.657 ± 0.434	0.654 ± 0.130
CAP	0.611 ± 0.070	0.986 ± 0.373	0.784 ± 0.149	0.731 ± 0.436
UV-A	0.652 ± 0.745	1.019 ± 0.387	1.045 ± 0.344	0.922 ± 0.296
UV-A +CAP	0.709 ± 0.135	0.980 ± 0.356	0.916 ± 0.426	0.860 ± 0.343

Values represent means ± S.E.

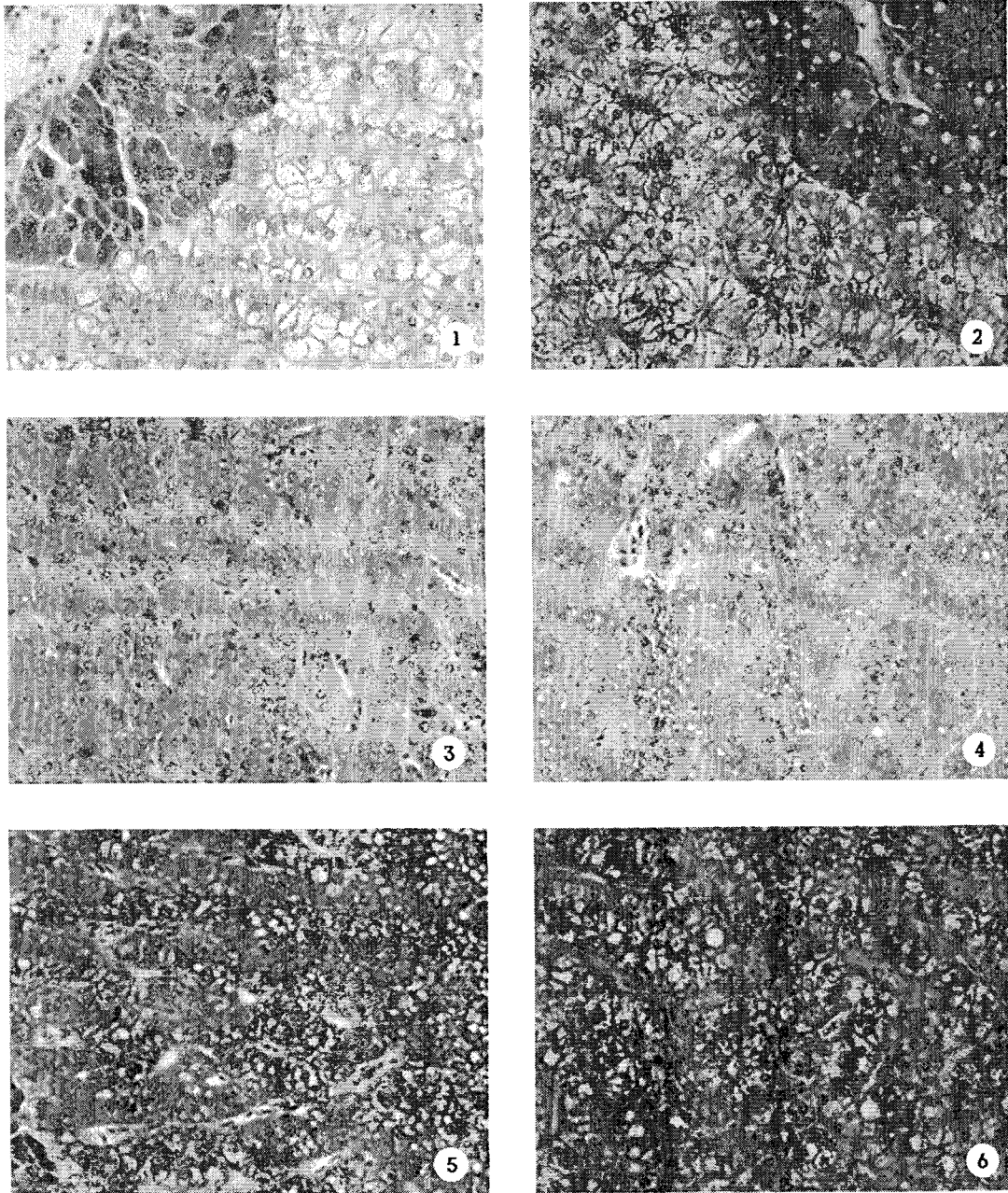


Fig. 2-5. Histological changes of liver from the individuals with UV-A irradiation and chloramphenicol administration. (H&E, $\times 400$) 1: 1DT-CAP1, Normal liver, 2: 4AT-CAP1, Normal liver, 3: 1DT-UV4, Atrophy of liver, 4: 4AT-Control, Atrophy of liver, 5: 4AT-UV3, Atrophy of liver, 6: 4AT-CAP+UV5, Atrophy of liver, 7: 4AT CAP5, Artrophy of liver, 8: 1DT CAP5, Foamy appearance, 9: 4AT-UV2, Foamy appearance, 10: 1DT-UV1, Fatty degeneration, 11: 1DT-control5, Fatty liver, 12: 4AT-control5, Fatty degeneration.

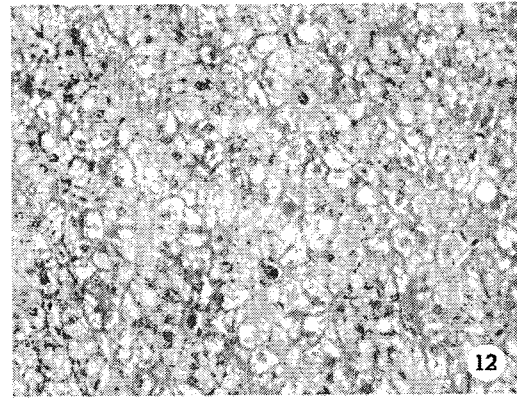
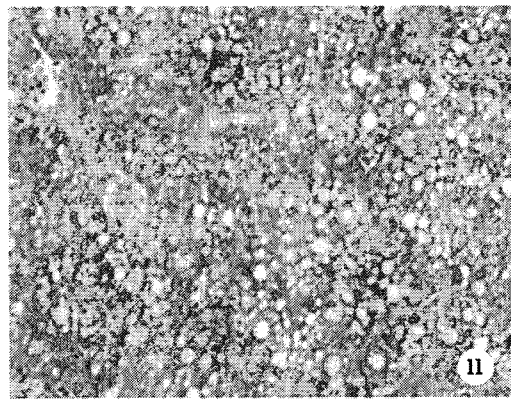
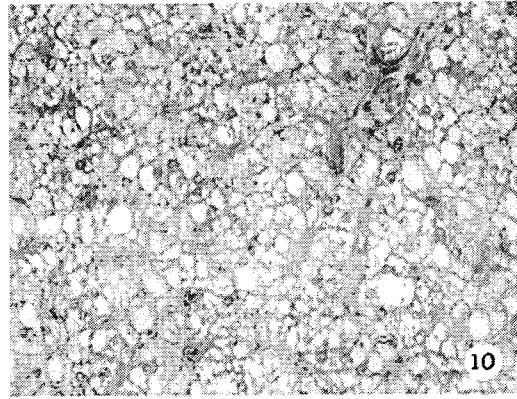
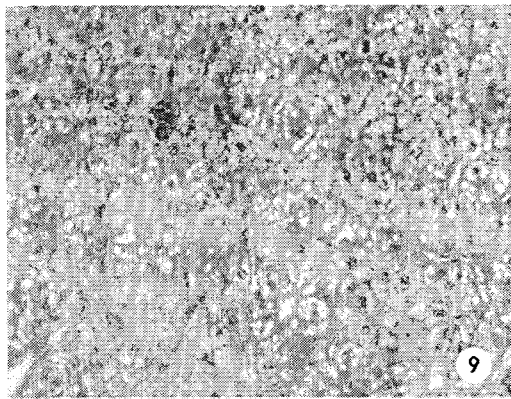
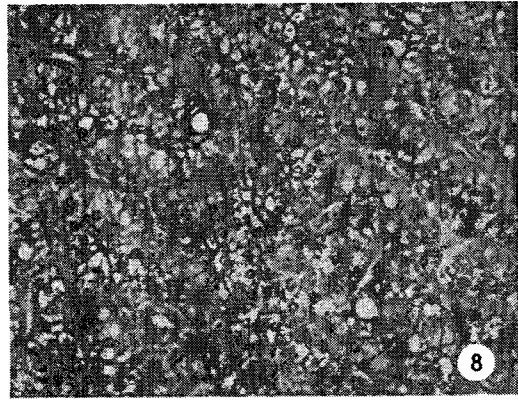
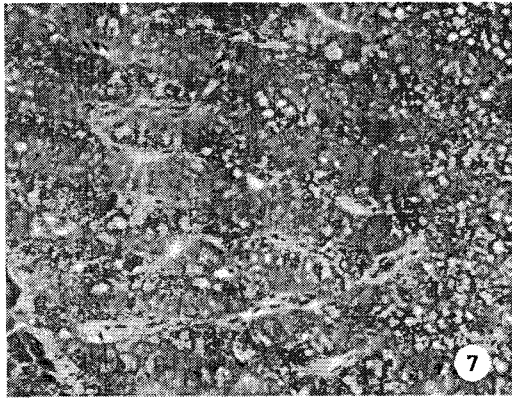


Fig. 2-5. Continued.

4. 넙치에 대한 carbon tetrachloride 투여의 병리학적 영향에 관한 연구

가. 연구 방법

임상용량의 약 3배인 200mg/kg의 chloramphenicol을 단회 및 매일 1회 5일 간 강제 경구 투여하였을 때 혈액학적 및 병리조직학적으로 독성 영향이 인정되지 않았으므로 광감작을 통한 부작용이 크게 의심되어 본 연구중심으로 수행되었다.

(1) 넙치에 대한 carbon tetrachloride 투여의 병리학적 영향에 관한 연구

(가) 어류의 선택

어류는 양식 중의 넙치를 분양받아 사용하였다. 넙치는 체중 40~100g, 체중은 14~18cm의 것을 사용하였다. 어류는 순환 여과식 시스템에서 유지하고, 수온은 25~27°C, 용존산소는 6~7ppm(mg/l)으로 유지하였다. 실험기간 동안 먹이는 일체 공급하지 않았다. 시험 직전에 6개체를 임의로 선택하여 혈액학적 및 병리조직학적 검사를 수행하여 건강에 특기할 이상이 없음을 미리 확인하였다.

(나) 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)의 조제 및 투여 방법

① 투여용 사염화탄소의 조제

사염화탄소(analytic grade, JT Baker, Holland)를 희석제로써 올리브 오일과 1:1의 비율로 혼합하여 경구용으로 조제하였다.

② CCl₄의 투여 방법

체중 당 0.02ml의 사염화탄소를 예비실험으로 복강 배측의 상주축근(epaxial muscle)을 통한 근육 내 및 복강 내 경로로 시도하였다. 근육 주사의 경우 근조직의 심한 괴사, 괴사근육의 탈락현상(부육)이 일어났으며, 복강 주사의 경우, 복강 부위 복벽의 괴사가 동반되었으며, 다수의 폐사가 발생하였다. 또한 육안 및 조직학적 간장의 손상내용 및 정도에 있어 개체에 따라, 불규칙하여 그 투여경로로는 적합하지 않는 것으로 판단되어 경구 내지 위 내 투여법을 적용하기로 하였다.

그 결과 육안 및 병리조직학적으로 간장에 대한 손상 변화가 일정하게 관찰·확인되었다. 즉 미리 조제된 CCl₄ 용액을 경구용 존대를 사용하여 체중 kg당 2ml를, 마취(benzocaine, Sigma) 후 위 내 투여하였다. 다시 3일 후 동량의 CCl₄를 동일 조건으로 투여하였다.

(다) 샘플링 및 분석방법

두 번째 CCl₄ 투여 후 5, 6 및 7일째에 어류를 benzocaine으로 마취한 다음, 부검을 실시하였다. 마취 후 부검 직전에 혈액을 미부혈관(caudal vessel)으로부터 최대량으로 채취하였으며, 내부 복강장기를 육안으로 세밀히 관찰한 후, 간장을 포함한 주요 장기를 부완액(Bouin's

solution)에 고정하여 상법에 따라 광학현미경용 HE염색 표본을 제작하였다(Roberts, 2001). 육안 사진은 2.1mega pixel 디지털카메라(QV-2900UX, Casio, Japan)를 통하여 얻었으며, 현미경 사진은 디지털 사진촬영장치(Polaroid DMC-3, USA)를 사용하여 촬영하였다.

채혈 후 혈액에 대하여는 슬라이드글라스에 도말표본(smear preparation)을 제작하였으며, 헤마토크릿치(Ht or PCV) 측정을 실시하고, 남은 혈액으로부터는 혈청을 분리하여 혈장총단백(total protein), ALT(alanine transaminase) 및 AST(aspartate transaminase)치를 자동 혈액생화학 분석장치(Kodakchem700, Rochester, New York)를 사용하여 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

한 때 수의학 분야에서 처음으로 간흡충증(fascioliasis) 치료제로 도입되었다. 1921년에 위장관 선충류 구제에 효과가 확인되었다(Roberson, 1977). 지금도 산업적으로 용제로써 드라이크리닝 등에 사용되고 있다. 이 물질은 휘발성의 무색 액상으로 유기용매에 잘 녹으며, 물에는 잘 녹지 않는다. 사람을 포함한 모든 포유류에 급성 및 만성독성을 발현한다고 알려져 있다. 특히 종에 따라 그 독성이 다르지만, 돼지에서는 결코 사용되지 않아야 할 정도로 독성이 강하며, 양은 이 물질에 대하여 내성이 큰 것으로 알려져 있다. 그러나 조류에서는 독성을 발현하지 않는 것으로 되어 있다.

급성독성은 약용량 이상으로 투여 시 12~24시간 내에 중추신경 억압, 하리, 운동실조, 실혈관계 허탈 등이 나타난다. 만성 독성은 주로 경구 약용량에서도 간장의 손상이 일어나고, 신장 손상과 시각장애를 일으킬 수 있다. 피부 노출로 제지방작용을 통한 피부염이 발생할 수 있다. 발암을 일으킬 수 있는 것으로 되어 있다.

CCl_4 는 실험동물에서 간장병 모델 작성에서 사용되는데 그 간장손상의 기전은 매우 잘 알려져 있다. 즉, CCl_4 의 독성효과는 세포 내 P-450에 의해서 매우 독성이 있고, 반응성이 강한 $CCl_3 \cdot$ 란 free radical로 전환되기 때문이다. 국소적으로 발생된 free radical은 세포내 막성 인지질속의 polyenic fatty acid의 자가산화(autooxidation)를 초래한다. 이 지질의 산화성 분해가 일어나면서, 산소와 반응한 후, 새로운 radical인 유기과산화물이 형성된다(지질과산화, lipid peroxidation). 지질의 손상으로 ER의 구조와 기능이 신속히 파괴되기 때문에 CCl_4 에 의한 간장의 손상이 매우 심하고 시작도 매우 빠르다. 30분 내에 간장 내 단백질합성이 저하되고, 2시간 내에 sER이 종창되며, rER 부착 리보솜이 탈락된다. Triglyceride와 복합체를 이룰 간세포로부터의 apoprotein의 합성이 저하되기 때문에 인지질 분비가 감소된다. 간장은 지방변화가 생기고 미토콘드리아의 손상이 일어나 세포가 종창된다.

CCl_4 투여에 쥐가 흔히 사용되어 왔으며, 적용경로로서는 복강, 피하(Hsu, 1998) 및 경구(Reynolds, 1963; Shinozuka, 1971) 경로가 사용되었다. 그 외에 CCl_4 는 *in vitro* 적으로 분리된 쥐의 간세포에 적용하여 그 영향을 관찰하기도 하였다(Tyson, 1983; Berger, 1987). 그러나 CCl_4 를 어류에 적용한 예는 매우 드물어, 뱀장어(*Anguilla japonica*)(Inui, 1968), English sole(*Parophrys vetulus*) (Casillas, 1983), Channel catfish(*Ictalurus punctatus*)(Afifi and MacMLLAN, 1992)의 3종으로 알려져 있다. 그 투여는 복강 내(i.p.) 경로 또는 근육주사(i.m.)

에 의하였으며 경구투여에 따른 독성 영향을 본 경우는 저자 등에 의한 것이 처음인 것으로 사료된다.

어류의 간장에는 육상 포유류에서 확인되는 Kupffer cell이 없고, 소엽화가 분명하지 않으며 전형적인 portal triad가 관찰되지 않는다. 간세포의 구조 및 기능에 있어서는 포유류의 것과 큰 차이를 보이는 것 같지는 않으나, 번식을 포함한 체내·외적 조건에 따라 그 형태학적 변화 내용이 다양하고, 어중에 따라 간세포 내에 많은 지방과 당을 가지고 있을 수 있으며 특히 양식 어류의 경우에 흔히 관찰된다. 따라서 CCl₄의 생체막 손상의 내용에 차이가 있을 수 있고, 그 결과도 다를 수 있다고 생각된다.

CCl₄의 적용 경로에 따른 반응의 차이에 대하여 구체적으로 설명하는 예는 없으나, 간장에 대한 독성영향 평가에는 경구경로가 가장 바람직하며, 다음으로 근육주사이며, 복강경로가 가장 바람직하지 않는 것으로 보인다. 경구적용의 경우 소화관의 손상이 거의 없으나, 복강 경로의 경우 약물이 바로 복강 중피(mesothelium)에 영향을 주며, 간장 중피성 피막을 통하여 흡수되어 직접 영향을 입히는 것으로 보이며 그 영향이 불균일하게 나타난다. 그러나 경구경로는 바로 문맥(portal vein)을 따라 간장 내 유동혈관을 통하여 흡수되어 간장전반에 골고루 영향을 미치는 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서도 경구경로를 통하여 노출을 시도하였다.

넙치의 실험 전 대조군의 간장은 육안적으로 회색~연갈색으로, 간장체중비중량지수 (hepatosomatic index, HSI)는 1.3~1.5% 사이에 있어 경골어류에서의 지수범위(1.0~2.0)에 속하였다 (Fig. 2-6). HE 염색표본에서는, 세포질이 밝게 나타나, 글리코젠과 지방의 저장량이 많음을 시사하였다. 또한 간세포의 핵은 대부분 1개이며, 핵소체는 1~2개로 나타났다.

CCl₄ 투여 후 5일 (및 6일째)에는 HSI가 다소 낮아지는 경향으로 육안적으로 간장의 소견은 대조와 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 조직학적으로는 큰 변화를 보여, 5일째에는 간세포에 위축 소견이 현저하였으며, 대형의 경계가 명확한 지방포를 함유한 세포가 다수 확인되었으며, 나머지 세포는 세포질 내에 작은 지방 방울을 함유하고 있어 포말형의 세포질을 나타내었다. 대형 지방포를 함유한 세포의 분포는 실질 전역에 걸쳐 분균일한 분포를 이루었다 (Fig. 2-7). HSI가 낮아지는 것은 지방변화와 동반하여 일어나는 간세포의 위축에 따른 결과일 것으로 사료되나, 통계학적 유의성은 없었다.

CCl₄ 투여 7일째에는 간장이 육안적으로 색조 변화를 나타내지 않았으나, HSI가 현저히 줄어드는 위축성 변화의 경향을 보였다. 현미경적으로는 5일째의 소견과 유사하게 지방변화 소견을 보이는 개체도 많았으나, 위축소견을 동반하고 있었다. 대신 대형의 지방공포(lipid vacuole)를 함유한 세포는 현저히 줄어들었으며, 개체에 따라서는 심한 위축(또는 당/지질고갈 소견)을 보였다(Fig. 2-8). 가끔 실질 내에 국소적으로 염증성 세포의 침윤소를 동반한 개체가 확인되었으나, 실질세포에서 괴사성 변화는 확인되지 않았다.

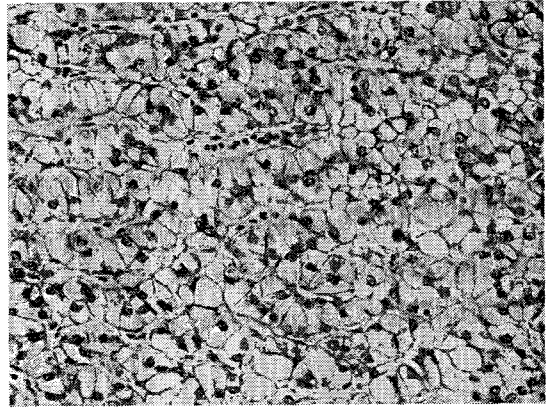


Figure 2-6. Gross and histological finding of a control liver

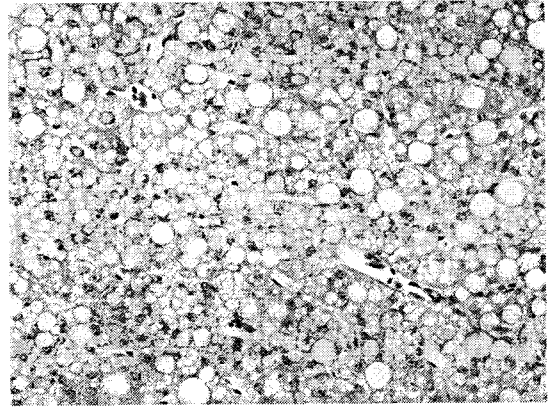
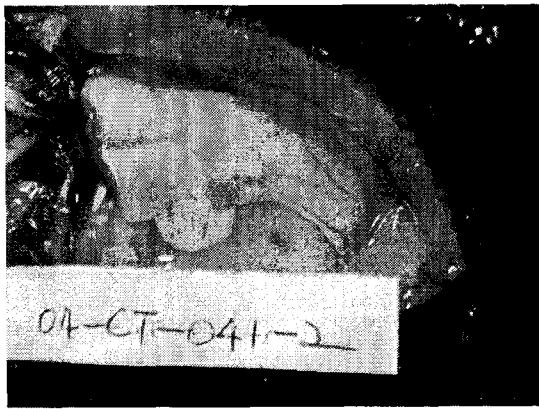


Figure 2-7. Gross and histological finding of a liver 5 days after intragastric administration of CCl₄. (HSI:1.11%)

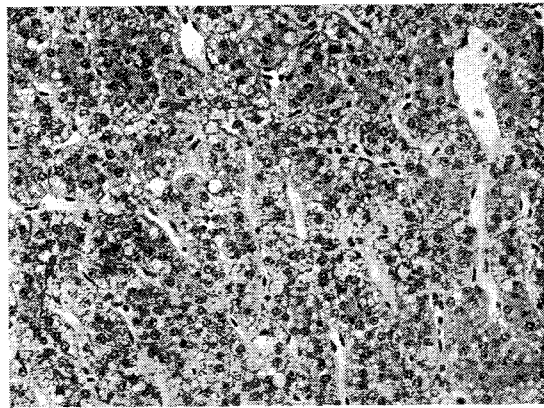
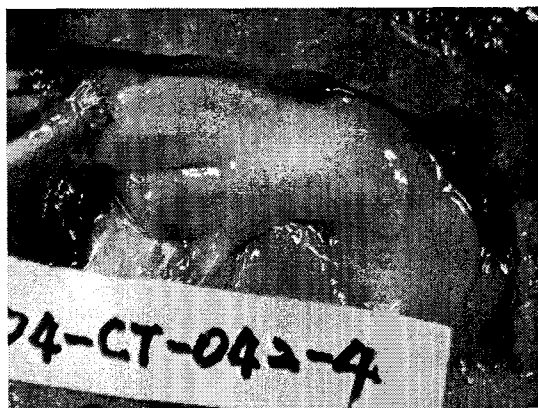


Figure 2-8. Gross and histological finding of a liver 7 days after intragastric administration of CCl₄.

어류의 경우, 복강(Casillas, 1983; Afifi and MacMLLAN, 1992) 또는 근육주사(Inui, 1968)를 통하여 CCl₄가 투여된 예가 있는데, 그 영향이 서로 다르게 나타나고 있다. 복강 투여의 경우인 차넬메기의 경우, 투여 후 1시간째에, English sole의 경우 4시간째에 그 독성 영향이 확인되기 시작하였다. 근육주사의 경우, 뱀장어에서 2일째까지 큰 변화가 없다가, 4일 후에 관찰했을 때 간조직의 변화가 관찰되기 시작하여, 7~10일 후에 가장 현저한 변성변화를 보이는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 보고예의 경우와는 달리, 경구경로를 사용하였다. 투여 이후 관찰은 5일 이후 수행되었으나, 7일째에 가장 그 변화가 심하여, Inui(1968)의 결과와 거의 시간적으로 일치하는 경향을 보였다. 복강주사의 경우, Casillas(1983)와 Afifi and MacMLLAN(1992) 모두 주사 48시간까지 관찰하였다. 그러나 전자의 경우는 간조직과 을 포함한 여러 장기와 혈액의 생화학적 변화에 대하여 조사하였으나, 후자의 경우에는 간세포만의 변화를 전자현미경적으로 추구하고 있다. Casillas(1983)의 결과를 보면 간장 외에 신장 및 비장의 변화를 기술하고 있다. 간장 표면과 복막의 염증 소견, 간의 피막 하 실질의 심한 변성변화에 근거하여, 복막 내지 장간막을 통하여 혈관으로 흡수된 CCl₄의 전신적인 영향과 복강으로부터 직접 국소접촉 영향이 복합적으로 나타난 것으로 생각된다. 따라서 근육주사를 통하여 관찰한 Inui(1968)의 뱀장어에 대한 결과가 간 조직에 대한 영향을 판단하기에는 적합한 것으로 사료된다.

뱀장어의 경우, 간장의 육안적 변화에 대한 기술은 없었다. 본 연구에서는 간장의 육안적 색조의 변화는 두드러지지 않고, HSI의 감소 경향이 나타났다. 쥐(Hsu, 1998)에서는 CCl₄의 경우 투여 후, 다소 황색조를 띄거나, 표면이 거칠어지면서 우굴우굴해져 보인다고 한다. 각각 황색조는 지방축적을, 간장표면의 소견은 위축소견에 해당하는 소견으로 보이나 후자에 대하여는 HSI 측정이 이루어지지 않았을 뿐 아니라, 육안적 변화와 관련하여 현미경적 소견을 특별히 언급을 하지 않았다.

포유류에서 CCl₄는 경구투여 후 2시간 내에 간 내 농도가 최대에 이르는 것으로 알려져 있다(Rechnagel and Litteria, 1960). 투여 후 15분 내에 쥐 간조직의 변화를 소엽중심부의 간세포 ergastoplasm, 즉 r-ER의 초미세구조에서부터 확인되기 시작한다고 보고되어 있다(Reynolds, 1963). 투여 후 1시간 정도 경과되면, ergastoplasm이 완전히 용해된다고 한다.

본 연구에서 CCl₄투여 후 광학현미경적으로 확인된 유의한 변화로써는 지방간 소견과 위축 소견이었으며, 이는 CCl₄의 free radical에 의한 독성영향으로 평가되었다. 그러나 실질의 괴사성 변화는 없었으며, 총단백량, ALT 및 AST값에 변화를 나타내지 않았다 (Table 2-6). 포유동물의 경우 대부분 CCl₄에 의한 간독성을 보이나, 종에 따라 그 정도가 다르다고 알려져 있다. 조류에서는 독성을 발현하지 않는 것으로 되어 있다. 뱀장어의 경우, 경구투여 7~10일 후에 실질세포는 핵농축, 다형태성 핵변형, 세포종창, 호산성 세포질 형성, 괴사소 주변 염증세포 침윤 등이 일어난다고 한다. 게다가 총단백량 감소, ALT, AST 및 ALP값의 상승이 7~10일 사이에 최고치에 이른다고 알려져 있다. 차넬메기의 경우에는 복강경로로 간장에서 괴사성 변화는 복강 및 인접 장기에 일어난 국소성의 변화로 생각되며, 경구를 통한 전신성 변화와는 그 손상 기전이 다를 것으로 생각된다. 예비실험에서 넙치에서도 복강경로에서는 유사한 변화가 관찰되었다(미발표). 게다가 본 연구에서는 CCl₄가 2회로 투여되었다. 따라서 CCl₄에 의한 간장손상 기전은 포유류와 유사할 것으로 예상되지만, 어류에서도 간장 손상도는 어종에 따라 다를 것

로 충분히 예상된다.

이상의 결과를 종합하면, 경구적으로 투여한 CCl_4 는 넙치 치어에 대하여 주로 간장의 지방변화 및 위축 또는 당/지질 고갈과 같은 경미한 변성변화를 가져오는 것으로 나타났다. 그러나 대부분의 포유류와 뱀장어에서 보고된 괴사성 변화는 동반하지 않는 것으로 사료되었다.

5. 클로로폼페니콜의 광감작에 관한 연구

가. 연구 방법

(1) 실험어의 유지 및 임상적 검사

실험어는 대표적인 해수 양식어종인 넙치 (Olive flounder, *Paralichys olivaceus*)를 감포 소재 양어장으로부터, 실험실로 입식하였으며, 입식 후 3일 동안 순치한 후 사용하였다. 넙치 체중의 범위는 40~100g, 체장의 범위는 14~18cm 이었다. 실험기간 동안 수온은 25~27°C로 유지시켰으며, 수조는 순환 여과식 시스템을 이용하였다. 또한 실험기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

순치 넙치군으로부터 6개체를 임의로 선별하여 혈액학적 및 병리조직학적 검사를 수행하여 건강상태를 평가하여 큰 이상이 없음을 확인하였다.

(2) 간장 손상 유발

간장의 손상은 사염화탄소 (CCl_4)의 경구적 투여를 통하여 인위적으로 유발하였다. 사염화탄소 (tetrachloromethane; carbon tetrachloride, high grade, J.T. Baker)를 올리브오일과 1:1의 비율로 혼합하여 2ml/kg을 경구용 존대를 사용하여 위내투여를 하였다. 3일 후 다시 동량으로 투여하여, 마지막 투여 후 7일째에 부검하여 간장의 손상 내용을 육안 및 조직학적으로 조사하였으며, 동시에 혈액 내 총단백량, ALT 및 AST치를 측정하였다.

(3) UV-A 조사 방법

(가) UV-A 조사(照査)장치

실험에 이용한 UVA 조사장치 (315-400nm, Philips TL8W/05, Holand)는 한국ACC로부터 구입하였으며, 50 x 38 x 35cm 크기의 사각 플라스틱 수조에 바닥으로부터 25cm 높이에 23cm간격으로 램프 2개를 고정하였다. 사육수의 수표면 바로 아래에서 조사되도록 하였으며, 방수용 석영관을 씌워 사용하였다.

(나) UV-A 조사(照査) 실험군 설정 및 조사

UV-A의 조사는 1일 6시간씩 4일간 반복 실시하였다. 실험군은 대조군(Group C, D)을 포함하여 총 6군으로 하였다 (Table 2-6).

즉, 무처리군에 대한 UV조사군 (Group A1), 간장손상군에 대한 조사군 (Group A2), CAP 투여 후의 조사군 (Group A3), 그리고, 간장손상 개체에 CAP를 투여한 후의 조사군 (Group

A4)이 었다. CAP는 임상용량의 약 2배인 150mg/kg을 1일 1회 4일간 반복 경구 투여하였고, CAP 투여 후 1시간 후 1일 6시간씩 4일 동안 반복으로 UV-A 조사하였다 (Table 2-6). 경구용 CAP는 (헤로세친, 종근당)을 PBS (phosphate-buffered saline)에 현탁시켜 조제하였다. CAP의 투여는 경구용 존대를 사용하였으며, 모두 벤조카인 포화용액 (Benzocaine, Sigma, USA)으로 경미하게 마취 후 강제 위장관 내 투여를 하였다. 자외선 무노출군 (Group C)과 간장 손상만 일으킨군 (Group D)을 대조로 하였다.

4일 째의 최종 조사 후 5일째 부검을 실시하였다. UV-A가 조사 시 수온은 25~27℃로 일정하게 유지시켰고, 다른 곳에서 빛이 투과되지 않도록 차광막 및 수조 덮개를 사용하였다.

(4) UV-B 조사(照査) 방법

(가) UV-B 조사(照査) 장치

실험에 이용한 UV-B 조사장치에는 파장 280~360nm (TL20W/12RS Philips, Holand)의 UV-B 램프를 사용하였으며, 램프를 수조바닥에서 110cm, 수면에서 80cm의 높이에 고정하였다. 그리고 수조아래 수면 위 40cm에 cellulose diacetate filter (cellulose paper, 광진지업)를 설치하여 자연광에 없는 해로운 짧은 파장을 차단하였다 (Fig. 2-9).

(나) UV-B 조사(照査) 실험군 설정 및 조사

UV-B는 단회 노출이라도 긴 시간 노출로, 상피에 화상 (sunburn)성 손상과 폐사를 유발하였다 (Fig. 2-10). 따라서 조사량 결정을 위한 예비실험을 수행하였으며, 그 결과는 Table 2-6과 같으며, 단회 노출 30분에서는 피부에 어떠한 병리조직학적 변화도 수반하지 않았다. 따라서 UV-B에 대해서는 노출량을 단회 30분 노출로 결정하였다.

UV-A 조사 실험군과 같이, 대조 (Group C, D)군을 포함하여, 무처리 상태에서 UV-B만 조사한 군 (Group B1), 간장손상 유도 후 UV-B만 조사한 군 (Group B2), CAP투여 후 UV-B를 조사한 군 (Group B3), 간장손상 유도 개체에 CAP투여한 후 UV-B를 조사한 군의 총 6군으로 하였다. 자외선에 비노출 무처리군 (Group C)과 자외선 비노출 간장손상(Group D)을 대조로 하였다.

CAP의 경구투여 방법은 UV-A 조사 실험군에서의 경우가 같았으나, 단회 조사였으며, 투여 후 1시간째부터 UV-B를 30분간 조사하였다. 조사 완료 후 24시간째에 부검하여 병리조직학적 조사를 실시하였다.

UV-B 조사 동안 그리고 조사 시 외부로 빛이 나가지 않도록 차단하였으며, 차광막을 이용하였다. 조사기간 동안 동일 조건을 유지하도록 하였으며, UV-B 조사시간은 예비 실험을 거쳐 피부 및 다른 장기에 이상이 없었던 시간을 확인하여 실험에 적용하였다.

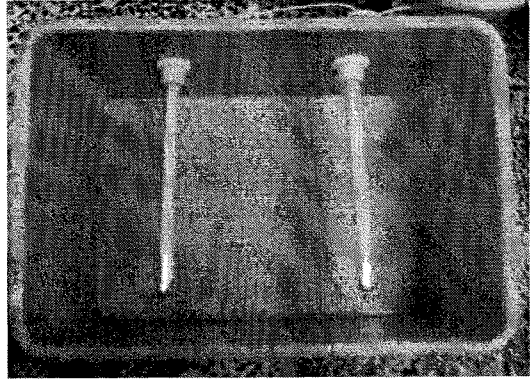
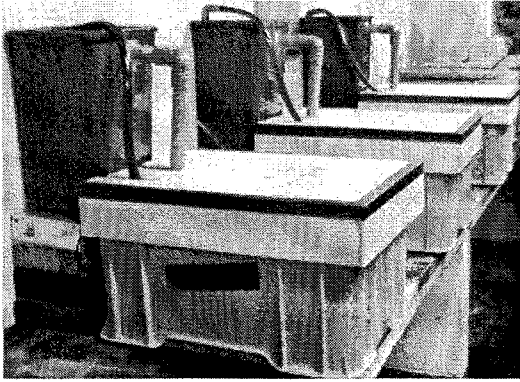


Fig. 2-9. UV irradiation equipment.

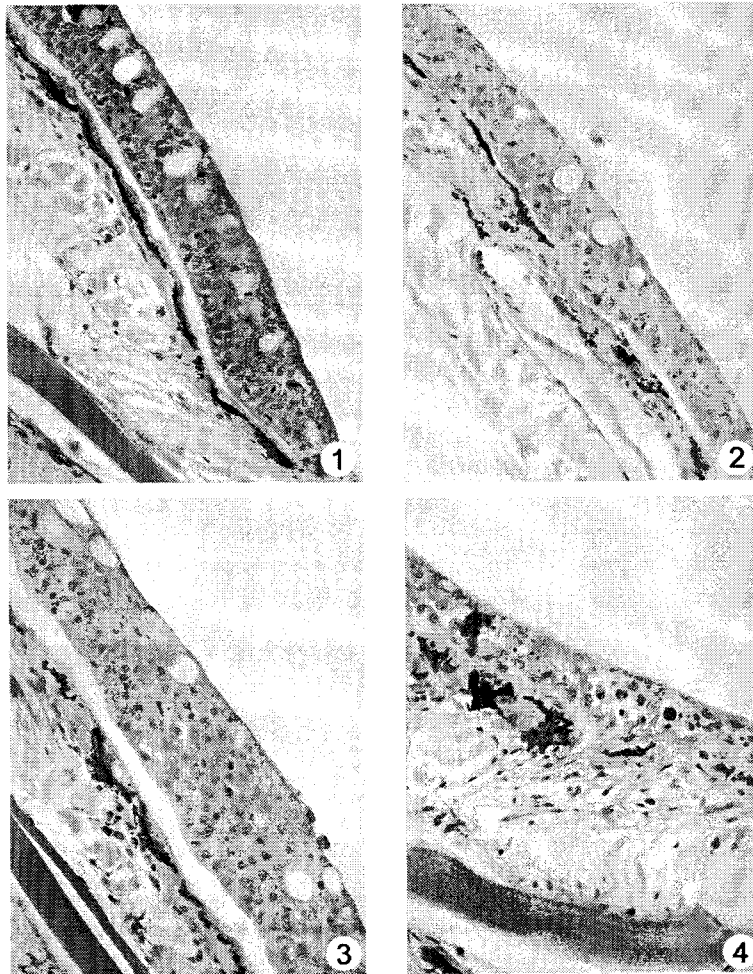


Fig. 2-10. The skin of histological changes of tissues in the Olive flounder. Only UV-B irradiation groups. 1: UV-B irradiation for 10mines, 2: UV-B irradiation for 30mines, 3: UV-B irradiation for 60mines, 4: UV-B irradiation for 90mines.

Table 2-6. Groups of UV-A

UVA groups	Number of fishes	Treatment
A1	4	Only UVA
A2	4	CCl ₄ → UVA
A3	4	CAP* → UVA
A4	6	CCl ₄ → CAP → UVA
C	3	No CCl ₄ , No UV
D	4	CCl ₄ (for hepatic damage)

* CAP : Chloramphenicol

Table 2-7. Groups of UV-B

UVB groups	Number of fishes	Treatment
B1	4	Only UVB
B2	5	CCl ₄ → UVB
B3	5	CAP* → UVB
B4	5	CCl ₄ → CAP → UVB

* CAP : Chloramphenicol

(5) 병리조직학적 관찰

병리조직학적 관찰은 피부의 광감작 반응을 예상하여, 피부의 변화내용 조사를 중심으로 하였고, 내장 장기의 관찰은 CCl₄ 투여에 따른 간장손상의 내용과 광감작 작용에 동반할 수도 있는 내부 장기의 병변 유무를 조사하기 위한 목적으로 이루어졌다.

(가) 광학현미경 표본제작 및 관찰

일정한 부위의 얇은 피부조직 및 대부분의 장기 (아가미, 심장, 간장, 신장, 비장, 위, 장)를 부완액 (Bouin's solution)에 1차 고정하였다. 피부 조직은 복강 후연, 측선 연결 상단부 1 x 1cm를 메스로 절취하였다. 24시간 후 동 고정액에 2차고정을 실시하였다. 다시 24시간 후 수세하고, 70%에서 100% 순차 농도 알코올에 탈수하였다. Xylene 투명화 및 파라핀 친화하고, 파라핀 포매 후 microtome (Reichert-jung 820, Leica, Germany)을 사용하여, 약 4 μ m두께의 박편을 얻어, H&E 염색표본을 제작한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 필요한 부분에 대하여는 디지털 사진촬영장치 (Polaroid DMC-3, Polaroid, USA)를 사용하여 얻었다.

(나) 주사전자현미경 표본제작 및 관찰

광학현미경용 피부조직 샘플 시 그 일부를 취하여 0.1M phosphate buffer (pH 7.0~7.4)로 세정하고, 3% glutaraldehyde에 4 $^{\circ}$ C, overnight 전고정 (pre-fixation)하였다. 전고정(pre-fixation) 완료 후, 탈지 면도날을 사용하여 피부조직을 피부표면이 나오게 하여, 너비 약 5mm², 두께 약 1mm³의 크기로 세절하였다. 다시 0.1M phosphate buffer (pH 7.0~7.4)에 3 차례 10 분씩 수세 후, 4 $^{\circ}$ C에서 1% osmium tetroxide solution에 2시간 후고정(post-fixation)하였다. 이를 0.1M phosphate buffer (pH 7.0~7.4)에 3차례 각 10분씩 수세하여, 50~100% 순차농도의 에틸알코올에서 탈수하고, isoamyl acetate로 치환하여 CO₂를 이용한 임계점 건조 후 양면테이프를 시료대에 부착시켰다. Gold coating하여 주사현미경 (S-2400, HITACHI)으로 관찰하였다.

(6) 혈액학적 조사

혈액학적 조사는 건강한 실험어군 선택을 위한 건강검사와 UV조사 실험군에서 나타날 수 있는 혈액학적 영향을 조사하기 위하여 수행하였으며, 특히 혈청에 대한 생화학적 조사는 CCl₄에 의한 간장손상 시 영향을 평가하기 위함이었다.

(가) 혈액의 세포학적 파라메타

채혈은 벤조카인에 마취시킨 모든 실험어의 미부정맥에서 혈액응고방지제인 heparin (25,000 I.U, 중의제약)처리된 1회용 주사기를 이용하여 채혈하였다. 혈구의 형태 관찰을 위해 슬라이드에 혈액을 도말하였다. 도말 혈액은 Diff-quick법으로 염색하여 도말표본을 제작하였다. 또한 hematocrit (Ht)측정을 위해 헤파린처리 모세관 (capillary tube)으로 흡입한 뒤, microhematocrit centrifuge (Model; 01501, Hawksley & Sons Ltd., England)를 사용하여 12,000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 microhematocrit reader (Hawksley reader, Hawksley & Sons Ltd., England)로 그 값(%)을 측정하였다.

(나) 혈액의 생화학적 파라메타 측정

혈액 도말표본 제작 후 남은 혈액은 실온에서 약 1시간 도안 방치하고 이어 4℃에서 24시간 동안 방치한 후 3000rpm에서 5분간 원심 분리함으로써, 혈청을 분리하였다. 이 혈청은 -70℃에 냉동보관하면서 실험 시 녹여 혈청 내 TP (total protein), ALT (alanine transaminase) 및 AST (aspartate transaminase)치를 automat ed dry chemical system (Kodak Ektachem 700, Rochester, New York)으로 측정하였다.

(7) 유의성 검정

본 결과의 통계적 처리는 SPSS 통계 프로그램(SPSS Inc., USA)을 이용하여 ANOVA test를 실시하였다. 그리고 사후 다중비교는 T-test로 실험군과 대조군 평균간의 유의성을 검정하였다 ($P < 0.05$).

나. 연구 결과

(1) 임상증상 및 육안적 소견

실험에 임한 모든 군에서 실험기간 동안 임상증상 및 육안적으로 특기할 만한 변화를 관찰할 수 없었다.

(2) 병리조직학적 관찰

(가) 광학현미경적 관찰

① 간장 손상 유발군

조직학적으로는 4개체 모두에서 정상 간과 비교하여 (Fig. 2-11-①) 간장 세포의 위축 (Fig. 2-11-②)과 심한 지방 변화 (Fig. 2-11-③)를 관찰할 수 있었다. 또한 개체에 따라서 국소적인 간 염소도 관찰되었다.

② 대조군

Group C (Fig. 2-12-①)와 Group D (Fig. 2-12-②)의 피부는 모두 정상이었다 (Table 2-8). 다만 Group D의 내부 장기를 모두 조직학적 검사를 실시하였는데, 간장을 제외한 모든 장기 (아가미, 비장, 신장, 위, 장)는 정상소견을 보였다.

③ UV-A 조사군

Group A1 (Fig. 2-13-①), Group A2 (Fig. 2-13-②), Group A3 (Fig. 2-13-③)은 대조구와 비교하여 피부의 조직학적 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 Group A4의 피부 상피 내에 핵소실 (loss of nucleus)과 함께 세포질 내에 초자포함체 (hyaline inclusion)가 출현하는 특징적인 피사세포가 6개체 모두에서 관찰되었다 (Fig. 2-13-④) (Table 2-9).

위의 모든 UV-A군에서 피부와 간장을 제외한 내부 장기 (아가미, 심장, 신장, 비장, 위, 장)를 조사한 결과 아가미의 2차새변 상피층의 특기할 만한 변화가 없었고 (Fig. 2-14-①), 신장에

는 MMC 증가와 사구체 비후 소견외에는 세뇨관, 집합관 및 조혈조직은 정상 (Fig. 2-14-②)이었다. 비장에는 MMC 증가가 관찰되었으나 유의하지 않았다. 위장 (Fig. 2-14-③)과 장에서도 차이가 없었으며, 심장 (Fig. 2-14-④)도 특기할만한 변화는 없었다.

④ UV-B 조사군

Group B1 (Fig. 2-15-①), Group B2 (Fig. 2-15-②)는 대조구와 비교하여 변화가 없었다. Group B3는 5개체중 2개체에서 상피에 핵소실을 보이는 초자포합체를 함유한 피사세포가 확인되었다 (Fig. 2-15-③). 또한 Group B4에는 상피에 핵농축 (pyknosis) 및 핵소실을 보이는 초자포합체를 함유한 피사세포가 전 예에서 다수 확인되었다 (Fig. 2-15-④) (Table 2-10).

위의 모든 UV-B군에서 역시 피부와 간장을 제외한 내부장기 아가미 (Fig. 2-16-①), 신장 (Fig. 2-16-②), 위장 (Fig. 2-16-③), 심장 (Fig. 2-16-④) 등에 특기할 만한 변화는 관찰되지 않았다.

(나) 주사 전자현미경적 관찰

정상개체 (Fig. 2-17-①)를 대조로하여 Group A4의 3표본을 택하여 피부 표면을 주사현미경으로 관찰하였다. 피부 표면은 미세융기 (microridge)로 구성된 지문모양의 구조가 있는데 정상개체의 구조 (Fig. 2-17-②)와 동일하게 관찰되었다. 이는 피부의 표면에는 광감작으로 인한 손상이 없었던 것으로 사료된다.

역시 정상 개체를 대조로하여 Group B4의 3개의 표본을 택하여 피부 표면을 주사현미경으로 관찰하였다. 피부 표면의 특징적인 미세융기(microridge)로 구성된 지문모양의 구조가 정상적으로 관찰되었다 (Fig. 2-17-③). 본 군에서도 피부 표면은 광감작으로 인한 손상은 없었던 것으로 인정되었다.

(3) 혈액학적 조사

(가) 혈액의 세포학적 파라메타

UV-A 조사군의 모든 혈액 조직은 성숙 적혈구와 임파구, 단핵구 등이 형태학적인 이상소견 없었다. Ht는 23 ~33% 사이로, 아무런 자극도 주지 않은 녀치의 hematocrit(Ht) 31~33% 보다 하향하였다. 그러나 이는 피부 및 간장의 변화와는 유의적 관계가 없었다.

역시 UV-B 조사군의 모든 혈액 조직에서 형태학적인 변화는 없었다. hematocrit (Ht)는 23~39%까지 매우 다양하게 나타났으며, 이 역시 정상 녀치의 값보다 다소 하향하지만 피부조직의 변화와는 유의적인 상관관계가 없었다.

(나) 혈액의 생화학적 파라메타 측정

Group C에서 TP의 평균은 4.0g/dl였고, ALT와 AST의 평균은 각각 0.5 μ /l 와 17.0 μ /l 로 나

타났다. Group D에서는 TP의 평균은 3.8g/dl였으며, ALT와 AST의 평균은 각각 4.9 μ /l와 19.9 μ /l로 나타났다 (Table 2-11).

UV-A 조사군은 각 Group에서 총단백량, ALT, AST치의 평균변화는 대조군(Group C, D)과 비교하여 소폭 관찰되었으나 유의하지 않았다 (Table 2-11). Group A2의 값은 얻지 못하였다.

UV-B 조사군은 각 Group에서 총단백량, ALT, AST치의 대조군에 비하여 평균변화는 소폭 관찰되었으나 유의하지 않았다. 다만 Group B1 총 단백질의 평균은 2.3g/dl로, Group B2는 2.8g/dl으로 유의하게 낮게 관찰되었으나 (Table 6) 이는 광감작 효과와는 연관이 없는 변화로 사료된다.

Table 2-8. Result of histological change in skin about control.

Group	Necrotic bodies of skin
C	-
D	-

∴ negative

Table 2-9. Result of histological change in skin about Groups A

Group	Necrotic bodies of skin
A1	-
A2	-
A3	-
A4	+

∴ negative , +: mild positive

Table 2-10. Result of histological change in skin about Groups B

Group	Necrotic bodies of skin
B1	-
B2	-
B3	+
B4	++

∴ negative , +: mildly positive, ++: severely positive

Table 2-11. Changes of blood total protein(TP), alanine transaminase(ALT), asparate transaminase (AST) blood chemistry in experimental groups

Group	Ht (%)	TP (g/dl)	ALT (μ/ℓ)	AST (μ/ℓ)
C	31 \pm 11.0 (n=3)	4.0 \pm 0.5 (n=3)	0.5 \pm 0.5 (n=3)	17.0 \pm 2.3 (n=3)
D	32 \pm 9.1 (n=4)	3.8 \pm 0.8 (n=4)	4.9 \pm 5.5 (n=4)	19.9 \pm 5.1 (n=3)
A1	33 \pm 2.4 (n=4)	3.4 \pm 1.1 (n=4)	3.0 \pm 2.6 (n=4)	14.6 \pm 8.5 (n=3)
A2	23 \pm 6.4 (n=4)	ND** (n=4)	ND** (n=4)	ND** (n=4)
A3	33 \pm 2.4 (n=5)	3.0 \pm 1.1 (n=4)	2.1 \pm 1.5 (n=4)	27.5 \pm 7.1 (n=4)
A4	26 \pm 3.3 (n=6)	3.2 \pm 0.4 (n=6)	2.7 \pm 1.4 (n=6)	10.6 \pm 2.9 (n=6)
B1	23 \pm 2.6 (n=4)	2.3 \pm 0.7* (n=3)	6.5 \pm 3.6 (n=3)	51.3 \pm 4.5 (n=2)
B2	39 \pm 4.3 (n=5)	2.8 \pm 0.9* (n=4)	0.5 \pm 0.3 (n=4)	28.0 \pm 6.1 (n=4)
B3	30 \pm 3.0 (n=5)	3.5 \pm 0.2 (n=5)	2.7 \pm 0.9 (n=5)	23.1 \pm 5.9 (n=5)
B4	31 \pm 4.9 (n=5)	3.1 \pm 0.4 (n=5)	1.4 \pm 0.8 (n=5)	19.1 \pm 6.7 (n=5)

* Statistical significance from control (P<0.05), **: No data

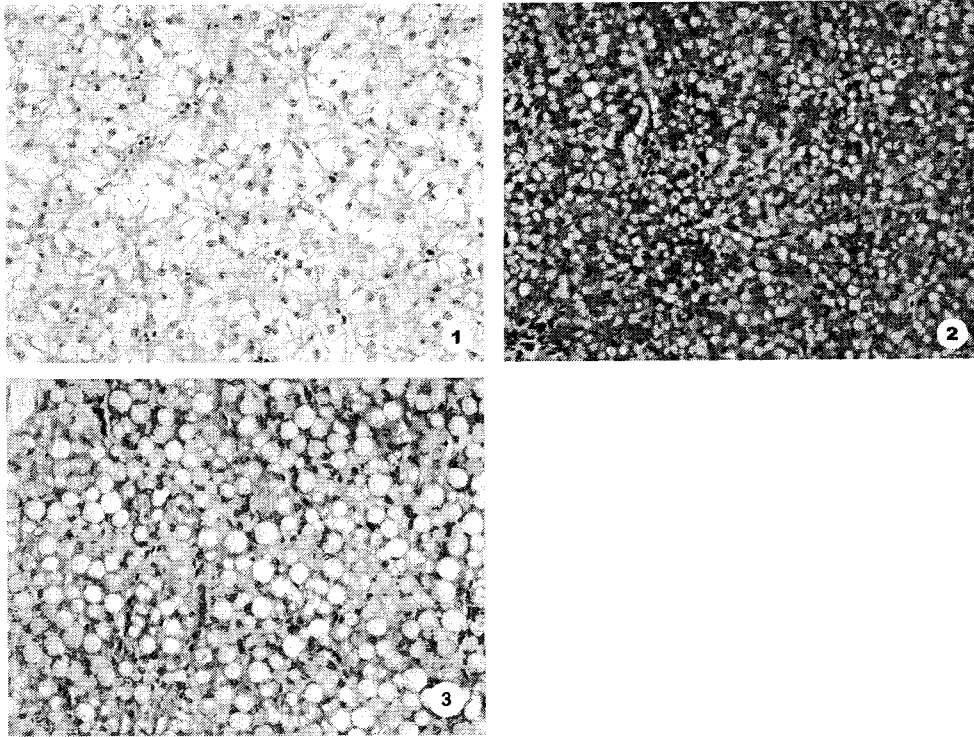


Fig. 2-11. The normal and hepatic damage histological feature of liver in olive flounder. H&E, $\times 400$. 1: The normal histological feature of liver, 2: Atrophy liver after CCl_4 oral injections, 3: Fatty liver with lipid droplets in cytoplasm of a hepatocyte.



Fig. 2-12. The normal histological feature of skin in olive flounder. H&E, $\times 400$. 1: The normal histological feature of skin. No irradiation, No CCl_4 . BM : basement membrane, M : mucous cell, 2: The normal histological feature of skin. The CCl_4 oral injection.

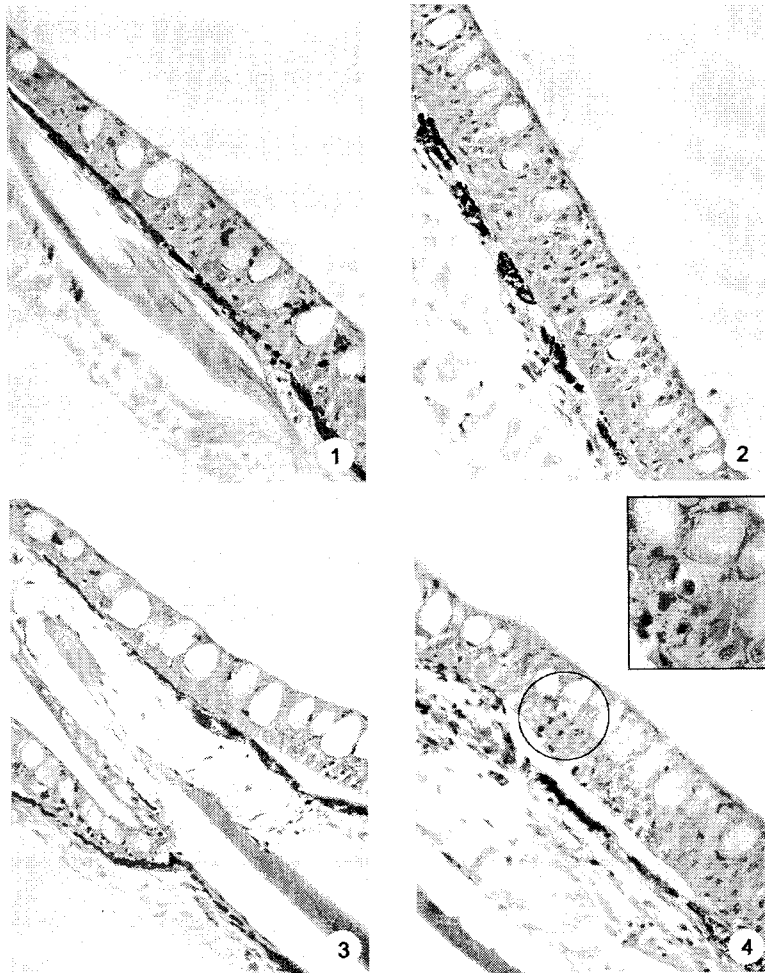


Fig. 2-13. The skin of histological changes of tissues in the Olive flounder. UV-A groups. H&E, $\times 400$. 1: Only UV-A irradiated, 2: Carbon tetrachloride plus UV-A irradiated, 3: Chloramphenicol plus UV-A irradiated, 4: Carbon tetrachloride plus chloramphenicol plus UV-A irradiated. Circle : Necrotic cell.

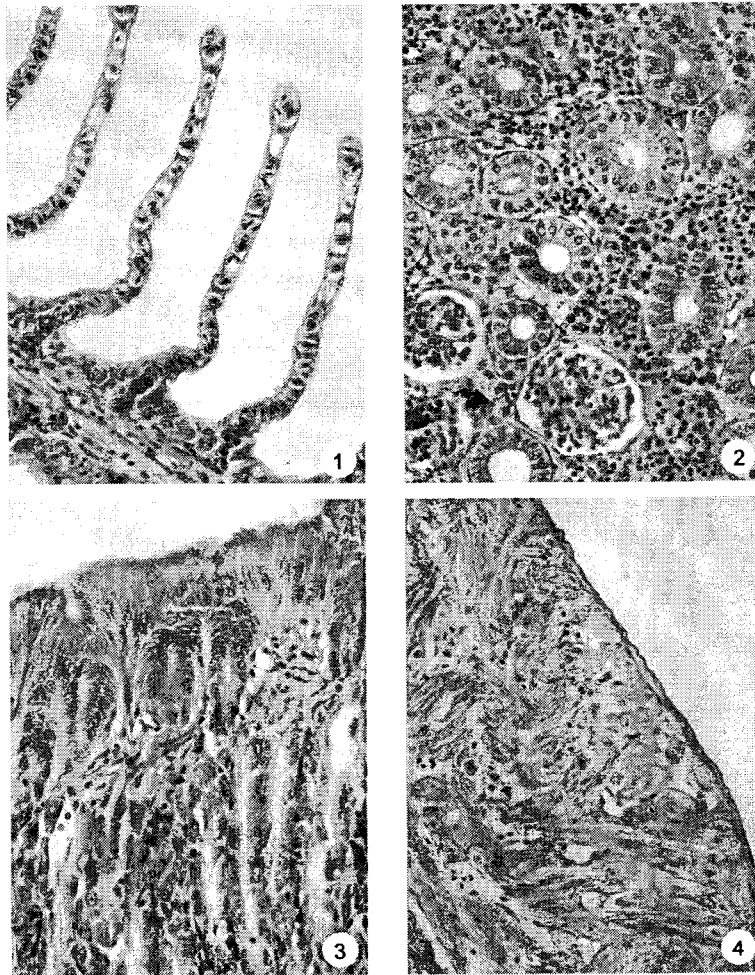


Fig. 2-14. The histological features of gill, kidney, stomach, heart in the olive flounder. UV-A groups. H&E, $\times 400$. 1: Gill, 2: Kidney after UV-A irradiated fish, 3: Stomach after carbon tetrachloride injection, 4: Heart after carbon tetrachloride injection & UV-A irradiated

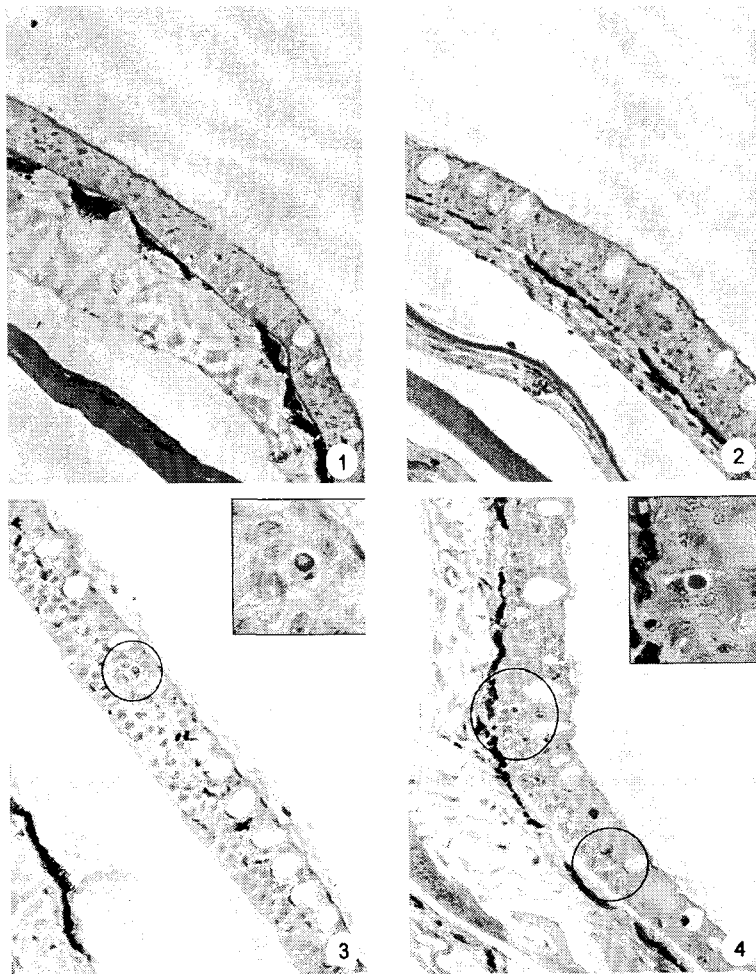


Fig. 2-15. The skin of histological changes of tissues in the Olive flounder. UV-B groups. H&E, $\times 400$. 1: Only UV-B irradiated, 2: Carbon tetrachloride and UV-B irradiated, 3: Chloramphenicol and UV-B irradiated, 4: Carbon tetrachloride and chloramphenicol and UV-B irradiated.

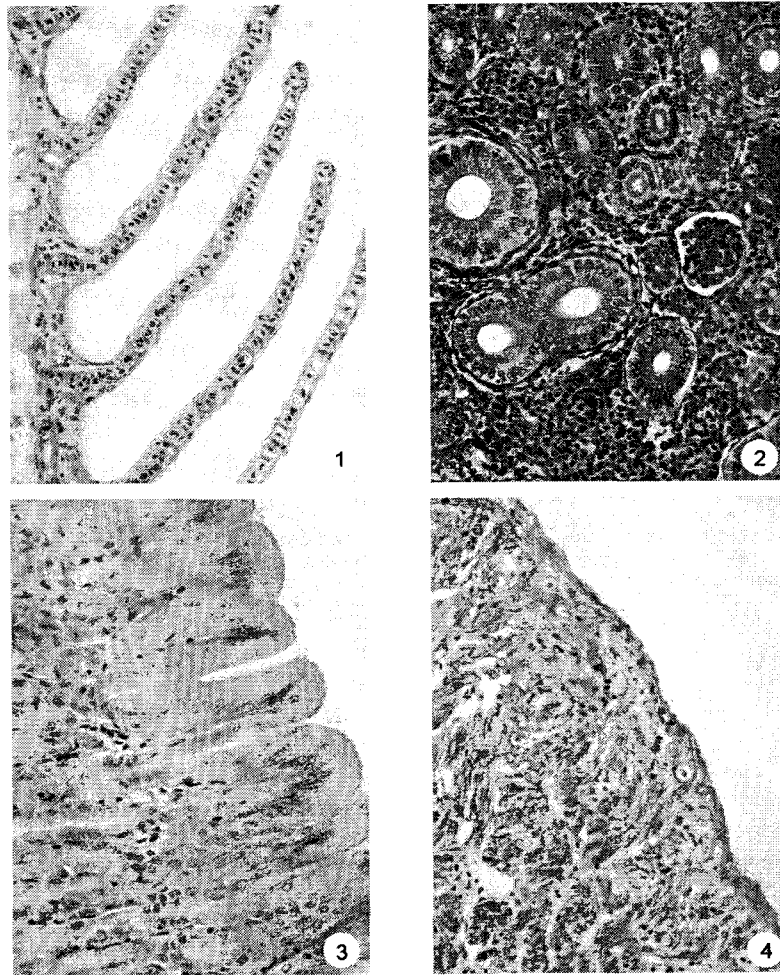


Fig. 2-16. The histological features of gill, kidney, stomach, heart in the olive flounder. UV-B groups. H&E, $\times 400$. 1: Gill after carbon tetrachloride injection and UV-B irradiation, 2: Kidney after UV-B irradiated fish, 3: Stomach after for carbon tetrachloride injection, 4: Heart after carbon tetrachloride injection and UV-B irradiation.

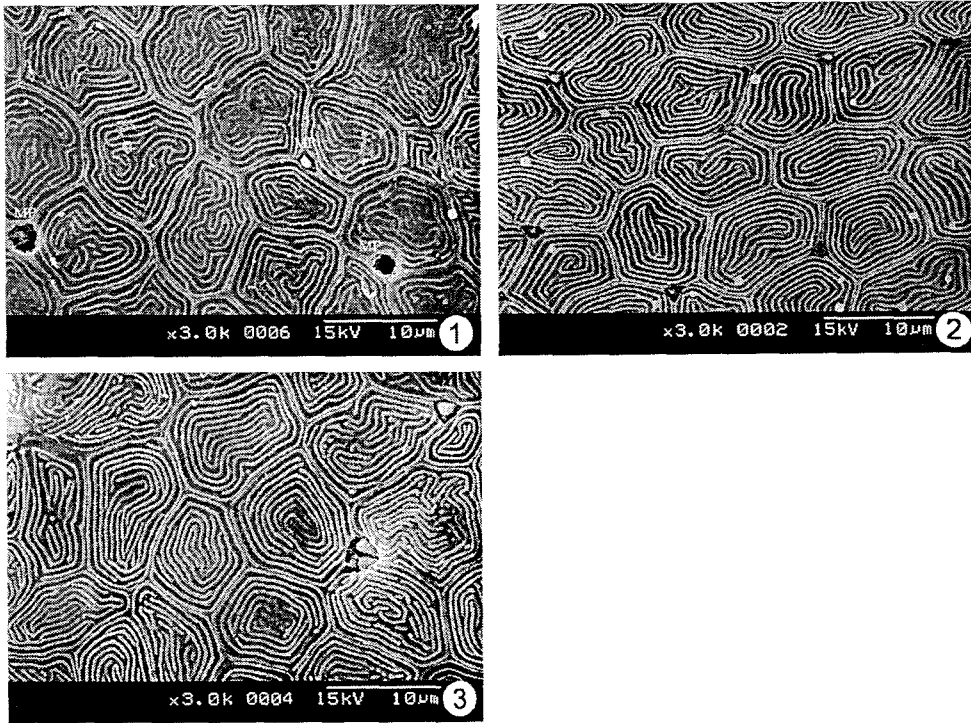


Fig. 2-17. The scanning electron microscopic features of skin in Olive flounder. $\times 3000$. 1: The micro ridge of normal skin, 2: UV-A irradiated skin in olive flounder, 3: UV-B irradiated skin of olive flounder.

다. 고 찰

어류에서의 광감작은 phenothiazine, porphyrin 등에서 보고된바 있으며, 섭취한 물질이 체내를 순환하다가 표피에 이르러 자외선에 노출되었을 때 발생한다. 현재 시판되는 수산용 약제의 광감작 효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 비공식적인 발표이지만, CAP 투약 후 차광막이 없는 야외 노지에서 화상 내지 광감작독성을 의심하게 하는 대량폐사 상황이 발생하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 CAP의 광감작 유발 물질로서의 가능성을 추적하고자 하였으며, 또한 간장 손상이 광감작 작용에 상승적 영향을 미칠 수 있는지에 대하여 알기 위하여, UV-A 및 UV-B 조사를 통하여 일련의 병리학적 연구를 수행하였다.

광감작이란 화상과 구별되는 현상이며, 광흡수성 물질 (photodynamic substance)이 체내에 발생하거나, 그러한 물질을 섭취하여 혈중에 순환될 경우, 자외선 (ultraviolet light) 노출로 피부염 (dermatitis)이 발생하는 현상을 말한다 (Jones *et al.*, 1997). 포유류에서는 광감작 유형을 크게 3가지로 보고 있다. 첫 번째 1차 광감작으로 물질 자체만으로 광감작을 일으키는 것을 말한다. 특정 식물의 색소 helianthrones와 furocoumarins 등과 구충제인 phenothiazine이 있다. 두 번째 porphyrin의 대사장애로 인한 광감작으로, 효소 결핍으로 생성된 uroporphyrin, coproporphyrin 등이 UV를 흡수해 피부염을 일으킨다. 세 번째 2차 광감작으로 간장 손상을 입었을 경우 대사되지 않은 산물이 체내를 순환하다가 광활성을 일으킨다. 대표적인 예가 chlorophyll이다 (Jones *et al.*, 1997).

위에서 언급한 것 외에도 Johnson 등의 연구에서 포유류에서 quinolone계 항생제가 광감작을 일으킨다고 하였다 (Johnson *et al.* 1997; Klecak *et al.* 1997).

연어과 어류인 Atlantic salmon에서 phenothiazine은 광감작 독성이 알려져 있다 (Hardy, 2001). Bullock 등은 Atlantic salmon 및 sea trout에서의 ulcerative dermal necrosis (UDN)이 광감작 독성의 관여가 의심되고 하였다 (Bullock & Roberts, 1979; Roberts, 2001). 또한 잉어과 어류가 광흡수활성을 가진 reten, fluoranthene과 같은 방향족 탄소화합물을 섭취할 경우, 광감작 반응의 발생할 수 있다고 알려져 있다. (Bullock *et al.*, 1981, Häkkinen *et al.*, 2003, 2004; Weinstein, 1997).

본 연구에서는 CAP 투약시 UV-A 조사시 피부 상피에 핵소실 (loss of nucleus)과 함께 세포질 내에 초자포함체 (hyaline inclusion)가 출현하는 특징적인 괴사세포가 관찰되었으며, UV-B 조사에서도 핵농축 (pyknosis) 및 핵소실을 보이는 초자포함체를 함유한 괴사세포가 관찰되었다. 특기할 만한 점은 UV-A 조사군에서는 간장 손상개체에서만 상피의 병리학적 변화가 나타났으며, UV-B 조사군에서는 간장 손상개체에 특히 두드러지게 나타났다.

사염화탄소 (CCl_4 ; Carbon tetrachloride)는 P-450에 의하여 free radical CCl_3 로 변환되어 독성 효과를 나타낸다. free radical은 국소적으로 세포막의 인지질에 있는 polyenic fatty acid의 auto-oxidation을 일으킨다고 알려져 있다. 사염화탄소에 노출시 간장의 단백질 합성이 저하되고, triglycerides와의 복합체인 apoprotein 합성이 어려워지며 당단백의 분비가 감소한다. 따라서 지방간이 발생하게 된다 (Robbins *et al.*, 1999). Ree의 연구에서 대표적인 간장 손상을 유발시키는 약물로 Rat에 지속적으로 복강주사 하였을 때 간세포 괴사 발생시킨다고 하였다 (Ree,

1963). Casillas 등은 English sole (*Parophrys vetulus*)에 복강주사 (4.8ml CCl₄/kg)를 하였을 때 간세포의 괴사가 발생한다고 하였고, Inui는 eel에 복강주사 (0.01cc CCl₄/100g)하였을 때 ALT, AST, ALP치가 증가한다고 하였다 (Casillas *et al.*, 1983; Inui, 1968).

본 연구에서는 대부분이 간장에서 대사되는 CAP가 간장에 손상이 유발되었을 때 광감작 발생 유무를 알아보려고 하였다. 따라서 인위적인 간장 손상 유발을 위해 대표적인 약물인 사염화탄소를 사용하였으며, 복강 주사로 인한 급성폐사를 방지하기위하여 경구투여로 실시하였다. 실시결과 간장에서 간세포의 심한 위축, 산재적인 지방 축적, 국소적인 간염소가 관찰되었다.

광범위 항생제인 CAP는 현재 수산용으로 시판되고 있지 않으나, 어병치료에 효과가 높으므로 현장에서 상용되고 있다. 이전 실험과 Jung의 보고에 따르면 급성독성으로 인한 폐사 혹은 내부 장기의 변화는 없는 것으로 알려져 있다 (Jung, 2003). 포유류에서의 부작용으로 이미 재생 불량성 빈혈 (hypoplastic anemia), 간기능이 미숙한 신생아에서의 회색 증후군 'gray baby syndrome' 등이 보고 되어있다 (Lee, 2003). 어류에서의 부작용으로는 oxytetracycline과 함께 투여할 경우, 뱀장어의 적혈구 세포질 공포화, 핵변형, erythroblast의 감소, erythrocyte의 지방대사 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Kreutzmann, 1977).

본 연구에서 CAP만 투약 혹은 간장 손상 후 CAP를 투약 하였을 때, 병리학적 변화가 없었음을 확인하였다. 그러나 간장을 손상 시킨 후 클로람페니콜을 투약하고 UV-A에 노출시킨 6 개체 모두 핵소실 (loss of nucleus)과 함께 세포질 내에 초자포함체 (hyaline inclusion)가 출현하는 특징적인 괴사세포가 관찰되었다. 한편 CAP를 투약하고 UV-B에 노출시킨 일부 개체에서 핵소실을 보이는 초자 포함체를 함유한 괴사세포가 확인되었다. 간장을 손상 시킨 후 클로람페니콜을 투약하고 UV-B에 노출시켰을 때 상피에 핵농축 (pyknosis) 및 핵소실을 보이는 초자 포함체를 함유한 괴사세포가 전 예에서 다수 확인되었다.

위의 내용으로 정리해 보면 광범위 항생제인 CAP는 UV-A 및 UV-B에 대하여 광감작 효과를 가지고 있으며, 간장의 대사 장애가 있는 경우 특히 광감작의 위험이 높아질 것이라 사료된다. 약물로 인한 피해를 줄이려면, 우선 투약어의 건강상태 특히 간장의 상태를 검진이 필요하다. 그리고 약물을 투여할 때 반드시 차광을 하여 자외선에 노출되지 않도록 주의할 것을 하여야 할 것이다.

본 실험은 일반 투여량 70~80mg/kg의 약 2배인 150mg/kg인 고농도의 CAP를 투약하여 극단적인 조건으로 시행하였다. 이후 약물의 농도를 순차적으로 다르게 하여, 순차적 농도에 따른 광감작의 발생 유무를 판단하는 실험이 필요하다. 또한 클로람페니콜 계열의 약물인 치암페니콜과 플로르페니콜의 광감작 가능성에 대한 실험도 필요하다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 목표 달성도

구분	목 표	달성도	내 용
내성측면	내성균주의 확보 및 특성 분석	100 %	- 1994년부터 2003년까지 10년간에 걸친 어병세균의 확보와 그 내성 특성 분석
	<i>tet</i> 유전자의 분석을 multiplex PCR 기술의 개발	100%	- 6개의 gene을 single PCR reaction으로 내성 유전자를 분석하는 것은 최초임 - 동종의 gene group간의 차이까지도 분별할 수 있는 기법임 - 타 분야에의 활용성이 매우 높은 기술임
	<i>gyrA</i> 유전자 cloning과 그 mutation 분석	100%	- <i>E.tarda</i> 의 <i>gyrA</i> 유전자 full sequence cloning - Topoisomerase IV 의 유전자 cloning - 해양 환경에서의 isolate가 나타내는 유전 특성 분석 - <i>in vitro</i> mutant 가 나타내는 mutation 분석 - MAMA 법 응용에 의한 대량 분석 기술 개발
	어병세균에 적용하여 내성 유전자의 분포 및 특성 분석	100%	- <i>tet</i> gene들의 분포도 분석은 우리 나라에서 최초임 - 내성 plasmid에 의한 높은 내성전달 비율 확인 - <i>tet B</i> 와 <i>tetG</i> 의 활용이 있다는 새로운 사실을 발견 - 개발된 기술의 적용 결과 그 탁월성을 입증함 - Quinolone resistant <i>E.tarda</i> 의 <i>gyrA</i> 유전자에서 나타나는 제한적 mutation에 대한 증거 확보 - <i>E.tarda</i> chromosome 에서의 DNA gyrase subunit gene 의 location 결정
	미생물 총에의 적용	100%	- 개발된 기법의 직접 활용 임 - 항생제를 많이 사용하고 있는 양식장 주변 (그물 망주위를 중심)의 미생물총에 대한 내성 유전자 분석은 최초임 - 장내세균의 분석과 어류에 대한 항생제 사용에 의한 내성 유전자 분석을 다양한 형태의 <i>tet</i> gene을 대상으로 하여 실시된 것은 최초임

어류의 방 어체계 및 생리적 기 능에 미치 는 영향	In vivo 상태하에서 CAP의 생리적 독성 평가	100%	-생체내 CAP의 잔류량 분석 -조혈기관 및 면역기능에 대한 영향 파악 -각종 조직 장기에 대한 조직학적 변화를 조사하였음
	In vivo 상태하에서CAP의 생리적 독성 평가	100%	-순환기(혈관 및 심장)계통에 대한 CAP의 영향 파악 -소화기(위, 장관)계통에 대한 CAP의 영향 파악 -호흡기 계통 및 면역기능에 대한 CAP의 영향 파악
	양식현장에서 CAP및 CAP+UV가 어떠한 결과를 유도 할 수 있는지 분석	100%	-CAP 단독을 사용할 시에는 양식현장에서 어류의 대량 폐사가 일어나지 않을 것으로 파악됨 -그러나, CAP+UV시에는 어류의 대량 폐사가 일어날 가능성 이 매우 높음
	UV 및 UV+CAP 사용시 어류의 방어 체계에 미치는 영향을 혈액학적 및 면역학적 관점에서 분석	100%	-UV 자체가 어류의 각종 조직에 대하여 병리학적 손상은 초 래하지 않았으나, 혈액학적 조성 및 면역학적 기능에는 경미 한 영향을 미치는 사실 파악함 -UV는 어류에 대한 CAP의 독작용을 증대시킨다는 사실을 파 악함

구분	목 표	달성도 (%)	내 용
독성영향 평가측면	급성독성 영향평가	100 %	단회 또는 다회의 과다 용량 투여에 따른 임상 및 병리 조직학적 평가
	UV 조사 장치 (UV-A 및 B) 개발	100%	조사에 따른 피부화상 발생 유무평가
	CAP의 피부 광감작 독성 평가	100%	정상개체에 대한 CAP 투여 후 UV-A 및 B 조사
	인위적 간장 손상 모델 개발	100%	Carbon tetrachloride(CCl ₄) 투여에 의한 인위적 간장 손 상 모델 개발
	인위적 간장 손상 병어 모델에 대한 광감작 독성 평가	100%	Carbon tetrachloride(CCl ₄) 투여 인위적 간장 손상 개체 에 대한 CAP의 광감작 독성 평가

제 2 절 기술적 · 학문적 발전에의 기여도

1. 세균의 내성발현에 관한 연구

- 최근 어병의 증가와 함께 내성균 발생도 증가하고 있으나 그 증가의 현상만 조사하고 있을 뿐 그 유전자가 어떤 특성을 가지고 있는지 그리고 그 특징적 위험성은 어떠한지에 대한 분석은 이루어지지 않고 있었다.
- 본 연구에서는 국내에서 가장 중요한 어병 세균인 *E.tarda*에 나타나는 내성균의 유전자 특성과 현황을 파악하여 어떠한 위험성에 대한 분석을 분자 생물학적인 관점에서 구체적으로 분석하여 과학적으로 증명된 내성 정보의 data를 이루게 하므로써 (GenBank에 등록) 향후 우리나라에서 나타나는 내성균이 새로운 출현인지 아닌지를 정확하게 알 수 있게 하였다.
- 그러므로 향후 과학적으로 수산생물 내성 유전자를 수의 또는 인체 과학에서의 내성 유전자와 분자적 level에서의 비교를 통해 내성 유전자의 origin 추적이 가능하게 하였다. 즉 국내 어류에서 나타나는 또는 현재 나타나 있는 내성균은 어떠한 경로로 유입되었고, 그 변이와 분포는 현재와 미래에 어떤 상태로 진행 되고 있는지에 대한 예측을 가능하게 하였다.
- 기술적으로 본 연구에서 활용되는 할 cloning법과 multiplex PCR 등은 향후 beta lactamase의 유전자를 포함한 거의 모든 분야 항생제 내성 특성 분석에 적용 가능한 과학적인 기법이라고 할 수 있다. 또한 직접 항생제 (Tc)를 경구 투여 하는 *In vivo* 실험은 장내세균에서의 내성균 변화뿐만 아니라 유전자의 변화 kinetics도 추적하는 새로운 접근으로 보다 정밀한 내성균의 변화를 알 수 있는데 큰 역할을 할 수 있는 방법이 될 것이다.
- Database화 된 유전 정보는 양식어류 수입을 위한 수산물 수입 검사소 또는 양식 협회 등에서 어떻게 무슨 내성 유전자에 대하여 어떠한 분석을 하여야 하는지에 대한 정확한 기준을 제시할 수 있을 것이다. 즉 내성 유전자의 분자생물학적인 비교 분석은 양식 현장에서 나타난 내성균이 함유한 유전자의 근원이 외국인지 또는 주변 환경인지 명확하게 밝혀 줄 수 있게 해 줄 것이다.
- 경제 산업적 측면에서도 현재 우리나라 어병세균이 나타내는 항생제 내성의 정도 분석과 유전적 특성분석이 이루어지게 되어 어병치료를 위한 보다 효과적인 대책 마련이 가능하게 되었다. 그리고 모든 약제는 치료 효과라는 장점과 함께 직접적인 내성균 유도라는 자체문제를 나타낼 수 있다는 단점들이 반드시 고려되어야 한다는 것을 동물약품회사와 어민에게 주지 할 수 있게 되었다. 또한 본 연구에서 이루어진 내성 유전자의 database 화 및 새로운 유전자의 screening을 통하여 현재 우리나라의 내성균 문제의 근본적인 조사가 이루어지고, 동시에 외국으로부터 이입되는 내성균을 막을 수 있는 대책마련이 가능하고, 향후 국제적 무역의 마찰과 어민보호를 위한 논리적이고 과학적인 무역 장벽을 만들어 나갈 수 있는 정보를 제공하게 되었다.

2. 항생제의 생리 및 면역학적 부작용과 독성에 관한 측면

- Chloramphenicol이 어류의 생리적 기능에 미치는 영향 및 독성학적 분석의 결과는 항생제를 중심으로 한 각종 약제의 어류 특이의 독성영향 연구에 정보를 학계와 어민에게 제공하여 양식현장에서 산업적으로는 어민들에게 어류의 건강에 있어서 약물안전사용과 환경조건의 중요성 인식시켜 약화사고로 인한 경제적 피해를 막는데 기여 할 것이며,

- 또한, 학문적으로는 양식현장에서의 약화사고 평가 및 약물의 안전 사용에 관한 정보를 제공하여 항생제 및 각종 약제의 타당한 사용법 근거를 마련 할 수 있도록 하고 양식 현장에서 증대되고 있는 각종 약화사고에 대한 과학적인 평가 까지도 가능하게 하였다. 향후 수산 과학 분야에서 어류 특이의 독성 발현 양상 연구와 각종 약물의 일반약리 실험의 중요성과 효과에 대한 연구에서 중요한 이정표가 될 것이라고 생각한다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 세균의 항생제 내성발현에 관한 연구

본 연구 결과로부터 각종 내성균이 갖는 내성 유전자의 특이적 염기배열에 변화를 확인 가능하게 하므로, 그 종류가 증가 추세에 있는 내성균에 대한 특이적 분별과 그 내성 발현의 원천을 이해할 수 있게 된다. 이는 향후 이식경로 등의 파악을 가능케 하여 근원적인 차단책 마련이 가능하다. 이는 수산생물의 원산지 확인과 함께, 세계적인 질병 유입지 확인이라는 새로운 hot issue로 향후 대두될 수 있을 것이다.

현재 세계 각국에서 양식업의 활성화를 위하여 많은 노력들을 기울이고 있는 실정이며, 그 일환으로 수입되는 종묘 또는 활어에 대한 검역사업에 대한 중요성이 국가적으로 인식되어지고 있는 상황에서, 수입어류에 의한 이식성 내성균의 전파 가능성에 대한 경보 체계에 중요한 정보를 제공 할 수 있게 되었다. 국제적으로 분쟁의 소지가 있을 때 활용성이 높은 gene database일 것이다.

그러므로 향후 본 연구의 활용은 양식 현장에서 증대되고 있는 내성균의 진원지가 어디냐 하는 것에 대한 과학적인 접근이 가능하므로 경제적으로나 외교적 측면 모두에서 본 연구는 그 의미가 매우 크며 국가간 또는 수출입업자 간에 나타나는 분쟁해결을 위한 과학적인 조사 방법과 준비된 자료를 본 연구를 통하여 제공 할 수 있다.

수산물의 원산지판명 등에도 본 연구의 기법과 개념은 적용 할 수 있고 또 직접 응용도 가능하다. 학문적으로도 DNA walking에 의한 새로운 variable region screening법은 family적으로 나타나는 유전자에 대한 다른 학문 분야에서 활용 가능하게 하여야 할 것이다.

외국에서 밝혀진 유전정보를 제외한 새로운 유전정보도 확실하게 얻을 수 있으므로 새로운 내성 유전자 정보를 얻는 본 연구에 바탕을 둔 분석을 실시한다면 아주 용이 할 것이다. 추가적으로 가장 보편적으로 많이 나타나는 *Vibrio spp*에서 beta-lactamase 유전자에 대한 정밀한 분석이 이루어지고 이를 본 연구 결과와 비교 할 수 있다면 훨씬 진전된 유전적 해석이 가능 할 것이다.

제 2 절 항생제의 생리 및 면역학적 부작용 및 독성에 관한 측면

본 연구 결과는 이 항생제 뿐 아니라, 다른 종류의 항생제에 대하여도 적용이 가능하다. 우리나라에서는 아직 표준사양법이 확립되어 있지 않아, 특히 식이성 간장병의 발생 확률이 극단적으로 높을 것으로 짐작된다.

일반적으로 항생제나 다른 각종 물질은 대부분 간에서 대사된 후 배설과정을 거치게 된다. 간장의 기능에 문제가 없을 경우에는 그것이 용량이 많거나 사용기간이 길다고 하더라도 집단적 폐사에 이르는 결과로 추이되지 않을 것이다.

본 연구에서 CAP은 CCl₄를 응용한 간장손상 개체에서 광감작 독성을 실험적으로 발현시키고 있지만, 실제 임상에서와 같이 육안적으로 상피가 벗겨지거나, 심한 피사적 손상 내지 폐사

에 이르는 유사상황은 재현되지 않았다. 이는 인위적 간장손상의 내용이 기대한 바와는 달리 경미한 수준에 머물렀기 때문인 것과 자외선의 노출도 자연 자외선에 의한 것이 아니었기 때문인 것으로 생각된다. 따라서, 간장 특이의 기능손상을 유도하거나, 식이성으로 지방간병을 유발시킨 상황에서 해당 약물과 자외선에 노출시켰을 때 피부의 변화를 관찰하는 일이 남았다고 생각된다.

어류의 피부는 포유류의 경우에 비해 매우 섬세한 조직이므로, 어체의 외부환경으로부터의 보호와 밀접한 관련이 있다. 특히 넙치와 같은 체부의 반이 직사광선을 한꺼번에 받을 수 있는 조건으로 광선에너지에 대하여 매우 민감할 수 있다. Ulcerative dermal necrosis(UDN)에서와 같이 그 원인의 일부를 광감작성 인자에 두고 있다는 사실만 하여도 지금 적용되고 있는 모든 항생제 등 화학요법제에 대하여 잠재 광감작성을 파악해 가야할 것으로 사료된다. 이 부분은 장래 사료(기능성 사료 포함)개발, 치료 약물의 개발, 영양보조제의 개발 등과 관련하여 반드시 통과되어야 할 시험법의 하나로도 정착되어야 한다고 생각되며, 약물투여 전에 어류의 건강평가가 반드시 따라야 하는 것도 이 연구결과로써 뒷받침할 수 있다.

제 6 장 참고문헌

- Akasaka, T., Onodera, Y., Tanaka, M. and Sato, K., (1999) Cloning, Expression, and Enzymatic Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 530-536.
- Andersen, S. R. and R. A. Sandaa. (1994) Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 908-912.
- Bébéar, C.M., Charron, A., Joseph, M.B., Bébéar, C. and Renaudin, J., (1998) Cloning and Nucleotide Sequences of the Topoisomerase IV *parC* and *parE* Genes of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2024-2031.
- Briheim, G., and Dahlgren, C. (1987) Influence of antibiotics on formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced leukocyte chemiluminescence. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 31, 763-767.
- Bullock AM, Roberts RJ (1979) Induction of UDN-like lesions in salmoid fish by exposure to ultraviolet light in the presence of phototoxic agents *J Fish Dis* 2, 439-441.
- Bullock AM, Roberts RJ (1981) Sunburn lesions in salmonid fry: a clinical and histological report. *J Fish Dis* 4, 271-275.
- Bullock AM, Roberts RJ (1992) The influence of ultraviolet-B radiation on the mechanism of wound repair in the skin of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis.* 15, 143-152.
- Casillas E, Myers M, Ames WE (1983) Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in english sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. *Aquat Toxicol* 2, 61-78.
- Castells, G., Intorre, L., Bertini, S., Cristofol, C., and Arboix, M. (2000) Oral single-dose pharmacokinetics of thiamphenicol in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 23, 53-54.
- Chen, W. and T. Kuo. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21, 2260.
- Colman, S.D., Hu, P.C. and Bott, K.F., (1990) *Mycoplasma pneumoniae* DNA gyrase genes. *Mol. Microbiol.* 4, 1129-1134.
- Cravedi JP, Baradat M (1991) Comparative metabolic profiling of chloramphenicol by isolated hepatocytes from rat and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 100C, No. 3, 649-652.
- Cravedi, J.P., Heuillet, G., Peletan, J., and Wal, J. (1985) Disposition and metabolism of chloramphenicol in trout. *Xenobiotica*, 15, 115-121.
- Dimri, G.P. and Das, H.K., (1990) Cloning and sequence analysis of *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 18, 151-156.

- Dosogne, H., Hoeben, D., Burvenich, C., and Lohuis, J.A.C.M. (1998) Effect of cephapirin and meccillinam on the phagocytic and respiratory burst activity of neutrophil leukocytes isolated from bovine blood. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 21, 421-427.
- Feder, Jr H.M., Osler, C., and Maderazo, E.G. (1981) Chloramphenicol: a review of its use in clinical practice. *Infect. Dis.*, 3, 479-479.
- Ferguson HW (1989) Systemic pathology of fish. Iowa state university, USA.
- Guillaume, G., D. Verbrugge, M. L. Chasseur-Libotte, W. Moens, J. M. Collard. (2000) PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiology Ecology*, 32, 77-85.
- Häkkinen J, Vehniäinen E, Oikari A (2003) Histopathological responses of newly hatched larvae of whitefish (*Coregonus lavaretus s.l.*) to UV-B induced toxicity of retene. *Aquat Toxicol* 63, 159-171.
- Häkkinen J, Vehniäinen E, Oikari A (2004) High sensitivity of northern pike larvae to UV-B but no UV-photoinduced toxicity of retene. *Aquat Toxicol* 66, 393-404.
- Hanse, L. M., P. C. Blanchard and D. C. Hirsh. (1996) Distribution of tet (H) among *Pasteurella* isolates from the United States and Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1558-1560.
- Hoeben, D., Burvenich, H., and Heyneman, R. (1997a) Influence of antimicrobial agents on bacterial activity of bovine milk polymorphonuclear leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56, 271-282.
- Hoeben, D., Dosogne, H., Heyneman, R., and Burvenich, H. (1997b) Effect of antibiotics on the phagocytic and respiratory burst activity of bovine granulocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 332, 289-297.
- Holt, D.E., Harvey, D., and Hurley, R. (1993) Chloramphenicol toxicity. *Adv. Drug. React. Toxicol. Rev.*, 12, 83-95.
- Holt, D.E., Harvey, D., and Hurley, R. (1993) Chloramphenicol toxicity. *Adv. Drug. React. Toxicol. Rev.*, 12, 83-95.
- Holt, D.E., Ryder, T.A., Fairbairn, A., and Hurley, R., and Harvey, D. (1997) The myelotoxicity of chloramphenicol: *in vitro* and *in vivo* studies: I. *In vitro* effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.*, 16, 570-576.
- Holt, D.E., Ryder, T.A., Fairbairn, A., Hurley, R., and Harvey, D. (1997) The myelotoxicity of chloramphenicol: *in vitro* and *in vivo* studies: I. *In vitro* effects on cells in culture. *Hum. Exp. Toxicol.*, 16, 570-576.
- Horowitz, D.S. and Wang, J.C., (1987) Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 262, 5339-5344.
- Horowitz, M.S. and Loeb, L.A., (1988) An *E. coli* promoter that regulates transcription by DNA superhelix-induced cruciform extrusion. *Science*. 241, 703-705.

- Intorre, L., Castells, G., Cristofol, C., Bertini, S., Soldani, G., and Arboix, M. (2002) Residue depletion of thiamphenicol in the sea-bass. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 25, 59-63.
- Inui Y (1968) Pathological study on the effects of carbon tetrachloride poisoning on the eel liver. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab. Vol. 18, No. 2*, 157-167.
- Johnson BE, Gibbs NK, Ferguson J (1997) Quinolone antibiotic with potential to photosensitize skin tumorigenesis. *J Photochem Photobiol B: Biol* 37, 171-173.
- Jung, J.S., Seo, J.S., Eom, H.K., Kim, N.Y., Lee, S.H., Huh, M.D., Jung, H.D., and Chung, J.K. (2004) Tissue level of chloramphenicol and haematological changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* orally administered chloramphenicol. *J. Fish. Pathol.*, 17, 113-121.
- Kerry, J., S. NicGabhainn and P. Smith. (1997) Changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) smolts in a marine environment. *Aquaculture*, 157, 187-195.
- Kim BH, Lee SK, Yoon BI (1997) Phototoxicity studies of LB20304a. *Korean J Vert Pathol* 1, 40-45.
- Kim, J.H., Cho, E.H., Kim, K.S., Kim, H.Y. and Kim, Y.M., 1998. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from *Serratia marcescens* and characterization of mutations in *gyrA* of quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 190-193.
- Klecak G, Urbach F, Urwyler H (1997) Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J Photochem Photobiol B: Biol* 37, 174-181
- Kreutzmann, L. (1977) The effect of chloramphenicol and oxytetracycline on haematopoiesis in the european eel (*Anguilla anguilla*). *Aquacul.*, 10, 323-334.
- Kreuzer, K.N. and Cozzarelli, N.R., (1979) *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* 140, 424-435.
- Kureishi, A., Diver, J.M., Beckthold, B., Schollaardt, T. and Bryan, L.E., (1994) Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1944-1952.
- Ling, S.H.M., Wang, X.H., Xie, L., Lim T.M. and Leung, K.Y., (2000) Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiol.* 146, 7-19.
- Maejima, K., and Nagase, S. (1991) Effect of starvation and refeeding on the circadian rhythm of haematological and clinicobiochemical values, and water intake of rats. *Exp. Anim. Tokyo.*, 40, 389-393.
- Malvisi, J., della Rocca, G., Anfossi, P., Tomasi, L., Di Salvo, A., Zanchetta, S., Magni, A., Sello, M., and Giorgetti, G. (2002) Tissue distribution and residue depletion of thiamphenicol after multiple oral dosing in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and

- seabream (*Spraus aurata* L.) J. Appl. Ichthyol., 18, 35-39.
- McFadzen I, Baynes S, Hallam J, Beesley A, Lowe D (2000) Histopathology of the skin of UV-B irradiated sole (*Solea solea*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. Marine Environmental Research 50, 273-277.
- Milano JC, Loste-Berdot P, Vernet JL (1995) Photochemical oxidation of Chloramphenicol in water and in the presence of hydrogen peroxide. Environmental technology 16, 1101-1114.
- Miranda MA (2001) Photosensitization by drugs. Pure Appl Chem 73, No.3 481-486.
- Moore DE, (1998) Mechanism of photosensitization by phototoxic drugs. Mutation Research 422, 165-173.
- Moore, R.A., Beckthold, B., Wkureishiong, S.A. and Bryan, L.E., (1995) Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 107-111.
- Moriya, S., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H., (1985) Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. Nucleic Acids Res. 13, 2251-2265.
- Musso, D., Drancourt, M., Osscini, S. and Raoult, D., (1996) Sequence of quinolone resistance-determining region of *gyrA* gene for clinical isolates and for an *In vitro*-selected quinolone-resistant strain of *Coxiella burnetii*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 870-873.
- Neceda C, Sierra SG, Martinez JL (1997) Histopathology of UV-B irradiated brown trout *Salmo trutta* skin. Dis Aquat Org 31, 103-108.
- Nickerson, S.C., Paape, M.J., Harmon, R.J., and Ziv, G. (1986) Mammary leukocyte response to drug therapy. J. Dairy. Sci., 69, 1733-1742.
- Ogotu, B.R, Newton, C.R. Muchohi, S.N., Otieno, G.O., and Kokwaro, G.O. (2002) Phenytoin pharmacokinetics and clinical effects in African children following fosphenytoin and chloramphenicol coadministration. Br. J. Clin. Pharmacol., 54, 635-642.
- Okuda, J., Hayakawa, E., Nishibuchi, M. and Nishino, T., (1999) Sequence analysis of the *gyrA* and *parC* homologues of a wild-type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its fluoroquinolone-resistant mutants. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1156-1162.
- Oppegard, H. and Sorum, H., (1996) Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1126-1133.
- Paape, M.J., and Miller, R.H. (1990) Effects of Florfenicol, Chloramphenicol, and Thiamphenicol on Phagocytosis, Chemiluminescence, and Morphology of Bovine Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. J. Dairy. Sci., 73, 1734-1744.
- Paape, M.J., Nickerson, S.C., and Ziv, G. (1990) *In vivo* effects of chloramphenicol, tetracycline, and gentamicin on bovine neutrophil function and morphologic features. AM. J. Vet. Res., 51, 1055-1061.

- Pan, Slao-Su. and Fisher, L.M., (1996) Cloning and Characterization of the *parC* and *parE* Genes of *Streptococcus pneumoniae* Encoding DNA Topoisomerase IV: Role in Fluoroquinolone Resistance. *J. Bacteriol.* 178, 4060-4069.
- Pfeifer KF, Weber LJ (1979) The effect of carbon tetrachloride on the total plasma protein concentration of rainbow trout, *Salmo gairdneri* . *Comp. Biochem. Physiol.*, 64, 37-42.
- Qiang, Y.Z., Qin, T., Fu, W., Cheng, W.P., Li, Y.S. and Yi, G., (2002) Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 549-552.
- Ree HJ (1963) Effect of carbon tetrachloride-poisoned rat serum upon liver cell mitosis in normal adult rats. *Seoul Univ. J(c)*, 29-44.
- Robbins & Cotran (2005) Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed., Elsevier Saunders., USA.
- Roberts RJ Miscellaneous non-infectious diseases. In: *Fish Pathology*, 3rd ed., Roberts RJ, W.B. Saunders, London pp. 367-379.
- Roberts, M. C. (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Review*, 19, 1-24.
- Roberts, M. C., Y. Pang, D. E. Riley, S. L. Hillier, R. C. Berger and J. N. Krieger. (1993) Detection of Tet M and Tet O tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 387-393.
- Rodger HD (1991) Summer lesion syndrome in salmon: a retrospective study. *Vertebrate Record* 129, 237-239.
- Rosanas, A., Barbe, J. and Gibert, I., (1995) Cloning and sequencing of the *gyrA* gene from the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Gene*. 161, 11-14.
- Scott, A.L., and Klesius, P.H. (1981) Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. *Develop. Biol. Standard.*, 49, 243-254.
- Swanberg, S.L. and Wang, J.C., (1987) Cloning and sequencing of the *Escherichia coli gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *J. Mol. Biol.* 197, 729-736.
- Treves-Brown KM (2000) *Applied fish pharmacology*, Kluwer Academic Publishers PP. 148-154.
- Trevett, A.J., Naraqi, S., and Wembri, J. (1992) Typhoid fever complicated by chloramphenicol toxicity, ataxia and psychosis. *Papua New Guinea Med. J.*, 35, 205-209.
- Trevett, A.J., Naraqi, S., and Wembri, J. (1992) Typhoid fever complicated by chloramphenicol toxicity, ataxia and psychosis. *Papua New Guinea Med. J.*, 35, 205-209.
- Turton, J.A., Andrews, C.M., Havard, A.C., and Williams, T.C. (2002a) Studies on the haemotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin hartley guinea pig. *Int. J. Exp. Path.*, 83, 225-238.
- Turton, J.A., Andrews, C.M., Havard, A.C., Robinson, S., York, M., Willwams, T.C., and

- Gibson, F.M. (2002b) Haemotoxicity of thiamphenicol in the BALB/c mouse and Wister Hanover rat. *Food and Chem. Toxicol.*, 40, 1849-1861.
- Turton, J.A., Havard, A.C., Robinson, S., Holt, D.E., Andrews, C.M., Fagg, R., and Williams, T.C. (2000) An assessment of chloramphenicol and thiamphenicol in the induction of aplastic anaemia in the BALB/c mouse. *Food and Chem. Toxicol.*, 38, 925-938.
- Vacha, J., Pospisil, M., and Velconsky, V. (1981) The toxic effect of chloramphenicol on erythropoiesis in X-irradiated Mice. *Chemotherapy*, 27, 131-138.
- Vacha, J., Pospisil, M., and Velconsky, V. (1981) The toxic effect of chloramphenicol on erythropoiesis in X-irradiated Mice. *Chemotherapy*, 27, 131-138.
- Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E. and Jimenez de Anta, T., (1994) Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2477-2479.
- Wang, Y., Huang, W.M. and Taylor, D.E., (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 457-463.
- Warsa, U. C., M. Nonoyama, T. Ida, T. Okamoto, T. Okubo, C. Shimau-chi, A. Kuga and M. Inoue. (1996) Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in staphylococcus aureus of Asian countries by polymerase Chain Reaction. *Journal of Antibiotics*, 49, 1127-1132.
- Weifen, W., Lin, H., Xue, C., and Jamil, K. (2004) Elimination of chloramphenicol, sulphamethoxazole and oxytetracycline in shrimp, *Penaeus chinensis* following medicated-feed treatment. *Environ. Inter.*, 30, 367-373.
- Weinstein JE, Oris JT, Taylor DH (1997) An ultrastructural examination of the mode of UV-induced toxic action of fluoranthene in the fathead minnow *Pimephales promelas*.
- Yamamoto, S., Harayama, S., (1995) PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1104-1109.
- Yolanda, Saenz, Myrian, Zarazara, Laura, Brinas, Fernanda, Ruiz-Larrea, and Carmen, Torres., (2003) Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1001-1005.
- Yunis, A.A. (1988) Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 28, 83-100.
- Yunis, A.A. (1973) Chloramphenicol-induced bone marrow suppression. *Semin. Haematol.*, 10, 225-234.
- Zhao, J. and T. Aoki. (1992) Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. *Microbiology Immunology*, 36, 1051-1060.

- Ziv, G., Paape, M.J., and Dulin, A.M. (1983) Influence of antibiotics and intramammary antibiotics productson phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes. American J. vet. Res. 44, 385-388.
- 金井 泉, 金井 正光 (1983) 임상검사법 개요, p 402-420; 485-488; 497-501; 고문사, 서울.
- 김경환 (1997) 이우주의 약리학 강의, p 598-600; 의학문화사, 서울.
- 김명석. (1997) 환경적 변화에 따른 나일 티라피아의 oxolinic acid 흡수와 배설, 부경대학교 어병학과 석사논문.
- 김종명. (1993) 테트라사이클린 내성 황색포도상구균으로부터 테트라사이클린 내성 유전자의 클로닝. 경성대학교 약학과 박사논문.
- 최민순, 김영길. (1994) 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda* 약제 내성과 R plasmid.
- 최민순, 최상훈, 박관하. (1996) 뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성.

대학자체평가의견서

과제명 : 항생물질이 어류의 생리, 방어체계 및 내성 유전자 발생에 미치는 영향 분석

연구기간 : 2003. 6. 15 - 2005. 6. 15

토의 날짜 : 2005. 5. 4

1. 연구의 의미 부여에 대해서 (평가의 착안점 1)

FDA 허용 항균물질인 tetracycline등에 대한 내성균의 급격한 증가 때문에 최근에는 fluoroquinolone계 등과 같은 새로운 항생물질로의 대체 사용이 양식현장에서 급격하게 이루어지고 있다. 비록 항생물질의 사용이 어류의 세균성 질병을 치료할 수 있는 대책의 하나이기는 하지만 학계와 현장에서는 그 사용에 따른 생리적 부작용과 국민의 환경위해성에 대한 예방을 위한 내성유전자 연구에 대한 중요성이 경시되고 있는 실정이다. 다만 최근에 와서 항생제 사용에 의한 내성균의 분포가 증가 하고 있다는 보고 또는 부작용에 의한 폐사가 잇을 수 있다는 보편적인 보고만 이루어지고 있다. 그러므로 본 연구와 같이 내성 발생균이 가지는 내성 유전자의 특성과 변화에 대한 충분한 정보와 현장 적용상에서 나타날 수 있는 생리적인 부작용 분석은 시기적절하여 향후 어류질병의 치료에 있어서 내성균 발생의 원인과 대책 마련 그리고 적절한 사용을 위하여 매우 필수적인 연구가 되었다고 할 수 있다.

2. 연구내용의 적정성에 대하여(평가의 착안점 2)

본 연구는 어류질병 예방을 위한 효과적인 대처 방안이라고 할 수 있는 항생물질의 생리적 특성, 부작용에 대한 정보의 확보 그리고 내성균생성 방지를 위한 유전자 연구라는 분야들이 함께 이루어지고 있다. 그리고 접근 방법도 현장의 많은 균주 확보와 이의 내성 특성 분석, 그리고 질병 발생이 많고 일조량이 많은 여름철에 항생제 사용에 의한 생리적 독성을 분석하여 학문적 의미와 실질적인 의미를 부여 할 수 있었다고 할 수 있다. 또한 내성 유전자 연구에서는 이미 본 연구팀에서 이전의 연구에서 chloramphenicol의 유전적 특성을 분석한바 있으므로 현재는 Tc와 quinolone의 내성 유전자를 중심으로 접근하고, 생리적 독성 연구에서는 세계적으로 단기 사용이 목적이 되는 어류에서 Tc와 quinolone의 독성이 나타나지 않는다는 것을 조사 후 우리나라에서 음성적으로 많이 사용되고 있는 chloramphenicol에 대하여 접근 한 것도 충분한 조사와 현장의 환경을 고려한 의미라고 생각 한다. 그러므로 지금까지의 연구가 항균물질의 효과적인 사용 (약효, 약동력학 등)에 비교적 많은 비중이 두어졌다면 본 연구와 같이 생리적부작용과 내

성생성의 유전적 특성분석과 같은 연구가 보다 많이 이루어져야 보다 효과적인 어류질병 관리와 약화사고에 의한 대량 폐사의 예방이 이루어 질 수 있을 것이다.

3. 연구수행의 결과에 대해서 (평가의 착안점 3)

1) 내성균의 유전적 특성 분석을 위하여 내성 균주(*E. tarda*) 185 strains 의 확보와 항생제에 대한 내성정도 및 분포와 세균학적인 특성 분석과 함께 어떠한 type 의 *tet* gene들이 이들 분리균에서 활용되고 있는지를 분석함으로써 수산업에서의 내성균 문제를 위한 균주확보와 접근 방식의 구체성이라는 새로운 화두를 제시하고 있다. 더구나 multiplex PCR, MAMA법등의 새로운 기법도 잘 응용하여 그 잠재력을 충분히 활용하고 있다. 이렇게 다양한 방법을 통하여 실시된 *tet* gene들의 분포도 분석에서 최초로 특정 *tet* 유전자의 편향된 활용과 새로운 *tet* 유전자의 활용도 있다는 사실을 발견 하였을 뿐만 아니라 양식장 환경과 *in vivo*에서 나타나는 미생물 총에 까지 응용하여 각기 다른 내성균의 *tet* 유전자를 활용을 확인 하였다. 또한 우리나라에서 두 번째로 많이 사용되고 있는 quinolone에 대한 내성균의 특성 연구를 위한 기초적인 database를 위하여 quinolone에 내성이 있는 *E.tarda* 35 균주를 확보 하고 cloning 법의 개발과 함께 *E. tarda gyrA* gene 의 전체 염기 서열과 그 motif들의 분석에 의한 유전적 해석을 완결하였다. 흥미 있게도 유전적 변화 분석을 통하여 우리나라의 *E. tarda* 내성균은 매우 제한적인 유전적 변이를 가지고 있어 아직은 비교적 안전한 상태에 있다는 보고도하고 있다. 또한 *E. coli* KNK453 변이주에서 *E. tarda* GyrA 발현 분석법 그리고 관련 topoisomerase IV gene 3개 유전자 모두를 cloning 하고 그 full sequence를 밝혀 새로운 학문적 진전과 함께 *in vitro* 변이주 30주에 까지도 QRDR의 유전적 변화를 분석한 결과 다양한 유전적 변이가 현장 분리균과는 다르다는 현장 감각적인 제시도 함께 하고 있다.

2) Chloramphenicol(CAP)이 어류의 생리적 기능에 미치는 영향 및 독성학적 분석에서는 먼저 CAP를 경구 투여한 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)에서의 조직 내 잔류량을 비교와 함께 조직 내 CAP 소멸과도 비교 하여 그 의미를 증가시켰다고 할 수 있다. 그리고 Ht 수치, ALT와 ALP, GGT, LDH의 변화도 분석하여 그 독성적 측면도 분석 되어져 흥미롭게 되어 있다고 할 수 있다. 그러나 생리적 기능 분석 및 조직학적 분석에서는 약물 투여에 따른 순환기 및 호흡기 기능과 두신, 체신, 장, 위, 간 및 비장에서 조직학적 이상을 관찰할 수 없어 일반적인 예측과 유사 하였다고 생각 된다. 한편, 넙치 식세포를 이용한 *in vitro* 및 *in vivo* 면역 능력 검사에서 CAP의 농도에 의존적으로 억제됨을 확인하여 그 독성이 어류에서도 나타남을 확인 하는 개가를 보였다. 그러므로 CAP의 투여가 양식넙치의 조혈 기관에 있어 부작용을 일으키고, 면역반응의 억제에 관여한다는 사실을 과학적으로 입증 하였다고 할 수 있다. 또 하나의 흥미로운 결과는 UV-A(파장 320-400nm)의 조사가 chloramphenicol이 투여 된 어류에서 혈액학적 및 면역학적 부작용이 현저히 증대

시킴을 확인 하는 현장 적용적 결과도 도출 하였다. 결론적으로 CAP 자체는 양식 현장에서 대량 폐사를 유발하지 않으나, 양식 환경조건의 변화 (예, UV 조사 등)에 따라서는 어류에게 치명적인 부작용을 유발시켜 대량 폐사를 일으킬 가능성이 매우 높다는 사실을 밝혀 양식 현장에서 질병치료 목적으로 CAP 사용 시에는 양식장내의 환경조건이 매우 중요한 요소임을 알 수 있는 중요한 정보를 확보 하였다고 생각 된다.

4. 연구의 활용에 대하여 (평가의 착안점 4)

1) 내성균이 갖는 내성 유전자의 변화에 대한 database화는 내성 특성의 원천을 이해할 수 있게 되어 이식경로 등의 파악에 활용할 수 있고 국제적으로 문제가 되고 있는 이식 내성균의 이입에 대한 근원적인 차단책 마련에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 추정된다. 현재 우리나라에서 많은 문제점을 야기 시키고 있는 수입 종묘 또는 활어에 대한 검역사업에서 이식산 내성균의 전파 가능성에 대한 위험성 제고에 의한 분쟁에 적극적으로 대응하는데 충분히 활용 할 수 있는 과학적인 접근이라고 생각 된다. 확립된 multiplex PCR, MAMA법등의 새로운 기법은 family적으로 나타나는 유전자에 대한 다른 학문 분야에서 활용 가능하고 외국에서 밝혀진 유전정보를 제외한 새로운 내성 유전정보도 확실하게 얻을 수 있게 하여 주는 잠재력을 가지고 있다고 생각한다.

2) Chloramphenicol이 어류의 생리적 기능에 미치는 영향 및 독성학적 분석의 결과는 항생제를 중심으로 한 각종 약제의 어류 특이의 독성영향 연구에 정보를 학계와 어민에게 제공하는 결과라고 할 수 있다. 특히 본 연구는 어류 특이의 독성 발현 양상 연구 필요성에 대한 실마리와 약물 투여 이전 숙주 건강의 중요성에 대한 인식제고를 위한 계기를 제공 하였다고 할 수 있다. 보다 현장적 접근에서는 약식현장에서의 약화사고 평가 및 약물의 안전 사용에 관한 정보를 제공하여 항생제 및 각종 약제의 타당한 사용법 근거를 마련 할 수 있도록 하고 현장에서 증대되고 있는 각종 약화사고에 대한 과학적인 평가 까지도 가능하게 하였다. 향후 수산과학 분야에서 각종 약물의 일반약리 실험의 중요성과 효과에 대한 평가에서 중요한 이정표가 될 것이라고 생각한다.

5. 결론 (평가의 착안점 5)

1). 항생제 사용에 있어서 내성균 발생의 문제를 새로운 유전적 해석에 의하여 접근 하였고, 생리적 영향은 환경 특히 질병 다발 시기 또는 최대 항생제 사용 시기인 여름철의 일조량과 연계하여 매우 흥미 있는 결과들을 도출 되었다고 할 수

있다.

2). 모든 항생물질은 약물의 치료 효과라는 장점과 함께, 세균의 내성을 유도 할 수 있다는 것과 어류 생리에의 영향 그리고 직·간접적인 자체독성을 나타낼 수 있다는 단점들이 반드시 고려 되어져야 경제적이고 건전한 양식산업의 발전이 있을 수 있다는 것을 알리는 계기가 되었다고 할 수 있다.

6. 업적 (평가의 착안점 6)

본 연구의 결과로 최초 목표인 SCI 급 논문 2편은 발표완료 되었고, 더불어 국내 학술 진흥재단 등재 후보지에도 2편이 발표완료 되어 이미 소기의 과학적 업적을 이루었고 향후에도 계속적으로 발표 할 예정으로 있다.

[국외 SCI 학회지 : 2건]

Lyu Jin Jun, Joon Bum Jeong, Min-Do Huh, Joon-Ki Chung, Dong-lim Choi, Chang-Hoon Lee, and Hyun Do Jeong. (2004). Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture* 240. 89-100.

Soon Bum Shin, Min Ho Yoo, Joon Bum Jeong, Young Min Kim, Joon-Ki Chung, Min Do Huh, Jack L. Komisar, and Hyun Do Jeong. (2005). Molecular cloning of the *gyrA* gene and its mutation in clinical isolates of quinolone resistant *Edwardsiella tarda*. *Diseases of Aquatic Organisms*. (in press)

[국내 학술 진흥재단 등재 후보 학회지 : 2건]

So Jung Jung, Jung Soo Seo, Hye Kyung Eom, Na Yung Kim, Sang Hwan Lee, Min Do Huh, Hyun Do, and Joon Ki Chung. (2004). Tissue level of chloramphenicol and haematological changes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, orally administered with chloramphenicol. *J. Fish Pathol.*, 17 (2), 113-121.

Jung Soo Seo, So Jung Jung, Sang Hwan Lee, Na Yung Kim, Hye Kyung Eom, Min Do Huh, Hyun Do, and Joon Ki Chung. (2004). Effects of chloramphenicol on chemiluminescence response of leukocyte isolated from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 17 (3), 217-222.

[학회발표 : 3건]

Min Do Huh, Hye Jeong Choi, Mu Kun Lee, Na Yeong Song, Joon Ki Chung and Hyun Do Jeong (2005) Pathological effect of carbon tetrachloride (CCl₄) on liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Hye Jeong Choi, Mu Kun Lee, Na Yeong Song, Joon Ki Chung and Hyun Do Jeong and Min Do Huh (2005) Photosensitizatiional effect of chloramphenicol on the skin of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Spring Meeting of The Korean Society of Fish Pathology

Soon Bum Shin, Lyu Jin Jun, Sin Hoo Park, and Hyun Do Jeong (2004) Molecular cloning of the DNA gyrase gyrA gene from the fish pathogen *Edwardsiella tarda*. The Sixth Japan-Korea, Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture.

토론자	정현도 정준기 허민도	연구 책임자, 부경대학교 수산생명의학과 연구원, 부경대학교 수산생명의학과 연구원, 부경대학교 수산생명의학과	
토론 참 여자	박남규 이형호 강주찬 김기홍 김중균	부경대학교 생물공학과 부경대학교 생물공학과 부경대학교 수산생명의학과 부경대학교 수산생명의학과 부경대학교 생물공학과	

주관기관 : 부경대학교