호남지역 Sea Grant 시범대학사업단

2007년도 최종연구보고서

뱀장어의 양식 및 유통 중 스트레스 감소에 미치는 **Aspirin**투여 효과

(Effect of aspirin on reducing stress of eel during its culture and transport)

2007. 3. .

군산대학교 **SG**연구사업단

해 양 수 산 부 지 정

호남지역 **Sea Grant** 시범대학사업단

제 출 문

호남지역 Sea Grant 시범대학사업단 주관대학

목포해양대학교 총장 귀하

본 보고서를 2006년 7월부터 2007년 3월까지의 “뱀장어의 양식 및 유통 중 스트레스 감소에 미치는 Aspirin투여 효과” 과제의 2007년도 최종연구 보고서로 제출합니다.

2007년 3월 일

대학(교)명 : 군산대학교

사업단장 : 서승원

연구팀장 : 박성우

참여교수 : 구재근

요 약 문

Ⅰ. 과 제 명

뱀장어의 양식 및 유통 중 스트레스 감소에 미치는 Aspirin투여 효과

(Effect of aspirin on reducing stress of eel during its culture and transport)

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

뱀장어는 서해안의 주요 담수 양식 대상 종으로 지역 어민의 주 수입원으로 매년 생산량이 증가하고 있다. 그러나 양식 또는 유통 중에 스트레스로 인한 다양한 질병이 발생되어 대량폐사가 유발되고 있어, 양식어민의 현안 문제로 대두되고 있다. 또 양식 현장에서는 질병 발생 시 또는 유통 후에 질병의 예방 및 치료를 주로 항생제의 의존하고 있어, 양식 비용에 미치는 약제 비용의 가중 및 투약 후의 어체 내 약제의 잔류 문제 등이 발생되고 있다. 또한 건강 식품인 뱀장어의 이미지 손상 등으로 판매가 제한되어 뱀장어 양식업의 확대 및 양식어가 소득의 감소를 초래하고 있다. 본 연구에서는 인체의 혈행 개선, 지방산 조성의 개선 등을 통한 스트레스 감소효과 가 있는 aspirin을 뱀장어에 투여하여, 뱀장어의 혈액응고, 혈장 지방산의 조성의 변화 등 주요 스트레스 지표를 조사함으로서 양식 또는 유통 중에 발생하는 질병과 폐사를 최소하기 위한 스트레스 경감대책을 확립하기 위하여 다음과 같은 목적으로 실시하였음.

1. Aspirin의 투여방법 확립,
2. 혈중 aspirin과 지방산 조성의 변화
3. 뱀장어의 양식 및 유통에 따른 스트레스의 감소 대책 확립하여 스트레스 기원의 질병 폐사 경감 대책 확립

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 뱀장어의 혈장의 aspirin정량법과 투여후의 약물의 동태
   HPLC에 의한 미량 정량법과 경시적 혈장내의 농도 변화 측정
2. 투여 후의 Ht값, Leucocrit값, 지방산 조성의 변화, 혈액의 응고능 및 위장과 소화관의 병리조직학적 변화측정
3. 실용화 시험
   경구 투여 및 약욕 후의 저온쇼크, 수송 및 아질산 독성에 대한 혈액학적 조직학적 변화

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용계획

1. 연구개발 결과

가. 혈장 중의 aspirin (ASA)정량법 확립

Aspirin(acetylsalicylic acid, ASA)은 체내에서 급속히 salicylic acis(SA)로 분해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 투여 방법에 따른 생리 효과와 뱀장어 혈액내의 aspirin 잔류 함량을 검토하기 위해서는 ASA와 SA의 함량을 동시에 분석하여야한다. 뱀장어 혈액 중의 ASA와 SA 분석을 위해 HPLC분석 조건 설정 및 검출 한계와 회수율을 각각 구하였다. HPLC 분석조건은 다음과 같다. 즉, 뱀장어 혈장 200 ㎕에 동량의 내부 표준물질(5 ㎍/㎖ 2-methylbenzoic acid, MBA in a 50: 50 mixture of 0.2 M HCl and 0.2 M orthophosphoric acid)을 첨가한 후 400 ㎕ acetonitrile과 혼합한 첨가하였다. 4℃에서 15분간 방치한 후 원심분리 (12,500 rpm, 2분)후 상청액을 110 ㎎의 식염을 함유한 시험관에 옮겨 균질화한 다음 4℃에 10분간 방치하였다. 다시 12,500 rpm에 2분간 원심한 다음 상청액을 membrane filter (0.45 ㎚)로 여과하였다. 여과액 20 ul를 reversed phase Novapak C18 column (4 ㎛ silica, 150 × 4 ㎜)과 UV detecter (237 ㎚)을 부착한 HPLC에 주입한 다음 용출액(740 ㎖ water, 900 ㎕ orthophosphoric acid (85%), 180 ㎖ acetonitrile)으로 분리하였다. 혈장중 방해 물질은 인산과 acetonitril을 가한 후 원심분리하므로서 효과적으로 제거할 수 있었다. 한계 검출 농도는 ASA는 0.05 ppm, SA는 0.01 ppm이었으며 뱀장어 혈장을 이용한 회수율은 ASA가 70.8-99.6%, SA가 95.2-100.3%였다. 또한 Retention time (flow-rate 1.0 ㎖/min) 은 각각 4.25 min (ASA), 7.18 min (SA) and 9.84 min (MBA)으로 비교적 신속히 분석할 수 있음을 확인할 수 있었다.

나. Aspirin투여 (약욕 및 경구투여) 후의 말초혈액의 Ht, Hg및 혈액 응고능(prothtrombin time, PT); activated partial thromboplastin time, APTT)의 변화

(1) 약욕

ASA약욕 전의 Ht치는 33.3%였지만, 약욕 후 대조군의 Ht치에 비해 높아져 ($P>0.05$), 약욕 3시간 후에는 33.8%, 약욕 6시간과 12시간 후에는 각각 35.5%와 36.5%, 그리고 약욕 24시간 후에는 38.5%로 약욕시간이 길어질수록 점차 증가하였다. 그러나 leucocrit치는 ASA약욕군과 대조군 모두 1.0%로 거의 변화가 없이 일정하였다.

ASA약욕 후 말초혈액의 헤모글로빈 농도는 현저하게 증가하였다. 즉 대조군의 헤모글로빈의 농도는 6.10-6.17 ㎎/100 ㎖으로 변화가 없었지만, ASA약욕 3시간 후부터 6.56 mg/100 ㎖로 증가하기 시작하여, 12시간과 24시간 후에는 각각 7.17과 7.68 ㎎/100 ㎖으로 약욕시간이 길어질수록 말초혈액의 헤모글로빈의 농도는 증가하였다. ASA약욕 후의 대조군의 PT값은

5.1-5.2 sec로 변화가 없는 반면 ASA약욕군의 PT값은 대조군에 비해 현저하게 길어졌다 (P>0.05). 즉 약욕 3시간 후에는 5.4 sec로 응고시간이 길어졌으며, 약욕시간이 길어질수록 응고시간은 더욱 길어져 약욕 24시간 후에는 6.2 sec로 가장 늦게 응고하였다.

ASA약욕 뱀장어의 말초혈액의 APPT값은 약욕시간이 길어질수록 대조군의 6.2-6.4 sec에 비해 응고시간이 현저하게 길어져(P>0.05), 약욕 12시간 후와 24시간 후에는 7.4와 7.7 sec로 길어졌다.

(2) 경구 투여

ASA경구투여하였을 때 대조군의 Ht치는 전 실험기간을 통하여 31.0-33.3%이었는 반면 ASA첨가군의 Ht치는 경구 투여 일수에 비례하여 증가하기 시작하여 투여 7일 후에는 37.5%로 되었다. 그러나 그 후 10일 후와 14일 후에는 모두 37.7% 투여 7일 후와 별다른 차이가 없었다. 또 말초혈액의 헤모글로빈의 농도는 대조군은 5.8-6.2 g/100 ㎖의 범위에서 별다른 차이가 없었지만, ASA첨가 사료 투여군의 헤모글로빈 농도는 투여 일수와 더불어 지속적으로 증가하여 투여 14일후에는 7.5 g/100 ㎖에 달하였다. 한편 PT값과 APTT값의 변화는 대조군의 PT치는 5.0-5.2 sec였지만, ASA 경구투여군의 PT치는 투여일수에 비례하여 응고시간이 늦어졌다. 즉 투여 7일후에는 6.1 sec, 투여 10일 후와 14일 후에는 각각 6.2 sec로 되었다. 또 APTT치는 대조군은 전 실험기간을 통하여 6.0-6.2 sec 이었다. 반면에 ASA경구투여군은 투여 3일 후부터 7.3 sec로 응고시간이 늦어지기 시작하여, 투여 14일 후에는 최대치인 7.7 sec로 응고시간이 늦어졌다.

다. ASA투여 후의 아가미와 소화관의 병리조직학적 변화

약욕 및 경구투여군 모두 아가미, 위 및 소화관에서 대조군과 차이가 없었다.

라. 지방산 조성의 변화.

뱀장어 혈장내의 지방산 분석을 GC를 이용하여 분석한 결과 약욕 및 경구 투여 에 따른 지방산 조성의 차이는 없었다.

마. 저온 쇼크(16℃, 24시간)와 수송 (4시간과 8시간), 아질산독성에 미치는 투여 효과

혈액학적 변화

ASA 약욕군과 경투투여군 모두 대조군에 비해 Ht, Hg가 높았으며, PT와 APTT도 길어졌으며, 병리조직학적으로도 아가미의 변형과 정맥동의 울혈의 감소가 현저하게 감소되어, ASA의 투여가 사육중의 선별과 수송 등에 기인한 스트레스 저감에 유효한 것으로 나타났다. 또 아질산 중독증을 유발시켜 기존의 환수에 의한 처리 방법과 ASA의 약욕에 의한 효과를 비교하였을 때 ASA약욕이 매우 효과적인 것으로 나타났다.

2. 활용계획

가. Aspirin정량법: aspirin 정량 기법을 다른 어종에 응용

나. Aspirin의 투여효과를 다른 스트레스요인인 메트헤모글로빈 및 사육수의 산성화에 미치는 효과를 구명하기 위하여 적용

다. 뱀장어의 선별과 수송 전에 투여하여 산업규모에서의 효과 조사에 활용

라. 순환장애를 유발하는 질병의 치료 시에 다른 약제와 혼용 투여

마. 과밀 수용, 수온의 변화 등의 변화에도 적용 가능할 것으로 판단됨으로 투여 방법을 산업현장에 이전하여 활용

Ⅴ. 기대효과

1. 선별과 수송 후의 폐사율 감소
2. 질병치료시의 타 약제와 혼합 투여 효과 기대
3. 뱀장어 이외의 다른 어종에 활용 가능

S U M M A R Y
(영문요약문)

To decrease stress in eel (*Anguilla japonica*) during its culture or transportation, aspirin (ASA) known to inhibit platelet aggregation and formation of intra-arterial thrombi in human was administrated by dipping or oral routes. Concentrations of the drug and changes of fatty acids composition in blood plasma and muscle tissue were periodically measured by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography, respectively. Some hematological parameters such as hematocrit value, hemoglobin concentration, prothtrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were also determined to evaluate if blood stream was improved. Histopatholgical changes on the gill, stomach or intestine from the aspirin-administrated eel were observed to confirm any injury on the organs.

A HPLC Method was developed for the separation and quantification of aspirin(ASA) and salicylic acid(SA) simultaneously in eel plasma and muscle tissue. Two hundreds ul of serum or 1 g of muscle was added to 200 ul of internal standard solution (5 ug/ml 2-methylbenzoic acid, MBA in a 50:50 mixture of 0.2 M HCl and 0.2 M orthophosphoric acid) and vortex mixed for 2 sec. The mixture was mixed with 400 ul of acetonitrile, incubated for 15 min at 4℃, and centrifuged for 2 min at 12,500 rpm. The supernatant was transferred into a ependorf tube containing 110 mg of sodium chloride. The mixture was stood for 10 min at 4℃ and centrifuged 2 min at 12,500 rpm again. The supernatant was filtered with a membrane filter. Twenty ul of the supernatant were injected into the HPLC equipped with reversed phase Novapak C18 column (4 um silica, 150x4 mm), and UV detector(237 nm). The mobile phase consisted of 740 ml water, 900 ul orthophosphoric acid (85%) and 180 ml acetonitrile. The retention times (flow-rate 1.0 ml/min) were 4.8 min (ASA), 8.4 min (SA) and 11.5 min (MBA). The limit of quantification was 0.1 ppm for SA and 0.05 ppm for ASA. The mean recovery from eel's serum was 75% for ASA and 120% for SA. This method was fully applied to analyze ASA and SA in the plasma and muscle of eel administrated by bath or oral routes.

Eel were administrated aspirin by either dipping in a concentration of 20 ppm for 24 hrs or feeding the feed supplemented with 50 mg/kg BW for 7 days. After administration of aspirin peripheral blood were taken from the arterious bulb.

And eel administrated aspirin by bath or oral routes were transferred into tanks and kept for 48 hr and 120 hr to determine how long the drug residued in the plasam. This HPLC method was applied to analyze ASA and SA of eel plasma after either dipping in a concentration of 20 ppm or feeding the feed supplemented with 50 ㎎/kg BW. Only SA was detected in eel plasma after the administration of ASA by dipping or oral routes because the drug was quickly decomposed into SA in eel plasma. The amounts of SA in eel plasma reached the highest value at 3hr in dipping and 7 days in oral administration. When eel administrated ASA by dipping or oral routes were kept in ASA free aquaria, 0.02-0.03 ㎍/㎖ of SA were detectable 48 hr after the administration.

Hemoatological parameters in the aspirin-administrated fish were greatly increased comparing with those in control fish. But any difference in leucocrit values weren't found after administration of aspirin. Administration of aspirin never resulted in any histopathological changes on the gills, stomach and intestine.

After eel were kept in aquaria at 16℃ for 48 hr or transported in bags for 4 and 8 hr after administration of aspirin, hematological parameters in eel administrated aspirin were significantly higher than those in control fish.

When eels with methemoglobinemia were bathed in aquaria supplemented with aspirin, sodium chloride, aspirin plus sodium chloride, or exchanged half volume of the water, aspirin addition and water exchange greatly reduced methemoglobin rate and nitrite concentration in peripheral blood stream. Sodium chloride or sodium chloride plus aspirin additions were less effective than aspirin addition to decrease the above two parameters.

From these results, it is suggested that administration of aspirin by dipping or oral routes was very effective to improve blood circulation and to reduce methemoglobin rate or nitrite in peripheral blood of eel which were under stressful conditions such as low temperature and transportation or exposed to high concentration of nitrite during its culture.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction ---------- 10

Chapter 2 Present status of research ---------- 11

Chapter 3 Achievement of goals and contribution of related fields
Section 1 Determination of aspirin in the plasma of eel (*Aanguilla japonica*) by high-performance liquid chromatography (HPLC) ---------- 12
1. Materials and methods ---------- 12
2. Results and discussion ---------- 15

Section 2 Changes in the concentration of aspirin and the composition of fatty acids in the plasma of eels (*A. japonica*) administrated aspirin by dipping or oral routes---------- 20
1. Materials and methods ---------- 19
2. Results and discussion ---------- 21

Section 3 Hematological and histopathological changes in eels(*A. japonica*) administrated aspirin by bath and oral routes ------ 22

1. Materials and methods ---------- 22
2. Results and discussion ---------- 25

Section 4 A trial test for actual application of aspirin administration in eel culture industry---------- 43
1. Materials and methods ---------- 44
2. Results and discussion ---------- 46
Chapter 4. Achivement of the goals and contribution ---------- 62
Chapter 5 Application plans of research results ---------- 63
Chapter 6 References ---------- 64

목 차

제 1 장 서 론 ---------- 10

제 2 장 국내외 연구개발 현황 ---------- 11

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 ---------- 12

제 1절 뱀장어 혈장 중의 aspirin정량법의 확립 ---------- 13
1. 재료 및 방법 ---------- 12

2. 결과 및 고찰 ---------- 15

제 2절 Aspirin 투여 뱀장어 혈장에서의 aspirin의 농도와
지방산 조성의 변화. ---------- 19

1. 재료 및 방법 ---------- 19

2. 결과 및 고찰 ---------- 21

제 3절 Aspirin투여 양식 뱀장어의 혈액학적 및 병리조직학적 변화
---------- 22
1. 재료 및 방법 ---------- 22

2. 결과 및 고찰 ---------- 25

제 4절 실용화 ---------- 43

1. 재료 및 방법 ---------- 44

2. 결과 및 고찰 ---------- 46

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도 ---------- 62

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 ---------- 63

제 6 장 참고문헌 ---------- 64

제 1장 서론

제1절 연구개발의 목적과 범위 및 필요성

뱀장어는 서해안의 주요 담수 양식 대상 종으로 지역 어민의 주 수입원으로 매년 생산량이 증가하고 있다. 그러나 양식 중의 선별 또는 종묘의 후에 스트레스로 인한 혈행순환의 장애로 먹이 섭취가 불량하거나 다양한 질병이 발생되어 대량폐사가 유발되고 있어, 양식어민의 현안 문제로 대두되고 있다.

뱀장어 양식현장에서는 최소한 4차례의 선별을 하고 있다. 즉 1차 선별은 실뱀장어 (0.2 g)를 먹이 부침하여 30-40일간 사육하여 체중이 3-4 g일 때, 2차 선별은 다시 60-70일 사육하여 체중이 10-20 g일 때이다. 그리고 3차 선별은 다시 60-70일간 사육하여 체중이 50-100 g일 때 실시하며 마지막인 출하선별은 3차 선별 후 60-70일간 사육하여 체중이 200-250 g일 때 실시하고 있다. 선별 방법은 대개 fish pumper를 이용하여 체포한 다음 선별기를 통과시켜 선별하는 것이 일반적이다. 이 중에 사육수온인 28-30℃에서 저온 상태인 16-18℃에서 선별한 다음 새로운 사육조에 옮기고 2-3일에 걸쳐 사육수온으로 상승시키고 있다. 또한 종묘나 상품의 수송도 저온의 수송용기에 넣어 4-8시간의 운송시간이 소요되고 있다. 이러한 선별과 사육후에는 스트레스로 인해 먹이 섭취가 불량해지고, 체색이 검어지며, 아가미 울혈증 등의 질병이 발생하여 폐사가 발생하지만 양식어민들은 당연한 사실로서 받아들이고 있는 것이 현실이다. 또한 양식 현장에서는 질병 발생 시 또는 유통 후에 질병의 예방 및 치료를 주로 항생제의 의존하고 있어, 양식 비용에 미치는 약제 비용의 가중 및 투약 후의 어체 내 약제의 잔류 문제 등이 발생함. 또한 건강 식품인 뱀장어의 이미지 손상 등으로 판매가 제한되어 뱀장어 양식업의 확대 및 양식어가 소득의 감소를 초래하고 있다.

본 연구에서는 인체의 혈행 개선, 지방산 조성의 개선 등을 통한 스트레스 감소효과 가 있는 aspirin을 뱀장어에 투여하여, 뱀장어의 혈액응고, 혈장 지방산의 조성의 변화 등 주요 스트레스 지표를 조사함으로서 양식 또는 유통 중에 발생하는 질병과 폐사를 최소하기 위한 스트레스 경감대책을 확립하고자 실시하였다.

제 2장 국내외 연구개발 현황

뱀장어의 선별 및 종묘의 수송 후의 스트레스에 기인한 원인 불명의 폐사와 질병 발생에 의한 연구는 전무하며, 주로 수온의 상승이나 식염의 첨가 등의 소극적인 방법을 실시하고 있다.

인체의 혈행개선 효과가 있는 Aspirin을 어류 양식에 적용함으로 인체와 마찬가지의 혈행개선 효과와 투여 후의 소화관의 병리조직학적 변화가 어류 양식에의 적용 가능성을 입증한다면 보다 많은 어류에 적용할 수 있을 것이며, 또한 사육중의 다양한 스트레스 요인. 즉 pH의 감소, 진동 및 소음 등에 기인한 경우에도 적용할 수 있다. 또 어류의 질병의 대부분은 전신적 패혈증으로 혈행순환장애를 동반함으로 질병의 치료에 있어 치료 약제와 혼합 투여 (약욕 또는 경구 투여)함으로서 치료 효과를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1절 뱀장어 혈장 중의 aspirin정량법의 확립

Aspirin(ASA)은 진통제로 잘 알려져 있으나 anti-thrombotic agent으로도 사용되고 있다. 본 연구에서는 뱀장어에 ASA를 투여하여 뱀장어의 이동중 스트레스를 경감하고자 한다. ASA를 뱀장어에 약욕 및 경구 투여하기 위해서는 우선 뱀장어 혈장 중의 ASA의 농도 측정 방법 개발이 요구된다. 그러나 아직까지 뱀장어 혈장 내 ASA의 측정방법에 관한보고는 없다. 반면에 ASA는 인체에 진통제 혹은 심장병 예방을 위해 많이 이용되고 있어 인체, 의약품 및 실험동물의 혈장내의 ASA 및 관련물질의 분석 방법은 많이 보고되고 있다. 이들 방법중 HPLC를 이용한 방법으로는 인체 혈청 및 화장품내의 ASA를 측정한 방법 등이 있다(Tebbett et al, 1985; Mikami et al, 2002 ; Kees et al, 1996).

ASA는 in vivo에서 salicylic acid(SA)로 신속히 분해되며 특히 물, methanol, 혈액 중에서는 급격히 분해되므로 시료 전처리 조건이 매우 까다롭다. 특히 물에서는 pH에 따라 안정성이 크게 달라지는 데 pH 2-3에서 가장 안정하고 pH 7.0에서는 하루 만에 약 20%의 ASA가 SA로 분해된다(Kelly, 1970). 따라서 본 실험의 경우 ASA 투여 방법이 사람이나 동물과 달리 약욕 혹은 먹이에 혼합하여 구강 투여하므로 대부분의 ASA는 SA로 분해가 예상된다. 또한 뱀장어의 혈장 성분은 인체의 혈장 성분과 다르고 혈액 채취를 위한 마취성분 등 다양한 방해물질이 발생이 예상되므로 기존의 보고된 방법들을 중심으로 뱀장어 혈장 중 SA와 ASA 분석에 적합한 방법을 검토, 선정하였다.

1. 재료 및 방법

가. 뱀장어

평균체중 200 g의 뱀장어 (*Anguilla japonica*) 180마리를 전라북도의 양식업자에서 구입하여 1.5% urethan에 마취한 다음 멸균 플라스틱 주사기를 사용하여 동맥구에서 채혈하였다. 혈액은 3,000 rpm에 10분간 원심하여 상청부의 혈장을 회수하였다. 모든 혈장을 모아 혼합한 다음 에펜돌프시험관에 1 ㎖씩 분주하여 사용 시까지 -80℃에 보존하였다.

나. 시약

실험에 사용한 aspirin (acetylsalicylic acid, ASA), salicylic acid (SA)와 내부표준물질인 2-methylbenzoic acid(MBA)는 Sigma사로부터 구입하였다. 그러나 어류에 적용, 투여할 ASA는 인체용 ASA(Bayer, Korea)의 제품을 사용하였다. Acetonitrile은 HPLC 등급용(Fisher, Korea)을 사용하였고 기타 시약은 특급용 시약을 사용하였다.

다. ASA 및 SA의 정량

뱀장어 혈장내 ASA와 SA함량을 정량은 Kees et al.(1996)의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 실시하였다. 시료 전처리를 위해 냉동 혈장을 저온에서 해동한 후 200㎕를 시험관에 취한

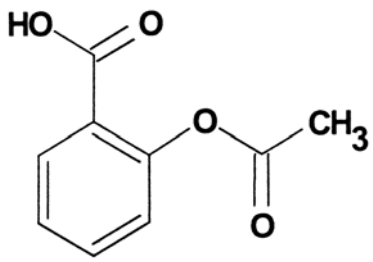

Fig. 1. Chemical structure of aspirin (synonyms: benzoic acid. 2-(acetyloxy), salicylic acid acetate).

후 내부 표준물질 용액(5 ㎍/㎖ 2-methylbenzoic acid, MBA in a 50: 50 mixture of 0.2 M HCl and 0.2 M orthophosphoric acid) 200 ㎕을 첨가하여 1-2초간 혼합하였다. 다시 400㎕의 acetonitrile을 첨가하여 혼합한 후 4℃에서 15분 유지한 후 원심분리 (12,500 rpm, 2분)하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 110 ㎎의 식염을 함유한 시험관에 옮겨 균질화한 다음 4℃에 10분간 유지한 후 12,500 rpm에 2분간 원심분리한 상청액을 membrane filter (0.45 ㎛)로 여과하여 HPLC에 주입하였다.

실험에 사용한 HPLC는 UV detecter가 부착된 HPLC(Waters 사)를 사용하였으며 칼럼은 reversed phase Novapak C18 column (4 ㎛ silica, 150 × 4 ㎜)를 사용하였다. 분석조건은 이동상은 혼합용매(740 ㎖ water, 900 ㎕ orthophosphoric acid, 180 ㎖ acetonitrile)를 사용하였으며 유속은 1 ㎖/min, 컬럼 온도 30℃, 검출 파장은 237 ㎚에서 측정하였다.

라. 직선성 검증

검량선 작성을 위해 ASA와 SA의 표준용액을 acetonitrile로 단계별로 희석한 후 일정량의 내부표준물질을 첨가한 후 측정하였다. ASA와 SA 검량선 모두 표준용액의 농도와 피크면적의 비(표준 용액 피크면적/MBA 표준물질 피크면적)와의 상관계수를 구하였다.

마. 회수율 측정

시료 전처리 과정 중 손실 정도를 점검하기 위하여 ASA를 투여하지 않은 뱀장어 혈장에 ASA와 SA 의 5종의 농도별로 용액을 spike한 후 3회 반복하여 측정하였다. 회수율은 spike한 표준용액의 농도에 대한 회수된 농도의 백분율로 나타내었다.

2. 결과 및 고찰

뱀장어 혈장내 ASA의 함량을 측정하기 위해 methyl benzoic aicd(MBA)를 내부 표준물질로 사용하여 HPLC 분석을 하였다. ASA은 in vivo에서 신속히 salicylic acid(SA)로 분해되어 37℃ 혈장속에서 반감기는 약 1시간이다(Harris and Riegeiman, 1967). 따라서 뱀장어에 약욕 및 구강을 통해 ASA를 투여하여 스트레스를 감소시키로 그를 통해 질병을 감소시키려는 본 연구 조건에서도 뱀장어 혈장내 대부분의 ASA가 SA로 분해될 것으로 예상되므로 ASA와 SA를 동시에 측정 조건을 검토하였다.

가. 분리능

표준 시약 및 ASA를 투여하지 않은 뱀장어 혈장 내의 ASA와 SA를 spike하여 분석한 HPLC의 크로마토그람은 Fig. 2와 같다. ASA, SA, MBA 간 분리도가 우수하였으며 뱀장어 혈장 성분과도 양호하게 분리가 되어 뱀장어 혈장 중 ASA와 SA 분석에 방해 물질이 없음을 알 수 있다. 또한 ASA 4.25분, SA 7.18분, MBA 9.84분으로 모두 10분 이내 신속하게 분석이 가능하였다. 본 전처리 및 HPLC 분석조건은 Kees 등(1996)이 보고한 인체 혈장내의 ASA와 SA를 동시에 신속하게 분석하기 위해 연구 보고한 방법으로 뱀장어의 경우에도 적용이 가능하였다.

나. 검량선

검량선 작성을 위해 ASA와 SA의 표준용액을 acetonitrile로 각각 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 ㎍/㎖로 희석한 액을 제조한 후 3회 반복 측정하여 표준 용액의 농도 대 피크 면적의 비를 회귀선식으로 나타내었다 (Fig. 3). ASA와 SA 둘다 0.1~4.0 ㎍/㎖ 농도 범위에서 희석한 표준 용액의 농도와 피크 면적비의 상관계수가 0.996이상의 직선형으로 나타났다.

다. 회수율

뱀장어 혈장 속 ASA과 SA의 농도를 측정하기 위해서는 시료 전처리 과정 중의 회수율의 검토가 필요하다. ASA를 투여하지 않은 뱀장어 혈장에 ASA와 SA를 5가지 농도(0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ㎍/㎖)로 spike하여 구한 평균 회수율은 SA가 95.2~100.3%, ASA가 70.8~99.6%로 SA의 회수율이 ASA에 비하여 높아 보다 정량적으로 측정이 가능하였다(Table 1). 인체 혈액 중의 ASA와 SA의 회수율도 동일하게 ASA의 회수율이 낮다(Kees et al, 1996). 이는 acetonitrile의 일부가 염 용액에 일부 녹고 또한 전처리 과장 중 일부 ASA의 분해가 발생하였기 때문으로 판단된다.

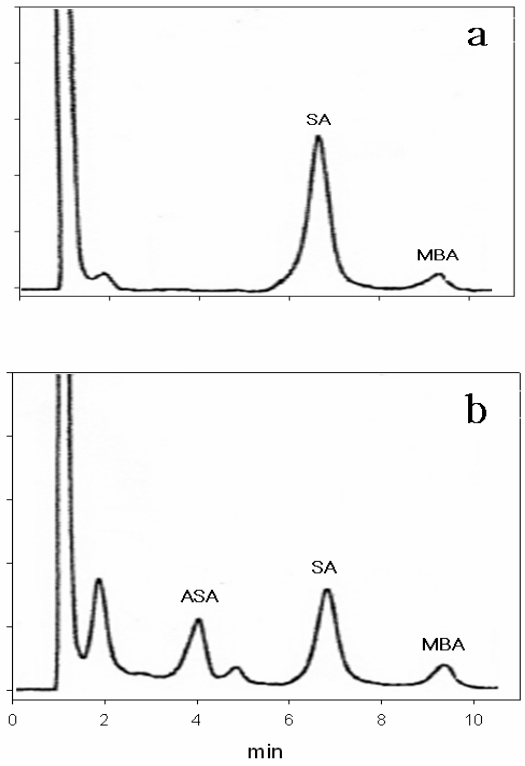

Fig. 2. HPLC chromatograms of eel plasma prepared (a) 3 hours after oral administration of aspirin and (b) by spiking drug-free plasma with standards (ASA, SA, MBA).

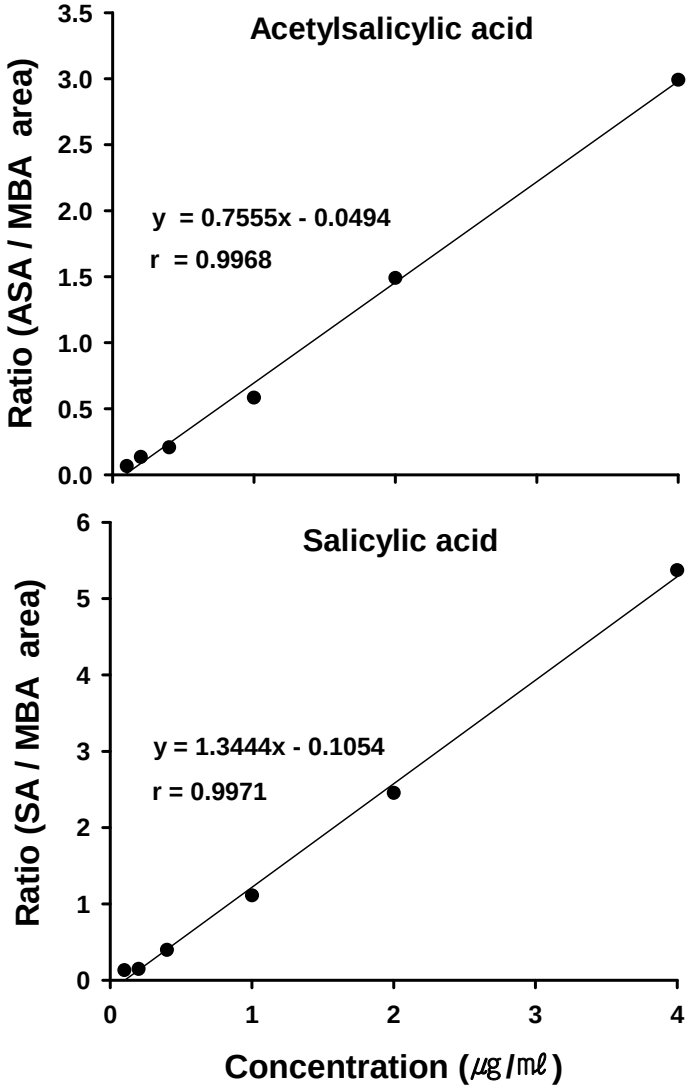

Fig. 3. Calibration curves of salicylic acid and acetylsalicylic acid.

Table 1. Recovery of aspirin(ASA) and salicylic acid(SA) in spiked eel plasma*

SA				ASA			
Added (㎍/㎖)	Found (㎍/㎖)	R.S.D. (%)	% Recovery	Added (㎍/㎖)	Found (㎍/㎖)	R.S.D. (%)	% Recovery
0.10	0.095	10.1	95.2	0.10	0.071	18.2	70.8
0.20	0.192	3.1	95.8	0.20	0.161	3.9	80.4
0.50	0.477	1.8	95.5	0.50	0.423	9.1	84.7
1.00	0.940	15.9	94.0	1.00	0.908	6.2	90.8
2.00	2.006	4.1	100.3	2.00	1.992	18.7	99.6

* : n=3

제 2절 Aspirin 투여 뱀장어 혈장에서의 aspirin의 농도와 지방산 조성의 변화.

가. 어류

민간 양만장에서 사육중인 체중 200 g전후의 뱀장어를 수조에 수용하여 순치한 다음 28℃에서 3주간 순치시킨 다음 사용하였다.

나. Aspirin (ASA)의 약욕 및 경구 투여

약욕 2일전에 먹이 투여를 금지한 다음 28℃의 사각 수조에 충분히 폭기하면서 20 ppm의 ASA에 약욕시켰다. ASA는 시판의 인체용 ASA (Bayer Korea)는 정량하여 온수에 용해시킨 다음 최종 농도가 20 ppm이 되도록 약욕수조에 첨가하였다. 약욕 후 0, 3, 6, 12, 24시간 후 채혈하였다.

경구투여는 순환여과 방식의 수조에 수용하여, 어체 중의 2%에 해당하는 시판의 분말사료와 사료양의 110%에 해당하는 수도수에 어체중 ㎏당 50 ㎎이 되도록 용해시킨 ASA을 혼합하여 반죽사료를 만들었다. 사료의 투여는 14일 동안 매일 오전 10시에 투여하였다. 투여 후 0, 3 5, 7, 14일 후 사료 투여 후 4시간이 경과한 다음 필요량의 뱀장어를 채포하여 혈액은 23G 주사침을 부착한 플라스틱 주사기(3 ㎖)로 동맥구에서 채혈하여 혈장을 분리하였다.

다. ASA와 SA의 농도 측정

제 1절의 방법에 따라 실시하였다.

라. 혈장 지방산 분석

혈장내의 지방산 분석은 Lepage and Roy(1986)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 100 ㎕ 혈장과 내부 표준물질(tridecanoic acid, C 13:0) 100 ㎍을 녹인 2 ㎖의 methanol-benzene(4:1, v/v)을 시험관에 넣었다. Magnetic bar를 넣고 교반하면서 200 ㎕ acetyl chloride를 서서히 1분에 걸쳐서 첨가하였다. 뚜껑을 한 후 100℃에서 1시간 동안 methanolysis를 하였다. 가열 후 물속에 담그어 냉각시킨 후 반응을 종결시키고 혼합물을 중화시키기 위해 6% K_2CO_3 5 ㎖를 서서히 첨가하였다. 교반한 후 원심 분리하여 상층의 bezene액을 GC에 주입하였다. GC의 분석조건은 Table 2와 같다. 분석된 지방산은 시료와 동일한 조건에서 분석한 PUFA No. 3(Supelco Co.)의 retention time과 비교하여 동정하였다.

Table 2. Operating conditions of GC for fatty acid composition

Instrument	HP GC model 6890
Column	SP-2330 (30 ㎝×250 ㎛×0.2 ㎛)
Oven temp	220℃
Inject temp	240℃
Detector temp	240℃
Detector	FID
Make up gas	He
Flow rate	0.8 ㎖/min
Split ratio	30 : 1

2. 결과 및 고찰

가. ASA의 약욕

20 ppm ASA액의 약욕 시간에 따른 뱀장어 혈장의 salicylic acid(SA)의 농도 변화는 Fig. 4와 같다. ASA는 혈장내 검출되지 않고 SA만 검출되었다. SA 농도는 3시간 후 0.06 ㎍/㎖으로 증가 후 6시간에 0.09 ㎍/㎖로 최대값을 나타내었고 이 후는 완만히 감소하는 경향을 나타내어 24시간 후에는 0.06 ㎍/㎖이였다. 이는 aspirin이 pH 중성에서 급격히 분해되고 in vivo 상에서 더욱 급격히 분해된다는 보고를 미루어 볼 때 약욕 시간이 6시간 이상에서는 혈장 내 aspirin의 흡수 속도와 분해 속도가 평형을 유지하기 때문으로 여겨진다.

Fig. 5는 GC로 분석한 뱀장어 혈장 중 지방산 조성을 나타낸 크로마토그램이며 Table 3은 약욕 시간에 따른 지방산 조성의 변화를 나타낸 표이다. 뱀장어 혈장의 주요 지방산은 18:1 n-7, 18:1 n-9, 16:0, 22:6 n-3이었으며 모노엔산이 가장 함량이 높았으며 다음으로 폴리엔산, 포화지방산 순이었다. 약욕 시간에 따라 지방산 조성은 포화지방산은 17.99-19.87%, 모노엔산은 55.08-57.76%, 폴리엔산은 22.79-24.73%로 약욕 시간에 따른 일정한 경향이 없었다.

나. ASP의 경구투여

ASA의 경구 투여 일수에 따른 뱀장어 혈장 내 SA 농도의 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 경구 투여의 경우도 ASA는 검출되지 않았다. ASA는 검출 3일에 14.56 ㎍/㎖로 최대 값을 나타낸 후 그 후 완만히 감소하는 경향을 나타내었으며 7일 3.13 ㎍/㎖ 이후는 거의 변화가 없었다. 약욕 24시간 투여시 혈장내 SA농도가 0.06 ㎍/㎖임에 비하여 경구 투여군은 7일 이후 3.31 ㎍/㎖를 유지하여 월등히 높았다. 따라서 약욕에 비하여 경구 투여가 효율적임을 알 수 있다.

혈장 내 지방산 조성은 Table 4와 같다. 경구 투여에 따른 혈장 내 지방산 조성의 뚜렷한 경향은 나타나지 않았다.

다. ASA관련 물질의 잔류 함량

약욕과 경구 투여 후 휴약 기간 중 혈장에 잔류하는 ASA관련물질 함량을 분석하였다. Fig. 7은 24시간 20 ppm ASA액에 약욕 후 ASA가 없는 수욕조 상에서 50시간 사육하면서 혈장내 aspirin관련 물질 함량을 측정한 것이다. 혈장내 ASA는 검출이 되지 않아 ASA는 모두 salicylic acid로 분해되었음을 알 수 있었다. Salicylic acid는 0시간에 0.09 ㎍/㎖으로 최대값을 나타낸 후 완만히 감소하는 경향을 나타내어 24시간 이후는 0.03 ㎍/㎖ 이하로, 48시간 이후에는 0.02 ㎍/㎖ 이하로 미량만 잔류하였다. 따라서 약욕의 경우 ASA 약욕 후 2일 휴약 기간을 설정하면 ASA의 잔류 문제는 해결됨을 알 수 있다.

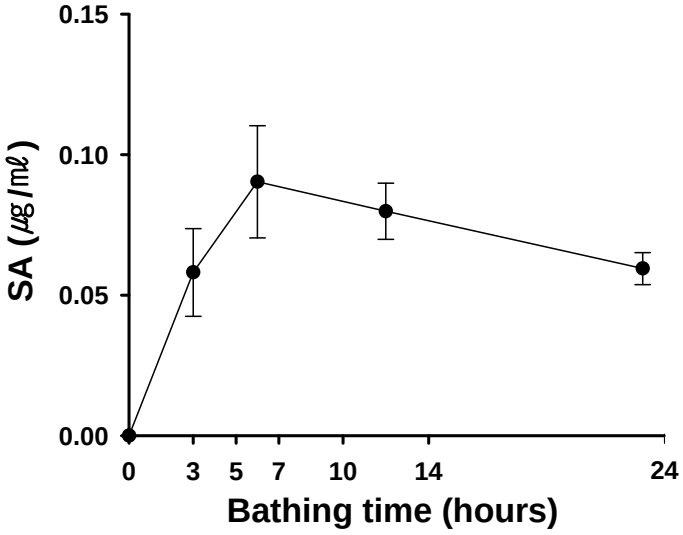

Fig. 4. Changes in salicylic acid (SA) of peripheral blood from eels bathed in a concentration of 20 ppm aspirin.

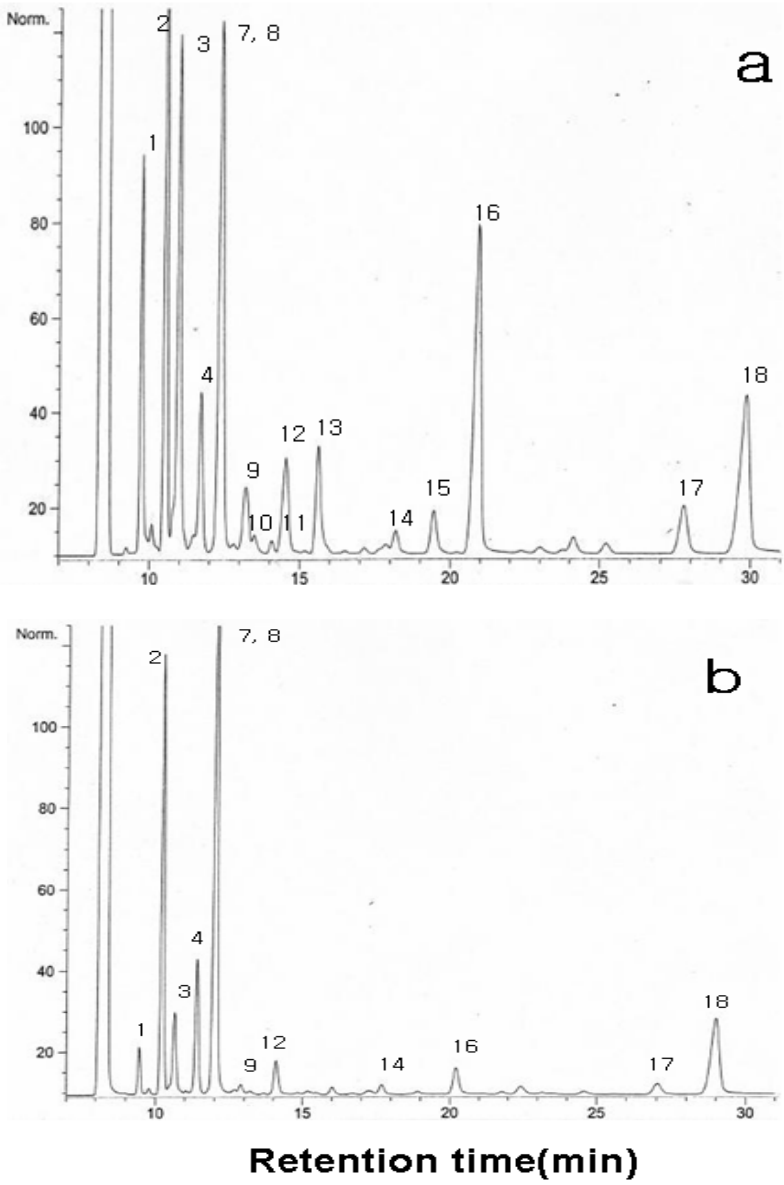

Fig. 5. Fatty acid composition of standard (a) and eel plasma (b). 1;C14:0, 2;C16:0, 3;C16:1, 4;C16:2, 7;C18:1, 8;C18:1, 9;C18:2, 12;C18:4, 14;C20:4, 16;C20:5, 17;C22:5, 18;C22:6.

Table 3. Changes in fatty acid composition of eel plasma during aspirin bath

Fatty acid	Bathing time (hours)				
	0	3	6	12	24
14:0	1.69	1.86	1.73	1.81	1.57
16:0	18.18	18.11	17.72	18.23	16.42
∑Saturates	19.87	19.97	19.45	20.04	17.99
16:1-7	4.18	4.78	4.96	4.42	4.24
18:1n-9	26.45	25.15	26.40	25.50	26.52
18:1n-7	26.45	25.15	26.40	25.50	26.52
∑Monoenes	57.08	55.08	57.76	55.42	57.28
16:2n-4	6.18	7.09	6.30	6.41	6.47
18:2n-6	-	2.63	2.64	2.18	2.64
18:4n-3	2.37	2.65	2.59	2.46	2.80
20:4n-6	0.86	0.96	1.01	1.28	1.05
20:5n-3	2.08	1.21	1.04	1.35	0.94
22:5n-3	1.51	1.40	1.41	1.41	1.61
22:6n-3	10.05	8.02	7.80	9.45	9.22
∑Polyenes	23.05	23.96	22.79	24.54	24.73

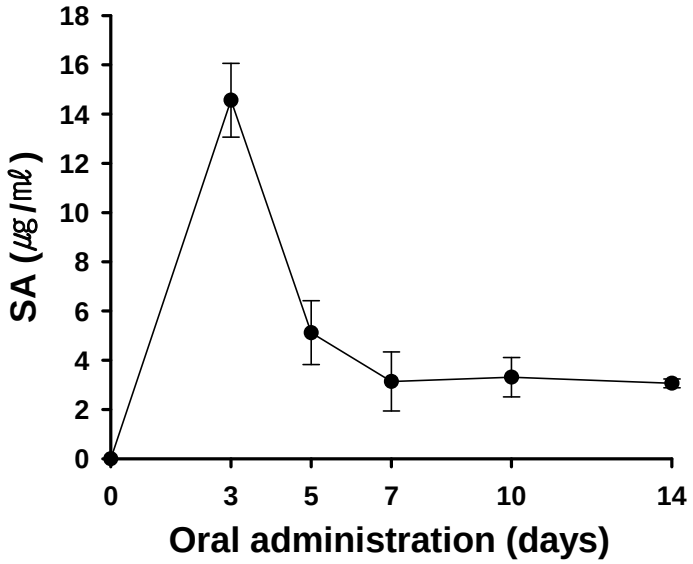

Fig. 6. Changes of salicylic acid (SA) in the peripheral blood from eels fed the aspirin-supplemented diet (50 ㎎/㎏ of body weight).

Table 4. Changes in fatty acid composition of eel plasma during aspirin oral administration

Fatty acid	Oral administration (days)					
	0	3	5	7	10	14
14:0	1.69	1.56	1.81	1.46	1.73	1.65
16:0	18.18	17.72	19.34	19.70	19.41	20.2
∑Saturates	19.87	19.28	21.15	21.16	21.14	21.85
16:1n-7	4.18	4.41	4.73	3.56	3.90	4.35
18:1n-9	26.45	27.08	25.13	25.92	26.08	26.00
18:1n-7	26.45	27.08	25.13	25.92	26.08	26.00
∑Monoenes	57.08	58.57	54.99	55.4	56.06	56.35
16:2n-4	6.18	5.66	6.28	6.98	7.02	6.22
18:2n-6	-	1.06	1.01	0.61	0.61	1.17
18:4n-3	2.37	1.86	2.04	1.73	1.74	1.69
20:4n-6	0.86	0.79	0.89	0.79	0.95	0.74
20:5n-3	2.08	1.58	2.42	2.65	2.43	2.31
22:5n-3	1.51	1.14	1.26	1.22	1.25	1.33
22:6n-3	10.05	10.06	9.97	9.46	8.80	8.34
∑Polyenes	23.05	22.15	23.87	23.44	22.80	21.80

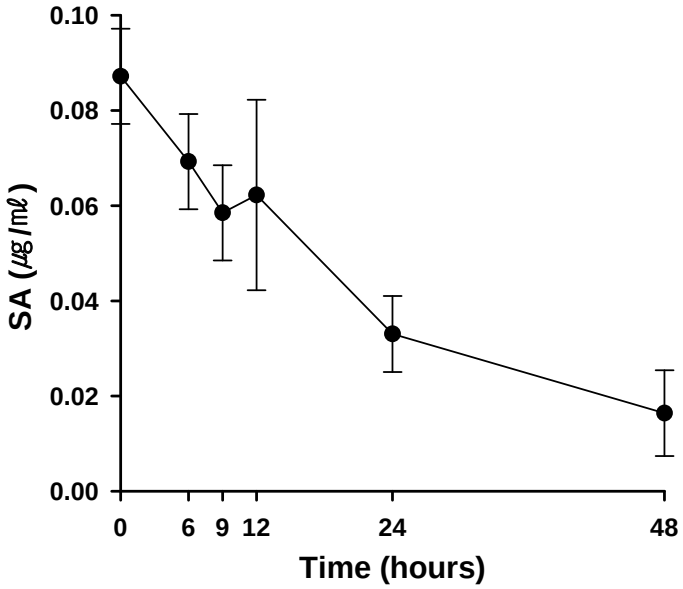

Fig. 7. Changes in salicylic acid residues in the eels plasma after aspirin bathing for 24 hours.

약욕 투여 후 휴약 기간 중 혈장내 지방산 조성은 Table 5와 같다. 혈장 내 지방산 조성은 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다.

72시간 경구 투여 후 aspirin이 없는 수욕조에서 120시간 사육하면서 사육 시간에 따른 잔류하량을 측정하였다(Fig. 8). 약욕의 경우와 동일하게 aspirin은 검출되지 않았으며 0시간에 7.54 ㎍/㎖로 최대치를 나태낸 후 급격히 감소하여 48시간에 0.06 ㎍/㎖이 검출되었고 120시간 이후에는 0.03 ㎍/㎖이 검출되었다.

따라서 약욕 과 경구 투여 후 aspirin이 salicylic acid로 분해되고 salicylic acid도 관련 물질의 대부분이 48시간 이내에 분해되어 거의 잔류하지 않음을 알 수 있다.

경구 투여 후 휴약기간 중 지방산 조성은 Table 6과 같다. 혈장 내 지방산 조성은 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다.

Table 5. Changes in fatty acid composition in the eels plasma after aspirin bathing for 24hours.

Fatty acid	Hours after aspirin bath					
	0	6	9	12	24	48
14:0	2.26	1.70	1.96	1.86	1.53	1.43
16:0	17.22	16.09	16.92	22.24	17.06	15.74
∑Saturates	19.48	17.79	18.88	24.10	18.59	17.17
16:1n-7	5.76	4.69	4.96	4.74	4.55	4.77
18:1n-9	24.75	25.72	25.50	22.43	26.31	26.76
18:1n-7	24.75	25.72	25.50	22.43	26.31	26.76
∑Monoenes	55.26	56.13	55.96	49.60	57.17	58.29
16:2n-4	5.64	5.08	5.77	6.17	5.57	4.49
18:2n-6	2.56	3.20	2.369	2.82	2.31	2.33
18:4n-3	2.46	2.73	2.53	2.07	2.33	2.45
20:4n-6	1.04	3.40	3.19	3.75	3.08	3.02
20:5n-3	3.36	0.82	0.72	0.86	0.81	0.83
22:5n-3	1.45	1.65	1.44	1.36	1.35	1.62
22:6n-3	8.74	9.21	9.15	9.27	8.79	9.80
∑Polyenes	25.25	26.09	25.16	26.30	24.24	24.54

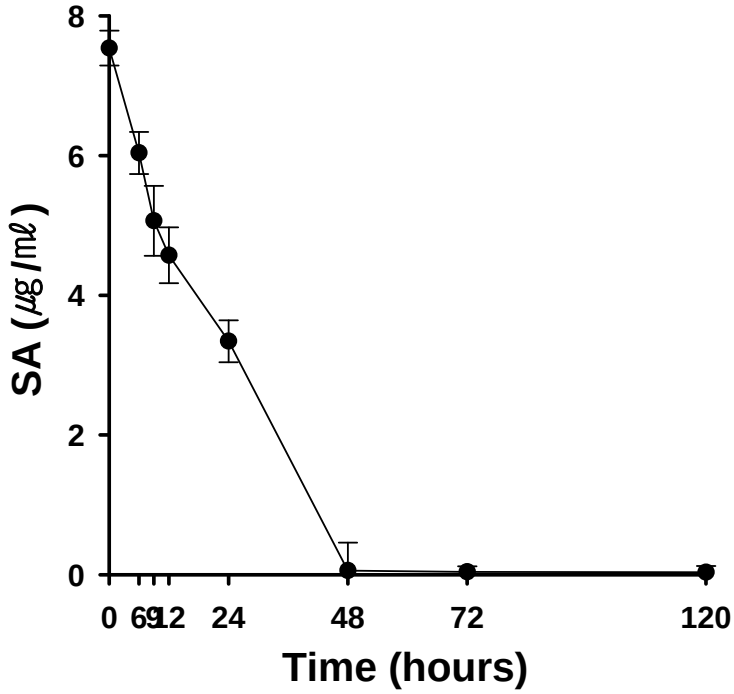

Fig. 8. Changes in salicylic acid residues in eels plasma after oral aspirin-supplemented diet for 7 days.

Table 6. Changes in fatty acid compositions of eel plasma fed the aspirin-supplemented diet (50 ㎎/㎏ of body weight)for 7 days.

Fatty acid	Hours after oral administration							
	0	6	9	12	24	48	72	120
14:0	1.69	1.79	1.68	1.75	1.76	1.72	1.46	1.51
16:0	18.18	19.00	18.78	18.16	17.13	19.32	18.16	17.98
∑Saturates	19.87	20.79	20.46	19.91	18.89	21.04	19.62	19.49
16:1n-7	4.18	4.13	3.76	4.35	4.64	4.48	4.45	4.36
18:1n-9	26.45	26.67	26.81	27.23	27.09	25.33	26.51	27.04
18:1n-7	26.45	26.67	26.81	27.23	27.09	25.33	26.51	27.04
∑Monoenes	57.08	57.47	57.38	58.81	58.82	55.14	57.47	58.44
16:2n-4	6.18	7.17	6.94	6.23	6.48	5.53	5.60	5.55
18:2n-6	-	0.62	0.52	-	0.93	1.12	-	0.98
18:4n-3	2.37	2.06	2.18	2.34	2.29	2.05	-	1.80
20:4n-6	0.86	0.66	0.76	0.79	0.81	0.80	1.24	0.75
20:5n-3	2.08	1.62	1.77	2.40	1.78	1.85	1.99	1.63
22:5n-3	1.51	1.12	1.16	1.14	1.22	1.28	1.67	1.15
22:6n-3	10.05	8.48	8.83	8.38	8.78	11.19	12.41	10.20
∑Polyenes	23.05	21.73	22.16	21.28	22.29	23.82	22.91	22.06

제 3절 Aspirin투여 양식 뱀장어의 혈액학적 및 병리조직학적 변화

헤마토크리트치 또는 leucocrit치는 어류의 건강상태나 스트레스를 평가할 때 널리 사용되고 있다 (Blaxhall, 1972; Hickey). 급성 스트레스에는 높은 Ht치를 나타내며 (Soivio and Oikari, 1976; Wells et al., 1984; Barton et al, 1985), 낮은 Ht치는 질병의 감염되었음을 의미한다 (Cardwell and Smith, 1971). Leucocrit value는 어류의 건강 상태의 지표로(McLeay and Gordon, 1977; Wedemeyer et al., 1983), 비정상적으로 높은 leucocrit value는 잠재적인 질병상태를 의미하며(Wedemeyer et al., 1983), 극단적으로 낮은 leucocrit value는 급성 스트레스에 유발되는 corticosteroids에 의해 림프구의 순환이 억제되기 때문이거나(Donaldson, 1981: Schreck, 1981), 백혈구의 파괴를 유발하는 세균성 질병의 감염을 의미한다(Wedemeyer et al., 1983). 경구용 혈전치료제를 투여하면 혈액응고기전에서 피브리노겐(fibrinogen)이 피브린(fibrin)으로의 전환과 밀접한 관계가 있는 외인성 응고인자 중 VII 인자에 가장 영향을 주어 응고시간이 길어진다.

1. 재료 및 방법

가. 어류

민간 양만장에서 사육중인 체중 200 g전후의 뱀장어를 순치한 다음 28℃에서 3주간 순치시킨 다음 사용하였다.

나. Aspirin (ASA)의 약욕 및 경구 투여

약욕 2일전에 먹이 투여를 금지한 다음 28℃의 사각 수조에 충분히 폭기하면서 20ppm의 ASA에 약욕시켰다. ASA는 시판의 인체용 ASA (Bayer Korea)는 정량하여 온수에 용해시킨 다음 최종 농도가 20 ppm이 되도록 약욕수조에 첨가하였다. 약욕 후 0, 3, 6, 12, 24시간 후 채혈하였다.

경구투여는 순환여과 방식의 수조에 수용하여, 어체 중의 2%에 해당하는 시판의 분말사료와 사료양의 110%에 해당하는 수도수에 어체중 ㎏당 50 ㎎이 되도록 용해시킨 ASA을 혼합하여 반죽사료를 만들었다. 사료의 투여는 14일 동안 매일 오전 10시에 투여하였다. 투여 후 0, 3, 5, 7, 14일 후 사료 투여 후 4시간이 경과한 다음 필요량의 뱀장어를 채포하여 혈장을 분리하거나 체측근 및 소화관을 채취하였다.

다. 채혈

혈액은 23G 주사침을 부착한 플라스틱 주사기(3㎖)로 미부정맥 또는 동맥구에서 채혈하였다. Prothrombin time (PT) 및 activated partial thromboplastin time (APTT)는 3.2% sodium citrate가 0.3 ㎖가 들어 있는 시판의 플라스틱 시험관인 vacuette (greiner bio-one, Austria)에 채혈하였고, 그 외는 미리 헤파린을 처리한 주사기를 사용하였다. Hematocrit치(Ht), leucocrit치(Leut, McLay et al., 1977) 및 hemoglobin농도(Hb)를 제외하고는 3마리에서

채혈한 혈액을 pool하여 사용하였다.

라. Hematocrit value, leucocrit value 및 hemoglobin 농도 측정

채혈한 혈액은 헤마토크리관에 옮겨 sealer로 봉한 다음 실온에서 헤마토크리트 원심분리기 (Hakwsley, England)로 채혈한 11,500 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. Hematocrit치(%)는 micro-hematocrit reader (Hawksley, England)로 전 혈액의 높이에 대한 적혈구층의 높이의 비율에 100을 곱하여 산출하였다. Leucocrit치는 McLay et al.(1977)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 혈액을 헤마토크리트 원심기로 원심 후 적혈구층과 혈장층 사이에 있는 buffy coat층의 높이를 해부현미경 (× 50)과 대안 마이크로메타로 측정하여 다음 식으로 계산하였다.

Leucocrit치(%)= buffy coat의 높이/전 혈액의 높이 × 100

헤모글로빈의 농도는 시안메타헤모글로빈법으로 혈액 25-50 ㎕를 희석핵 5 ㎖와 혼합하여 실온에 30분간 방치한 다음 540 ㎚에서 흡광도를 측정하여 희석배수를 곱하여 계산하였다.

마. PT 및 APPT의 측정

시판의 PT 측정용 및 APPT 측정용 kit (Dade Behring, Germany)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였지만 어류에 적용하기 위하여 약간의 변형시켜 측정하였다. 즉 3마리의 혈액을 pool하여 3.0 ㎖가 되도록 플라스틱 시험관에 채혈한 다음 4회 정도 뒤집어 잘 혼합하였다. 채혈한 시험관은 3,000 rpm에 10분간 원심한 다음 상청액을 채취하여 별도의 시험관에 옮기고 바로 측정하거나 냉장 보관하였다가 4시간 이내에 측정하였다.

PT측정은 혈장 0.1 ㎖을 시험관에 넣고, 37℃의 항온수조에 1분간 가온한 다음 미리 37℃의 항온수조 가온한 Tromboplastin C 0.2 ㎖를 첨가하고 stopwatch를 누르고 시험관을 꺼내어 비스듬히 기울여 하얀 섬유소의 덩어리가 형성되는 응고시간 (sec)을 측정하였다.

APPT는 37℃의 항온수조에 0.02M $CaCl_2$ (Dade Behring, Germany) 2-3 ㎖을 넣은 시험관과 APPT측정용 actin시약 을 시험관에 0.1 ㎖가 든 시험관을 미리 가온하였다. 단 actin시약의 가온시간은 1분이었다. 가온한 actin시약 0.1 ㎖가 든 시험관에 검사할 혈장 0.1 ㎖을 넣고 잘 혼합한 다음 다시 항온수조에서 3분간 가온하였다. 3분이되기 전 약 10초전에 미리 가온해 둔 $CaCl_2$ 0.1 ㎖를 정확히 3분이 되는 순간에 actin시약과 혈장이 혼합된 시험관에 첨가하고 stopwatch를 누르고 잘 혼합하였다. 시험관을 꺼내어 내용물이 시험관의 중간 부분까지 흐를 수 있도록 시험관을 충분히 기울여 물처럼 흐르듯 것이 덩어리가 형성되면서 잘 움직이지 않을 때까지의 시간 (sec)을 측정하였다. 덩어리가 생겼는지 1-2초 내에 관찰하고 없으면 다시 수조에 되돌려 1-2초 후에 확인하는 과정을 반복하다가 생기면 시간을 정지하고 시간을 측정하였다.

바. 병리조직학적 변화

아가미, 위 및 장의 일부를 절취하여 10%중성 포르말린에 고정한 다음 상법에 따라 5 ㎛의 파라핀 조직 절편을 만들어 Mayer hematoxylin & eosin (H&E)염색 후 형태적 변화를 관찰하였다.

사. 통계

Aspirin의 약욕군 및 경구 투여군과 대조군에서의 헤마토크리트치, leucocrit치, PT 및 APTT 값의 유의차는 P>0.05의 수준에서 student-t의 검정으로 비교하였다.

2. 결과 및 고찰

가. ASA의 약욕

ASA약욕 뱀장어 말초혈액의 Ht치와 헤모글로빈 농도의 변화는 Fig. 9에 표시하였다. ASA 약욕 전의 Ht치는 33.3%였지만, 약욕 후 대조군의 Ht치에 비해 높아져(P>0.05), 약욕 3시간 후에는 33.8%, 약욕 6시간과 12시간 후에는 각각 35.5%와 36.5%, 그리고 약욕 24시간 후에는 38.5%로 약욕시간이 길어질수록 점차 증가하였다. 그러나 leucocrit치는 ASA약욕군과 대조군 모두 1.0%로 거의 변화가 없이 일정하였다.

ASA약욕 후 말초혈액의 헤모글로빈 농도는 현저하게 증가하였다. 즉 대조군의 헤모글로빈의 농도는 6.10-6.17 ㎎/100 ㎖으로 변화가 없었지만, ASA약욕 3시간 후부터 6.56 ㎎/100 ㎖로 증가하기 시작하여, 12시간과 24시간 후에는 각각 7.17과 7.68 ㎎/100 ㎖으로 약욕시간이 길어질수록 말초혈액의 헤모글로빈의 농도는 증가하였다.

ASA약욕 뱀장어의 말초혈액의 PT값과 APTT값의 변화는 Fig. 10에 표시하였다. 대조군의 PT값은 5.1-5.2 sec로 변화가 없는 반면 ASA약욕군의 PT값은 대조군에 비해 현저하게 길어졌다(P>0.05). 즉 약욕 3시간 후에는 5.4 sec로 응고시간이 길어졌으며, 약욕시간이 길어질수록 응고시간은 더욱 길어져 약욕 24시간 후에는 6.2 sec로 가장 늦게 응고하였다.

ASA약욕 뱀장어의 말초혈액의 APPT값은 약욕시간이 길어질수록 대조군의 6.2-6.4 sec에 비해 응고시간이 현저하게 길어져(P>0.05), 약욕 12시간 후와 24시간 후에는 7.4 sec와 7.7 sec로 길어졌다. ASA의 약욕 시간이 길어질수록 PT치와 APTT치 모두 길어졌다.

ASA 약욕 후의 뱀장어 아가미 조직의 변화는 Fig. 11에 표시한 것처럼 대조군과 차이는 발견할 수 없었다.

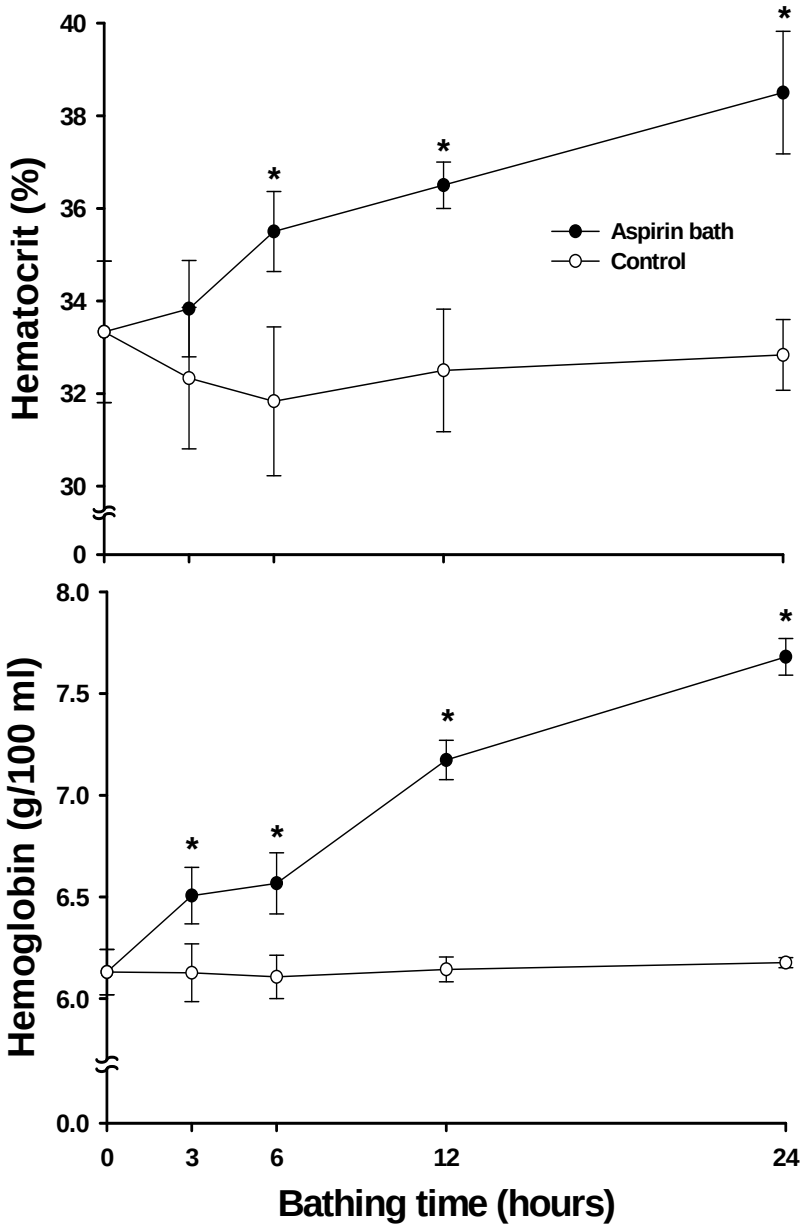

Fig. 9. Changes in the hematocrit values (%) and hemoglobin contents (g/100 ㎖) of peripheral blood from eels bathed in a concentration of 20 ppm aspirin or control fish (n=3).

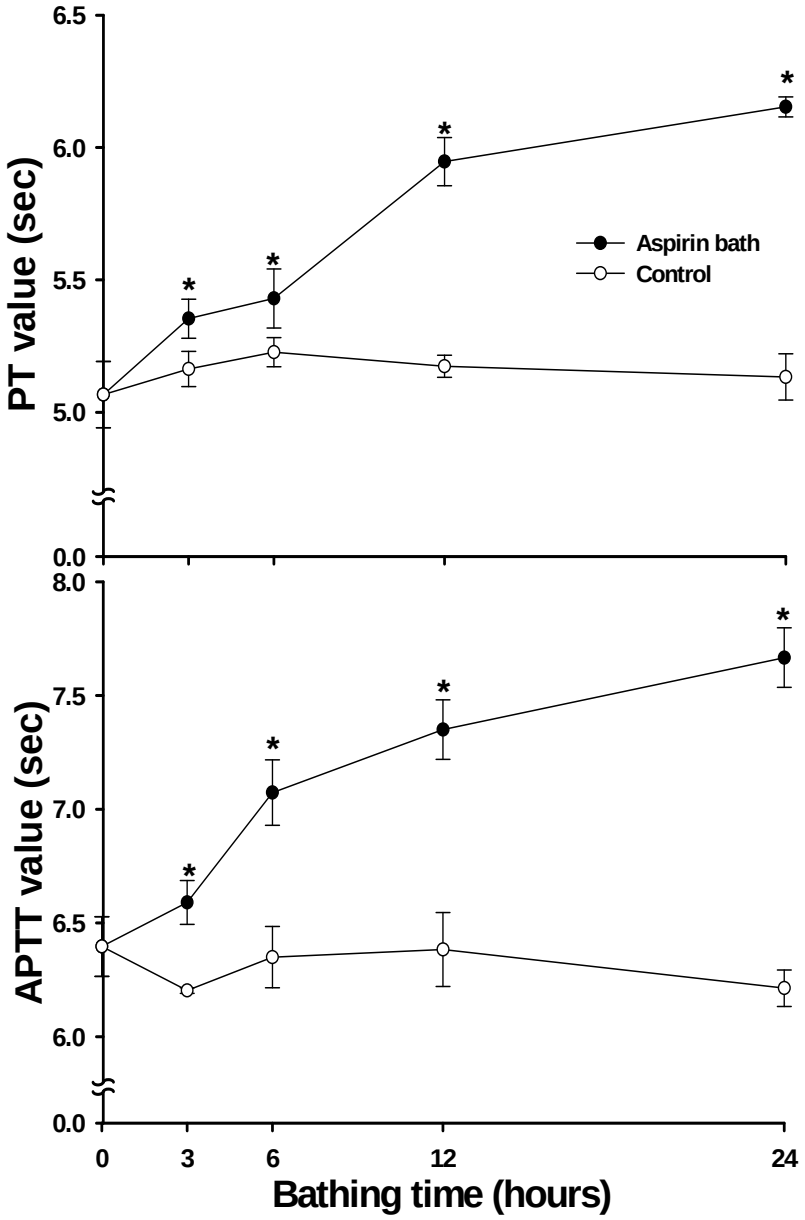

Fig. 10. Changes in the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT) of peripheral blood from eels bathed in a concentration of 20 ppm aspirin or control fish. Pooled serum from 3 fish was used each trial (n=3).

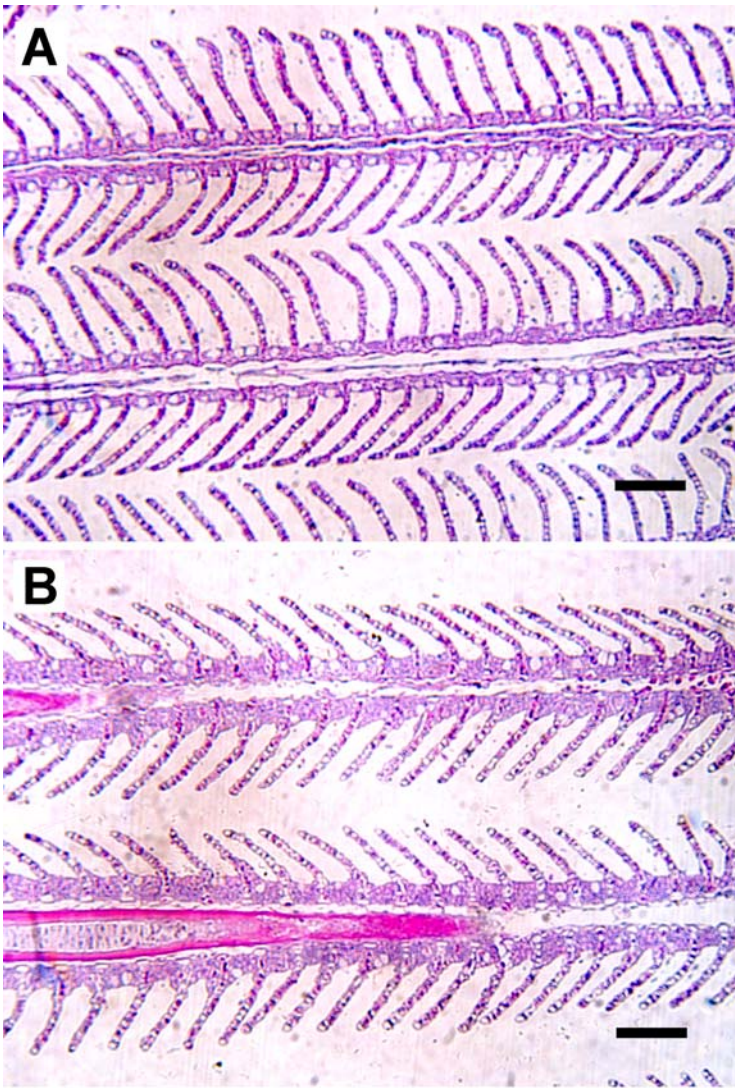

Fig. 11. Microphotographs of gill from eel bathed in a concentration of 20 ppm aspirin for 24 hr (A) and control eel (B). H&E stain. Bars indicate 10 ㎛.

나. ASA의 경구투여

ASA약욕 뱀장어 말초혈액의 Ht치와 헤모글로빈 농도의 변화는 Fig. 12에 표시하였다. 대조군의 Ht치는 전 실험기간을 통하여 31.0-33.3% 이었다. 반면에 ASA첨가군의 Ht치는 경구 투여 일수에 비례하여 증가하기 시작하여 투여 7일 후에는 37.5%로 되었다. 그러나 그 후 10일 후와 14일 후에는 모두 37.7% 투여 7일 후와 별다른 차이가 없었다. 또 말초혈액의 헤모글로빈의 농도는 대조군은 5.8-6.2 g/100 ㎖의 범위에서 별다른 차이가 없었지만, ASA첨가 사료 투여군의 헤모글로빈 농도는 투여 일수와 더불어 지속적으로 증가하여 투여 14일후에는 7.5 g/100 ㎖에 달하였다. 그러나 투여 7일 후부터는 완만한 증가세로 7일후와 커다란 차이를 보이지는 않았다.

ASA약욕 뱀장어의 말초혈액의 PT값과 APTT값의 변화는 Fig. 13에 표시하였다. 대조군의 PT치는 5.0-5.2 sec였지만, ASA 경구투여군의 PT치는 투여일수에 비례하여 응고시간이 늦어졌다. 즉 투여 7일후에는 6.1 sec, 투여 10일 후와 14일 후에는 각각 6.2 sec로 되었다. 한편 APTT치는 대조군은 전 실험기간을 통하여 6.0-6.2 sec 이었지만 ASA경구투여군은 투여 3일 후부터 7.3 sec로 응고시간이 늦어지기 시작하여, 투여 14일 후에는 최대치인 7.7sec로 응고시간이 길어졌다. ASA의 경투투여 일수가 길어짐에 따라 PT와 APPT는 증가하는 경향이었지만 투여 7일후와는 유효차가 없었다.

ASA 경구 투여군의 위와 장의 조직학적 변화는 Fig. 14에 표시한 것처럼 대조군과 차이가 없었다.

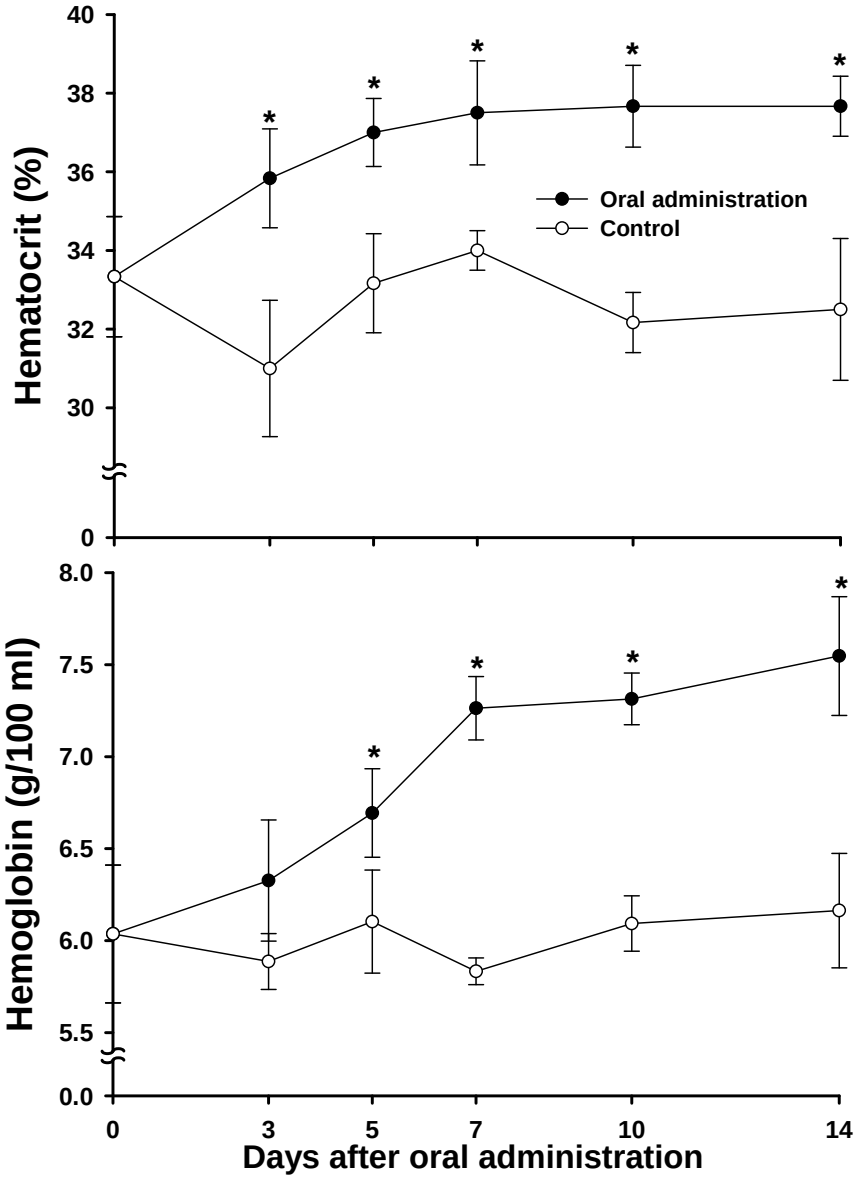

Fig. 12. Changes in the hematocrit values (%) the hemoglobin concentration (g/100 ㎖) of peripheral blood from eels fed the aspirin-supplemented diet (50 ㎎/kg of body weight) (n=3).

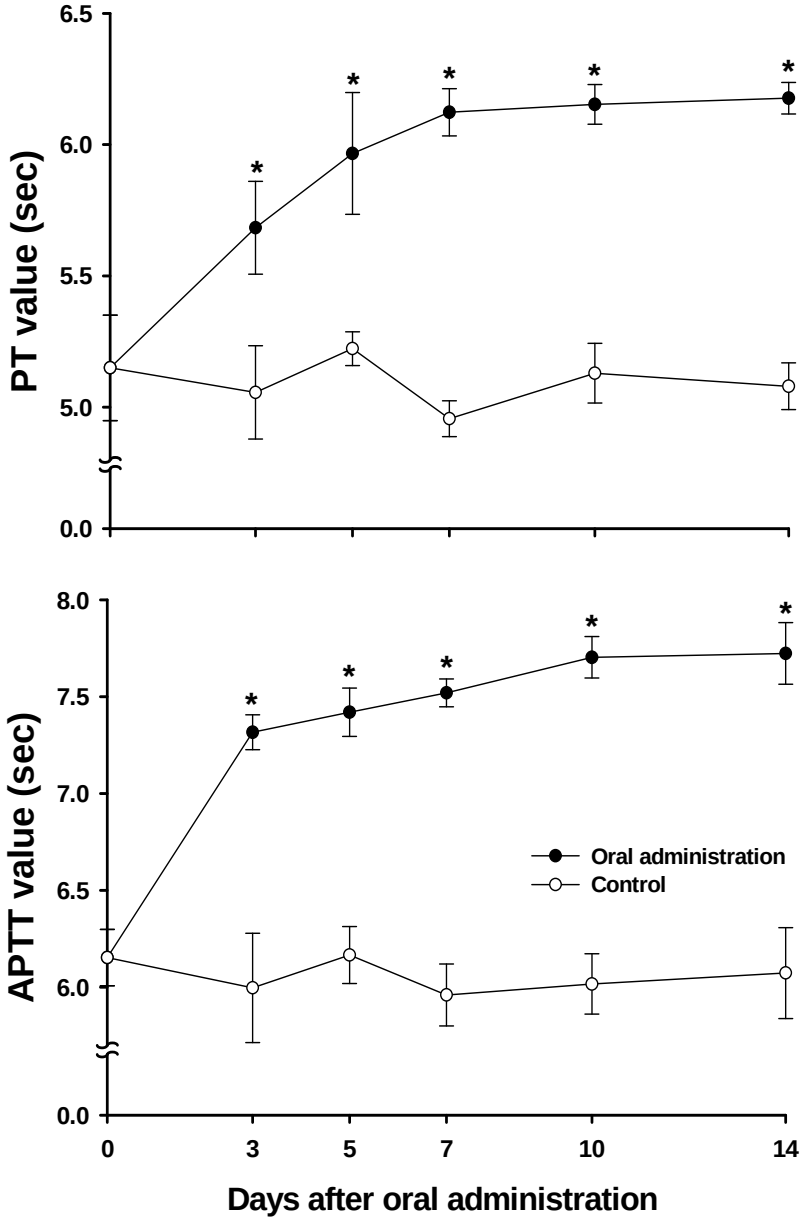

Fig. 13. Changes in the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT) of peripheral blood from eels fed the aspirin-supplemented diet ((50 ㎎/㎏ of body weight) (n=3).

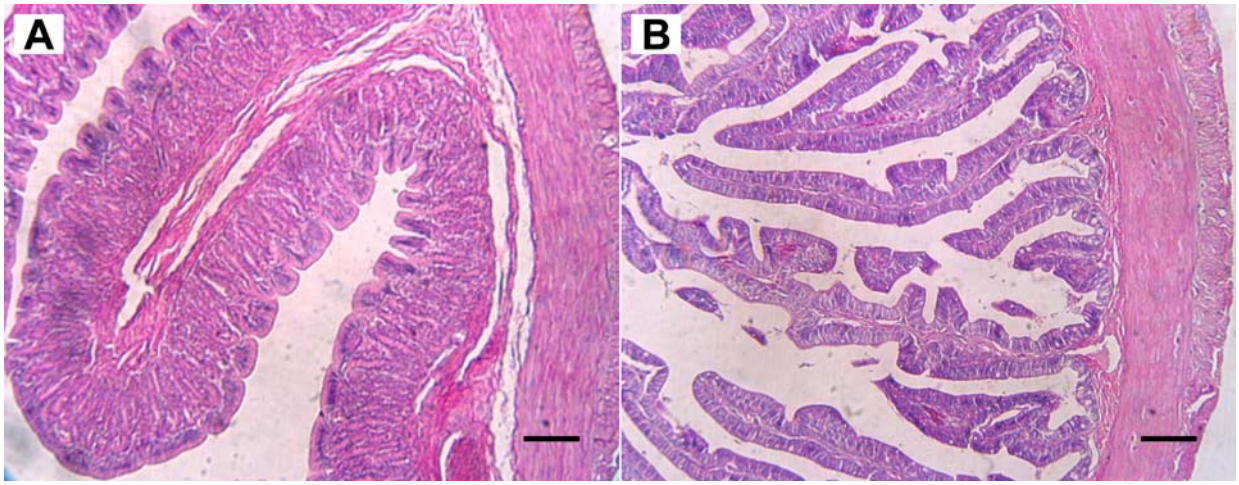

Fig. 14. Microphotographs of the stomach (A) and intestine (B) from eel fed the aspirin-supplemented diet (50 ㎎/㎏ of body weight) for 14 days. H&E stain. Bars indicate 10 ㎛.

제 4절 실용화 시험

1. 서론

뱀장어의 양식 과정에는 최소한 4차례의 선별을 하고 있다. 즉 1차 선별은 실뱀장어 (0.2g)를 먹이 부침하여 30-40일간 사육하여 체중이 3-4 g일 때, 2차 선별은 다시 60-70일 사육하여 체중이 10-20 g일 때이다. 그리고 3차 선별은 다시 60-70일간 사육하여 체중이 50-100 g일 때 실시하며 마지막인 출하선별은 3차 선별 후 60-70일간 사육하여 체중이 200-250g일 때 실시하고 있다. 선별 방법은 대개 fish pumper를 이용하여 체포한 다음 선별기를 통과시켜 선별하는 것이 일반적이다. 16-18℃의 수온에서 선별을 한 다음 다시 사육 수온으로 되돌리고 있어, 선별 과정의 저온에 수용하는 것이 뱀장어에게는 커다란 스트레스 요인으로 작용하고 있다.

순환여과방식에 의한 집약적 양식하는 하고 뱀장어 양식장에서는 어류에서 배출되는 질소성 대사산물의 주체인 암모니아를 질화과정의 중간산물인 아질산으로 변환시키는 것은 생물여과막의 종속영양세균에 의존하고 있다. 이 때문에 양어지내의 아질산의 농도가 급증하게 되는 경우가 뱀장어의 성장과 생잔에 위험 요소로 작용하게 된다. 이러한 아질산의 독성은 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 산소를 운반하는 능력이 없는 메토헤모글로빈 (methemoglobin, Met-Hb)으로 산화시켜 아질산중독증(methemoglobinemia)을 유발시키기 때문이다. 아질산 중독증을 유발시키는 아질산의 농도는 어종에 따라 커다란 차이가 나는 것으로 보고되었다. (Cameron, 1971; Russo et al., 1974; Smith and Williams, 1974; Westin, 1974; Brown and McLeay, 1975; Konikoff, 1975; Simth and Russo, 1975; Colt and Tchobanoglous, 1976). 아질산은 새변의 소금세포를 통하여 어체의 혈장으로 유입됨으로 혈장에서의 아질산의 농도는 환경수의 수십 배에 달하게 되며 (Eddy et al., 1983), 혈장내의 아질산은 다시 적혈구로 이동하여 Hb의 철이온을 Fe^{3+}로 산화시켜, Met-Hb으로 변화시키게 된다. 그럼으로 혈장의 Met-Hb의 농도가 상승하면 할수록 적혈구의 산소운반 능력은 저하하게 된다(Cameron, 1971). 건강한 뱀장어 혈액의 Met-Hb의 비율은 1%정도이지만(Kawatu et al, 1987), 아질산 중독증의 Met-Hb의 비율은 4-66%로(Kubota et al., 1981), 혈액, 아가미 및 간장이 갈색으로 퇴색되며, 병리조직학적으로는 적혈구 핵의 농축과 융해를 동반한 변성, 비세포의 적혈구 탐식 및 아가미 혈관내의 혈전형성, 간장과 비장의 헤모시드린 색소의 침착 등이 생기는 것으로 보고되었다 (Kubota et al., 1981). 어류의 아질산의 중독증의 치료는 사람에서 Met-Hb를 감소시키는 것으로 알려진 ascorbic acid의 경구투여 (Bancroft et al,.1945; David et al., 1988) 또는 송어류의 methylene bule약욕(Wedemeyer and Yasutake, 1978)도 있지만, 대개의 경우 아가미를 통한 아질산의 어체 내 유입을 억제하는 것 (Perrone and Maede, 1977; Tomasso et al., 1979)으로 알려진 식염을 양어지에 식염을 첨가하고 있다. 본 실험에서는 뱀장어의 선별, 수송 후와 아질산 중독시의 혈행을 개선시키고자 인간의 혈행 개선제로 널리 사용되고 있는 ASA를 뱀장어에 약욕 또는 경구 투여하여 혈액학적 및 병리조직학적으로 투여 효과를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시어

평균체중 200 g의 뱀장어 (*Anguilla japonica*)를 민간 양식업자에서 구입하여자체순환방식의 콘크리트 사각 수조(12 m x 12 m x 0.8 m)에 수용하여 28℃에서 시판의 뱀장어 반죽사료를 투여하면서 3주간 순치시킨 다음 사용하였다.

나. ASA의 투여 및 저온, 수송 및 아질산 스트레스

뱀장어에 스트레스를 가하기 전에 20 ppm의 ASA에 28℃에 24시간 약욕시키거나 또는 경구 투여는 어체중 kg당 50 ㎎의 ASA가 되도록 시판의 배합사료에 혼합하였다. 일간 사료의 투여량은 어체중의 2%로 하여 7 일간 투여하였다. ASA투여 후 뱀장어는 선별 조건을 반영하기 위하여 16℃지하수가 들어 있는 수조에 옮겨 48시간 방치하거나 종묘의 수송 조건을 을 반영하여 위하여 비닐 봉지에 넣어 4시간 또는 8시간 자동차로 수송하였다. 저온 또는 수송 후 뱀장어를 체포하여 채혈하거나 체측근을 채취하였다. 대조군은 ASA를 투여하지 않은 뱀장어를 같은 조건의 저온 처리과 수송한 다음 사용하였다. 동맥구에서 채혈하여 Hb, Ht및 혈장을 분리한 다음 PT, APTT를 측정하였다. 대조군도 ASA 약욕 및 경구투여군과 마찬가지로 실시하였다.

아질산 스트레스는 $NaNO_2$을 사육수에 용해시켜 120 ㎎ NO_2-N/ℓ (pH 5.0)에 24시간 수용하여 메타헤모글로빈증을 유발시킨 다음 일부는 식염 0.8% 또는 ASA 20 ppm, 식염 0.8%와 ASA 20 ppm 및 사육수를 1/2교환하고 24시간 사육하였다. 대조군은 아질산이 함유된 사육수에 24시간 방치한 다음 사용하였다. 동맥구에서 채혈하여 Ht, methemoglobin, 아질산의 농도를 측정하였다. 또 채혈한 혈액의 일부를 슬라이드 글라스에 도말하여 May-Grunwald giemsa염색후 혈구의 형태변화를 검경하였다.

다. 혈액학적 성상

제 2절에서의 방법과 같은 방법으로 측정하였다.

라. Methehemoglobin (Met-Hb)의 측정

Methemoglobin혈증을 유발시킨 다음 식염 또는 ASA처리군의 동맥구에서 heparin처리 플라스틱 주사기로 혈액을 채취하여 Dobowski의 방법을 변형한 Kawatsu et al. (1987)의 방법을 변형하여 Met-Hb를 측정하였다. 즉 채혈한 혈액에 다량의 멸균 생리식염수를 첨가하여 2000 rpm에 2분간 원심한 여분의 상청액을 제거하고, 멸균생리식염수에 재부유시켜 혈구의 부피가 40%가 되도록 혈구 부유액을 만들었다. 40%혈구 부유액 0.2 ㎖를 10 ㎖의 1/60 M 인산완충용액 ($KH2PO_4$ 5.67g, NaHPO4 3.55 g, 증류수 1 L의 보존액을 증류수로 4배 희석, pH 6.6)에 혼합한 다음 2000 rpm에 2분간 원심하여 상청액을 회수하였다. 상청액을 각각 2개의 시험관에 3 ㎖씩 옮긴 다음 그 중 1개의 시험관의 상청액 0.8ml을 인산완충용액을 맹검으로 하여 흡광도

(A1)를 측정하였다. 측정에 사용한 상청액을 대 시험관에 되돌린 다음 10% potassium cyanide 40 ㎕를 첨가하여 Met-Hb를 cyanmethehemoglobin으로 변화시켜 감소된 흡광도를 다시 완충액을 맹검으로 흡광도(A2)를 측정하였다.

다른 한 개의 상층액에 10% potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$)액 100 ㎕를 첨가 혼합한 다음 완충액을 0.8ml를 채취하여 맹검으로 흡광도(A3)를 측정하였다. 흡광도 측정 후 본디의 시험관으로 되돌린 다음 10% potassium cyanide 40 ㎕를 첨가해 잘 혼합 후 흡광도(A4)를 측정하였다. 흡광도는 630 nm에서 측정하였으며, A2, A3, A4에 각각 1.013, 1.033, 1.047을 곱하여 보정한 흡광도를 각각의 An′로 하여 메토헤모글로빈의 농도 (%)는 다음 식으로부터 구하였다.

$$\text{Met-Hb}\ (\%) = \frac{A1-A2'}{A3'-A4'} \times 100$$

라. 아가미의 병리조직학적 변화

저온 처리와 수송 스트레스군의 뱀장어는 아가미, 위 또는 장을, 아질산 스트레스 처리군은 아가미만을 절취하였으며, 아질산 중독증 유발군은 아가미만을 절취하여 10% 포르말린에 고정하여 상법에 따라 파라핀에 포매한 다음 5 ㎛의 조직절편을 만들어 Mayer′s hematoxylin-eosin (HE) 염색 후 광학현미경으로 검경하였다.

3. 결과 및 고찰

ASA의 약욕 또는 경구 투여 후 선별 조건을 반영하기 위한 16℃의 저온에서 48시간 사육하였을 때의 Hg 농도와 Ht치의 변화를 Fig. 15에, PT치와 APPT치의 변화는 Fig. 16에 표시하였다. ASA약욕군의 Ht치는 35.8%로 대조군은 32.8%높았으며, 경구투여군에서는 투여군의 32.7%, 대조군은 30.7%로 ASA투여군이 모두 대조군보다 높았다. 약욕군과 경구투여군을 비교하였을 때, 약욕군의 Ht치가 경구투여군에 비해 높게 나타났다 (P>0.05). ASA에 24시간 약욕시킨 군의 Hg는 7.09 g/100 ㎖이었으며, 대조군은 6.54 g/100 ㎖로 AS약욕군의 Hg가 높았다 (P>0.05). 또 ASA경구투여군의 Hg값은 7.34g/100 ㎖, 대조군은 6.23g/100 ㎖으로 역시 ASA 경구투여군의 Hg값이 높았다. 약욕군과 경구 투여군을 비교하였을 때 경구투여군의 Hg가 약욕군에 비해 높게 나타났다 (P>0.05).

ASA약욕군의 PT값 4.5sec. 대조군은 4.2 sec였으며, ASA경구투여군은 투여군이 6.3sec, 대조군이 5.1 sec로 모두 ASA투여군의 PT치가 높았다. 약욕군과 경구투여군을 비교하였을 때, 경구투여군의 PT치가 약욕군에 비해 높게 나타났다 (P>0.05). AS에 24시간 약욕시킨 군의 APPT치는 6.8 sec, 대조군은 6.0 sec였으며, 경구투여군의 APPT치는 6.3 sec로 대조군의 5.2 sec보다 높게 나타났다. 약욕군과 경구 투여군을 비교하였을 때 경구투여군의 APPT치도 PT치에서 처럼 경투투여군이 높게 나타났다 (P>0.05).

ASA의 약욕 또는 경구 투여 후 수송조건을 반영하기 위한 4시간과 8시간 수송 후의 Hg농도와 Ht치의 변화를 Fig. 17에, PT치와 APPT치의 변화는 Fig. 18에 표시하였다.

ASA약욕 처리한 다음 Ht치는 4시간 수송군은 33.3%로 대조군의 25.0%보다 높았으며, 8시간 수송군도 31.2%로 대조군의 25.5%에 비해 높았다. 4시간 수송과 8시간 수송을 비교하였을 때 4시간 수송군의 Ht치가 8시간 수송군보다 높았다(P>0.05). 경구투여 후 4시간 수송한 군은 28.7%, 8시간 수송군은 29.0%로 모두 대조군에 비해 높았지만 4시간과 8시간 간에는 차이는 없었다. 투여방법과 수송시간을 고려하였을 때는 약욕 후 4시간 수송군의 Ht가 가장 높았다.

ASA약욕군의 4시간 수송 후와 8시간 수송후의 Hg는 6.78과 6.66으로 대조군 5.78과 5.80에 비해 높게 나타났다. 경구투여 후 4시간 수송군의 Hg는 7.33 g/100 ㎖로 대조군보다 높았고, 8시간 수송군에서도 7.06으로 대조군보다 높았다. 그러나 수송시간과 투여 방법을 고려하였을 때는 경구투여 후 4시간 수송군이 다른 군에 비해 높게 나타났다(P>0.05).

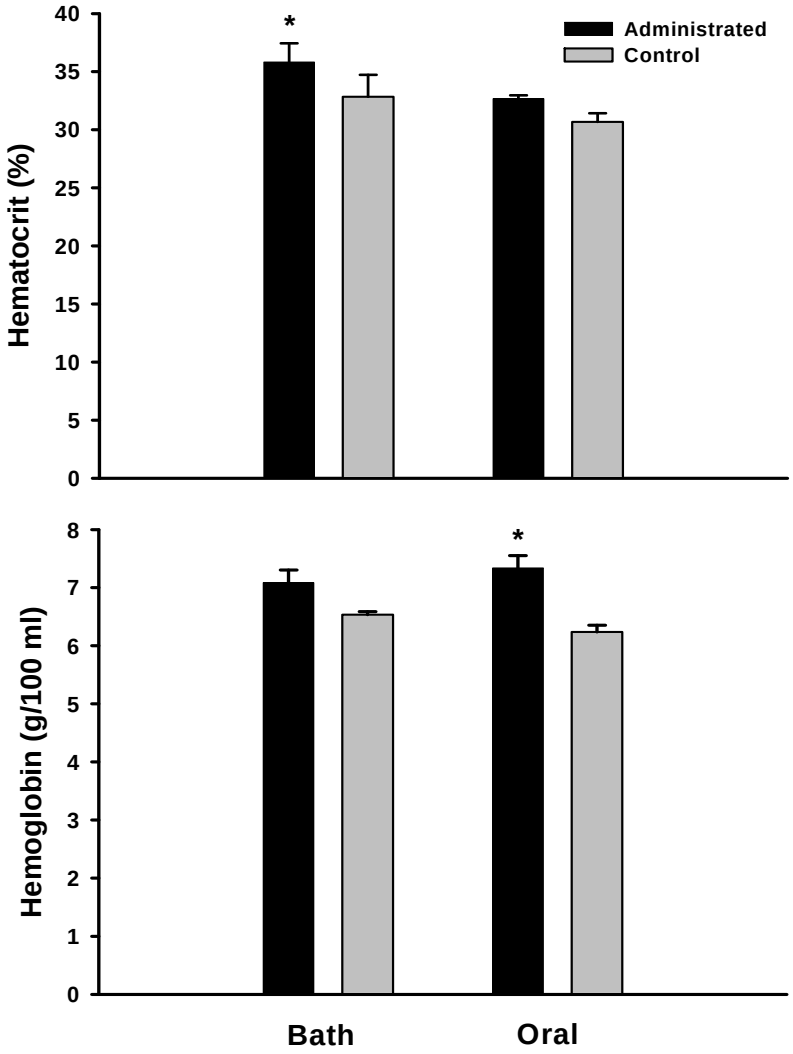

Fig. 15. Changes in the hematocrit values (%) and hemoglobin concentration (g/100 ㎖) of peripheral blood from eels held for 48 hr at 16℃ after adminstration of aspirin by bath or oral routes. (n=3).

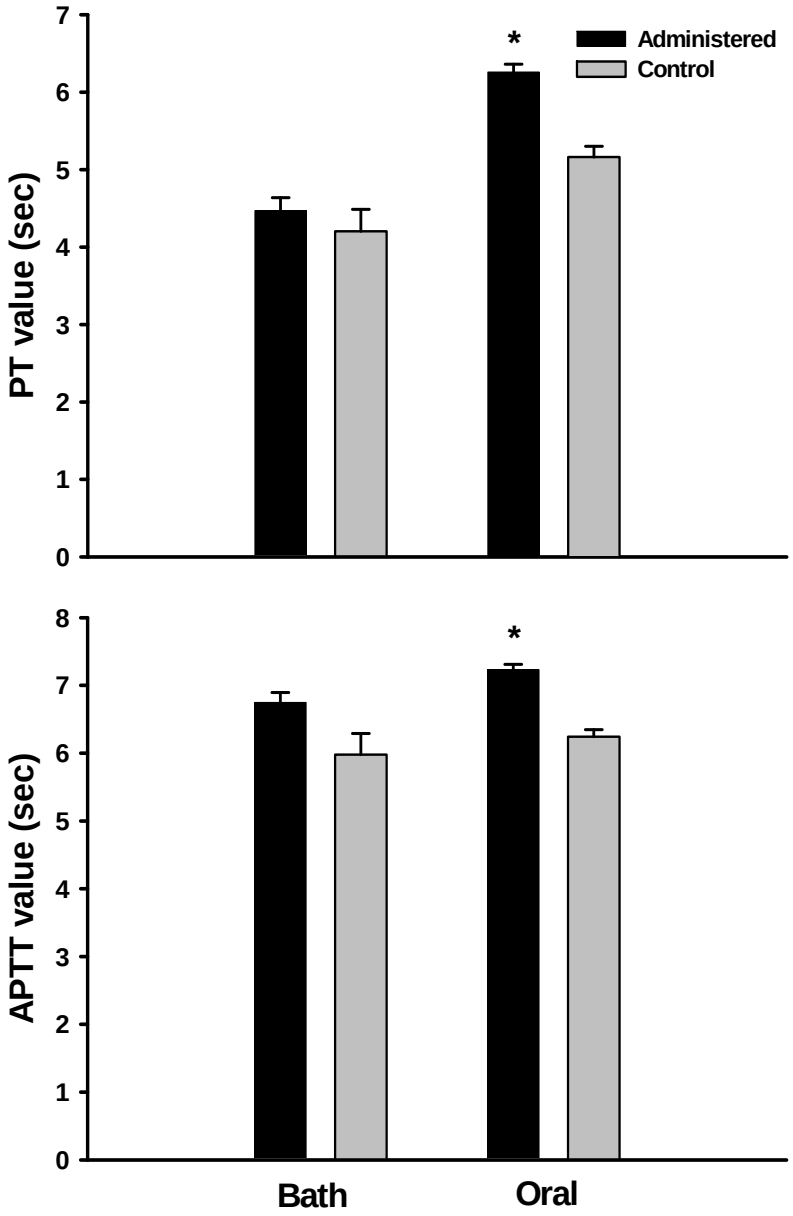

Fig. 16. Changes in the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT) of peripheral blood from eels held for 48 hr at 16℃ after adminstration of aspirin by bath or oral routes. (n=3).

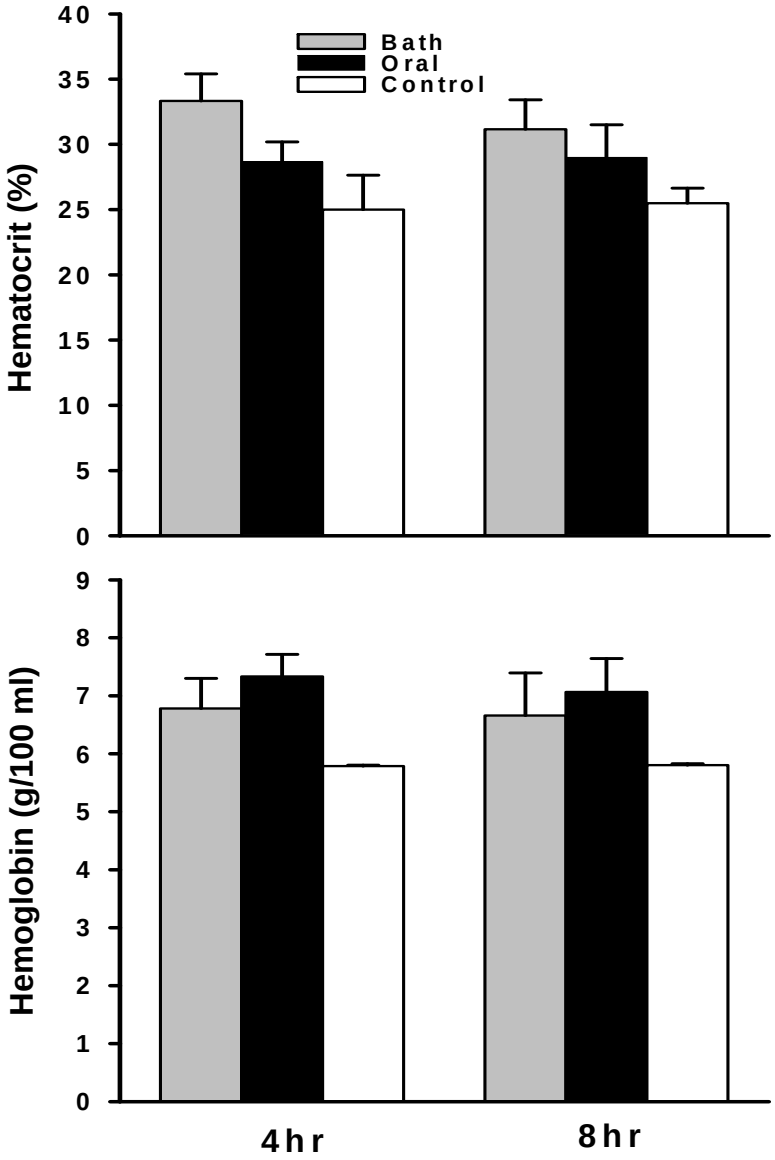

Fig. 17. Changes in the hematocrit values (%) and hemoglobin concentration (g/100 ㎖) of peripheral blood from eels transported for 4 and 8 hr after adminstration of aspirin by bath or oral routes. (n=3).

ASA약욕 후 4시간 수송군과 8시간 수송군의 PT치는 모두 5.7 sec로 대조군의 4.9sec와 4.5 sec에 높았지만, 두 군간의 유의차는 없었다. 경투투여군의 4시간 수송군과 8시간 수송군의 PT치는 각각 5.2 sec와 5.1sec로 대조군과는 보다는 높게 나타났지만, 투여 방법과 수송시간간을 비교하였을 때 4시간 수송군과 8시간 수송군 보두 약욕 투여군이 높게 나타났다($P>0.05$).

ASA약욕군의 APTT치는 4시간 수송군이 7.2 sec, 8시간 수송군은 7.1 sec로 대조군의 6.2sec와 5.9sec에 비해 높게 나타났지만 수송시간간의 유의차는 없었다. ASA경구투여 후 4시간 수송군과 8시간 수송군의 APTT치는 각각 6.8sec와 6.4sec로 대조군 보다 높았지만 두 수송시간간의 유의차는 없었다. 그러나 투여 방법 간을 비교하였을 때는 4시간 수송과 8시간 수송 모두 약욕군이 높게 나타났다.

선별과정의 재현을 위하여 선별 전에 ASA를 침지 또는 경구 투여한 뱀장어를 선별온도인 16℃의 저온에서 48시간 사육하였을 때 아가미의 조직학적 변화를 Fig. 19에 표시하였다. ASA 투여어류는 약욕과 경구 투여 모두 아가미에 별다른 변화를 발견할 수 없었다. 그러나 무투여 뱀장어는 새변의 중심정맥에 혈액이 고이는 울혈증상으로 새변이 변형되었으며, 2차새변의 상피세포도 증생되어 유착, 변형되는 등의 변화가 관찰되었다. 한편 경구 투여한 뱀장어의 소화관은 Fig. 20에 표시한 것처럼 위와 소화관에 별다른 이상은 발견되지 않았다.

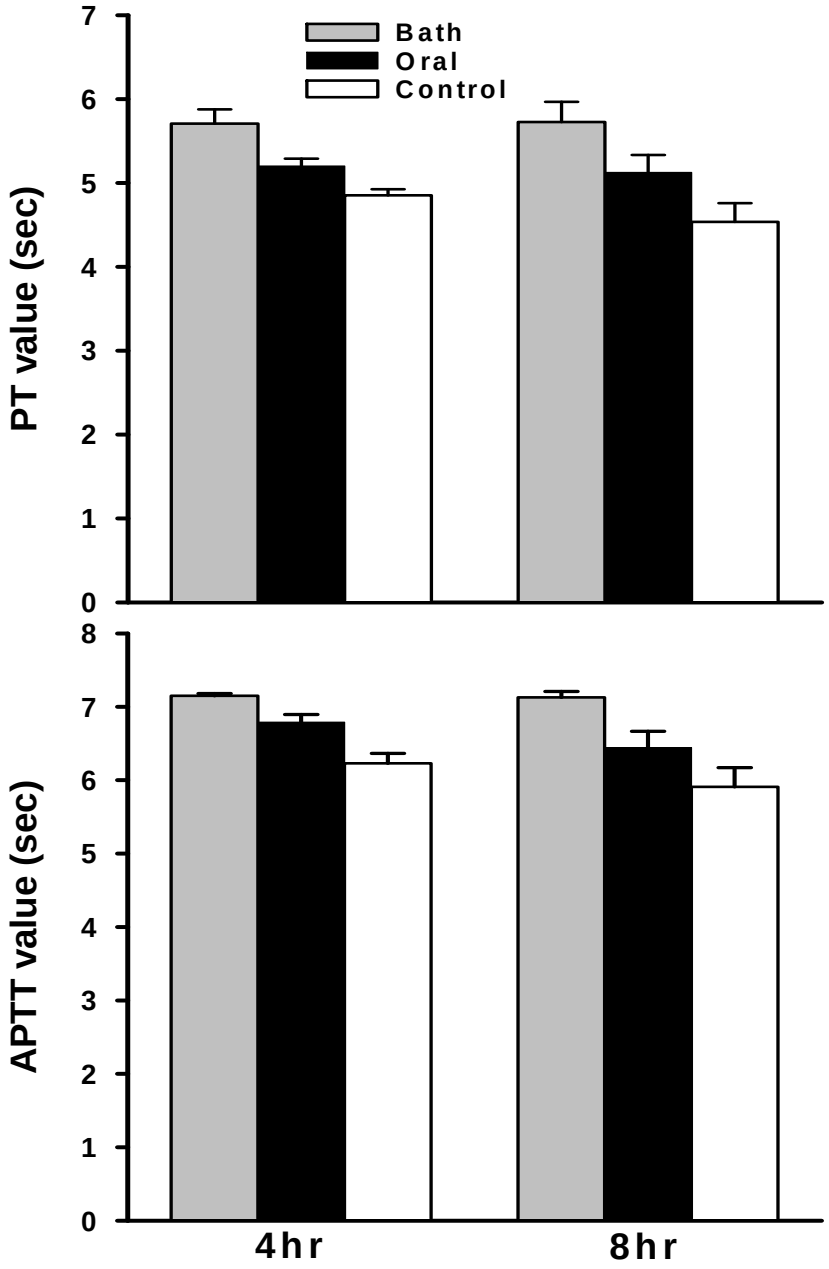

Fig. 18. Changes in the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT) of peripheral blood from eels transported for 4 and 8 hr after adminstration of aspirin by bath or oral routes. (n=3).

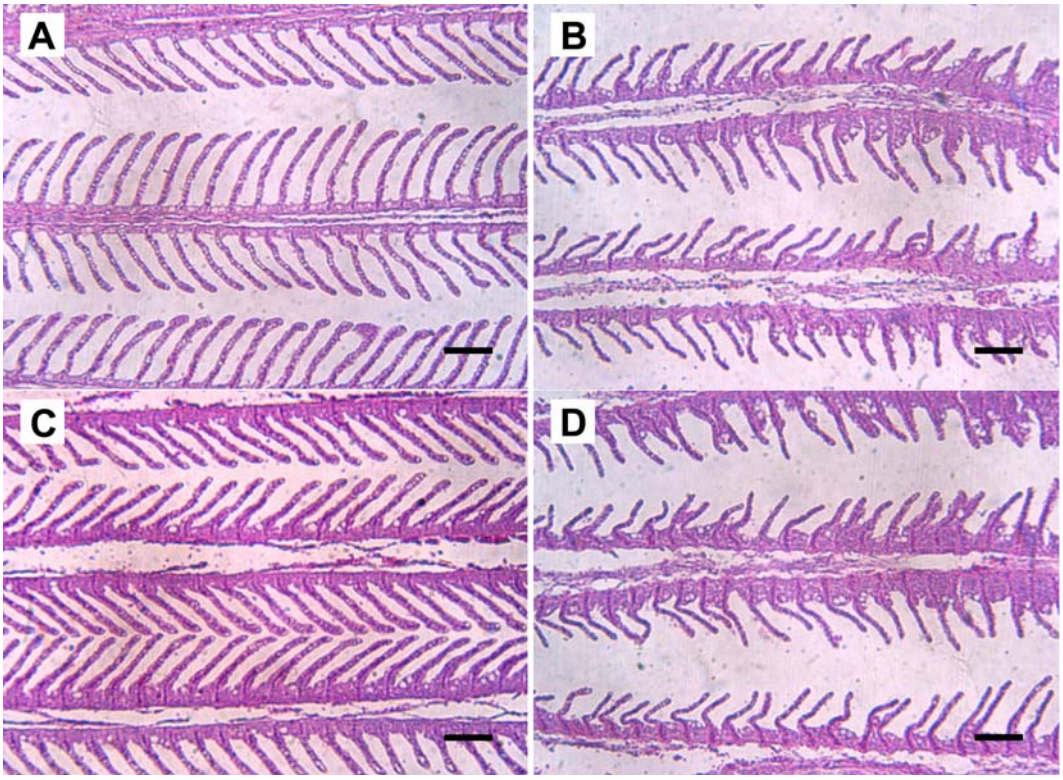

Fig. 19. Microphotographs of the gill from eels treated with a cold-thermal shock of 16℃ for 48 hr. The eel were bathed in a concentration of 20 ppm aspirin (A) and fed diet supplemented aspirin (50 mg/kg BW) for 7 days (C) 24 hr before the thermal shock. B and D are controls. H&E stain. Bars indicate 10 ㎛.

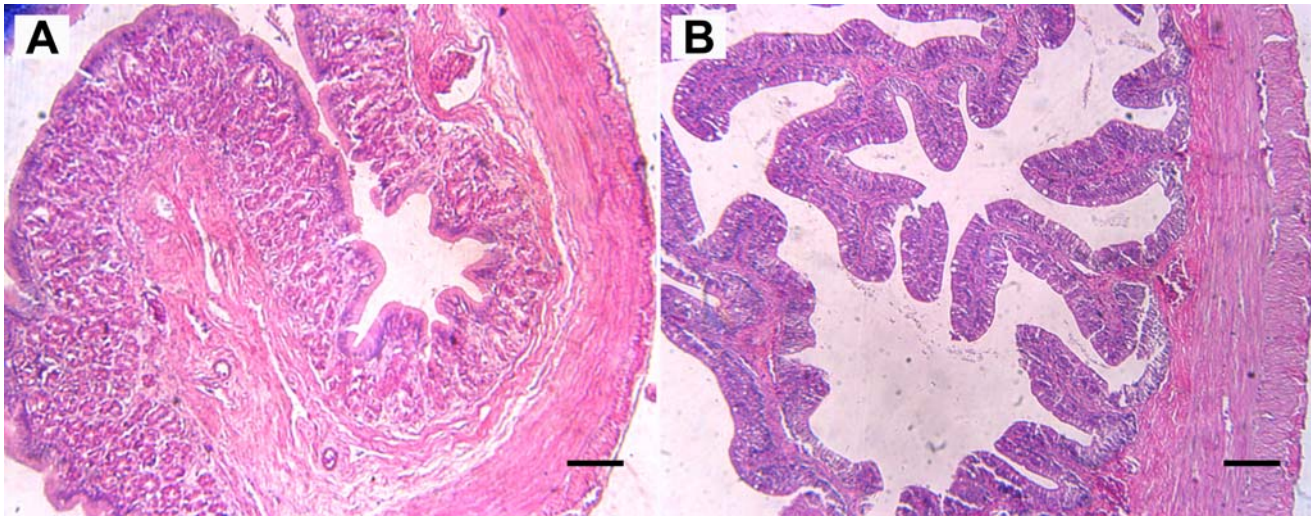

Fig. 20. Microphotographs of the stomach (A) and intestine (B) from eels fed the aspirin-supplemented diet (50 ㎎/kg BW) for 7 days followed by holding in tanks for 48 hr at 16℃. H&E stain. Bars indicate 10 ㎛.

ASA를 침지 또는 경구투여한 뱀장어를 4시간 또는 8시간 수송한 다음 선별온도인 16℃의 저온에서 48시간 사육하였을 때 아가미의 조직학적 변화를 Fig. 21에 표시하였다. ASA투여 뱀장어는 약욕과 경구 투여군 모두 아가미에 별다른 변화를 발견할 수 없었다. 그러나 무투여 뱀장어는 선별시의 저온 사육과 마찬가지로 중심정맥의 울혈과 2차새변의 증생과 유착 및 변형이 관찰되었다. 한편 경투투여 뱀장어의 소화관의 조직학적 변화는 Fig. 22처럼 수송에도 불구하고 변화가 없었다.

뱀장어를 120 ㎎ NO_2-N/ℓ에 24시간 사육하였을 때 Fig. 23에 표시한 것처럼 혈액도말표본에서는 세포질의 주변부가 호염기성으로 염색되는 원형의 미숙세포의 증가, 핵의 변형 또는 탈핵을 동반한 적혈구의 변성과 아가미에서는 2차 새변 기부의 상피세포의 증생과 모세혈관이 충혈되어 확장되었다.

아질산중독을 유발시킨 다음 사육수를 1/2환수하고 aspirin, 식염, NaCl과 aspirin의 혼욕 및 1/2환수와 환수하지 않고 사육한 대조군의 각 군의 말초혈액에서 채혈하여 Ht, 혈장 중의 methemoglobin율 및 아질산 농도를 Fig. 24에 표시하였다. 말초혈액의 Ht치는 ASA처리군, 식염 처리군 및 식염과 1/2환수군의 Ht치는 각각 38.9±4.2, 32.5±2.3, 33.3±3.0로 ASA와 식염의 혼합투여군의 29.6±1.1과 대조군의 28.6±1.9%보다 현저히 높았으며($P>0.05$), 그 중에서도 ASA 약욕군이 가장 높았다. 혈장의 methemoglobin의 비율은 모든 처리군이 대조군의 20.3±1.5%에 비해 현저히 낮았으며($P>0.05$) 특히 ASA처리구와 1/2환수구가 각각 14.1±0.8%와 14.5±1.5%로, 식염처리군과 식염 및 ASA의 혼합처리군에 비해 낮았다($P>0.05$). 혈장의 아질산의 농도는 모든 처리군이 대조군의 19.3±1.9 ㎎/ℓ에 비해 높았으며, ASA처리구와 환수구의 아질산 농도는 각각 1.4±0.5 ㎎/ℓ와 1.6±1.0 ㎎/ℓ로 현저하게 나타나 ASA처리와 환수가 효과적인 것으로 나타났다. 또 각 처리군의 말초혈액의 염색상은 Fig. 25에 표시한 것처럼 모든 변형 적혈구는 현저히 감소한 반면 모든 처리구에서 미숙혈구는 여전히 관찰되어 형태학적으로는 뚜렷한 차이를 발견할 없었다. 그러나 아가미의 조직표본에서는 Fig.26에 표시한 것처럼 ASA 20ppm약욕군의 아가미는 이상이 거의 없는 반면 식염과 ASA혼합약욕구와 환수구에서는 모세혈관의 충혈과 상피세포의 증생등의 변화가 관찰되었다. 이러한 결과는 아질산 중독시에 환수로 사망률을 줄이고 있는 현재의 대처 방법보다는 오히려 ASA에 약욕시키는 것이 효과적임을 알 수 있다.

Kusuda et al.(1981)은 뱀장어의 메트헤모글로빈혈증은 총 헤모글로빈에 대한 메트헤모글로빈의 비율이 33-70%로, 혈액도말표본에서는 핵농축, 핵붕괴 및 탈핵을 동반한 적혈구의 변성과 미숙세포가 증가하며, 병리조직학적으로는 비장 세포의 적혈구 탐식, 아가미의 혈전, 비장과 신장의 헤모시드린의 침착이 생긴다고 하였다.

Kawatsu et al.(1987)은 정상 뱀장어의 메토화율은 1%미만으로 메트헤모글로빈혈증의 뱀장어를 4℃에 여러 시간 수용하여도 메트헤모글로빈환원효소가 활성화되지 않기 때문에 메트화율은 변화가 없는 반면, 25℃에 6시간 수용하면 20-30%가 감소하며, 완전히 환수하면 24시간

내에 정상의 상태로 회복된다고 하였다. 그러나 Hirayama (1974)는 지수식 뱀장어 양식장에서의 사육수의 아질산의 농도는 대개 10 mg/l가 검출되는 것이 일반적이며, 순환여과방식인 경우에는 여과조에서 새로운 아질산이 축적되기 때문에 사육수에서의 아질산 농도는 더욱 상승한다고 하였다. Perrone et al(1977) 수중의 아질산은 아가미와 표피를 통하여 체내로 흡수되며, 체액의 삼투압의 환경수의 삼투압보다 낮은 해산어는 표피를 통한 아질산의 흡수가 적기 때문에 체표를 통한 아질산의 침투가 높은 담수어에 비해 아질산의 영향이 적다고 하였다. 뱀장어는 점막과 아가미가 불투과성의 막으로 되어 있어 물을 통과시키지 못하는 역할을 하고 있기 때문(松井, 1972) 해산어처럼 표피를 통한 아질산의 침투가 곤란하기 때문에 담수어 중에서도 아질산에 가장 저항성이 강한 어종(山形 & 丹羽, 1979)이다. 그러나 사육 방식이 고밀도 순환양식 또는 자체 순환방식으로 사육하고 있는 뱀장어 양식에서 수중의 아질산에 의한 피해는 빈번히 발생하고 있는 실정이다. 본 실험에서 120 ㎎ NO_2-N/ℓ에 24시간 노출시켜 메타헤모글로빈혈증을 유발시킨 결과 말초혈액의 도말표본상과 아가미의 병리조직상이 사육중에 발생한 기존의 결과와 일치하였다. 또 뱀장어에 메트헤모글로빈혈증을 유발시킨 다음 사육수를 1/2환수하고 식염과 ASA을 첨가하여 24시간 약욕시킨 다음 말초혈액의 Ht치, 헤모글로빈의 메트화율, 혈장의 아질산 농도를 측정한 결과 ASA처리구가 기존의 식염 처리보다 우수하며, 환수와 비슷한 효과적인 처리법으로 나타났다. 이는 ASA처리는 혈장의 아질산 농도를 현저하게 저하시켜, 헤모글로빈의 메트화율을 감소시켰으며 동시에 혈류의 흐름을 좋게 함으로서 말초혈액의 Ht치와 Hg농도를 상승시킨 것으로 추정된다. 그럼으로 뱀장어 양식시설에서 선별 및 수송 전과 수량 부족에 의한 부적절한 환수 조건일 경우 ASA를 약욕 또는 경구투여하는 것이 혈액흐름을 개선시켜 뱀장어의 생잔율 제고에 도움이 될 것으로 사료된다.

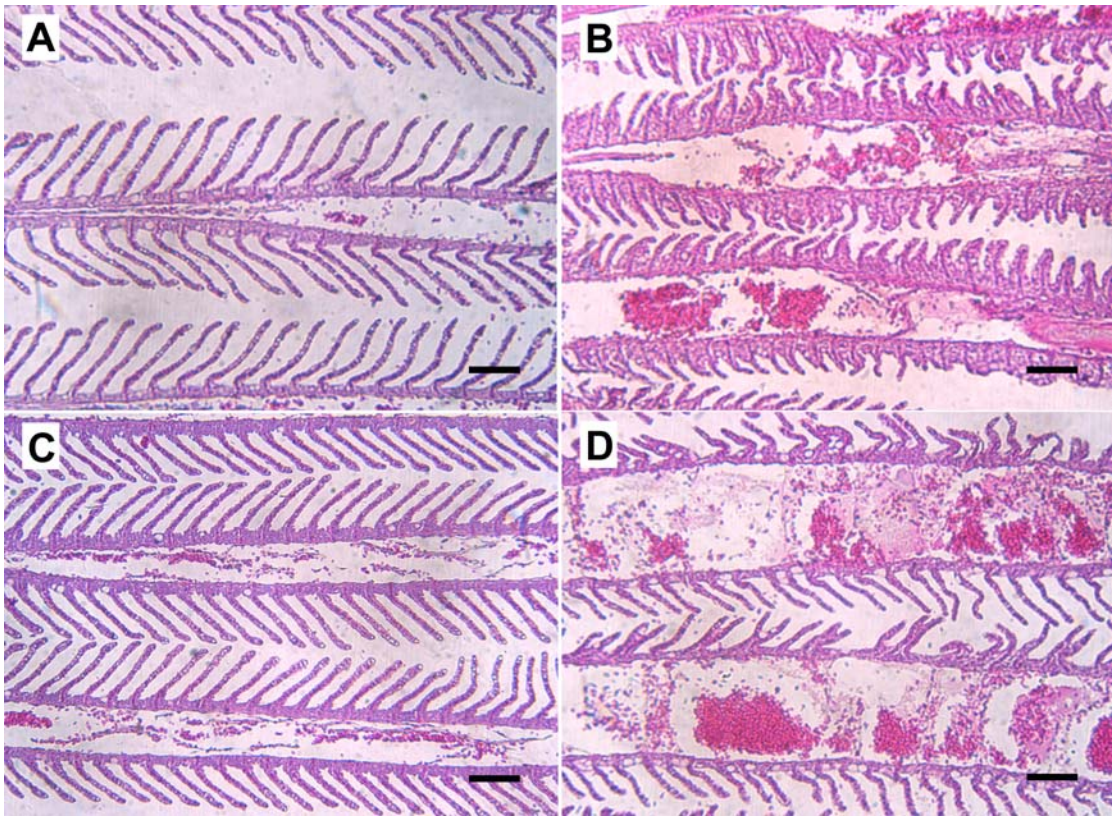

Fig. 21. Microphotographs of the gill from eels transported for 8 hr. The eel were bathed in a concentration of 20 ppm aspirin for 24 hr(A), and fed diet supplemented aspirin (50 mg/kg BW) for 7 days (C) 24 hr before transportation. B and D are controls. H&E stain. Bars indicate 10 ㎛.

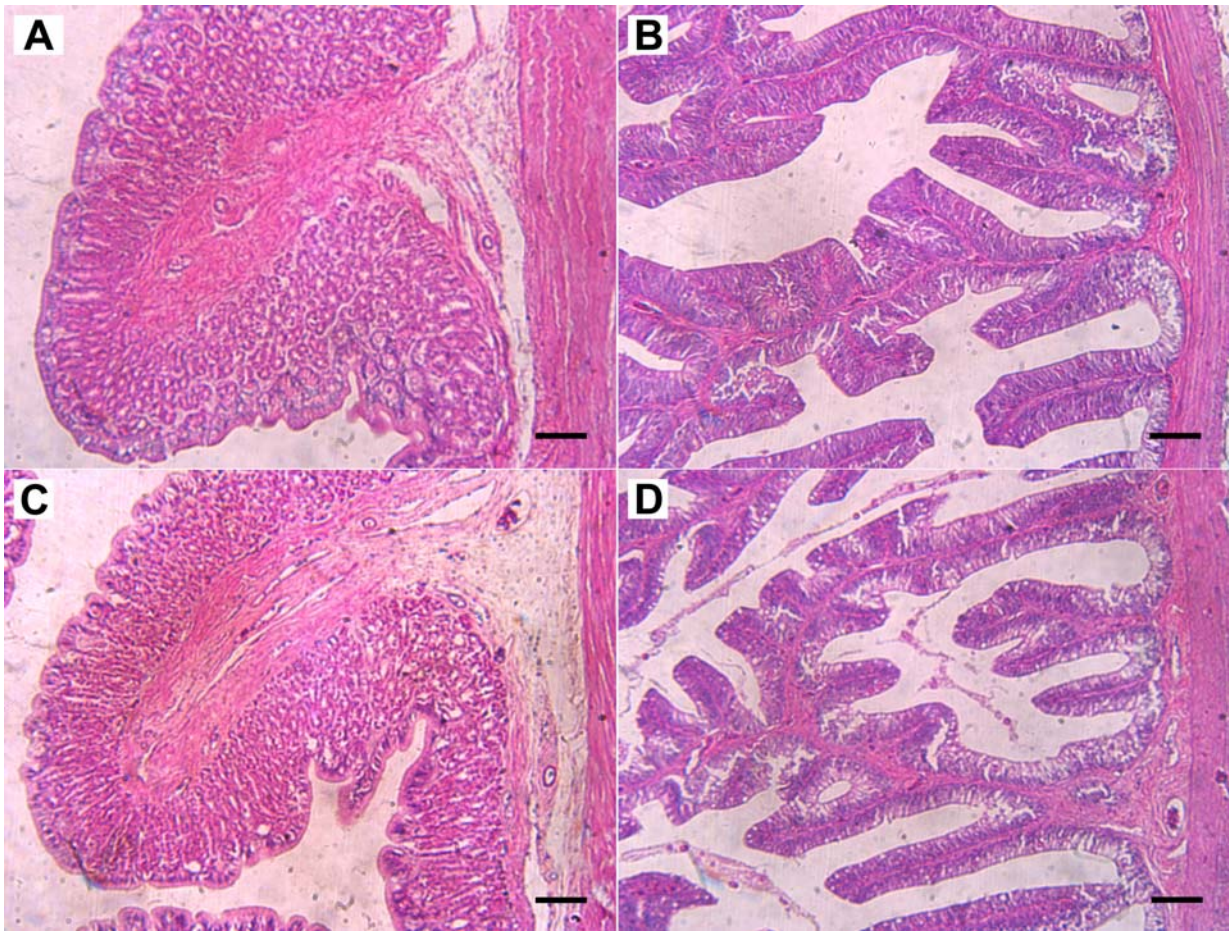

Fig. 22. Microphotographs of the stomach (A&C) and intestine (B&D) from eels fed the aspirin-supplemented diet (50 mg/kg BW) for 7 days. The eel were stressed by transportation for 4 hr (A&B) or 8 hr(C&D). H&E stain. Bars indicate 10 ㎛.

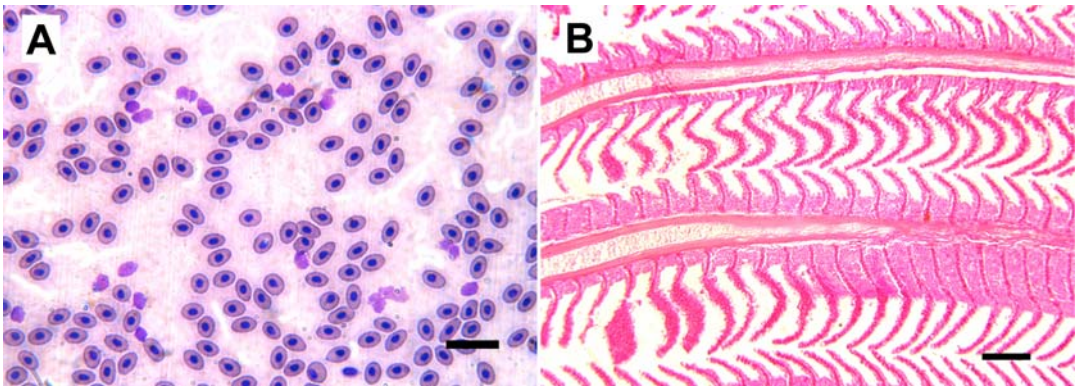

Fig. 23 Micrographs of peripheral blood and gill from eel exposed to 120 ㎎/ℓ NO_2-N for 24 hr. Peripheral blood and gill tissue were stained with May-Grunwald giemsa and HE, respectively. Bars indicate 30㎛ in A and 10 ㎛ in B.

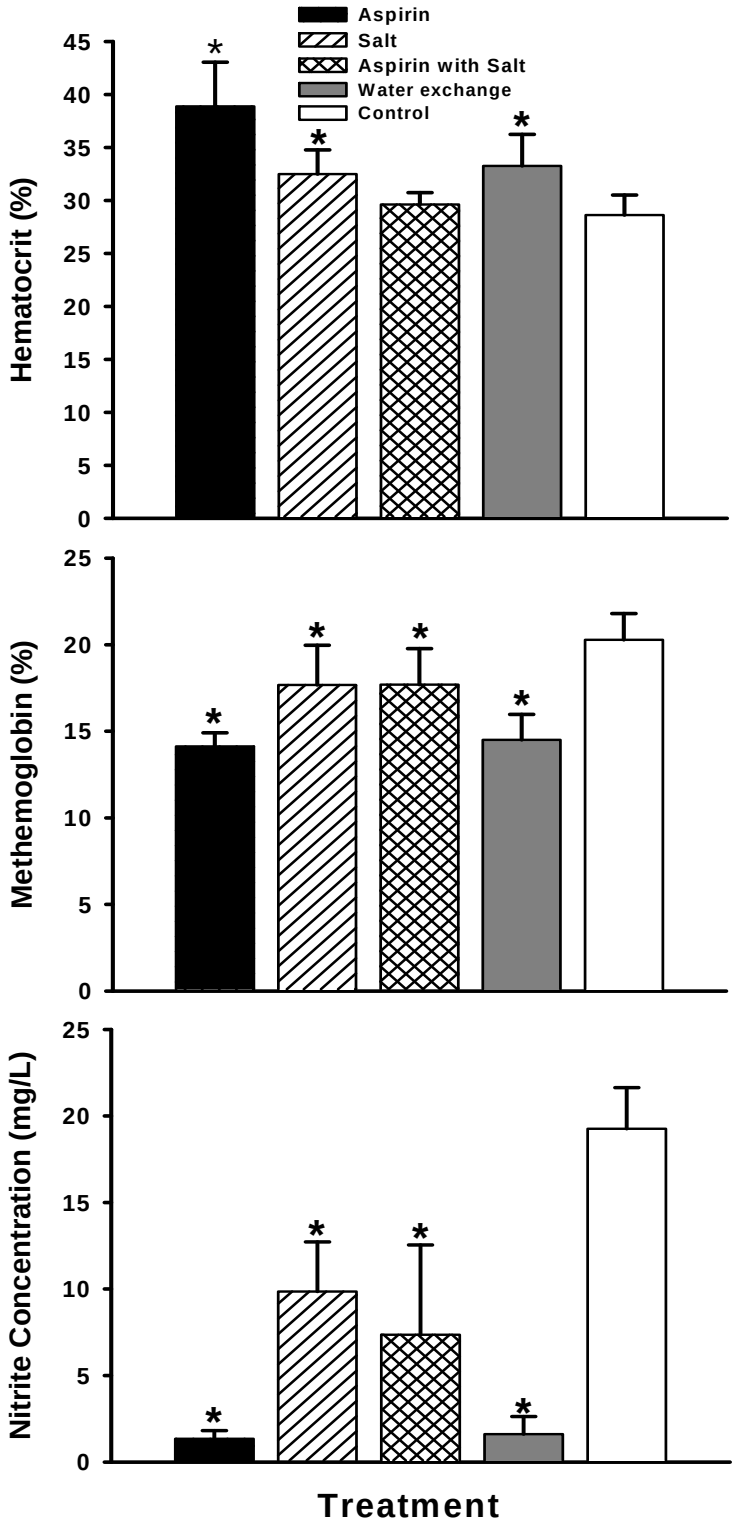

Fig. 24. Changes in hematocrit value, methemoglobin and nitrite in the plasma from eel treated with aspirin, sodium chloride, aspirin plus sodium chloride and water exchange. The eel were previously exposed to nitrite (120 ㎎ NO_2-N/ℓ) for 24 hr to induce methemoglobinia. Vertical bars indicate the mean SD (n=4).

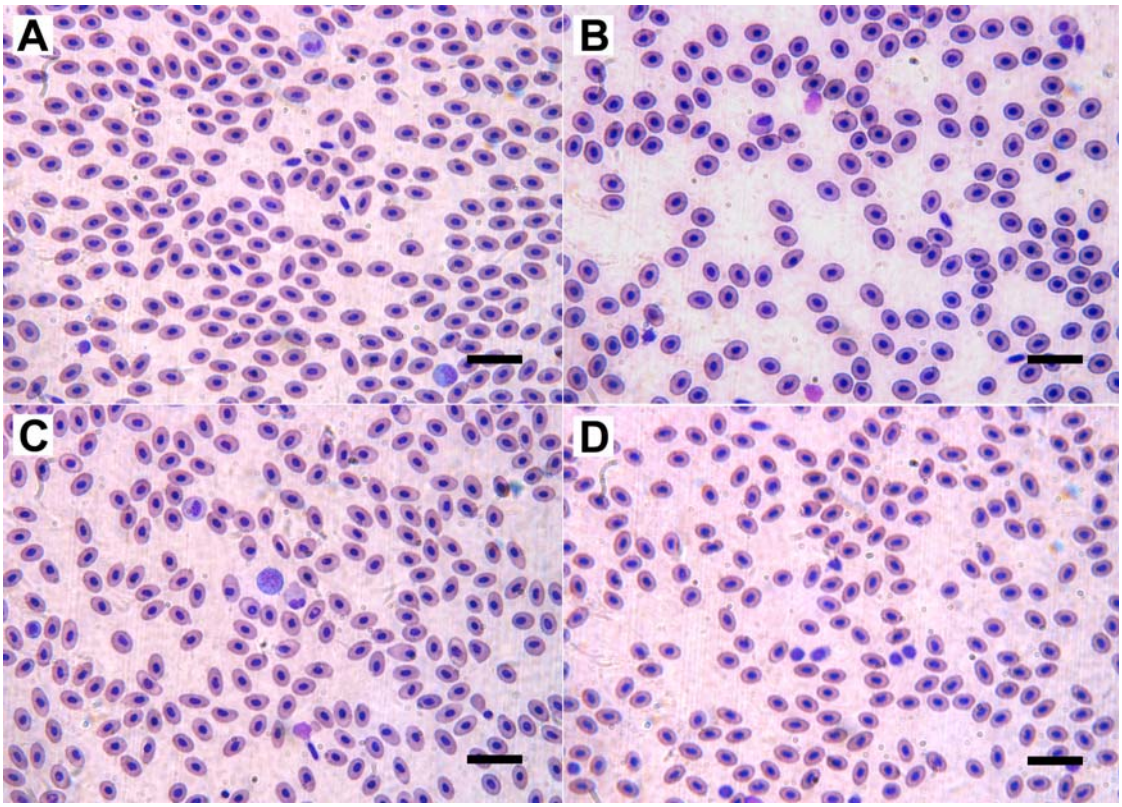

Fig. 25 Micrographs of peripheral blood from eel treated with aspirin, sodium chloride, aspirin plus sodium chloride and water exchange. The eel were previously exposed to nitrite (120 ㎎ NO_2-N/ℓ) for 24 hr to induce methemoglobinia. May-Grunwald giemsa. Bars indicate 30 ㎛.

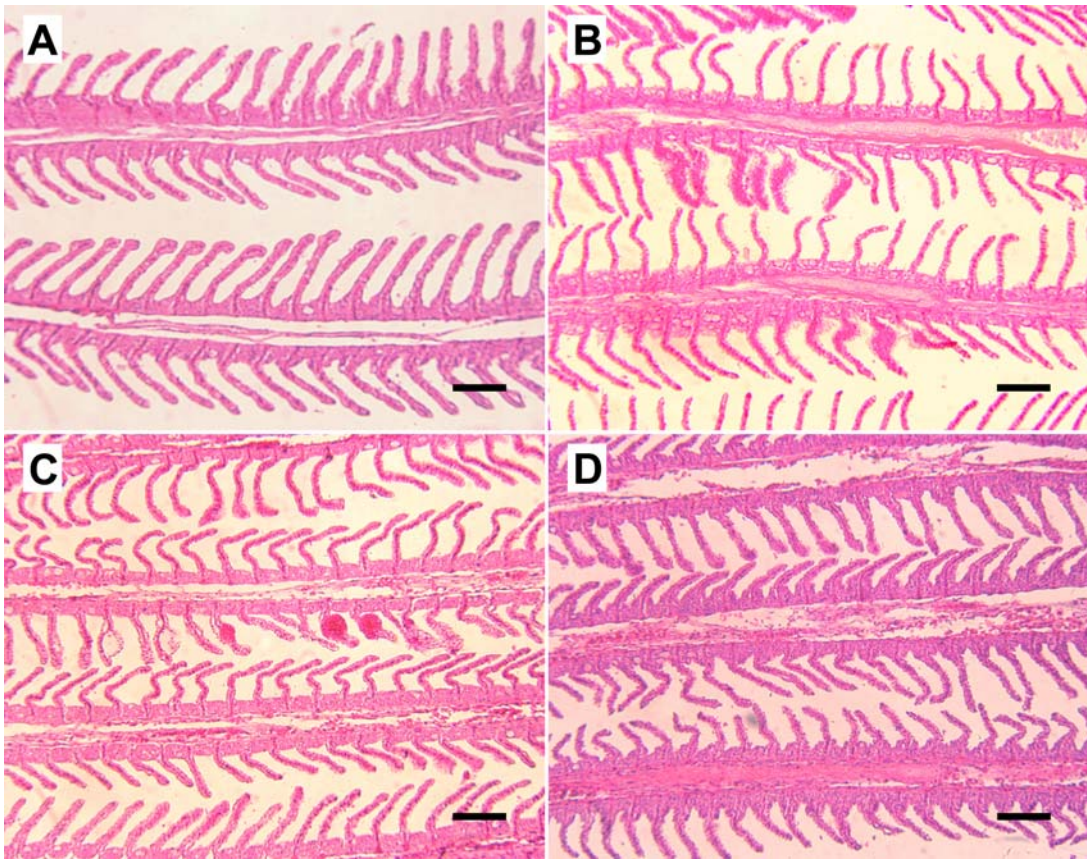

Fig. 26. Micrographs of the gill from eel bathed in 20 ppm aspirin (A), 0.8% NaCl(B), 0.8% NaCl and 20 ppm aspirin (C), and tap water (D) for 24 hr. The eel were kept in aquaria added 120 ㎎/ℓ NO_2-N (pH 5.0) for 24 hr to induce methemoglobinia. Bars indicate 10 ㎛. HE stain.

제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

양식 뱀장어의 사육 중 또는 수송에 유발되는 스트레스에 뱀장어는 혈액순환에 장애가 생겨 질병이 발생하는 경향임으로 인체용 혈전 용해제인 aspirin을 약욕 또는 경구투여하여 혈행을 개선시키는가를 알아보기 위한 것이 주목적이었다. 그러나 투여 aspirin이 뱀장어 체내에 잔류하여서는 식품의 이미지에 손상을 초래하게 된다. 그럼으로 약욕 또는 경구 투여하였을 때 뱀장어 체내의 aspirin의 동태를 알아보기 위하여 혈장 중의 농도를 측정하기 위한 HPLC에 의한 분석법을 확립하였다.

Aspirin의 약욕 농도는 20 ppm에 24시간이 적합하며, 경구투여는 50 ㎎/㎏ 어체중의 7일간 투여하는 것이 Ht, Hb, PT 및 APP의 증가 등의 혈액순환을 개선함으로 스트레스에 기인한 아가미의 울혈가 상피세포의 변화를 방지할 수 있다는 것이 혈액학적 및 병리조직학적으로 입증되어 뱀장어 양식의 선별과 수송중에 발생하는 스트레스요인을 감소시k킬 수 있으며, 아질산의 중독시의 사망률을 감소시키는데도 환수보다 뛰어난 결과를 얻었다. 그럼으로 순환여과식 고밀도 사육의 뱀장어 양식에서 Aspirin을 적절히 사용한다면 스트레서에 기인한 발병과 사망을 최소화시킬 수 있을 것으로 판단된다.

제 5장 연구개발 결과의 활용계획

1. Aspirin정량법: aspirin 정량 기법을 다른 어종에 응용
2. Aspirin의 투여효과를 다른 스트레스요인인 메트헤모글로빈 및 사육수에 산성화에 미치는 효과를 구명하기 위하여 적용
3. 뱀장어의 선별과 수송 전에 투여하여 산업규모에서의 효과 조사에 활용
4. 순환장애를 유발하는 질병의 치료 시에 다른 약제와 혼용 투여
5. 과밀 수용, 수온의 변화 등의 변화에도 적용 가능할 것으로 판단됨으로 투여 방법을 산업현장에 이전하여 활용
6. 뱀장어 이외의 다른 어종의 순환장애 유발 질병의 치료용 약제와 혼합 투여

제 6장 참고문헌

Abu-Qare, A. W. and Abou-Donia, M. B: A validated HPLC method for determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. J. Pharm. Biomed. Anal., 26: 939-947, 2001.

Bancroft, H., Gibson, Q. H., Harrison, D. C., and McMurray, J.: Familial idopathic methemoglobinemia and its treatment with ascorbic acid. Clin. Sci., 5: 145-157, 1945.

Barton, B. A., Weiner, G. S., and Schreck, C. B.: Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to acute handling stress. Can. J. Fish. & Aqaut. Sci., 42: 79-86, 1985.

Blaxhall, P. C.: The hemotological assesment of the health of freshwater fish. A review of selected literature. J. Fish Biol., 4: 593-604, 1972.

Brown, D. A. and McLeay, D. J.: Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin of juvenile rainbow trout. Prog. Fish-Cult., 37: 36-43, 1975.

Colt, J. and Tchobanoglous, G.: Evaluation of short-term toxicity of nitrogenous compounds in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture. 8: 209-224, 1976.

Cameron, J. N.: Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. Com. Biochem. & Physiol. A. Comp. Physiol., 40: 743-749, 1971.

Donaldson, E. M.: The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. Eds. Pickering, A. D. Stress and fish. Academic Press. pp 11-47, 1981.

Eddy, F. B., Kunzlink, P. A., and Bath, R. N.: Uptake and loss of nitrite from the blood of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, and Atlantic salmon, Salmo salar L, in fresh water. J. Fish Biol., 23: 105-116, 1983.

Gandhimathi, M., Ravi, T. K.. Abraham, A. and Thomas, R.: Simultaneous determination of aspirin and isosorbic 5-mononitrate in formulation by reversed phase high pressure liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., 32: 1145-1148, 2003.

Cardwell, R. D. and Smith, L. S.: Hematological manifestation of vibriosis upon juvenile chinook salmon. Prog. Fish-Cult., 33: 232-235, 1971.

Gilpin, R. K., Kasturi, P. and Gilpin, C. S.: Acidic drugs. Encyclopedia of analytical science. Vol. 6. Ed. by Townshend, A. Academic press. pp 3814-3815, 1995.

Gliman, A. G., Goodman, L. S. and Gliman, A.: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 6th ed., Macmillan, pp 682, 1980.

Cameron, J. N.: Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. Com. Biochem. &

Physiol. A. Comp. Physiol., 40: 743-749, 1971.

Hickey, C. R. Jr.: Fish hematology, its uses and significance. New York Fish and Game Journal. 24: 69-85, 1976.

Hirayama. K.: Watercontrol by filtration in closed clutre systems. Aquaculture. 4: 369-385, 1974.

Kawatsu, H., Nakanishi, Y., and Takeda, H.: Methemoglobin determination in eel blood. Nippon Suisan Gakkaishi. 53: 9-14, 1987.

Kees F., Jehnich D. and Grobecker H. : Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B., 677: 172-177, 1996.

Kim, C.-K. and Hwang, S.-J.: Simultaneous determination of salicylic acid and aspirin in commercial aspirin tablets. J. Kor. Pharm. Sci., 12: 126-131, 1982.

Klimes, J., Sochor, J. and Zahradnicek, M.: Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of salicylates in whole blood, plasma and isolated erythrocytes. J. Chromatogr., 584: 221-228, 1992.

Konikoff, M.: Toxicity nitrite to channel catfish. Prog. Fish-Cult., 37: 96-98, 1975.

Kubota, S. S., Amano, H., Ichioka, M., Miyazaki, T., and Niwa, M.: Methemoglobinemia in Japanese eel. 8: 149-161, 1981.

McCleay, D. J., Birtwell, I. K., Hartman, G. F., and Ennis, G. L.: Responses of arctic grayling(*Thymallus arciticus*) to acute and prolonged exposure to Yukon placer mining sediment. Can. J. Fish. & Aquat. Sci., 44: 658-673, 1987.

Mikami E., Goto T., Ohno T., Matsumoto H. and Nishida M.: Simultaneous analysis of dehydroactic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. J. Pharm. Biomed. Anal., 28: 261-267, 2002.

Perrrone, S. J. and Maeda, T. L.: Protective effect of chloride on nitrite toxicity to coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). J. Fish Res. Bd. Can., 34: 486-492, 1977.

Pirola, R., Bareggi, S. R. and Benedittis, G. D.: Determination of acetylsalicyclic acid and salicylic acid in skin and plasma by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B. 705: 309-315, 1998.

Russo, R. C., Smith, C. E., and Thurston, R. V.: Acute toxicity of nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res Bd. Can., 31: 1653-1655, 1974.

Schreck, C. B.: Stress and compensation in teleostean fishes: responses to social and physical factors. Eds. Pickering, A. D. Stress and fish. Academic Press. pp 295-321, 1981.

Smith, C. E. and Russo, R. C.: Nitrite-induced methemoglobinemia in rainbow trout. Prog. Fish-Cult., 37: 150-152, 1975.

Smith, C. E., and Williams, W. G.: Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. Trans. Am. Fish. Soc., 103: 89-90, 1974.

Soivio, A. and Oikari, A. : Hematological effects of stress on a teleost, *Exox lucius* L. J. Fish Biol., 8: 397-411. 1976.

Tebbett I.R., Omile, C.I., and Danesh, B. : Determination of paracetamol, salicylic acid and acetyl salicylic acid in serum by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr, 329, 196-198, 1985.

Tomasso, J. R., Simco, B. A. and Davis, K. B.: Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (Ictalurus punctatus). J. Fish. Res. Board. Can, 36: 1141-1144, 1979.

Wedemeyer, G. A. and Yasutake, W. T.: Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can., 35: 822-827. 1978.

Wedemeyer, G. A., Barton, B. A., and McLeay, D. J.: Stress and acclimation. Eds. Schreck and Moyle, P. B. Methods for fish biology. Am. Fish. Soc., pp 451-489, 1990.

Wedemeyer, G. A. Gould, R. W., and Yasutake, W. T.: Some potentials and limits of the leucocrit test as a fish health assessment method. J. Fish Biol., 23: 711-716, 1983.

Wells, R. M., Tetens, G. V., and Devries, A. L.: Recovery from stress following capture and anaesthesia of antarctic fish: hematology and blood chemistry. J. Fish Biol., 25: 567-576. 1984.

Westin, D. T.: Nitrate and nitrite toxicity to salmonid fishes. Prog. Fish-Cult., 36: 86-89, 1974.

Wise, D. J. and Tomasso, J. R.: Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. Prog. Fish-Cult., 50: 77-80, 1988.

松井 : 鰻學(生物學的硏究편). 恒星社 厚生閣. 東京. 215-224. 1972.

山形陽一, 丹羽誠: 亞窒酸のウナギに對する毒性について. 水産增殖, 27: 5-11, 1979

이진환, 최준식, 백채선, 범진필: 시판 아스피린 정제의 생체내 이용율. 약제학회지, 19: 131-136, 1989.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부지정 호남지역 Sea Grant 시범대학 사업단의 연구개발사업에 대한 2007년도 최종연구보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 "해양수산부지정 호남지역 Sea Grant 시범대학사업단에서 시행한 연구개발사업의 연구결과임"을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.